ARGENTINA
PAIS GIRASOL
ASAGIR 2003

Identificación y Caracterización de Fuentes de Resistencia a la Podredumbre Húmeda del Capítulo de Girasol (*Sclerotinia sclerotiorum*) mediante Marcadores Moleculares.

Raimondi Juan[1], Fernández Paula[2], Peluffo Lucila[2], Paniego Norma[2], Pereyra Víctor[1], Hopp Esteban[2], Heinz Ruth[2] , Escande Alberto[1]
[1] Grupo Girasol - EEA Balcarce INTA - [2] Instituto de Biotecnología - INTA Castelar

En Argentina, la podredumbre húmeda del capítulo (PHC) es una de las enfermedades más devastadoras del girasol, con una incidencia anual sobre la producción de la pampa húmeda del 10-20%. Si bien existen variedades más resistentes que otras, esta resistencia es parcial porque no proporciona protección completa al cultivo cuando las condiciones ambientales son muy favorables al desarrollo del hongo. En este trabajo describimos una iniciativa conjunta de INTA (Balcarce y Castelar) y ASAGIR, orientada a identificar y combinar fuentes de resistencia a PHC, y evaluar sistemas de selección eficientes para asistir a los programas de mejoramiento.

Objetivos

- identificación de distintas fuentes de resistencia a PHC
- detección de QTLs asociados a dicha resistencia
- construcción de colecciones de ADN copia específicas para la detección de transcriptos relacionados con el proceso de resistencia al patógeno
- estudio de abundancia de transcriptos para la caracterización funcional de las líneas en estudio.
- desarrollo de estrategias útiles para la selección asistida
- integración de las distintas fuentes de resistencia en poblaciones base para comenzar un programa de selección recurrente asistido por marcadores

Materiales

- ocho líneas endocriadas públicas de moderada resistencia (MR) al patógeno y una línea susceptible (S), y las generaciones F1 y F2 de los cruzamientos S x MR.
- marcadores microsatélites y ESTs desarrollados en el IB, INTA Castelar.

Métodos

Las líneas MR y S en estudio se evaluaron en el campo en la EEA Balcarce INTA, durante la campaña 2002-2003. Se evaluaron 15-30 plantas de cada línea parental, y 90-130 plantas de cada F2, mediante inoculación artificial del capítulo (2500 esporas/capítulo) durante floración (estado R5.2). Los capítulos inoculados se taparon con bolsas de papel durante 7 días. Se evaluaron los siguientes componentes de la enfermedad:

a. incidencia: porcentaje de plantas enfermas;
b. severidad: porcentaje del área del capítulo con síntomas;
c. período de incubación: días desde inoculación hasta aparición de síntomas.

Las tres variables fueron ajustadas respecto a un testigo susceptible (cultivar híbrido Rancul), que fue sembrado escalonado en el tiempo para poder reducir el efecto ambiental de las diferentes fechas de inoculación. Se estimó la intensidad de la enfermedad como el producto [(a) x (b)]/100. La incidencia se analizó mediante un test de homogeneidad de proporciones, y el período de incubación mediante análisis de la varianza.

A diferentes períodos post-inoculación (0, 2, 4 y 15 días) se colectó tejido de capítulos inoculados y sin inocular de todas las líneas en estudio para el análisis de abundancia de transcriptos. Las muestras colectadas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, y se extrajo ARN total (Qiagen, Alemania). El análisis de expresión por abundancia relativa de transcriptos se está efectuando mediante RT-PCR, empleando "primers" específicos diseñados a partir de las secuencias de ESTs aisladas previamente (Fernández y col. 2003). En una segunda etapa se realizarán análisis cuantitativos de abundancia de transcriptos por RT-PCR en tiempo real.

Se construyó además una colección de ADN copia diferencial a través de la técnica de hibridación substractiva (Diatchenko y col., 1996), utilizando el sistema PCR-Select cDNA Subtraction Kit® (Clontech, EUA) de una línea resistente, al cuarto día posterior a la inoculación con el patógeno, según protocolo descripto previamente (Fernández y col. 2003).

El mapeo génico y la detección de QTLs asociados a la resistencia a PHC se efectuarán en dos poblaciones. Para ello se prevé efectuar la evaluación fenotípica de aproximadamente 300 familias F2:3 de cada población en varios ambientes, en 2003-2004. Ya se autofecundaron 150 plantas de cada población F2, y se extrajo ADN de todas ellas; actualmente se están incrementando estos materiales en Yuto (Jujuy). El mapeo génico con marcadores microsatélites y de ESTs, y la detección de QTLs asociados a resistencia a PHC, se efectuará durante 2004.

Para integrar las diversas fuentes de resistencia, durante la campaña 2002-2003 se efectuaron cruzamientos de las líneas en todas las combinaciones posibles dentro de grupos heteróticos. Con estos materiales se iniciarán ciclos de recombinación durante 2003-2004 para crear poblaciones base; se espera comenzar con el primer ciclo de selección recurrente, eventualmente asistida con marcadores, en 2004-2005.

Tabla 1. Secuencias expresadas únicas (ESTs) aisladas de colecciones de cDNA diferenciales órgano-específicas. Se listan aquellas secuencias que estarían funcionalmente relacionadas con procesos de tolerancia o resistencia a estreses bióticos y/o abióticos.

EST AN [a]	Función probable [b]	AN [c]	Organismo	E
BU671801	Fructosyl transferase	P05065	Nicotiana paniculata	3E-44
BU671803	Cyclophilin protein	AF242312-1	Euphorbia esula	1E-17
BU671804	pit2 protein, Pi starvation	T03677	Nicotiana tabacum	3E-24
BU671805	Glycolate oxidase protein	D14044-1	Cucurbita sp.	5E-95
BU671806	Heat shock protein	AJ249331-1	Cucumis sativus	8E-40
BU671807	Putative beta-1,3-glucanase protein	AJ271598-1	Hieracium piloselloides	1E-37
BU671818	Leucine zipper-containing protein	U37437-1	Euphorbia esula	1E-47
BU671832	Pssl70 stress 70 protein	X69213-1	Pisum sativum	6E-27
BU671840	Catalase protein	1906388A	Helianthus annuus	6E-88
BU671841	Homologous to plastidic aldolases pr	A84600	Solanum tuberosum	5E-29
BU671845	Magnesium chelatase subunit protein	AF026399-1	Glycine max	2E-34
BU671864	Plastidic aldolase protein	M32605-1	Nicotiana paniculata	1E-51
BU671866	Protoporphyrin IX:Mg chelatase prot	2404467A	Anthirrinum majus	0.00
BU671867	Oxygen-evolving enhancing protein	AP003203-10	Oryza sativa	5E-93
BU671886	Multicatalytic endopeptidase protein	CAA73619.1	Arabidopsis thaliana	4E-17
BU671887	Aquaporin 1 protein	Y08161-1	Nicotiana tabacum	5E-85
BU671888	Putative beta-1,3-glucanase protein	AL021713-18	Hieracium iloselloides	2E-17
BU671889	Germin-like protein	AF032973-1	Oryza sativa	8E-41
BU671904	1,2-beta-fructan 1F-fructosyltransferase protein	AJ009756-1	Helianthus tuberosus	E-59
BU671906	Polygalacturonase inhibitor protein	Z49063-1	Actinidia deliciosa	3E-42
BU671909	Lipid transfer protein precursor	S71564	Davidia involucrata	2E-37
BU671910	Lipid transfer protein (LTP)	AF195863-1	Gossypium hirsutum	0.00
BU671924	Cysteine protease	AJ245868-1	Medicago sativa	6E-16
BU671928	Cyclophilin protein	AF242312-1	Euphorbia esula	3E-17
BU671929	Putative zinc-protease protein	AC002339-10	Arabidopsis thaliana	9E-62
BU671946	Leucine zipper-containing protein	AL138655-2	Arabidopsis thaliana	3E-40
BU671948	Stress related putative protein	AC009606-5	Arabidopsis thaliana	3E-18
BU671954	mRNA for dehydrin related protein	X92650.1	Helianthus annuus	0.00
BU671955	Thaumatin-like protein	X15224-1	Nicotiana tabacum	3E-34
BU671960	Spermidine synthase 1 protein	AF375409-1	Hyoscyamus niger	6E-18
BU671972	Ankyrin-like protein	AB015474-2	Arabidopsis thaliana	8E-33
BU671977	Chloroplast Drought-induced Stress	Y09987-1	S. tuberosum	8E-41
BU671989	Cationic peroxidase protein	AF039027-1	Glycine max	2E-40
BU672016	mRNA for protease inhibitor	22759722	Zinnia elegans	3E-24
BU672102	Thioredoxin-like protein CDSP32	T07367	Solanum tuberosum	2E-56
BU672106	Cysteine Syntahse B (CSASE B)	D91040	Ralstonia solanacearum	2E-16

[a] Número de acceso en GenBank de las secuencias derivadas del proyecto EST de INTA.
[b] De acuerdo a comparación con secuencias en bases de datos utilizando el programa BLASTX.
[c] Número de acceso de la secuencia en GenBank que presenta mayor similitud a la secuencia incógnita.

Resultados

La floración de los materiales tuvo una amplitud de cinco semanas. La intensidad de la enfermedad del testigo fue diferente (p<0.01) entre distintas fechas de inoculación. Por ello, la incidencia para cada material se calculó relativa al testigo; la misma fue diferente (p<0.01) entre líneas, y entre poblaciones F2. La severidad de la enfermedad fue cercana al 100% en todos los materiales, excepto en las líneas RK 416 y RHA 801, que fue de aprox. 70%. Por ello, se presentan los datos de intensidad (incidencia x severidad; Fig. 1).

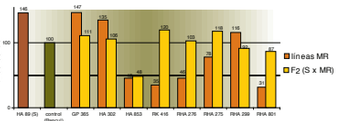

Figura 1. Intensidad de la enfermedad, relativa a un control susceptible, de líneas endocriadas moderadamente resistentes (MR) y susceptible (S) a podredumbre húmeda del capitulo, y de las poblaciones F_2 de los cruzamientos S x MR.

La línea S presentó más enfermedad que el control. Algunas líneas MR presentaron la misma tendencia (GP 365, HA 302, RHA 299); en estos casos, el promedio de la F2 respectiva fue inferior al promedio de ambas líneas parentales (Fig. 1).

El resto de las líneas MR presentó menor intensidad de enfermedad que el testigo, notablemente las líneas RHA 801, RK 416, HA 853 y RHA 276. Las F2 respectivas mostraron distintas tendencias, lo que indicaría la acción de diferentes efectos génicos de los factores asociados a la resistencia parcial. Por ejemplo, el promedio de la F2 del cruzamiento S x HA 853 fue muy similar al promedio de la línea parental MR, lo que indicaría preponderancia de efectos génicos dominantes. La inversa sucede en la F2 del cruzamiento S x RK 416, donde la resistencia parcial estaría determinada por factores recesivos. En otros casos (RHA 801, RHA 275, RHA 276), el promedio de la F2 se aproxima al promedio de las líneas parentales, indicando la preponderancia de efectos génicos aditivos (Fig. 1). Estos efectos génicos serán corroborados con los análisis fenotípicos y moleculares en la próxima campaña.

Los períodos de incubación fueron diferentes entre líneas (p<0.01). Las líneas MR que presentaron menor intensidad de la enfermedad (RHA 801, RK 416, RHA 276 y RHA 275) también presentaron los mayores períodos de incubación (Fig. 2), indicando la importancia de este componente de la resistencia parcial. En la próxima campaña se evaluará la relación entre ésta variable, y los porcentajes de cuerpos extraños y acidez del aceite.

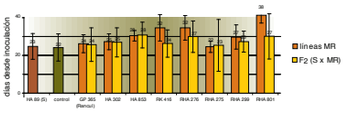

Figura 2. Período de incubación (días desde inoculación hasta aparición de síntomas), de líneas endocriadas moderadamente resistentes (MR) y susceptible (S) a podredumbre húmeda del capitulo, y de las poblaciones F_2 de los cruzamientos S x MR.

A partir de una base de datos de ESTs tejido-específicos de girasol desarrollada previamente en el IB, INTA Castelar, se seleccionaron aproximadamente 30 ESTs relacionados con mecanismos de defensa a estreses bióticos y abióticos (Tabla 1), para los que se sintetizaron oligonucleotidos específicos ("primers"). Actualmente se está realizando un estudio preliminar de abundancia de transcriptos de secuencias de oxalato oxidasa y proteína de transferencia de lípidos mediante RT-PCR. La abundancia de transcriptos es analizada con referencia a la expresión de genes constitutivos (actina en este caso). Para oxalato oxidasa se observaron resultados preliminares de interés en las líneas RHA 275 y RHA 801 (dos de las líneas MR de mejor comportamiento), con una expresión inicial superior tanto en los controles sin inocular como en los primeros días post-inoculación respecto de la línea susceptible (Figura 3).

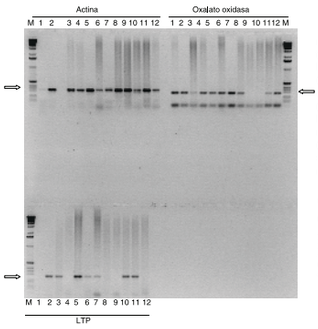

Figura 3. Análisis de expresión mediante RT-PCR de los transcriptos correspondientes a los ESTs oxalato oxidasa (BU671889), proteína de transferencia de lípidos (BU671910) y actina, en dos líneas endocriadas moderadamente resistentes (MR) a podredumbre húmeda del capitulo (RHA 275 y RHA 801) y una línea susceptible (S; HA 89).

M: marcador de peso molecular 1kb; 1-4: RHA 275 (MR); 5-8: RHA 801(MR); 9-12: HA89 (S); 1, 5, 9: muestras sin inocular: 2,6,10: dia 2 post-inoculación; 3,7,11: dia 4 post- inoculación; 4,8, 12: dia 15 post inoculación. Las flechas indican la posición de los transcriptos específicos.

vPor otro lado, se construyó una colección de ADN copia diferencial de una línea MR (a partir de tejido obtenido al cuarto día post-inoculación), arrestada con mensajeros de la misma línea sin inocular, con el objetivo de aislar transcriptos inducidos en respuesta al proceso de infección. Se obtuvieron 370 clones recombinantes que están siendo analizados por secuenciación y análisis bioinformático. Asimismo se construyó una colección de ADN copia recíproca de la anterior para estudiar represión génica durante el proceso de infección. La detección de transcriptos inducidos o suprimidos diferencialmente aportará nuevas secuencias de interés para el análisis de fuentes de resistencia por abundancia de transcriptos.

Conclusiones

- En las condiciones ambientales en que se efectuó el estudio se detectaron diferencias en el nivel de enfermedad entre la línea susceptible y algunas de las líneas moderadamente resistentes.
- Las líneas moderadamente resistentes presentarían distintos tipos de resistencia, evidenciados por las diferentes respuestas observadas en la poblaciones F2 de los cruzamientos S x MR.
- Las líneas MR preliminarmente seleccionadas para los estudios de mapeo génico y detección de QTLs son RHA 801 y RK 416, debido a que presentaron muy buen comportamiento, aparentan tener distintos mecanismos de resistencia, y su origen genealógico es diferente.
- Se seleccionaron 30 secuencias relacionadas con resistencia a estreses bióticos y abióticos, y se sintetizaron oligonucleótidos específicos para estudios de abundancia de transcriptos de utilidad para la caracterización de las líneas parentales.
- Los estudios preliminares de abundancia de transcriptos por RT-PCR muestran diferencias en niveles de expresión para alguno de los transcriptos de interés, como los correspondientes a oxalato oxidasas en algunas líneas MR respecto de la línea S.

Referencias

Fernández P, Paniego N, Lew S, Hopp HE, Heinz R. (2003). BMC Genomics. Enviado para publicacion.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell A.P, Chenchick A, Moqaddam F, Huang B, Lukyanov, S, Konstantin L, Gurskaya N, Sverdlov E, Siebert PD (1996) Proc. Natl. Sci. USA, 93, 6025-6030.

ASAGIR
ASOCIACION ARGENTINA DE GIRASOL