



Desarrollo de marcadores moleculares en girasol y su utilización en estudios de genómica estructural y funcional

P. Talia¹, P. Fernández¹, V. Nishinakamasu¹, L., L. Fernández¹, L. Peluffo¹, L. Sergio², N. Paniego¹, R. Heinz¹ y H. E. Hopp¹

¹ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Castelar, CICVyA, Instituto de Biotecnología, CC 25 (1712) Villa Udaondo, Pcia. de Buenos Aires. ²Bioaxioma (www.Bioaxioma.com)

Introducción

El girasol ocupa una fracción muy importante de la producción e industrialización de semillas oleaginosas en Argentina. A pesar de la importancia de este cultivo a nivel internacional, solo en los últimos años se avanzó considerablemente en los estudios genéticos y genómicos de esta especie. No obstante lo cual, la información derivada de los programas del área genómica de girasol es aún considerablemente menor respecto a la generada para otros cultivos de importancia agronómica como arroz, soja, o maíz. Los proyectos genómicos actualmente en curso se han concentrado en el desarrollo de un número importante de marcadores moleculares que incluyen RFLPs, AFLPs, SSRs y su utilización en la construcción de mapas genéticos de girasol, con distinto grado de saturación (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Recientemente se han abordado proyectos genómicos de otro tipo de marcadores moleculares, fundamentalmente aquellos basados en secuencias que se expresan (ESTs), lo cual ha ampliado considerablemente el número de secuencias públicas en bases de datos internacionales durante el último año. El desarrollo de estas herramientas proporciona información sumamente valiosa tanto para la identificación varietal como para su aplicación en programas de mejoramiento para caracteres agronómicos de interés.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo se orientan a complementar áreas básicas del conocimiento necesarias para responder a las demandas tecnológicas locales del cultivo. En este contexto proponemos el desarrollo de marcadores moleculares basados en secuencias que se expresan (ESTs) a partir de distintos órganos de girasol y análogos de genes de resistencia (RGAs), la evaluación y organización de los mismos a partir de una estrategia bioinformática, y su ubicación en un mapa de ligamiento para asistir la selección de un grupo de marcadores mínimo que de una cobertura amplia del genoma para su evaluación como herramientas para la identificación y la reglamentación de la protección varietal, la caracterización genómica de girasol y el mejoramiento asistido.

Este trabajo está financiado por un subsidio ANCyT BID1201 OC-AR PID024.

Materiales y Métodos

Para el aislamiento y caracterización de ESTs se construyeron colecciones de ADN copia diferenciales de hoja, tallo, raíz y flor de distintos estadios de desarrollo, utilizando la estrategia de hibridación subtractiva y selección por PCR (8).

Para el aislamiento y caracterización de los RGAs se utilizaron oligonucleótidos diseñados a partir de motivos estructurales conservados (9).

Para el análisis de las secuencias aisladas se utilizó una rutina de análisis (Biopipeline®) desarrollada por Bioaxioma (www.Bioaxioma.com) y la categorización funcional se realizó por análisis comparativo con secuencias en bases de datos utilizando el algoritmo BLAST (10) y por búsqueda de motivos conservados y dominios funcionales mediante comparación con bases de motivos (Pfam).

Para el mapeo genético se utiliza una selección compuesta por SSRs públicos y propietarios desarrollados por INTA (Ha-x-ar; 6) y SSR públicos desarrollados por la Universidad de Oregon (ORSx; 7), ESTs y RGA desarrollados en este trabajo. La evaluación de SSR se realiza por la técnica de PCR, siguiendo la metodología descrita previamente (5), mientras que los ESTs se analizan por la técnica de RFLP y SSCP. El mapeo se realiza sobre una población de 114 líneas recombinantes endocriadas (RILs) derivadas del cruzamiento PAC2 x RHA266 (suministradas por el Dr. Gentzbittel, Francia; 3, 4). Para el análisis y la determinación de grupos de ligamiento se utilizó el programa MapMaker considerando un valor mínimo de LOD score de 3,0.

Resultados

Aislamiento y caracterización de ESTs

En la tabla 1 se resume la información de las secuencias de ESTs aisladas y analizadas así como el número de secuencias

diferenciales, tamaño de inserto y marco abierto de lectura (ORF) promedio, por colección de ADN diferencial.

La Figura 1 resume la información derivada del análisis de funcionalidad del total de las secuencias obtenidas basado en la comparación con secuencias nucleotídicas y proteicas en bases de datos, utilizando el programa BLASTX

Aislamiento y caracterización de RGAs de girasol

Se analizó un total de 170 secuencias aisladas a partir de distintos genotipos, utilizando distintas combinaciones de "primers"; de estas 64 corresponden a secuencias únicas. En la Tabla 2 se muestran resultados de la comparación con bases de datos de algunas de las secuencias aisladas, previo análisis de ensamblado en de secuencias.

Mapeo genético

Hasta el momento se han analizado 133 SSR HA-x-ar y 90 SSR ORSx y 28 sondas derivadas de EST. De estos, 62, 29 y 11 marcadores respectivamente mostraron polimorfismos entre las líneas parentales. El análisis de segregación se completó para 50 HA-x-ar, 29 SSR ORSx y 2 ESTs, de los cuales 26, 11 y 2 agrupan en 14 de los 17 grupos de ligamiento descriptos para la especie (3, 4, 7). De estos grupos, 8 están referenciados los mapas descriptos por Tang (7) a través de la asociación de 11 ORS tal como lo muestra la Figura 2

Conclusiones

- Se aislaron y caracterizaron funcionalmente 329 secuencias únicas de girasol derivadas del proyecto ESTs y 64 derivadas del aislamiento de RGAs.

- Un número significativo (aproximadamente 11%) de las secuencias aisladas están relacionadas con respuestas a estreses bióticos y/o abióticos, constituyéndose en secuencias de alto interés para su aplicación en proyectos de mapeo y caracterización funcional de caracteres agronómicamente importantes para el girasol. Asimismo se aislaron secuencias relacionadas con mecanismos de transcripción génica, transducción de señales y genes homeóticos que aportan herramientas para estudios más básicos del girasol.

- Se realizó un mapeo genético preliminar incluyendo 81 marcadores sobre 94 RILs de la población RHA266xPAC2. El análisis de los marcadores utilizados muestra una distribución de los mismos en 14 de los 17 grupos de ligamiento de girasol. Al final de este trabajo se espera integrar los marcadores desarrollados en este proyecto y otros recientemente publicados (7) en un mapa de ligamiento de ALFP y RFLPs (3, 4). Este recurso permitirá un aprovechamiento más eficiente y económico de los datos disponibles para esta especie. Particularmente, los resultados de esta tarea son de fundamental importancia para el desarrollo de estudios destinados a la selección de un grupo mínimo de marcadores que asegure una cobertura amplia del genoma para su evaluación como herramientas para la identificación y la reglamentación de la protección varietal. Se espera que en un futuro cercano estas técnicas puedan ser utilizadas como complementarias a los caracteres fenológicos actualmente en uso para tal fin y que su aplicación en estudios de diversidad, permitan la evolución del sistema de protección de variedades.

Referencias bibliográficas

- Berry y col. (1995). Theor Appl Genet 91:195-199
- Gentzbittel y col. (1995). Theor Appl Genet 90:1079-1086
- Gentzbittel y col. (1999). Theor Appl Genet 99:218-234
- Al Chaarani y col. (2002) Theor Appl Genet, 104: 490-496.
- Mokrani y col. (2002). Theor Appl Genet. 106:149-56
- Paniego y col. (2002). Genome 45:34-43
- Tang et al. (2002). Theor Appl Genet. 105:1124-1136.
- Diatchenko y col. (1996). Proc Natl Sci USA 93:6025-6030.
- Bouzidi y col. (2002). Theor Appl Genet. 104(4):592-600
- Altschul y col. (1990). J Mol.Biol. 215:403-410



Tabla 1.

Colecciones de ADN copia diferenciales construidas a partir de distintos órganos y/o estadios de desarrollo de girasol

ESTs	Botón floral temprano	Botón floral tardío	Hoja	Tallo	Raiz	Total
Aislados	504	384	268	400	115	1671
Secuenciados	261	269	159	312	72	1073
Analizados	245	227	128	282	55	919
Sec. Únicas	40	140	63	82	4	329
Sec. diferenciales	31	131	42	81	4	289
Promedio ORF	269	220	257	265	225	247
Promedio inserto (bp)	495	365	443	463	370	441

Figura 1.

Representación funcional de ESTs aislados de girasol según resultados obtenidos utilizando el programa BLATX

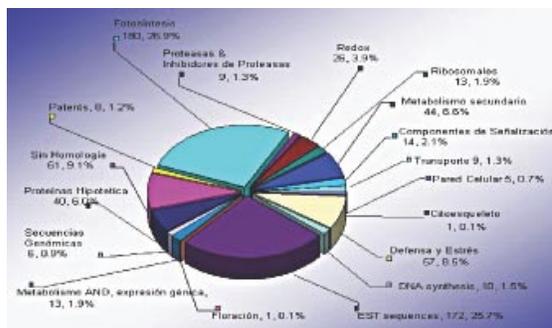


Tabla 2.

Secuencias aisladas con primers dirigidos a motivos conservados de RGAs

CAP 3	Secuencias	ADN	Numero de entrada	Alinamiento significativo	Score (bit)	e - Value
Contig 26	284, 285, 289, 290, 292, 307, 380, 286	V94 RHA340	AP003216-29 BAB84853	Oryza sativa putative cyst nematode resistance protein	70.2	6 ⁻¹¹
Contig 19	226, 210, 211, 124, 205	HA89 PAC2 ACA884 RHA266	AB049723-1 BAB33421.1	Pisum sativum putative senescen...	171	7 ⁻⁴²
Contig 23	333, 324, 364, 321, 27, 271, 269, 262, 268	RHA340 RHA266 ADNc sin inocular	AF090447-6 AAD20307.1	Zea mays copia-type pol polypro...	157	6 ⁻³⁷

Figura 2.

Grupos de ligamiento obtenidos del mapeo de marcadores SSR en la población RHA266xPAC2 (3,4).

