

Presencia del elemento genético transponible *dTdic1* en *Dianthus caryophyllus* con flores variegadas y no variegadas

Presence of the transposable genetic element *dTdic1* in *Dianthus caryophyllus* with variegated and no variegated flowers

Karen Rocío López Castro*, Liliana Franco-Lara**

Resumen

El objetivo de este trabajo era la búsqueda del EGT (Elemento Genético Transponible) *dTdic1* que ha sido asociado con la variegación del color de las flores de clavel y su relación con dos genes que codifican para enzimas involucradas en la biosíntesis de antocianinas, Chalcona isomerasa (*CHI*) y Dihidroflavonol reductasa (*DFR*). Su presencia y expresión se evaluó en siete genotipos con flores variegadas (líneas híbridas) y en cuatro genotipos de flores no variegadas (una línea híbrida y tres cultivares comerciales). Un alto número (indefinido) de copias del elemento *dTdic1* se detectó en todas las líneas variegadas y no variegadas. En consecuencia, la sola presencia de este EGT no pudo asociarse directamente con la variegación de los pigmentos florales de flores de clavel. Adicionalmente, *dTdic1* se encontró interrumpiendo el gen *CHI* en cuatro genotipos variegados y uno no variegado. No se observó evidencia de inserción de *dTdic1* en el gen *DFR* en ninguno de los genotipos.

Palabras clave: transposones, chalcona isomerasa, antocianinas

Abstract

The objective of this work was to search for the EGT (Transposable Genetic Element) *dTdic1* that has been associated with color variegation of carnation flowers and its relationship with two genes that code for enzymes involved in the synthesis of anthocyanins, Chalcone isomerase (*CHI*) and Dihydroflavonol reductase (*DFR*). Its presence and expression was evaluated in seven genotypes of variegated flowers and four no variegated flower genotypes (one hybrid line and three commercial cultivars). A high number of copies (undefined) of copies of the *dTdic1* element was detected in variegated and no variegated lines. Therefore, the main presence of this EGT was not associated directly with variegation of floral pigments. Additionally, *dTdic1* was found interrupting the *CHI* gene in four variegated and one no variegated phenotypes. No evidence was observed of insertion of *dTdic1* in the *DFR* gene in any of the genotypes.

Key words: transposons, chalcone isomerase, anthocyanins

Recibido: junio 28 de 2012

Aprobado: noviembre 21 de 2012

* MSc, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada, karen.lopez@unimilitar.edu.co

** MSc., PhD, Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad Militar Nueva Granada, liliana.franco@unimilitar.edu.co

Introducción

El clavel *Dianthus caryophyllus* (Cariophyllaceae) es un importante componente de la floricultura nacional e internacional (Asocolflores, 2009). Debido a su importancia comercial, se hacen esfuerzos permanentes de mejoramiento que incluyen, entre otros, la producción de nuevas coloraciones florales (Holley y Baker, 1991). El descubrimiento de EGTs (Elementos Genéticos Transponibles) presentes en genes de regulación o biosíntesis de antocianinas ha despertado gran interés por su potencial uso biotecnológico en la generación de nuevos genotipos florales (Liu *et al.*, 2001; To y Wang, 2006). El efecto de EGTs en la coloración de las flores ha sido estudiado en varias especies como *Nicotiana tabacum* (Liu *et al.*, 2001), *Ipomea* sp. (Lida *et al.*, 2004) y *Petunia* sp (Van Houwelingen *et al.*, 1998). Los EGTs se emplean en técnicas biotecnológicas de mejoramiento como mutagénesis insercional y “transposon tagging” (Chuck *et al.*, 1993; Babiychuk *et al.*, 1997). Recientemente, el elemento *dTdic1* fue usado como herramienta de mejoramiento vegetal a través de la técnica de “Tagging” (Patent Abstracts of Japan, 2007).

Los elementos genéticos transponibles (EGTs) descubiertos en plantas de maíz por Barbara McClintock en 1951, son fragmentos de DNA que pueden insertarse en nuevos lugares cromosomales y generalmente hacen copias de sí mismos en el proceso (Feschotte *et al.*, 2002). Los EGTs se clasifican de dos formas, de acuerdo al grado de autosuficiencia (autónomos y no autónomos) y según el mecanismo de transposición (Clase I y Clase II) (Galun, 2003). Los elementos de la clase II o elementos de DNA, se subdividen en familias que incluyen la superfamilia hAT en donde se encuentra el elemento *dTdic1* (superfamilia *Ac/Ds*, grupo II) (Itoh *et al.*, 2002), el *Activator* (*Ac*) en maíz y *Tam3* en Boca de Dragón (Itoh *et al.*, 2002; Galun, 2003; Huang *et al.*, 2009).

En un estudio reciente en clavel cultivar “Rhapsody”, se observó variegación del color de los pétalos caracterizada por flecos rojos de patrón azaroso sobre un fondo blanco, la cual se cree que es causada por una reversión de la actividad del gen *DFR* (Dihydroflavonol reductasa) tras la escisión del EGT *dTdic1* (Itoh *et al.*, 2002). De igual forma en flores de clavel amarillas con flecos y sectores blancos, los genes *CHI* (Chalcona isomerasa) y *DFR* también presentaron actividad de *dTdic1* asociada con patrones de variegación en los pétalos (Itoh *et al.*, 2002, Yoshida *et al.*, 2004).

Los principales pigmentos involucrados en la coloración floral son los carotenoides, flavonoides y betalainas, aunque otros pigmentos como clorofilas, fenilfenalenonas y quinochalconas también intervienen en la coloración de los pétalos (Davies, 2009). Las antocianinas son la base para casi todas las flores rosadas, rojas, anaranjadas, escarlatas, púrpuras y azules (Davies, 2009) y en el clavel son las responsables de los colores rojos (Itoh *et al.*, 2002). En el clavel, las chalconas están asociadas con el color amarillo de las flores debido a que en flores de clavel con pétalos amarillos se ha identificado el glucósido 2'-O de chalcona como el principal flavonoide, pigmento también conocido como isosalipurpósido (narigenin-chalcon-2'-glucosido) (Itoh *et al.*, 2002, Yoshida *et al.*, 2004, Ogata *et al.*, 2004). Para que esta chalcona se acumule, las plantas deben ser deficientes en la actividad de la enzima chalcona isomerasa (Gatt *et al.*, 1998).

El grupo de investigación en fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada, ha venido desarrollando un programa de mejoramiento genético de clavel en búsqueda de materiales tolerantes al ataque de *Fusarium oxysporum*. En el proceso de mejoramiento, se han generado materiales que se caracterizan por presentar patrones de variegación inestable en sus pétalos (Fernández y Filgueira, 2006). El objetivo de este trabajo fue la búsqueda del EGT *dTic1* dentro de los genes *CHI* y *DFR* de la ruta de biosíntesis de antocianinas, en seis líneas híbridas de clavel con flores variegadas y una línea no variegada provenientes de este programa de mejoramiento y tres cultivares comerciales, con el fin de caracterizar este fenómeno y determinar si la variegación se asocia con la presencia de este EGT. Este trabajo partió de la hipótesis que las líneas variegadas poseían el EGT *dTic1* activo, mientras que las no variegadas carecían de este.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron plantas de clavel con flores no variegadas y con flores variegadas. En la figura 1 se presenta un ejemplo de una flor con variegación. Las líneas con flores variegadas eran híbridos producidos por cruces entre plantas comerciales y silvestres que provenían del programa de mejoramiento del grupo de fitopatología molecular de la Universidad Militar Nueva Granada. Estas presentaban manchas, puntos y estrías, de formas y tamaños azarosos, de color diferente al color base. Las líneas UM225, UM226 y

VRB presentaban flores con puntos, manchas y estrías blancas sobre fondos rojos, UM290 y UM302 puntos, manchas y estrías rojas sobre fondos rojos o rosados y CRS mostraba estrías rosadas sobre un color base naranja. Los cultivares comerciales con flores no variegadas eran de color blanco en el caso de Kaly y Bagatel, blanco verdoso para Lady Green y flores de color rojo para la línea híbrida “comercial XXX”.

Detección de *dTdic1* por PCR y clonación de los productos de PCR

El ADN de hojas de clavel fue extraído por un método químico estándar. Brevemente, 1g de material foliar se maceró con nitrógeno líquido, se incubó por 30 minutos a 65 °C en 8 ml de buffer de extracción (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM EDTA disódico pH 8.0,

1.4 M NaCl, 1% PVP-40, 2% 2-mercaptoetanol). Después se hizo una extracción con 8 ml de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 después se centrifugó a 5.660 x g durante 10 min para recuperar el sobrenadante. Se adicionaron 0.8 ml de buffer de extracción secundario (0.8 ml de CTAB 10%, NaCl 0.7 M) en el que se incubó a 65 °C por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se adicionó isopropanol (2/3 volumen) y se almacenó a 4 °C. Al día siguiente se centrifugó a 5.660 x g durante 10 min y el pellet de ADN se resuspendió en 2 ml de TE 1 M NaCl (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Por último, se precipitó el ADN mediante adición de 5 ml de etanol, seguido por lavado con 1ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 12000 x g para retirar el exceso de etanol y el pellet se resuspendió en 0.3 ml de TE. El ADN se almacenó a - 20 °C tras adicionar RNAsa 100ug/ml. Los ensayos de PCR se dirigieron a la búsqueda



Figura 1. Ejemplo de variegación en la pigmentación de los pétalos de clavel. Se caracteriza por presentar manchas y flecos de forma, tamaño y frecuencia azarosa, sobre una base homogénea de color diferente.

Tabla 1. Cebadores para la amplificación de *dTdic1* (Itoh *et al.*, 2002)

Cebador	Secuencia 5'-3'	Dirección	Tm °C
dTdic1-2	CAGGGGTTTTAAATATCGGTATCG	Forward	56
CHI-2	AGGAGCTAACTCAAGGAGACCACTT	Reverse	56
CHI-1	GTGAATTAGTTTAAGAGTTTACGAACTTCTCAACACGTTA	Forward	59
CHI-2	AGGAGCTAACTCAAGGAGACCACTT	Reverse	59
dTdic1-1	CCGTCCGCCAGGGTTCAAATCTCGGCCGAGTTGACTCGT	Forward	65
DFR-1	GCTGCGTACTCCACGCTGCTTGCT	Reverse	65

queda del EGT *dTdic1* usando cebadores previamente reportados por Itoh y colaboradores (2002) (tabla 1). Adicionalmente en este trabajo se diseñaron tres pares de cebadores para la amplificación de *dTdic1* (tabla 2) usando como referencia la secuencia previamente publicada (AF250367).

Los cebadores dTdic1-F1, dTdic1-F2, dTdic1-R1, dTdic1-R2 y dTdic1-R3, fueron diseñados para la amplificación de *dTdic1* sin importar su lugar de inserción en el genoma, mientras que dTdic1-2 y CHI-2 permitieron la amplificación de *dTdic1* cuando se encontraba dentro del gen *CHI* (chalcona isomerasa). Los cebadores dTdic1-1 y DFR-1 permitieron la amplificación de *dTdic1* cuando se encontraba interrumpiendo el gen *DFR* (dihidroflavonol reductasa) (figura 2).

Las concentraciones finales de los reactivos para PCR fueron: 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μM de cada cebador, 1X Buffer, 1,5-2,5 mM de MgCl₂, 0,75 U de *Taq* Polimerasa (Promega, Madison, WI) y 40 ng de DNA para reacciones de 15 μl. Las reacciones se llevaron a cabo según el siguiente perfil térmico: ciclo de denaturación inicial de 95 °C, 7 min y 35 ciclos de 1 min a 90 °C, 1 min a 54-65 °C, 1,5 min a 72 °C y un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa estándar, teñido con bromuro de etidio.

Los productos de PCR se clonaron mediante el kit TOPO TA Cloning® Kit PCR® 2.1-TOPO® Vector (Invitrogen®), según instrucciones del fabricante. La transformación bacteriana se realizó por electroporación en células DH5α electrocompetentes (Sambrook y Russell, 2001). Células DH5α se cultivaron en 500ml

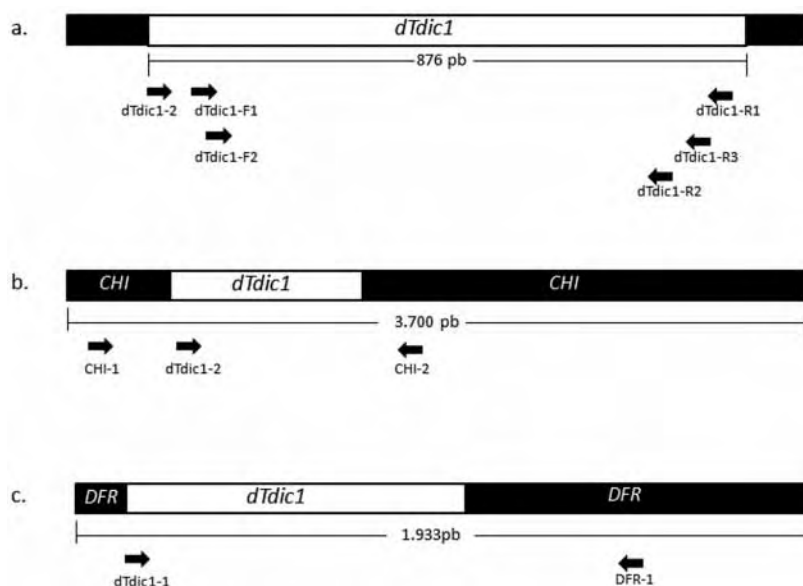


Figura 2. Diagramas de las regiones amplificadas por PCR en las líneas de clavel estudiadas. **a)** Cebadores utilizados para la amplificación de *dTdic1*, **b)** Cebadores utilizados para la amplificación de *dTdic1* interrumpiendo el gen *CHI* y **c)** cebadores utilizados para la amplificación de *dTdic1* interrumpiendo el gen *DFR*.

Tabla 2. Cebadores diseñados en este trabajo para la amplificación de *dTdic1*

Primer	Secuencia 5'-3'	Dirección	Tm °C
dTdic1-F1	ACGGTATCGGCCCTGA	Forward	55,8
dTdic1-F2	CCTGAATCGCTTGCTCGGACTAT	Forward	58,3
dTdic1-R1	GACGAGATAGGGCGAGA	Reverse	53
dTdic1-R2	GCCGAGTTGACTCGGAA	Reverse	54,7
dTdic1-R3	TAGGGCGAGATTCACGGACCTTT	Reverse	60,1

de caldo LB (Luria Broth) a 37 °C hasta obtener una OD de 0,35. Las células se recuperaron por centrifugación a 1.000 x g durante 15 min a 4 °C y el pellet se resuspendió en 250 ml de agua MilliQ hasta concentrar la masa celular en 10 ml de solución de glicerol (10% v/v). Las células se resuspendieron en caldo GYT frío (Glicerol 10% v/v, extracto de levadura 0,125% p/v y triptona 0,25% p/v) a una concentración de 3×10^{10} células/ml. Para la transformación se usaron 40 µl de suspensión de células electrocompetentes y 10-25 ng del plásmido ligado, los cuales se sometieron a un pulso eléctrico de 2.500 V. Las células electroporadas se incubaron en 1 ml de caldo SOC (Triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 0,05% p/v, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM y glucosa 20 mM) 1 hora a 37 °C y posteriormente 10 y 100 ml se sembraron en agar SOB (Triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 0,05% p/v, MgSO₄ 10 mM y KCl 2,5 mM) con X-gal 0.1 M, IPTG 20 mg/ml y ampicilina 0,1 mg/ml. Las colonias transformantes blancas fueron analizadas por PCR y enviadas a secuenciar.

Estimación de la abundancia de *dTdic1* en el genoma de clavel

Se fabricó una sonda complementaria a un fragmento de 757 pb de *dTdic1* utilizando el Kit Dig High Prime Labeling and Detection Starter Kit II de ROCHE® (Mannheim, Germany), según instrucciones del fabricante. Con el fin de detectar el elemento *dTdic1* en el DNA genómico de clavel, se realizó Southern blot utilizando el Kit Dig High Prime Labeling and Detection Starter Kit II de ROCHE®, siguiendo el protocolo descrito en DIG Application Manual for Filter Hybridization de ROCHE®. Para cada línea de clavel diferentes cantidades de ADN precalentado (10, 7, 5 y 2 µg) se digirieron durante 12 h con una de estas enzimas de restricción *BamHI*, *BglII*, *EcoRI* o *HindIII*. Las reacciones (200 µl) contenían 5 U de enzima por µg de DNA, 1 mg/ml de BSA, 1 mM de espermidina y 1X del buffer de la enzima. El DNA digerido se separó por electroforesis en geles de agarosa en concentraciones que variaron entre 0,7 - 1,5 % p/v. El DNA separado se transfirió por capilaridad, previa depurinación, denaturación y neutralización, a una membrana de nylon. La temperatura de hibridación se calculó según sugerencia del fabricante ($T_{\text{hyb}} = T_m - 22,5$), considerando el contenido GC de la sonda (37,33%) y del DNA blanco (40%). Las membranas se hibridaron con la sonda *dTdic1* (25 ng/ml de solución de hibridación) durante 12- 16 horas a 42 °C (también se evaluaron otras temperaturas de hibridación a 37 y 48 °C). Posterior a la hibridación se realizaron dos lavados (5 min, 2x SSC y 0,1% SDS a 25 °C) seguido por dos lavados (0,5x SSC

y 0,1% SDS durante 15 min a 65 °C). Las membranas se lavaron a temperatura ambiente con buffer de lavado (ácido maléico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5, Tween 20 0,3% v/v), y se incubaron en solución de bloqueo durante 30 min. Se adicionó solución de anticuerpo Anti-digoxigenina-Fosfatasa alcalina 1:10.000 en solución de bloqueo durante 30 min tras los cual las membranas se lavaron para eliminar el exceso de sonda. Posteriormente se adicionó el sustrato quimioluminiscente (CSPD-ROCHE®) sobre la membrana y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Para visualizar la quimioluminiscencia las membranas se expusieron a películas de alta sensibilidad Kodak® durante tiempos variables de entre 5 minutos y 24 horas. Las películas se revelaron con el Kit Developer and Replenisher y Fixer and Replenisher de Kodak®.

Estudio de la expresión de *dTdic1*

Con el fin de detectar transcritos de *dTdic1*, se extrajo RNA total a partir de pétalos de flores variegadas y no variegadas de clavel en estado 2 (estrella) utilizando TRIzol® Reagent de Invitrogen®, según recomendaciones del fabricante. A partir del RNA total se extrajo mRNA con el Fast Track® MAG mRNA Isolation Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron almacenadas en agua libre de RNAsas a -70 °C hasta su utilización en Northern y Dot blot. Extractos de RNA total (3-6 µg) y mRNA (0,13-0,46 µg) provenientes de las líneas de clavel variegadas y no variegadas fueron analizados por dot blot con el fin de detectar transcritos del elemento *dTdic1* que permitirían confirmar la transcripción del elemento. La misma sonda que se empleó para Southern blot se utilizó para los ensayos de Dot blot, siguiendo el mismo protocolo descrito para este excepto que las membranas fueron hibridadas con la sonda *dTdic1* durante 16 horas y la temperatura de hibridación fue de 50 °C. El lavado de alta astringencia se realizó a 50 °C según las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se realizó la detección y autorradiografía de las membranas como se mencionó anteriormente. Todas las soluciones fueron tratadas con DEPC (Dietilpirocarbonato) y la vidriera tratada con calor en un horno a 80 °C durante 12 h con el fin de inhibir la acción de RNAsas.

Resultados

Los resultados de PCR con cebadores *dTdic1F1/dTdic1R1* tanto en claveles con pétalos variegados (UM225, UM226, UM290, UM302, CRS y VRB) como no variegados (XXX, Bagatel, Kaly y Lady Green), produjeron dos amplicones, uno de 757 pb correspondiente al tamaño esperado para del EGT *dTdic1* (figura

3) y otro un poco más pequeño, sugiriendo la presencia de al menos otra copia de *dTdic1* un poco más corta en estos materiales.

Para determinar si *dTdic1* se encontraba dentro de los genes *CHI* y *DFR*, que hacen parte de la ruta de biosíntesis de antocianinas, se evaluaron los pares de cebadores CHI-1/CHI-2, *dTdic1*-2/CHI-2 y *dTdic1*-1/DFR-1 respectivamente (figura 2). Se encontró que usando los cebadores *dTdic1*-2/CHI2 que generaban una banda del tamaño esperado de 1250 pb, *dTdic1* se encontraba dentro del gen *CHI* en Bagatel (un cultivar de color blanco sin variegación) y en claveles con flores variegadas UM225, UM226, UM290 y VRB pero no se encontró en muestras de clavel variegado UM302 y CRS, ni en las no variegadas Kaly, XXX y Lady Green (figura 4). Cuando se emplearon los cebadores CHI1/CHI2, se obtuvieron amplicones de 950 pb, los cuales se esperan cuando *dTdic1* esta ausente del gen *CHI*. Utilizando estos cebadores la línea UM225 amplificó en pruebas posteriores (resultado no mostrado) así como los extractos de las líneas UM226, UM290, UM302, VRB, XXX, Lady Green, Bagatel, y no amplificaron Kaly y CRS (figura 5), sugiriendo la inserción de

algún tipo de elemento dentro del gen *CHI*. Ninguno de los ensayos de PCR realizados permitió amplificar el elemento *dTdic1* dentro del gen *DFR*.

Las secuencias de *dTdic1* obtenidas a partir de cuatro clones mostraron identidades del 92-95% con respecto a la secuencia del gen *CHI* (Gen FI1) de *Dianthus caryophyllus*, alelo FI1-m, interrumpido por el elemento transponible *dTdic1*" (número de accesión AF250367 del GenBank) descrita por Larsen y Brigs en 2000 (Itoh *et al.*, 2002). La figura 6 muestra los alineamientos de las secuencias "Bagatel CHI" y "VRB CHI". Se observan algunas diferencias puntuales y "gaps" con respecto a la secuencia previamente reportada (figura 6). Las secuencias de *dTdic1* obtenidas a partir de los clones obtenidos con cebadores *dTdic1*F1/*dTdic1*R1 permitieron identificar las regiones repetitivas que se generan tras un evento de transposición y los ITRs (secuencias repetidas invertidas) de 12 nucleótidos (figura 7) característicos de la familia de EGTs hAT (van den Broeck *et al.*, 1998).

Los ensayos de Southern blot realizados en este trabajo, usando una sonda construida contra *dTdic1*,

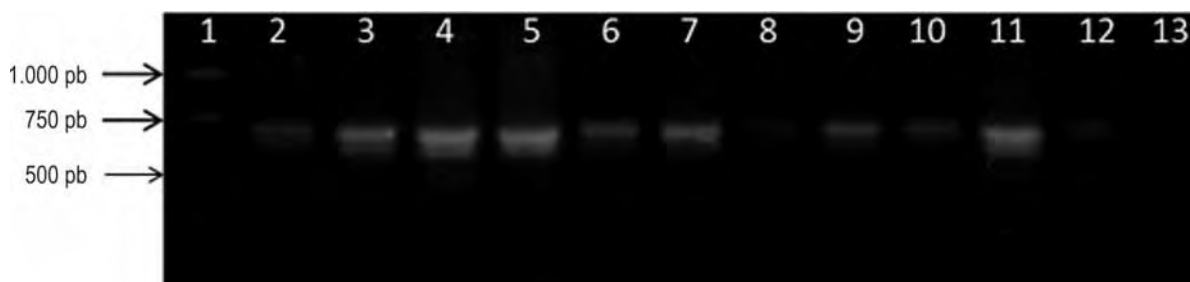


Figura 3. Amplificación de *dTdic* en claveles con pétalos variegados y no variegados. Carril 1, 1Kb DNA Ladder (Promega); Carril 2, Kaly; Carril 3, XXX; Carril 4, Bagatel; Carril 5, Lady Green; Carril 6, UM225; Carril 7, UM226; Carril 8, UM227; Carril 9, UM290; Carril 10, UM302; Carril 11, VRB; Carril 12, CRS y Carril 13, control negativo (ADN de apio).

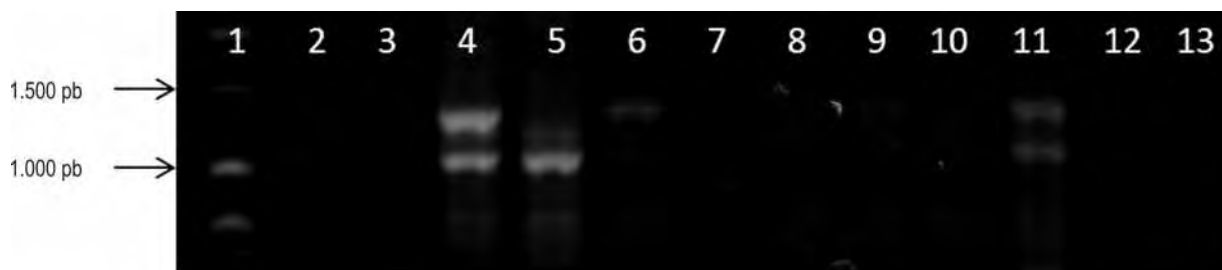


Figura 4. Amplificación del gen *CHI* interrumpido por *dTdic1* en claveles con pétalos variegados y no variegados. Carril 1, 1Kb DNA Ladder (Promega); Carril 2, Kaly; Carril 3, XXX; Carril 4, Bagatel; Carril 5, Lady Green; Carril 6, UM225; Carril 7, UM226; Carril 8, UM227; Carril 9, UM290; Carril 10, UM302; Carril 11, VRB; Carril 12, CRS y Carril 13, control negativo (ADN de apio). Las flechas indican bandas muy tenues no visibles en la fotografía.

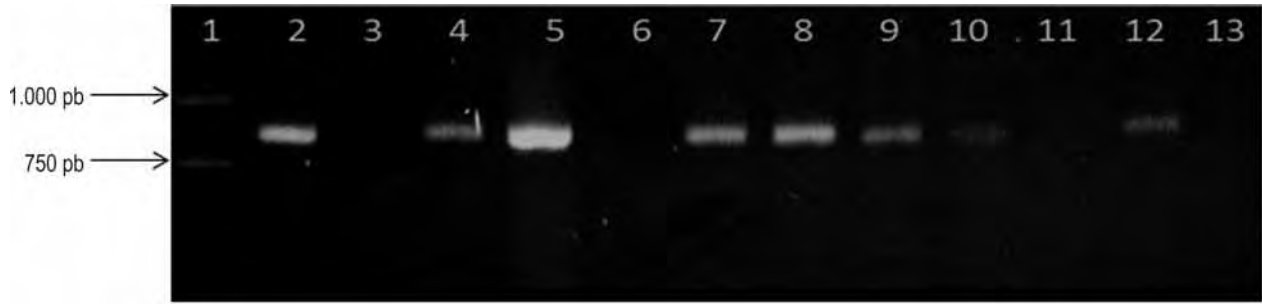


Figura 5. Amplificación del gen *CHI* sin interrupción de *dTdic1*. Carril 1, 1Kb DNA Ladder (Promega); Carril 2, XXX; Carril 3, Kaly; Carril 4, Lady Green; Carril 5, Bagatel; Carril 6, UM225; Carril 7, UM226; Carril 8, UM290; Carril 9, UM302; Carril 10, UM304; Carril 11, CRS; Carril 12, VRB; Carril 13, control negativo (ADN de apio).

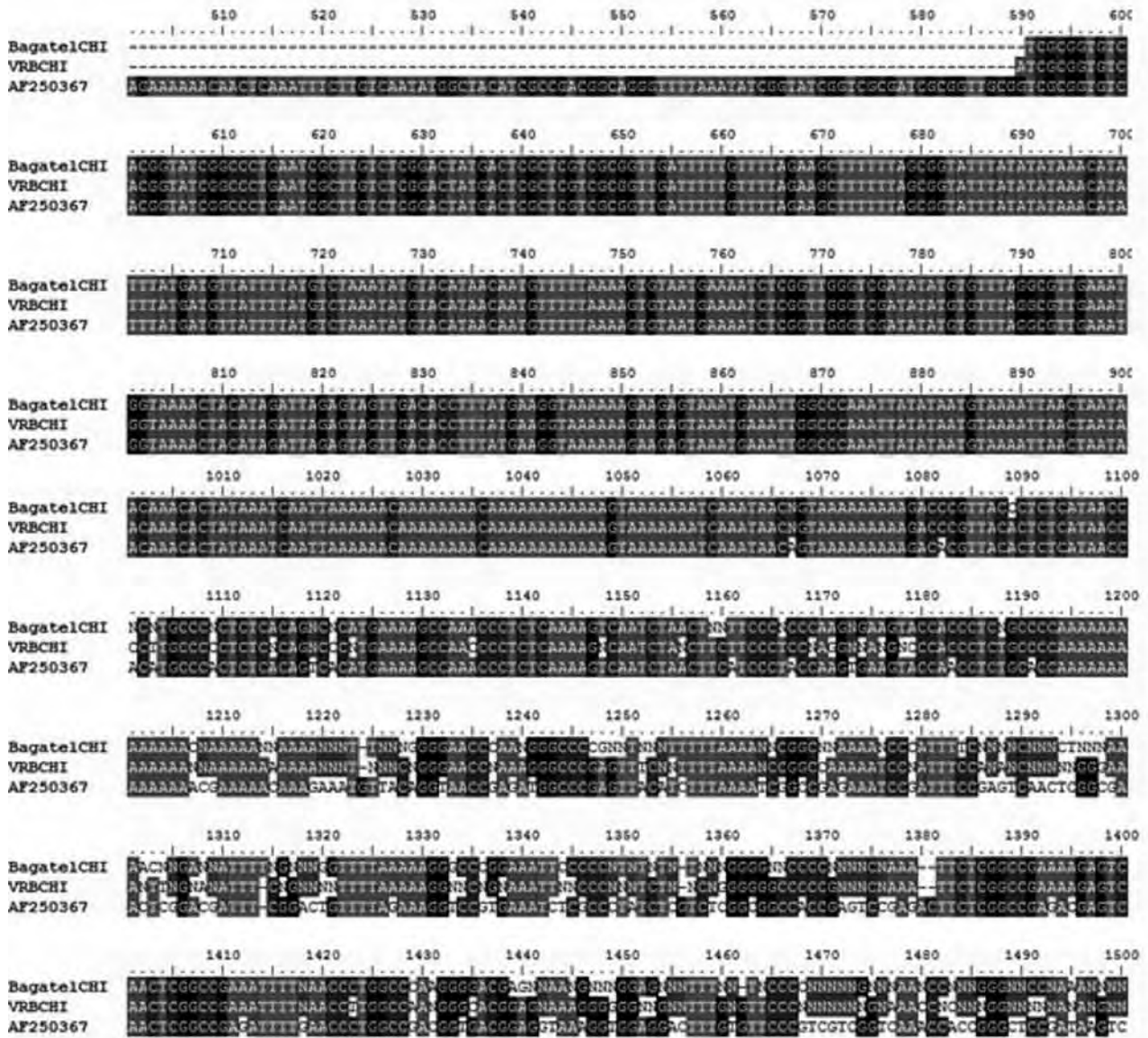


Figura 6. Alineamiento de secuencias de *dTdic1* insertado en el gen *CHI* obtenidos en este trabajo (“Bagatel CHI” y “VRB CHI”) y la secuencia *dTdic1* (AF250367) reportada en GeneBank.

mostraron que la sonda hibridaba sobre el ADN de las muestras, pero no se observaron bandas bien definidas, a pesar de que se evaluaron varias enzimas de restricción, temperaturas de hibridación y diferentes concentraciones de ADN (figura 8). A partir de este resultado se concluyó la presencia de múltiples copias de *dTdic1* en diferentes líneas de clavel. La figura 8 muestra la hibridación de la sonda en todas las muestras de clavel, pero no en el control negativo que era ADN de apio.

Inicialmente para evaluar la posible expresión de *dTdic1* en plantas con flores variegadas y no variegadas, se hicieron ensayos de Northern blot usando la misma sonda con la que se había detectado este EGT por Southern blot. Para estos ensayos, se hicieron extractos de RNA total, a partir de los cuales posteriormente se extrajo el mRNA usando un kit que emplea perlas conjugadas con cadenas de poliT. A pesar de que se hicieron varios ensayos cambiando las condiciones de hibridación y la cantidad de RNA, no se obtuvieron señales de hibridación. Entonces, se hicieron ensayos de dot blot de RNA total, empleando la misma sonda

que se había empleado anteriormente y se detectaron transcritos de *dTdic1* (figura 9) en las muestras de RNA total tanto de los claveles con flores variegadas (UM225, UM226, UM302 y UM304) como en no variegados (XXX, Candy, Kaly y Lady Green). Sin embargo, la sonda no hibridó sobre el mRNA de muestra o la señal estaba por debajo del nivel de detección de la prueba.

Discusión

La tabla 3 resume los resultados de PCR con los cebadores CHI-1/CHI-2, *dTdic1*-2/CHI-2 y *dTdic1*-1/DFR-1 y los resultados de expresión por dot blot usando una sonda complementaria a *dTdic1*. El EGT se detectó por PCR con los cebadores *dTdic1*F1/*dTdic1*R1 en los extractos de todas las líneas de clavel estudiadas, lo cual fue confirmado en las pruebas de Southern blot y dot blot. Con lo anterior se puede afirmar que la sola presencia de *dTdic1* en los claveles estudiados no se puede asociar con el fenómeno de variegación, pues este EGT está presente y se encuentra activo tanto en

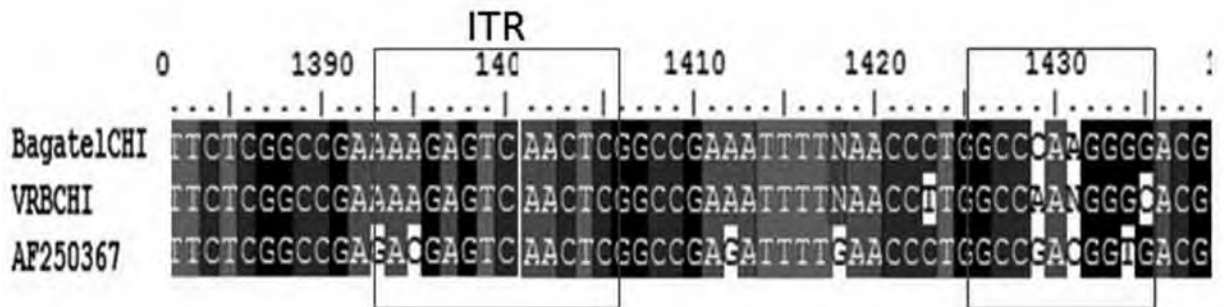


Figura 7. Alineamiento de secuencias de *dTdic1* insertado en el gen CHI en las líneas Bagatel (no variegado) y VRB (variegado) y la secuencia *dTdic1* (*dTdic1* AF250367). El recuadro azul muestra la región ITR (Repeticiones terminales invertidas) de *dTdic1* y el recuadro rojo muestra la región repetitiva del huésped.

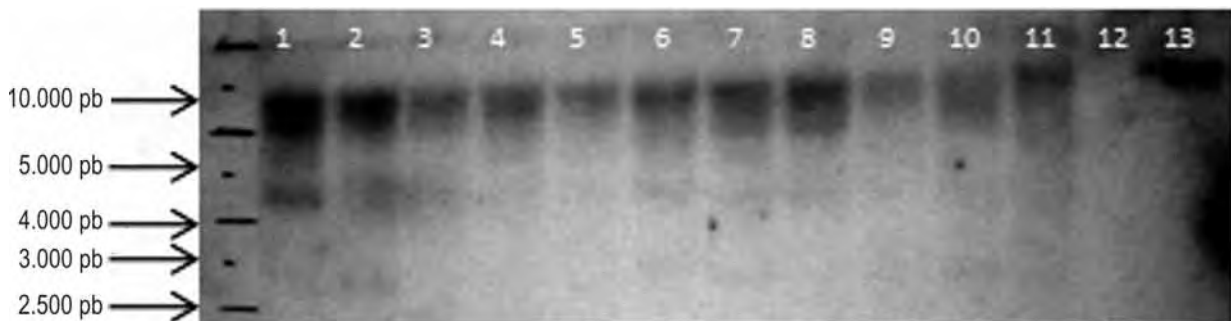


Figura 8. Southern blot de DNA total de clavel utilizando la sonda de DNA que hibrida con un fragmento de *dTdic1*. Carril 1, XXX; Carril 2, Kaly; Carril 3, Lady Green; Carril 4, Bagatel; Carril 5, UM225; Carril 6, UM226; Carril 7, UM290; Carril 8, UM302; Carril 9, UM304; Carril 10, CRS; Carril 11, VRB; Carril 12, control negativo apio y Carril 13, ADN de clavel sin digerir.

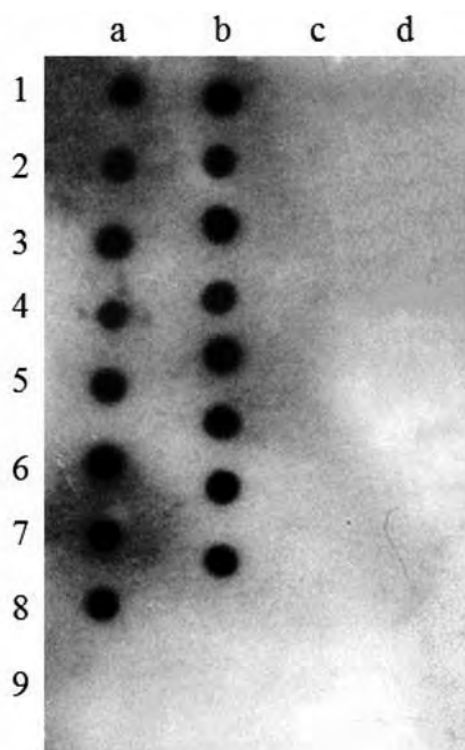


Figura 9. Dot blot de RNA total (carriles a y b) y mRNA (carriles c y d) utilizando la sonda complementaria a *dTdic1*. Carril 1, XXX; Carril 2, Candy; Carril 3, Kaly; Carril 4, Lady Green; Carril 5, UM225; Carril 6, UM226; Carril 7, UM302; Carril 8, UM304; Carril 9; Control negativo.

líneas que tienen o no variegación. Una de las causas posibles de la variegación en pétalos es la transposición de un EGT insertado en algún gen de la ruta metabólica de la biosíntesis de pigmentos. Cuando el EGT está insertado interrumpe la secuencia del gen haciéndolo inactivo. Pero cuando el EGT se transpone, deja tras de sí el gen más o menos intacto que puede o no ser funcional nuevamente, permitiendo la síntesis del pigmento. Las células descendientes de la célula en la que ocurre la transposición, serán pigmentadas (Liu *et al.*, 2001; Lida *et al.*, 2004). Sin embargo es importante tener en cuenta que la pigmentación de los pétalos de los claveles es un proceso complejo donde intervienen diversas capas celulares (Itoh *et al.*, 2002) en las que se pueden transponer o no los EGTs) dando lugar a los puntos, estrías y sectores cianicos y blancos que se observan en estos claveles. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan información sobre el EGT *dTdic1*, el cual se encontró interrumpiendo el gen *CHI* de la ruta de biosíntesis de antocianinas en claveles híbridos como UM225, UM226, UM290 y VRB y en comerciales como Bagatel (figura 4). La presencia del gen *CHI* sin interrupciones se observó en Bagatel, Lady Green, Comercial XXX, UM225, UM226, UM 290, UM302 y VBR, pero no fue detectado en Kaly y CRS. Los resultados sugieren que algunas líneas tienen dos o más copias del gen *CHI*, una de las cuales puede contener a *dTdic1* y la otra no, como sería el caso de Bagatel, UM225, UM226, UM290 y VRB (tabla 3).

Tabla 3. Relación entre diferentes fenotipos de flores de clavel y la presencia de *dTdic1* en los genes *CHI* y *DFR*.

Fenotipo	Clavel	Presencia de <i>dTdic1</i>	Gen <i>CHI</i> con <i>dTdic1</i>	Gen <i>CHI</i> sin <i>dTdic1</i>	Gen <i>DFR</i> con <i>dTdic1</i>	Transcritos de <i>dTdic1</i>
Color entero	Bagatel	Si	Si	Si	No	Si
Color entero	Kaly	Si	No	No	No	Si
Color entero	Lady Green	Si	No	Si	No	Si
Color entero	Comercial XXX	Si	No	Si	No	Si
Variegado	UM225	Si	Si	Si	No	Si
Variegado	UM226	Si	Si	Si	No	Si
Variegado	UM290	Si	Si	Si	No	Si
Variegado	UM302	Si	No	Si	No	Si
Variegado	VRB	Si	Si	Si	No	Si
Variegado	CRS	Si	No	No	No	Si

La presencia de *dTdic1* se había reportado interrumpiendo el gen *CHI* en claveles amarillos variegados (Itoh *et al.*, 2002) pero en este trabajo se presenta evidencia de la presencia del gen *CHI* interrumpido por *dTdic1* en claveles ciánicos variegados que presentan flecos y puntos rojos sobre un fondo blanco (UM225, UM226), flecos y puntos rojos oscuros sobre un fondo rojo (UM290) y flecos y puntos rosados sobre un fondo blanco (VRB). En el mismo estudio realizado por Itoh y colaboradores en 2002, la variegación del cultivar "Rhapsody" (flecos rojos sobre un fondo blanco) se asoció con la interrupción del gen *DFR* con *dTdic1*, pero en este trabajo no se encontró evidencia de inserción de *dTdic1* en este gen, en ninguno de los materiales estudiados. Contrario a lo esperado, los resultados de PCR y secuenciación de los amplicones y de los clones, revelaron la presencia de *dTdic1* en todos los claveles analizados tanto en los variegados como en los no variegados (figura 3). Esta observación es importante pues en la literatura solo hay un reporte de *dTdic1* y este se asocia únicamente con fenotipos variegados de clavel (Itoh *et al.*, 2002), pero no con plantas con flores de color homogéneo.

Se obtuvieron secuencias del EGT *dTdic1* provenientes de cuatro clones obtenidos por clonación del amplificador de los cebadores *dTdic1F1/dTdic1R1* las cuales mostraron identidades del 92-95% con respecto a la secuencia del gen *CHI* (Gen F11) de *Dianthus caryophyllus*, alelo F11-m, interrumpido por el elemento transponible *dTdic1* (número de accesión AF250367 del GenBank) descrita por Larsen y Brigs (2000) según (Itoh *et al.*, 2002) (figura 6). Estas secuencias permitieron identificar las regiones repetitivas que se generaron tras un evento de transposición y los ITRs (secuencias repetidas invertidas) de 12 nucleótidos (figura 7) características de los la familia hAT, a la cual pertenece el *dTdic1* y los elementos *Ac/Ds* de maíz y *dTph1* de petunia (van den Broeck *et al.*, 1998).

No se encontró información en la literatura acerca de la abundancia de *dTdic1* en el genoma de clavel. Sin embargo, en otros estudios acerca de EGTs de la misma familia, como *dTph1*, se han reportado desde 10 hasta 207 copias en diferentes líneas de petunia (De Keukeleire *et al.*, 2001). Es posible que la abundancia de *dTdic1* en los claveles estudiados sea similar al del elemento de petunia *dTph1*, razón por la cual técnica de Southern Blot no permitió la estimación de su abundancia (De Keukeleire *et al.*, 2001). Van den Broeck y colaboradores (1998) mencionaron el bajo número de estudios donde se estima la abundancia relativa de elementos genéticos transponibles a nivel de genoma debido a la ausencia de una técnica alternativa al Southern blot. Por esta razón se ha desarrollado otra

metodología alternativa para la estimación del número de copias de EGTs denominada "Transposon Display" (Van den Broeck *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 2006).

La expresión de *dTdic1* pudo ser confirmada en todos los claveles estudiados a nivel de RNA total, sin embargo no pudo ser detectada a partir de mRNA extraído. Usando una sonda que hibrida un fragmento de *dTdic1*, se detectaron en dot blot de RNA total RNAs complementarios en todos los casos, lo que sugiere la transcripción del EGT. Es posible que los transcritos carezcan de colas de poliA, porque estos no pudieron ser detectados en extractos de mRNA obtenidos mediante columnas de afinidad de poliT. Previamente Itoh y colaboradores (2001) habían realizado un análisis similar buscando los transcritos de mRNA del gen *CHI* que contenían el inserto de *dTdic1*, pero estos transcritos no pudieron ser detectados o estuvieron por debajo del nivel de detección. Según los autores, es probable que el elemento *dTdic1* estuviera insertado en orientación reversa, limitando la transcripción del elemento.

Conclusiones

El EGT *dTdic1* se detectó en los extractos de ADN de todos los claveles estudiados, tanto variegados como no variegados. *dTdic1* se encontró interrumpiendo el gen *CHI* en la variedad comercial Bagatel y en cuatro líneas variegadas UM225, UM226, UM290 y VRB. En las líneas restantes no se pudo determinar la posición de este EGT. La presencia y actividad de *dTdic1* fue confirmada mediante PCR, Southern blot y dot blot de extractos de RNA total, y se encontró que la presencia de *dTdic1* en los claveles estudiados no se asoció con la variegación. Las secuencias de *dTdic1* presentaron identidades del 92-95% con respecto a la secuencia del gen *CHI* (Gen F11) de *Dianthus caryophyllus*, alelo alelo F11-m, interrumpido por el elemento transponible *dTdic1* (número de accesión AF250367 del GenBank). En las secuencias obtenidas se identificaron las regiones repetitivas que se asocian a eventos de transposición y los ITRs (secuencias repetidas invertidas) de 12 nucleótidos característicos de los elementos genéticos transponibles de la familia hAT, a la cual pertenece el *dTdic1*. En los extractos de RNA total de todos los materiales estudiados, se evidenció la expresión de secuencias complementarias a *dTdic1* mediante dot blot, pero no mediante Northern blots de mRNA, lo que sugiere que estos transcritos carecen de colas de poliA. En este trabajo no se encontró evidencia de la presencia de *dTdic1* en el gen *DFR* en ninguno de los materiales estudiados.

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Militar Nueva Granada por la financiación del proyecto POST CIAS 471 y al Dr. Juan José Filgueira por haber suministrado el material de clavel del Programa de Mejoramiento de Clavel, para este estudio.

Referencias bibliográficas

- Babiychuk E., Fuangthong M., Van Montagu M., Inzé D and Kushnir S. 1997. Efficient gene tagging in *Arabidopsis thaliana* using a gene trap approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (94): 12722-12727.
- BioEdit (Biological sequence editor for Win 95/98/NT/2K/XP). Disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
- BLAST (National Center of Bioinformatic Information). Disponible en: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Chuck G., Robbins T., Nijjar C., Ralston E., Courtney-Gutterson N. and Donner H.K. 1993. Tagging and cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element Activator. *Plant Cell*. (5): 371-378.
- Davies K. 2009. Modifying Anthocyanin production in flowers en anthocyanins biosynthesis, functions and applications. In: Anthocyanins Gould K, Davies K and Winefield C. Eds. Springer Science Business Media. New Zealand. PP 49-83.
- De Keukeleire P., Maes T., Sauer M., Zethof J., Van Montagu M and Gerats T. 2001. Analysis by transposon display of the behavior of the *dTph1* element family during ontogeny and inbreeding of *Petunia hybrida*. *Molecular Genetics and Genomics*. (265): 72-81.
- Fernández G. P. y Filgueira J.J. 2006. Caracterización de patrones de variegación de clavel *Dianthus caryophyllus* y su posible relación con resistencia a *Fusarium oxysporum* En: XLVI Annual meeting American Phytopathological Society Caribbean Division, Cartagena, Colombia.
- Feschotte C., Jiang N. and Wesler S. 2002. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature*. (3): 329-341.
- Galun E. 2003. Class II transposable elements in eucariotes en Transposable elements, a guide to the perplexed and the novice. The Weisman Institute of Science. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. PP 163-183.
- Gatt M., Hammett K, Markham K. and Murria B. 1998. Yellow pinks: inter-specific hybridization between *Dianthus plumarius* and related species with yellow flowers. *Scientia Horticulturae*. (77): 207-218.
- Hoja de datos de la floricultura colombiana 2009 (Asocolflores). Disponible en: <http://www.asocolflores.org/>
- Holley W. and Baker R. 1992. Breeding for better varieties. In: Carnation production II. Holley W and Baker R. Eds. Kendall Publishing Company. Colorado State University.
- Huang J., Zhang K., Shen Y., Huang Z., Li M., Tang D., Gu M. and Cheng Z. 2009. Identification of a high frequency transposon induced by tissue culture, nDaiZ, a member of the hAT family in rice. *Genomics*. (93): 274-281.
- Itoh Y., Higeta D., Suzuki A., Yoshida H. and Ozeki Y. 2002. Excision of transposable elements from the Chalcone isomerase and Dihydroflavonol 4-reductase genes may contribute to the variegation of the yellow-flowered carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Plant Cell Physiology*. (43): 578-585.
- Lida S., Morita Y., Choi J.D., Park K.I. and Hoshino A. 2004. Genetics and epigenetics in flower pigmentation associated with transposable elements in morning glories. *Advances in Biophysics*. (38): 141-159.
- Liu D., Galli M. y Crawford N. 2001. Engineering variegated floral patterns in tobacco plants using Arabidopsis transposable element *Tag 1*. *Plant Cell Physiology*. (42): 419-423.
- Ogata J., Itoh Y., Ishida M., Yoshida H. and Yoshihiro O. 2004. Cloning and heterologous expression of cDNAs encoding flavonoid glucosyltransferases from *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biotechnology*. (21): 367-375.
- Patent Abstract of Japan (Intellectual Property Library). Disponible en : <http://ip.com/patapp/JP2007037407A>.
- Sambrook J. and Russell D. 2001. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Volume 1 and 2.
- Takagi K., Ishikawa N, Maekawa M., Tsugane K. and lida S. 2007. Transposon display for active DNA transposons in rice. *Genes and Genetic Systems*. (82): 109-122.
- To K. Y. and Wnag C.K. 2006. Molecular breeding of flower colour. In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Volume I, Chapter 35. Global Science Books. Uk.
- Yoshida H., Itoh Y., Ozeki Y., Iwashina T. and Yamaguchi M. 2004. Variation in chalcononaringenin 2'-O- glucoside contents in the petals of carnations (*Dianthus caryophyllus*) bearing yellow flowers. *Scientia Horticulturae*. (99): 175-186.
- Van den Broeck D., Maes T., Sauer M., Zethof J., De Keukeleire P., D'Hauw M., Van Montagu M. and Gerats T. 1998. Transposon Display Identifies individual transposable elements in high copy lines. *The Plant Journal*. (13): 121-129.
- Van Houwelingen A., Souer E., Spelt K., Kloods D., Mol J. and Koes R. 1998. Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposition mutagenesis in *Petunia hybrida*. *The Plant Journal*. (13): 39-50.