

LOS COMPUESTOS ORGANICOS VOLÁTILES, DEFENSA NATURAL DEL ALGODÓN GOSSYPIUM HIRSUTUM L., MEJORABLE GRACIAS A LA BIOTECNOLOGÍA

Ronald Villamar^{1,2,3}, Gabriel Liu-Ba^{4,5}, Thierry Legavre², Christopher Viot²

¹Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), Ecuador.
²UMR AGAP, Equipe Génomique et Sélection, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement - CIRAD, Av. Agropolis, 34398 Montpellier, France.
³Université de Montpellier, France.
⁴Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador.
⁵Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, mención Fitomejoramiento - Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

Plano de la presentación

- Introducción
- Enfoque del proyecto
- Metodología
- Resultados
- Conclusiones
- Orientaciones

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Algodón Upland *Gossypium hirsutum*

- Cultivo anual
- *G. hirsutum* más cultivado (95% de la producción mundial de fibra)
- Genoma alotetraploide AD

Un cultivo muy atacado por artrópodos
 → Importante consumo de insecticidas de síntesis

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

→ Costos elevados de protección química
 → Riesgos para la salud y el medioambiente

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Defensas naturales químicas del algodónero contra artrópodos plagas
 → Glándulas de gossipol conteniendo terpenoides altamente tóxicos
 = Sistema de defensa directa por mortalidad o crecimiento retardado

Toxicidad
 Glándulas de gossipol.
 Gossypol

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Un mecanismo de defensa natural por mediación de **Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs)**, que modifican el comportamiento de ciertas plagas y predadores :

→ Atracción de enemigos de artrópodos-plagas
 → Repulsión de artrópodos buscando instalar sus huevos

Repulsión Hembra ponedora
Atracción Predador
 COVs - Compuestos Orgánicos Volátiles emitidos por las hojas
 Herbivoría

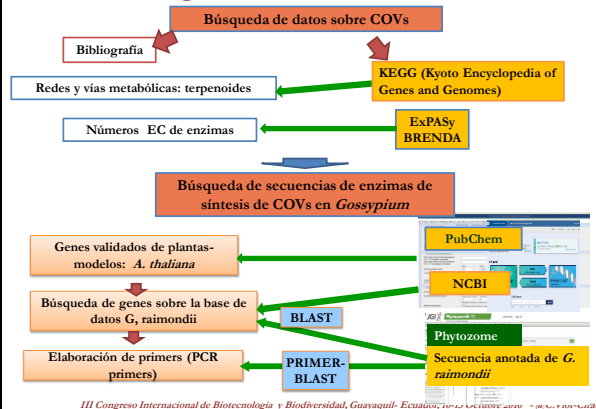
III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Nuestro proyecto de investigación busca:

- Apoyo de la biotecnología para más uso de estos mecanismos de defensa natural por entomólogos y fitomejoradores en beneficio de los pequeños agricultores
- Elucidar las bases genéticas
- Estudiar la diversidad en el germoplasma

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Metodología : Bioinformática



III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

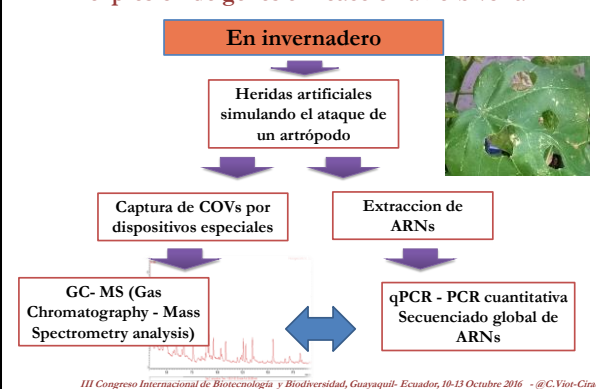
Germoplasma para los diferentes estudios

→ ADN, COVs, ARN

BG	sp	name	origene 1	origene 2	origene 3	age 1	age 2	age 3	Etude COV	Etude ARN	Etude ADN
1	1020	HIRSU	ALLEN ZARIA	Africa C.	Nigeria	Chad	recent 1	1910			X
2	449	HIRSU	ROWDEN	América N	USA	Sel. in Bohemian (1869)	recent 1	1899			X
3	173	HIRSU	TRIUMPH	América N	USA	fonds Old Stormproof	recent 1	1899			X
4	22	HIRSU	Allen 51 106	Africa C.	chad	fonds Allen	recent 2	1950	X	X	X
5	178	HIRSU	N'KOURAJA 144143	Africa W	Mali		recent 2	1950	X	X	X
6	700	HIRSU	EMPIRE B4	América N	USA	fonds Old Stormproof	recent 2	19447			X
7	749	HIRSU	COCKER 100-2	América N	USA	Stoneville 2 * Coker Foster (?)	recent 2	1938			X
8	2319	HIRSU	TLE-1	América N	usa		recent 2	1941	X	X	X
9	2320	hirsu	Princ 3-79	América N	usa		recent 2	1948			X
10	203	HIRSU	REBA B50	Africa C.	Central Africa	Stoneville-B1439 * Allen 50T	recent 3	1960			X
11	142	HIRSU	IBCO 908	Africa C.	Chad	Allen Nkouraja Triumph	recent 3	1975	X	X	X
12	1178	HIRSU	NTA 84.4	Africa W	Mali		recent 3	1984	X	X	X
13	244	HIRSU	HART 120-7	Africa W	Ivory Coast	sel. in I. 229-29 (HAR)	recent 3	1984			X
14	1813	HIRSU	IRMA BLT-PP	Africa C.	Cameroon		recent 4	1990	X	X	X
15	2487	HIRSU	IRMA1457	Africa C.	Cameroon	ISA 784 * IRMA B192	recent 4	2008	X	X	X
16	1818	HIRSU	H 279 A	Africa W	Benin		recent 4	1991	X	X	X
17	2048	HIRSU	STAM 59A	Africa W	Benin		recent 4	1992			X
18	2141	HIRSU	R 405-5	Africa W	Ivory Coast		recent 4	1996	X	X	X
19	7431	HIRSU	SS 1254	Africa C.	CAMEROON	Bakula (Goade)	wild feral latifolium		X	X	X
20	6284	HIRSU	AS 0302	América S	Venezuela	NW CARACAS 6 km N de La Victoria	wild Mariu-G		X	X	X
21	6325	HIRSU	AS 0603	América NC	MEXIQUE	PK 2145 Puata Ixtapa-Azapulco	wild moravia				X
22	6323	HIRSU	AS 0601	América NC	MEX	CN-197 (1982)	wild palenon		X	X	X
23	1525	HERBA	con nghe an	Asia SE	Viet-Nam		recent 2 A-gem				X
24	7085	ARBO	G 15	Africa C.	Dem Rep Congo	GANDAJIKA	recent 2 A-gem				X
25	7110	RAIMO	G 7	América S	Peru		wild D-gem				X

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Estudio de los COVs emitidos y de los cambios de expresión de genes en reacción a herbivoría



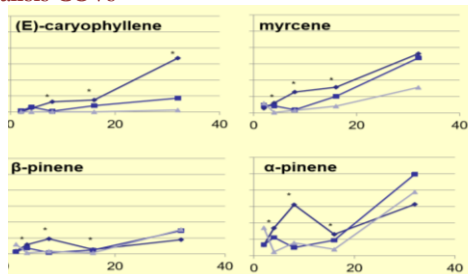
III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Preparación de cebadores ADN



III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

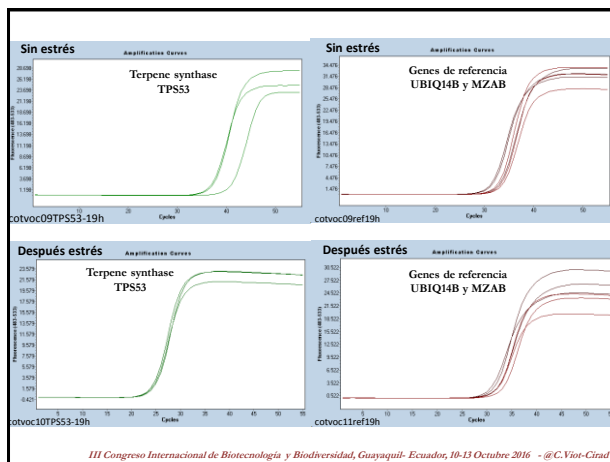
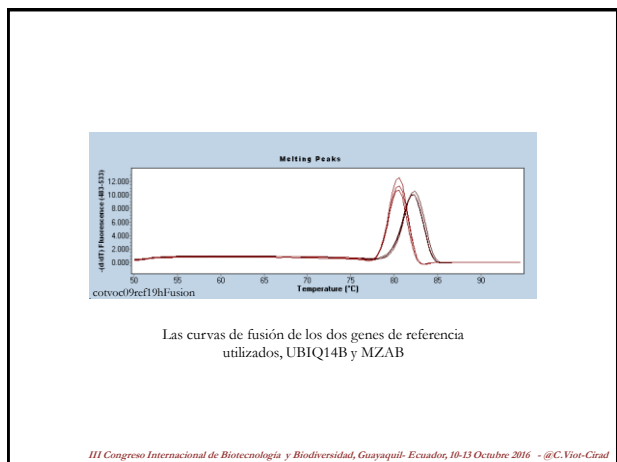
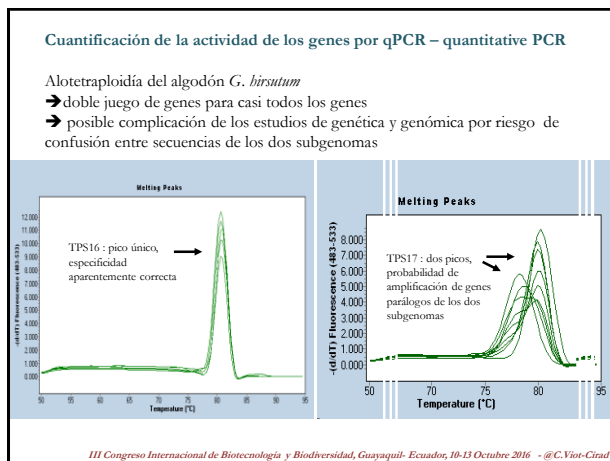
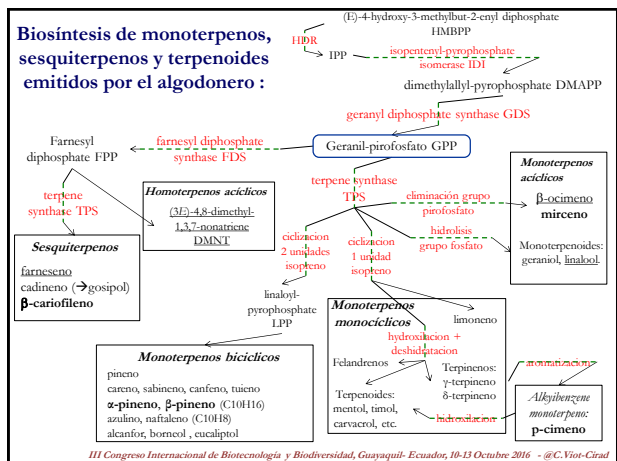
Análisis COVs



Principales compuestos orgánicos volátiles emitidos por el algodón *Gossypium hirsutum* en reacción a un ataque de herbivoría

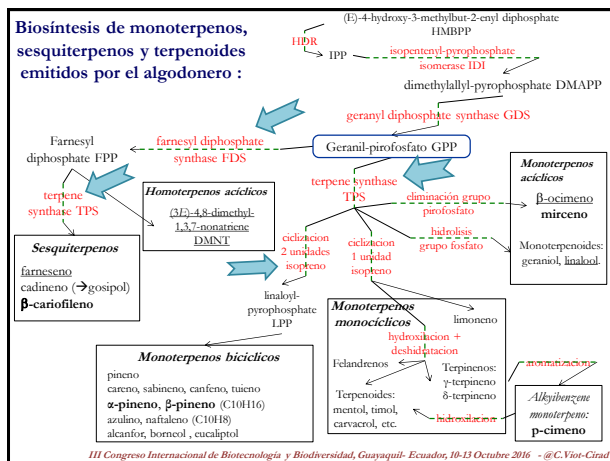
De: Marchand et al 2015.

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad



	Diferencia de expresión de ARNs después del estrés
TPS53	x 744
TPS76	x 110
TPS85	x 8.5
TPS16	x 8.1
TPS18	x 6.8

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad



Conclusiones

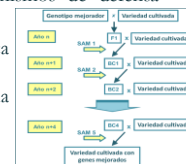
- Las plantas del algodónero *Gossypium hirsutum* reaccionaron al estrés artificial simulando un ataque de artrópodo herbívoro por una fuerte estimulación de la producción de ARNs de genes del metabolismo de los terpenoides.
- Los genes estimulados son ubicados al inicio de las vías metabólicas conduciendo a los 5 principales compuestos volátiles identificados por los análisis de cromatografía.

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Orientaciones y metas

Meta esencial : apoyar al mejoramiento genético del algodón *Gossypium hirsutum* con respecto a los mecanismos de defensa natural contra artrópodos:

- ➔ Caracterización de la variabilidad genética dentro del germoplasma mejorado actual
- ➔ Posibilidades para una selección asistida por marcadores.



En relación con estas metas, las etapas próximas incluyen :

- ➔ Estudio profundizado de las modificaciones de la expresión de ARNs en reacción a la herbivoría
- ➔ Exploración de los germoplasmas de variedades antiguas y de genotipos silvestres para genes permitiendo mejorar estos mecanismos de defensa natural.

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

Muchas gracias por su atención

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES, DEFENSA NATURAL DEL ALGODÓN *Gossypium hirsutum* L. MEJORABLE GRACIAS A LA BIOTECNOLOGÍA.

Ronald Villamar^{1,2,3}, Gabriel Liu-Ba^{4,5}, Thierry Legavre², Christopher Viot²

¹Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT), Ecuador.

²UMR AGAP, Equipe Génétique et Sélection, Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement - CIRAD, Av. Agropolis, 34398 Montpellier, France; villamar@montpellier.inra.fr; chris.viot@cirad.fr

³ Université de Montpellier, France.

⁴ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador.

⁵ Doctorante del Programa en Ciencias Agropecuarias, mención Fitomejoramiento - Universidad Nacional de Colombia - Sede Palmira.

RESUMEN

La sostenibilidad de la agricultura, incluyendo la reducción de los costos de producción, y la adaptación a normas más estrictas para la salud de los agricultores y de las poblaciones y para el medioambiente en las regiones de cultivo, son grandes desafíos modernos tomados en consideración por los fitomejoradores. Para reducir las pérdidas en cantidad y calidad de la producción al mismo tiempo que la dependencia a productos fitosanitarios de síntesis, una opción desarrollada nuevamente, es utilizar mejor los mecanismos naturales de defensa de las plantas. El CIRAD investiga las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COVs) por las plantas de algodón de la especie *Gossypium hirsutum* L., la más cultivada a escala mundial, y atacada por una gran diversidad de plagas. Después de heridas artificiales imitando un ataque de artrópodo, en invernadero, observamos por cromatografía cambios de emisión de COVs particularmente para cuatro moléculas de la clase terpenos, parcialmente idénticas a aquellas emitidas en reacción a ataques de artrópodos. Simultáneamente los cambios de las frecuencias de ARNs correspondiendo a enzimas de la biosíntesis de los terpenos son caracterizados en PCR cuantitativa gracias a cebadores diseñados para ser altamente específicos. Las experimentaciones estudian la evolución temporal después de la herida y la variabilidad en el germoplasma cultivado y en los recursos genéticos de la especie. Nuestros primeros resultados muestran la posibilidad de apoyar con la genética molecular la creación varietal algodónera en relación con los mecanismos de defensa natural contra los artrópodos depredadores.

Palabras clave: Protección vegetal, Fitomejoramiento, Compuestos Orgánicos Volátiles, *Gossypium hirsutum*.

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

- Diapositiva 1 -
Presentación

- Diapositiva 2 -
Plano de la ponencia

- Diapositiva 3 -
El algodón moderno es un cultivo anual, obtenido por domesticación de plantas arbustivas naturalmente perennes
El producto es la fibra de algodón, base de uno de los comercios y una de las industrias más importantes a nivel mundial
Cultivo tropical necesitando mucha mano de obra, el algodón tiene una gran importancia para millones de familias rurales en países más o menos desarrollados
Es uno de los cultivos más atacados por plagas, en particular artrópodos: sea el follaje, sea los botones florales y las capsulas. Eso además de enfermedades y plagas del suelo tales como fusariosis, nematodos. Significa riesgos de pérdidas de cosecha.
El algodón necesita una intensa protección química

- Diapositiva 4 -
En consecuencia de la necesidad de muchos pesticidas: dificultades y costos de cultivo, riesgos para salud humana y medio-ambiente

- Diapositiva 5 -
Los algodóneros tienen defensas naturales contra los depredadores.
Defensa directa por toxicidad: el sesquiterpenoide Gossipol es altamente tóxico cuando ingerido. Defensa contra larvas de noctuidas en particular.
Las glándulas de gossipol son una defensa eficaz pero insuficiente.
Hay otras defensas naturales de los algodóneros: por ej. los pelos sobre hojas y tallos, pero eso contra artrópodos « picadores-chupadores ».

- Diapositiva 6 -
Sistema de defensa de las plantas por mensajes químicos volátiles = sistema natural de defensa poco estudiado, empezando de ser tomado en consideración en los programas de protección de los cultivos y de mejoramiento varietal sólo desde hace 20 años
➔ Es el objeto de nuestro proyecto de investigación. Se hablará hoy de la parte de genética molecular, de las metodologías y los resultados.

- Diapositiva 7 -
Buscamos elucidar las bases genéticas de los mecanismos de emisión de COVs, estudiar la diversidad en el germoplasma y las consecuencias de la selección humana, en particular en el período reciente y con el uso masivo de plaguicidas de síntesis, provocando una menor necesidad de resistencias naturales, y los efectos de la domesticación en general

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

- Diapositiva 8 -
La bioinformática es esencial en el proyecto y utiliza las bases de datos sobre enzimas, las secuencias anotadas de los algodóneros, los datos de las especies-modelos.

- Diapositiva 9 -
El germoplasma estudiado busca cubrir una diversidad geográfica de variedades cultivadas actuales y una diversidad temporal hacia variedades antiguas, en África o EEUU, esperando poder caracterizar una evolución bajo la domesticación más y más intensa en condiciones de cultivo más y más artificializadas

- Diapositiva 10 -
Las experimentaciones estudian los efectos de la herbivoría (simulada) sobre :
Emisión de COVs : captura de COVs por dispositivos especiales
Cambios del transcriptoma : extracción de ARNs y estudio de los cambios de expresión de genes ligados al metabolismo de los terpenoides
Se relaciona los dos conjuntos de datos : ARNs y COVs, para elucidar las bases genéticas de la reacción de emisión de COVs

- Diapositiva 11 -
Se concibió cebadores ADN a partir de un bisqueado sobre los genes de *Terpene synthase*, en especies-modelos y gracias a las anotaciones de la secuencia de *Gossypium raimondii* (Paterson 2012).
Se probó la presencia de genes correspondientes, por la producción en PCR de amplicones de la longitud adecuada (incluyendo el primer intron).
Se averiguó la eficacia de los pares de cebadores en PCR cuantitativa.

- Diapositiva 12 -
Los estudios muestran que unos COVs son emitidos en más grandes cantidades después de heridas provocadas por artrópodos o artificiales.

- Diapositiva 13 -
El esquema muestra las vías de biosíntesis para los terpenoides involucrados dentro del estudio
Empieza con el Geranyl-pirofosfato GPP
En negrita: las moléculas identificadas en emisiones por el algodónero en reacción a herbivoría
Subrayado : otras moléculas importantes
En rojo en el esquema = enzimas transformando una molécula en la otra según indicado por las flechas
(Hay unos nombres en español y otros en inglés: díctalos)
Como se ve, es bastante complicado (y aun es un pequeño parte de los moléculas del grupo terpenoides vegetales)
Se identificó las enzimas claves para las diferentes vías de síntesis ; enzimas que podrían ver su cantidad aumentar en caso de reacción al estrés, para la producción de los compuestos orgánicos volátiles
En tal caso, los ARNs correspondientes tienen que ver su producción aumentada
Así, los genes de la reacción al estrés podrían ser identificados

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viot-Cirad

- Diapositiva 14 -

La PCR cuantitativa es una de las herramientas centrales en este estudio, permitiendo medir las cantidades de ARN de genes determinados

Se necesita cebadores ADN específicos para los genes que se busca estudiar

La aleloplaidia del algodón, la duplicación de genes y aun los pseudo-genes pueden inducir confusiones

se prefieren cebadores dando una alta especificidad

pico simple de la curva de fusión del amplicon ; sin embargo puede variar el tamaño exacto según el genotipo (polimorfismo)

curvas de fusión con picos múltiples pueden significar : genes amplificados en los dos subgenomas, genes muy parecidos

Aun con picos múltiples, se puede estudiar cambios de expresión y afinar si deseable la definición de los cebadores

- Diapositiva 15 -

Se utiliza, para la evaluación de las cantidades de ARN, genes de referencia que suelen tener una expresión estable a lo largo del tiempo y pese a cambios medioambientales.

Se observa buena especificidad aparente para los dos genes de referencia utilizados, UBIQ14B y MZAB

- Diapositiva 16 -

Las curvas de amplificación de genes muestran una muy importante diferencia de producción de ARN después del estrés (1-2 días después) para un gen, el TPS53.

Abajo izquierda, su amplificación es mas precoz, entonces había mas ARN. Mientras tanto, los genes de referencia no cambiaron su expresión ARN. Hay tres genotipos de algodón probados cada vez.

Las curvas de amplificación y los Cp de los genes de referencia varían por supuesto un poco con el genotipo y la concentración del extracto de tejidos muestreos que no se ajusta a un nivel perfectamente igual entre muestras

Entonces, hay estabilidad para los genes de referencia, mientras hay un cambio total para el gen de sintasa de terpeno TPS53, expresado mucho más después del estrés, como lo atesta la curva de amplificación arrancando mucho más precozmente

- Diapositiva 17 -

Los dos genes de referencia utilizados quedaron estables en expresión y permiten calcular los cambios en genes estudiados gracias a unos cálculos utilizando la eficacia observada de amplificación para cada gen (y el efecto del ciclo circadiano).

Más datos serán dados en la publicación prevista para fines del año

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viott-Cirad

- Diapositiva 18 -

En el mismo esquema ya presentado de las vías de biosíntesis para los terpenoides involucrados dentro del estudio, indicamos con flechas azules las enzimas para las cuales la producción de ARNs fue intensificada en plantas estresadas por un ataque simulado de herbivoría.

Así, la búsqueda por bioinformática y la selección por amplificación del ADN nos permitieron identificar una parte de los genes involucrados en la reacción de emisión de los compuestos orgánicos volátiles

Se nota que no son específicos, de los COVs involucrados ; los genes que aumentaron su expresión producen enzimas que alimentan sectores grandes de la biosíntesis de los terpenos

- Diapositiva 19 -

La identificación de genes que reaccionan al estrés y que son directamente ligados al metabolismo de los terpenoides emitidos después del estrés permite encarar un mejoramiento varietal de estas defensas naturales con ayuda de la genética molecular.

Se supone que existen diferencias dentro del germoplasma mejorado moderno: experimentaciones permiten sospechar en ciertas variedades difundidas un funcionalidad menor de estas defensas naturales.

- Diapositiva 20 -

Orientaciones de las experimentaciones próximas:

estudio profundizado de las modificaciones de la expresión de ARN: RNA-seq diferencial entre plantas sin estrés y plantas después de estrés.

búsqueda para caracterizar genes específicos correspondiendo a los COVs : bioinformática, genómica translacional (datos de otras especies, especies-modelos tales como *Arabidopsis thaliana*)

exploración de los germoplasmas de variedades antiguas y de genotipos silvestres actual : emisión de COVs y expresión génica.

III Congreso Internacional de Biotecnología y Biodiversidad, Guayaquil- Ecuador, 10-13 Octubre 2016 - @C.Viott-Cirad