

Desarrollo y aplicación de marcadores SNPs e InDels en girasol



Fusari, C.; Lia, V.; Hopp, E.; Heinz, R. y Paniego, N.*

Instituto de Biotecnología, CNIA-INTA CC25 Castelar, Buenos Aires, Argentina.
*npaniego@cnia.inta.gov.ar

Hasta hace relativamente poco tiempo, la disponibilidad de marcadores moleculares basados en Polimorfismos de Simple Nucleótido (SNP) era muy escasa en girasol. Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), son los elegidos para el análisis de ligamiento por ser altamente polimórficos, usualmente heredados de manera codominante y cromosoma específicos. Sin embargo, una desventaja de éstos, es que existe cierta inestabilidad en el grado de ligamiento con el locus que representan. Esta desventaja puede ser superada con el uso de marcadores funcionales de tipo SNPs (mutaciones puntuales) e InDels (eventos de Inserción y/o Delección). Éstos derivan de sitios polimórficos presentes en regiones codificantes o reguladoras de genes cuya función está potencialmente involucrada en la variación observada para un determinado carácter agronómico. La utilización de sistemas masivos para su evaluación convierten a estos marcadores útiles tanto para la construcción de mapas genéticos de alta densidad, como para llevar a cabo estudios genéticos de asociación. Los estudios de asociación comprenden el análisis de la diversidad nucleotídica, la estructura del desequilibrio de ligamiento (LD) y la evaluación de selección. La diversidad nucleotídica es una de las mayores fuentes de variación fenotípica, y por tanto, el estudio sistemático del análisis de asociación entre SNPs y fenotipos de interés, es actualmente una alternativa promisoría para la identificación de

variantes alélicas causativas (Quantitative Trait Nucleotides, QTNs), de las cuales deriva una estrategia de selección asistida directa basada en genes candidatos. Esta metodología facilita la selección de genotipos superiores en base a su secuencia de ADN reduciendo el costo de pruebas fenotípicas y posibilitando la selección para caracteres complejos con alta interacción ambiental. Si bien esta estrategia es de desarrollo reciente en plantas, existen casos de aplicación en maíz, cebada, arroz y trigo. En girasol, la potencialidad de la técnica queda demostrada por el trabajo de Kolkman y colaboradores (2004) [1] al caracterizar alelos de la enzima que confiere resistencia a imidazolinas y sulfonilureas en girasol, y al desarrollar un sistema de marcadores moleculares para monitorear la presencia de estas variantes alélicas naturales en especies silvestres y en nuevos híbridos. En cuanto a los análisis de asociación y diversidad alélica, Liu y Burke (2006) [2] han examinado 9 loci, obteniendo una frecuencia de 1 SNP cada 38,8 bp para girasol cultivado. El objetivo de este trabajo es evaluar el potencial de los marcadores moleculares basados en mutaciones puntuales (SNPs) e inserciones y/o delecciones cortas (InDels) para la caracterización genética del girasol. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar regiones de 500 1600 pb para 28 genes candidatos que fueron evaluados sobre dos genotipos de un grupo de 19 líneas de girasol cultivado que incluye los parentales

de dos poblaciones de mapeo en estudio. El 35,7 % de los oligonucleótidos iniciadores ensayados (10 de 28) originaron un producto único de amplificación y fueron utilizados para aislar la correspondiente región genómica en las restantes líneas en evaluación. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados, lográndose un total de 7216 pb de lectura confiable, siendo el 49 % de las secuencias regiones codificantes. A partir de estas secuencias se definieron 90 SNPs y 34 InDels usando el programa SeqScape v2.5 (Applied Biosystem). En promedio esto representa 1 SNP cada 80 pb.

Paralelamente, se analizaron 55,532 ESTs públicos de girasol usando el programa SNP Discovery [3] encontrándose un total de 47,531 SNPs sobre 4 Mb analizadas, lo cual arroja una frecuencia de 1 SNP cada 96 pb. Para confirmar experimentalmente estos polimorfismos y estimar los valores de diversidad en el conjunto de genotipos analizados en este trabajo, se seleccionaron 31 candidatos considerando los parámetros de confia-

bilidad del SNP provistos por el programa. Lograron amplificarse 16 regiones y de éstas, 12 se analizaron por secuenciación. Los datos en conjunto permitieron estimar la diversidad nucleotídica presente, la frecuencia de SNPs e InDels y el número de haplotipos en cada gen candidato utilizando el programa DNAsp [4]. Los datos preliminares obtenidos en este trabajo sugieren que estos marcadores podrían ser utilizados como herramientas para la identificación de caracteres complejos en girasol.

Bibliografía:

- Kolkman JM, Slabaugh MB, Bruniard JM, Berry S, Bushman BS, Olungu C, Maes N, Abratti G, Zambelli A, Miller JF et al. *Theor Appl Genet* 2004, 109(6):1147-1159.
- Liu A, Burke JM. *Genetics* 2006, 173(1):321-330.
- Barker G, Batley J, O' SH, Edwards KJ, Edwards D. *Bioinformatics* 2003,19(3):421-422.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. *Bioinformatics* 2003, 19(18):2496-2497.

Obtención de plantas transgénicas de girasol

Radonic, L.M.; Zimmermann, J.M.; Zavallo, D.; López, N.; y López-Bilbao, M.*

Instituto de Biotecnología, INTA Castelar. *mlopezbilbao@cni.inta.gov.ar.
Financiación: PICTO ASAGIR 08-13164

Hasta el momento y a nivel mundial no existe el girasol transgénico liberado al mercado, aunque sí en forma controlada y experimental bajo todas las normativas que rigen para los cultivos transgénicos, tanto en empresas privadas como en entidades públicas. La investigación en transgénesis en girasol realizada en el Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar, tiene dos objetivos, el primero es «aplicado» y el segundo de «investigación básica».

Para cumplir con ambos objetivos el grupo de Transformación de Girasol desarrolló un protocolo de transformación eficiente y reproducible donde la selección en kanamicina se realiza por formación de raíces *in vitro* y donde no se obtienen escapes (Radonic y col., 2006). En el primer caso, nuestro grupo busca la obtención de plantas de girasol con capacidad para resistir el ataque de hongos.

La elección de este objetivo se debe a que es ampliamente conocido que una importante limitación del cultivo son las enfermedades provocadas por hongos, fundamentalmente la podredumbre del capítulo y la verticilosis, causadas por los patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahliae*, respectivamente, las que además de disminuir el rendimiento, afectan la calidad de los productos. Por otra parte, el mejoramiento genético convencional no ha sido eficiente para

incorporar resistencia a estas enfermedades, en parte por el limitado uso de fuentes efectivas de resistencia genética a los principales patógenos pero también debido al carácter poligénico de la resistencia frente a patógenos como *Sclerotinia*.

Existe desde hace más de una década, la sólida evidencia de que la sobre-expresión de transgenes codificantes para proteínas antifúngicas pueden conferir protección frente al ataque de patógenos y que esta protección se ve aumentada debido al efecto sinérgico de la expresión de dos o más genes (Broglie y col., 1991; Melchers y col., 1993). Los avances de este trabajo se muestran en el póster *TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE GIRASOL CON GENES ANTIFÚNGICOS* de este mismo Congreso ASAGIR 2007.

El segundo objetivo está relacionado con la caracterización funcional de genes de interés en plantas transgénicas, utilizando girasol cultivado o especies modelo como tabaco o lechuga. Esta última se considera actualmente la especie modelo dentro de la familia *Compositae*.

El desarrollo de herramientas relacionadas a la expresión eficiente de genes candidatos para caracteres de interés como la resistencia a estreses bióticos y abióticos en girasol, aislados y caracterizados en el Instituto de Biotecnología, INTA Castelar, es fundamental para validar la función predicha por análisis *in silico*. Esta

estrategia permitirá evaluar la expresión espacio-temporal de genes candidatos a través del análisis de sobreexpresión o silenciamiento génico, aspecto fundamental en el área de genómica funcional para la validación de genes claves.

Esta aplicación de la transgénesis para asistir a la genómica funcional constituye el punto de partida para el desarrollo de marcadores funcionales para el cultivo de girasol.

Bibliografía:

- Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ and Broglie R (1991) *Rhizoctonia Solani Sci* 254: 1194–1997.
- Melchers LS, Sela-Buurlage MB, Vloemans SA, Woloshuk CP, Van Roekel JSC, Pen J, van den Elzen PJM and Cornelissen BJC (1993) *Plant Mol Biol* 21: 583–593.
- Radonic LM, Zimmermann JM, Zavallo D, López N, López Bilbao MG. (2006) *Electronic J. of Biotechnology* , Vol 9 (3): 315-319.