Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

Argentinien/Argentina, Mendoza, Parque General San Martín (Prov. Mendoza), Franz Xaver

Marco Dalla Rizza
Coordinación Unidad de Biotecnología
INIA Las Brujas
mdallarizza@inia.org.uy

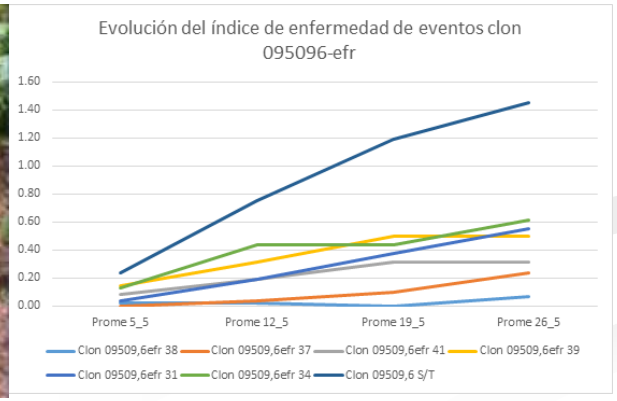
Miércoles 3 de Mayo de 2017

INIA
URUGUAY

Alternativas para el manejo de enfermedades mediante transgenia de plantas en nuestro país

Reseña de la charla:

- Biotecnología en INIA
- Técnicas de mejoramiento genético
- Resistencia a *Rasltonia solanacearum*: Papa-EFR
- Estrategias moleculares de resistencia al hongo *Claviceps paspali* en *Paspalum dilatatum* cv Chirú



INIA URUGUAY

Biotecnología

Actividad basada en conocimiento multidisciplinario que emplea recursos biológicos para obtener productos útiles, acelerar procesos, brindar alternativas productivas.

•Rol integrador de conocimiento
(biología, patología, genética, mejoramiento, gestión, etc.).

•Potencial como acelerador de procesos
(propagación *in vitro*, mejoramiento asistido por marcadores, etc.).

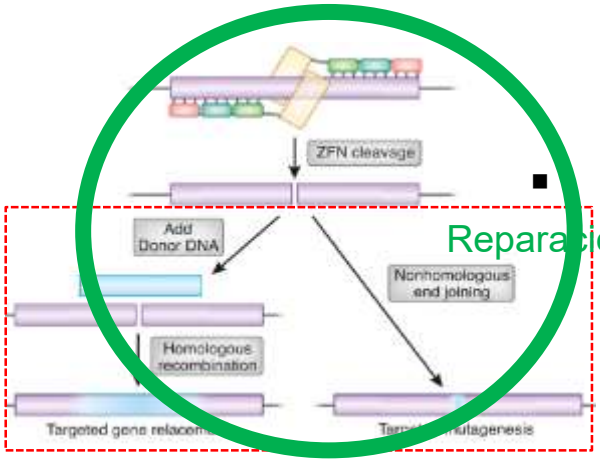
•Impulso innovador y generador de alternativas tecnológicas
(rescate de embriones, granjas moleculares, selección genómica etc.).

Dos revoluciones tecnológicas de las cuales somos testigo:
- secuenciación de genomas
- capacidad de transferir genes

EL CONTEXTO DE LA CIENCIA, era biotecnológica

- Capacidad para leer genomas
  - Salto tecnológico:
    - Secuenciación, genotipado por SNP
    - Costos decrecientes
    - Incorporación de la Selección genómica

- Nuevas herramientas de transformación genética
- **Edición de genomas (ZFNs, TALENs, CRISPR-CAS):**



- Reparación

modificaciones de ADN precisas y eficientes

inducción de roturas de la doble hebra de ADN blanco

estimulación del mecanismos propios de reparación celular

contiene solamente la secuencia en el sitio blanco y mantiene la estructura original del locus de inserción

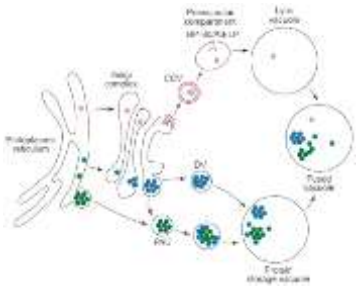
Estrategia de INIA en mejoramiento genético

- desarrollar germoplasma adaptado a condiciones locales

- permitir la incorporación de tecnologías convenientes

- promover el fortalecimiento de proyectos locales y/o regionales en el área de biotecnologías agropecuarias

- La política de alianzas estratégicas de INIA es abierta, garantizando el libre acceso a varias tecnologías consideradas relevantes desde el punto de vista de la producción, sustentabilidad de los sistemas o diversificación de mercados.



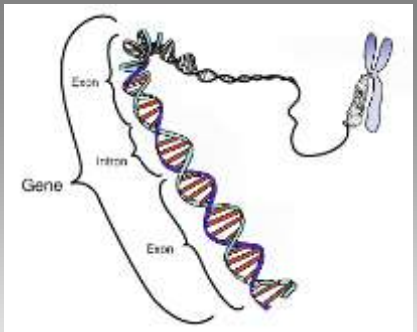
La domesticación produce cambios:

- La soja cultivada difiere de la silvestre en 186.177 inserciones/deleciones de ADN

- 4.444 variaciones de presencia/ausencia de más de 500 pb faltan en la domesticada
- 1148 variaciones de presencia/ausencia de más de 500 pb faltan en la silvestre
- difieren en 856 genes
- 28 fragmentos de genes ausentes en todas las domesticadas relacionados con resistencia a enfermedades o metabolismo

Lam et al., 2010. Nature Genetics, 42: 1053-1059

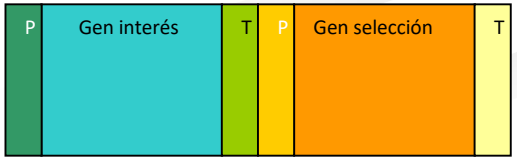
Biotecnología



Un **organismo genéticamente modificado** (**OGM**) es un organismo cuyo material genético ha sido alterado usando técnicas de ingeniería genética. La ingeniería genética permite modificar organismos mediante la inserción de uno o varios genes en el genoma. Estos organismos son la fuente de los alimentos genéticamente modificados y también son empleados en investigación para generar conocimiento biológico.

Material genético: está compuesto por una secuencia codificante (el gen de interés) y por secuencias regulatorias. Las **secuencias regulatorias** son los **promotores (P)** que determinan el momento, lugar y nivel de expresión de cada gen y los **terminadores (T)**, que indican la terminación de la transcripción (proceso que interviene en la expresión del gen).

Un gen es una unidad de información dentro del genoma que contiene todos los elementos necesarios para su expresión de manera regulada.

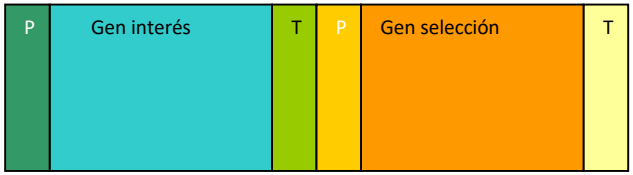


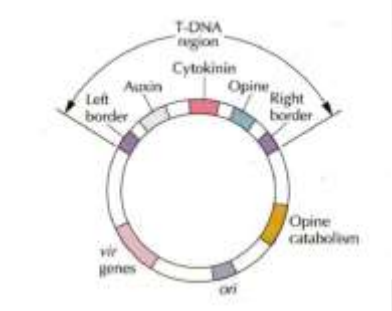
Métodos de transformación de plantas

a) Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: un vector biológico que participa de la transferencia;

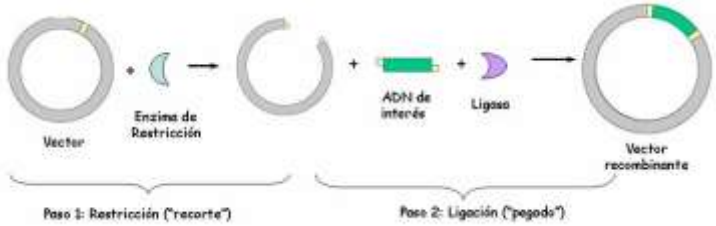
b) Métodos de transformación genética directos: por distintos mecanismos físicos se introduce el ADN en la célula.

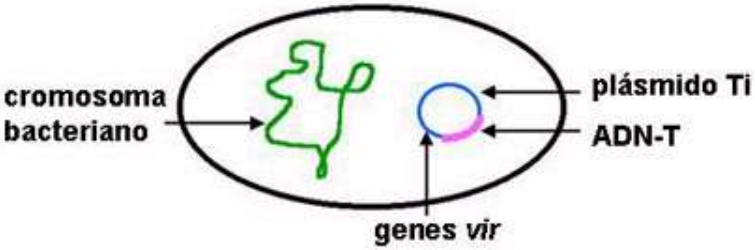
c) Métodos basados en daño y reparación celular: ZNF, TALEN, CRISPR-CAS





El gen que va a ser transferido o *transgén* está compuesto por una secuencia codificante (el gen de interés) y por secuencias regulatorias. Las secuencias regulatorias son los **promotores (P)** que determinan el momento, lugar y nivel de expresión de cada gen y los **terminadores (T)**, que indican la terminación de la transcripción (proceso que interviene en la expresión del gen).





Representación de los pasos de restricción y ligación para clonar un fragmento de ADN en un vector

Cuadernos de Biotecnología, Nros 18, 67.

MEJORAMIENTO GENÉTICO Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Métodos tradicionales de transformación:

No controla inserción del transgén:

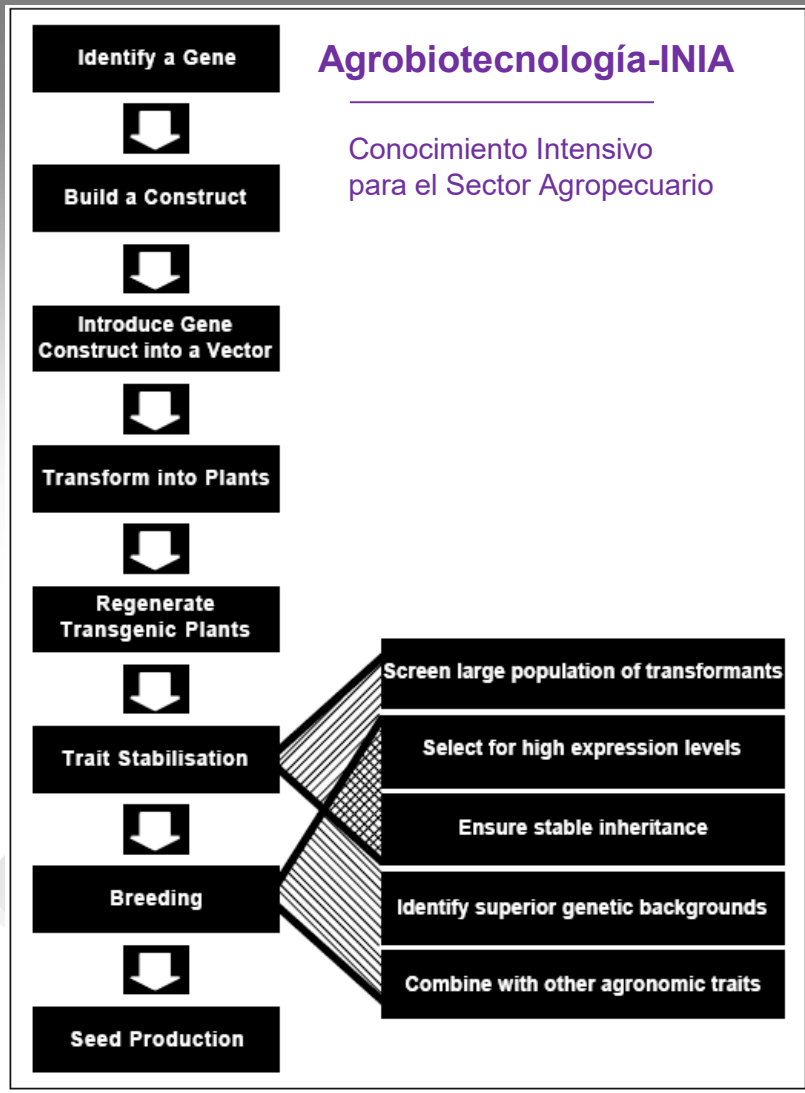
- múltiples sitios de inserción
- dosificación variable a cada sitio de inserción
- altamente heterogénea para el nivel de expresión

La ingeniería genética y Fitomejoramiento:

(i) evaluación de una gran población de eventos primarios para identificar aquellos con altos niveles de expresión del gen insertado

(ii) evaluación en la progenie de estos eventos iniciales para estabilizar la herencia y altos niveles de expresión y

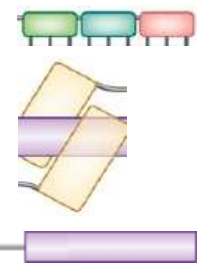
(iii) identificar las bases genéticas que aumentan el nivel de expresión



Woodfield D. and D. White Breeding strategies for developing transgenic white clover cultivars. Agronomy Society of New Zealand Special Publication No. 11 / Grassland Research and Practice Series No. 6.

MEJORAMIENTO GENÉTICO Y NUEVAS HERRAMIENTAS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Edición de genomas (Genome editing; ZFNs, TALENs, CRISPR): Características:



-No presentarían ninguna parte del cassette de la técnica (gene SDN y ADN donante) o cualquier ADN donante integrado en loci no blanco.

-Contiene solamente la secuencia en el sitio blanco y mantiene la estructura original del locus de inserción.

-Puede ser usado para transgénesis, intragénesis y cisgénesis.

-Puede optimizar el ambiente genómico para la expresión génica: puede ser diseñado para agregar o intercambiar genes específicos en sus loci nativos (pej, reemplazando un gene de resistencia a enfermedades con otro del mismo pool de genes o agregando uno a un cluster existente).

-Disminuye el peligro asociado a disrupción de genes y/o elementos regulatorios en el genoma recipiente.

-Se puede flexibilizar el requerimiento de datos –caso a caso- para el análisis de riesgos.

Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas

Marchitamientos vasculares

- Medidas culturales, químicas y biológicas son ineficientes.

- Búsqueda de estrategias efectivas de control a través de **resistencia genética**.

- Sistema vascular: vasos xilemáticos, elementos traqueales de transporte de agua y minerales, elementos floemáticos de transporte de productos fotosintéticos.

- Paradójicamente, aunque el floema es rico en azúcares la mayoría de los patógenos vasculares colonizan los vasos xilemáticos pobres en nutrientes.

- Especies anuales y perennes.

- Generalmente pasan el invierno en el suelo, rastrojo de plantas, cursos de agua o en insectos vectores.

- La mayoría de los patógenos vasculares son trasmitidos por el suelo y penetran por las raíces via heridas o grietas que aparecen en la zona de formación de raíces laterales, algunos entran por estomas de hojas e hidatodos como en *Xanthomonas oryzae*. Otros son depositados directamente en el xilema por insectos vectores (*Xylella fastidiosa*).

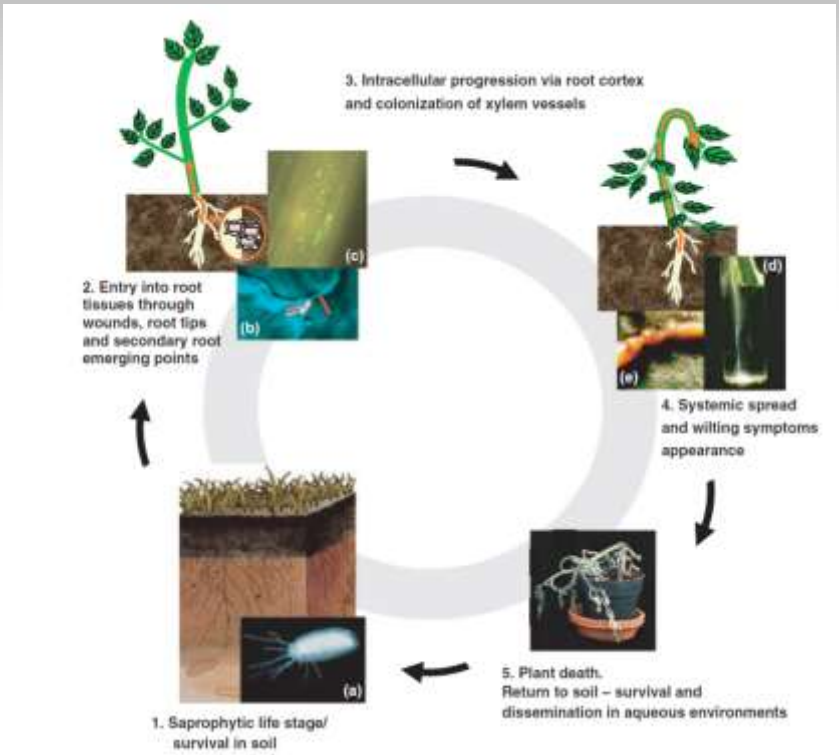
Table 1 | Publically available genome sequences of vascular wilt pathogens.

Organism	Species	Reference
Fungus	*Verticillium dahliae*	Klosterman et al. (2011)
	Verticillium albo-atrum	Klosterman et al. (2011)
	Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*	Ma et al. (2010)
Bacterium	*Ralstonia solanacearum*	Salanoubat et al. (2002)
	Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*	Lee et al. (2005)
	Xanthomonas campestris pv. *campestris*	Qian et al. (2005)
	Xylella fastidiosa	Simpson et al. (2000)
	Clavibacter michiganensis ssp. *michiganensis*	Gartemann et al. (2008)
	Erwinia amylovora	Sebaihia et al. (2010), Smits et al. (2010), Powney et al. (2011)
Oomycete	*Pythium ultimum*	Lévesque et al. (2010)

Yadeta KA and Thomma BPHJ (2013) The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. Front.Plant Sci. 4:97.

Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas

Murchera de la papa (BW) causado por *R. solanacearum*



Genin, 2010

En el mundo: Raza 1, prevalece en climas cálidos
Raza 3, de climas templados
UY 031: R3B2 -filotipo IIB, secuevar 1 (IIB-1) (Siri et al. 2011)

Factores de virulencia

- producción de Exopolisacáridos (EPS)
- múltiples enzimas de degradación de la pared celular (EDPC)

Regulación de la virulencia en bacterial wilt

- la expresión de los factores de virulencia depende de la densidad poblacional celular (quorum sensing)

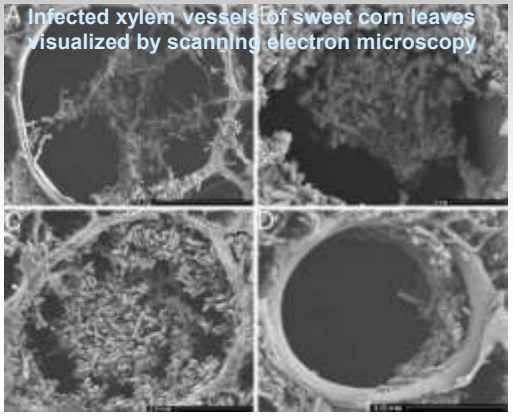
- **conversión de fenotipos**: de *fenotipos móviles* (optimizados para sobrevivencia en el suelo y reconocimiento e invasión de la planta) a *fenotipos no móviles* que producen EPS, presumiblemente adaptado a ciclo parasitario en la planta.

- producción de efectores de tipo III (TTE) esenciales para suprimir el reconocimiento y respuesta de defensa de la planta
- la bacteria alcanza alta densidad poblacional en la cavidad intercelular donde se da la conversión de fenotipo. Actividad de las EDPC importante y posteriormente EPS.

- 3-Hydroxypalmitic acid methyl ester (3-OH PAME) actúa como molécula señal de quorum-sensing (i.e. quormone) y por lo tanto es esencial para la red de reacciones que regulan la virulencia de *R. solanacearum.*

Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas

Murchera de la papa (BW) causado por *R. solanacearum*



Maria D. Koutsoudis et al. PNAS 2006;103:5983-5988

Sylvie Priou, P. Aley, L. Gutarra, A. Salas & M. Vargas CIP, Lima, Peru (2005) Characterization of promising sources of high levels of resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in wild species of potato. APS Annual meeting.

Por qué es importante trabajar en Bacterial Wilt?

- Es un patógeno cuarentenario, en USA considerado agente de Bioterrorismo
- Tiene alto rango de huéspedes (más de 200 especies)
- Distribución geográfica amplia (en papa más de 40 países)
- El control químico es inefectivo
- No existe resistencia genética
- Se disemina en forma latente a través de tubérculos infectados
- Permanece en el rastrojo de cultivos y suelos, se trasporta por el agua.

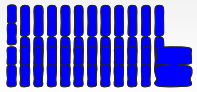
MEJORAMIENTO GENÉTICO

Búsqueda de resistencia genética, papa-*Ralstonia solanacearum*

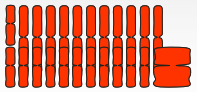
Esquema Cruzamientos Gametas 2n Programa de mejoramiento INIA Las Brujas

cmm x phu

(2n=2x ; 1 EBN) 2n=2x ; 2 EBN)



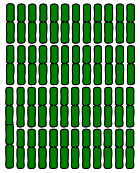
2n=2x=24



2n=2x=24

F1-(cmm x phu) x tbr

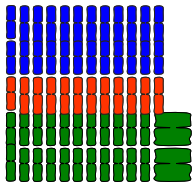
(2n=3x ; 2 EBN) (2n=4x ; 4 EBN)



2n=4x=48

BC1-(F1 x tbr) x tbr

(2n=5x ; 4 EBN) (2n=4x ; 4 EBN)



2n=5x=60

BC1

BC2

Cortesía: F.Vilaró , M. González, G. Galván. INIA-Fagro
A. Vaco, M. Giambiasi and P. Speranza. Laboratory of Plant Genetics Evolution and Domestication, Fagro-UdelaR

- F1 (cmm x phu) 3x (2004-06)
- BC1 (F1 x tbr) 5x (2008)
- BC2 (BC1 x tbr) 4x-5x (2009)
- BC3 (BC2 x tbr) 4x (2011)

- Gran número de plantines para obtener una variedad (10^3-10^{5-6})
- Arrastre de ligamiento (pej, tipo y cantidad de glicoalcaloides)

Incorporando resistencia genética a enfermedades bacterianas en el germpoplasma de papa y tomate *Ralstonia solanacearum y Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance

nature biotechnology

Séverine Lacombe[1,5,6], Alejandra Rougon-Cardoso[1,5,6], Emma Sherwood[1,5,6], Nemo Peeters[2], Douglas Dahlbeck[3], H Peter van Esse[4], Matthew Smoker[1], Ghanasyam Rallapalli[1], Bart P H J Thomma[4], Brian Staskawicz[3], Jonathan D G Jones[1] & Cyril Zipfel[1]

Nature Biotechnology 2010, 4:365-369

Alternativa complementaria para buscar otras fuentes de resistencia: adquisición de resistencia mediante ingeniería genética para la sobreexpresión de 'genes de defensa'

✓**Receptor EFR**: Elongation Factor-Tu Receptor: receptor de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) exclusivo de la familia *Brassicaceae*

✓El ligando-**PAMP** es un fragmento del factor de elongación EF-Tu

✓ Genes de resistencia parcial brindan una resistencia más duradera/indefinida y pueden combinarse con otros genes.

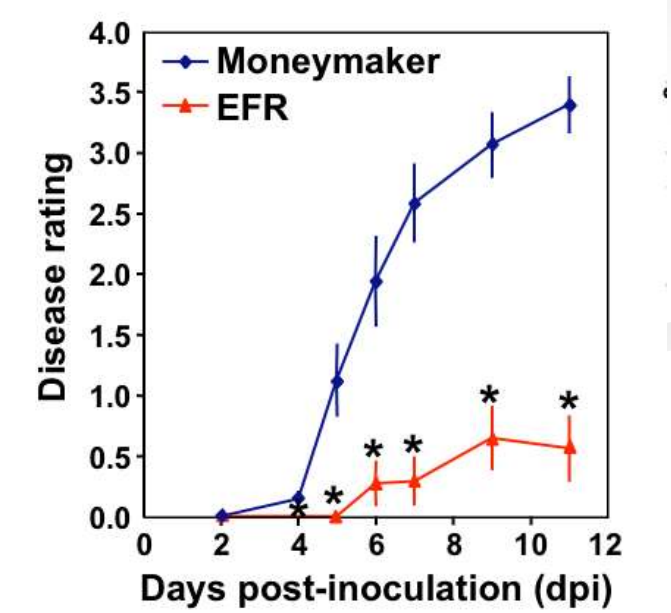
✓ Transformación mediada por *A. tumefaciens*

Incorporando resistencia genética a enfermedades bacterianas en el germpoplasma de papa y tomate *Ralstonia solanacearum y Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*

La sobreexpresión de EFR confiere resistencia a un amplio rango de bacterias patógenas:

- *N. benthamiana* — *Psudomonas syringae pv. syringae*
  P. syringae pv. tabaci
  Agrobacterium tumefaciens

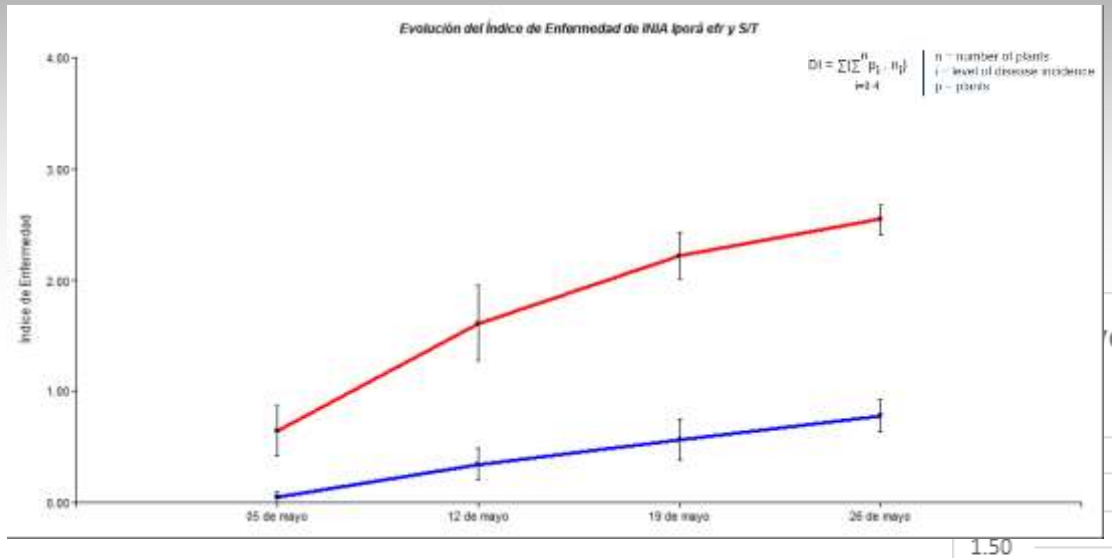
- Tomate (Moneymaker)
  Ralstonia solanacearum
  Xanthomonas perforans
  (ex. X. axonopodis pv. vesicatoria)

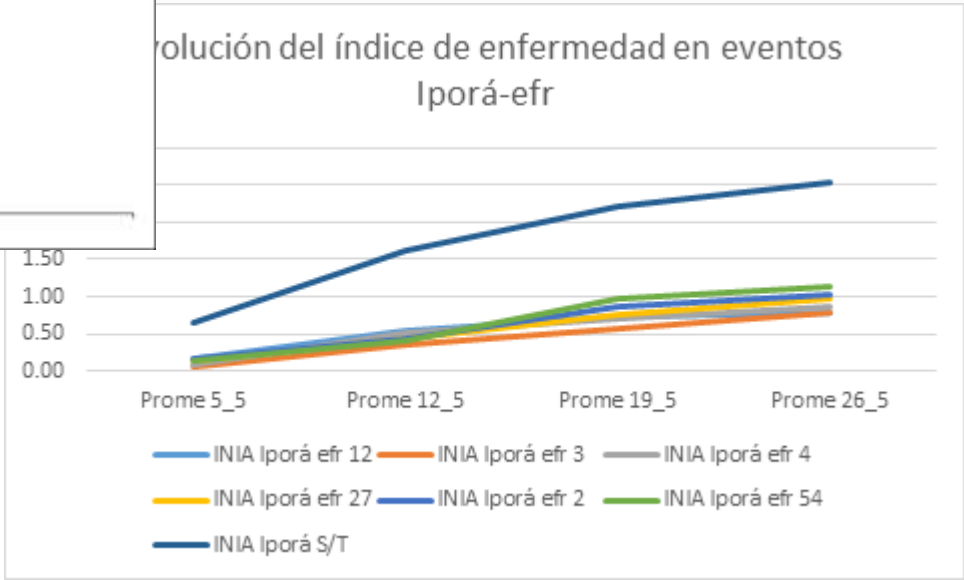


Lacombe et al, Nature Biotechnology 2010, 4:365-369

Ralstonia solanacearum GMI1000

Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas

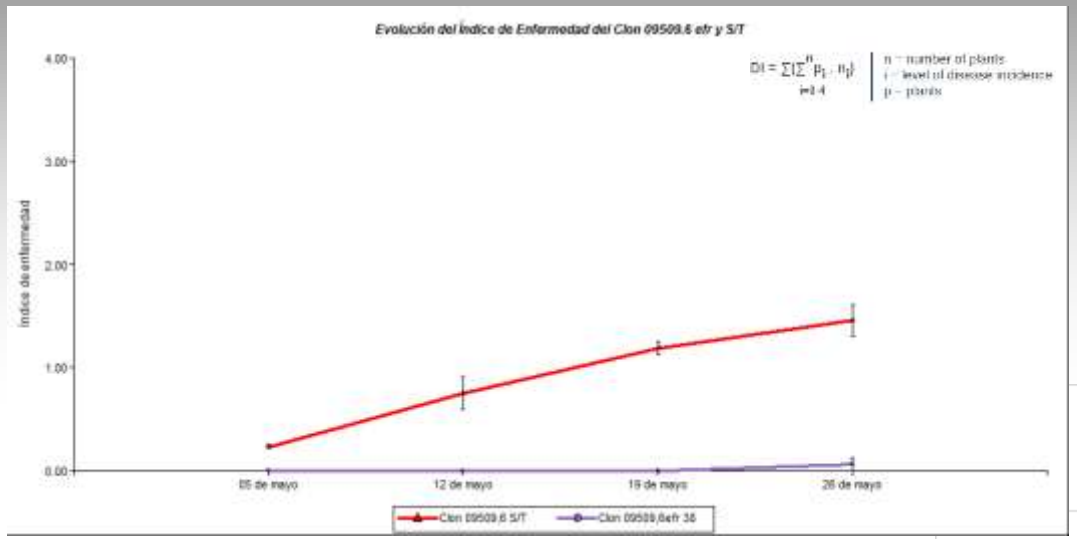


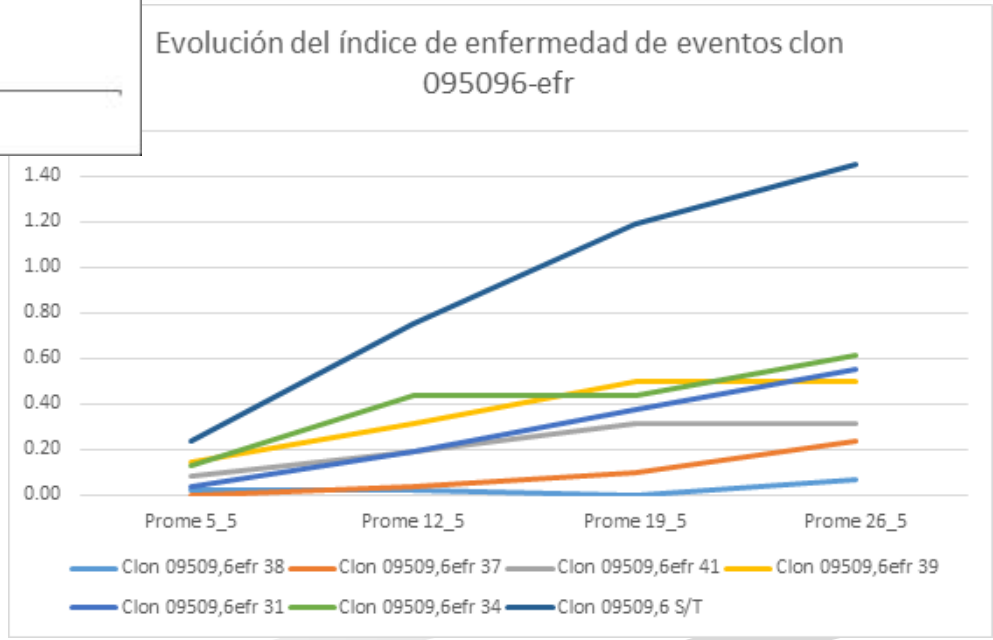


INIA Iporá vs INIA Iporá-EFR

- el receptor EFR en la papa está reconociendo la presencia de *R. solanacearum*
- el ABC es sensiblemente inferior en la papa-EFR
- en las diferentes líneas transformadas existe una tendencia similar de respuesta

Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas



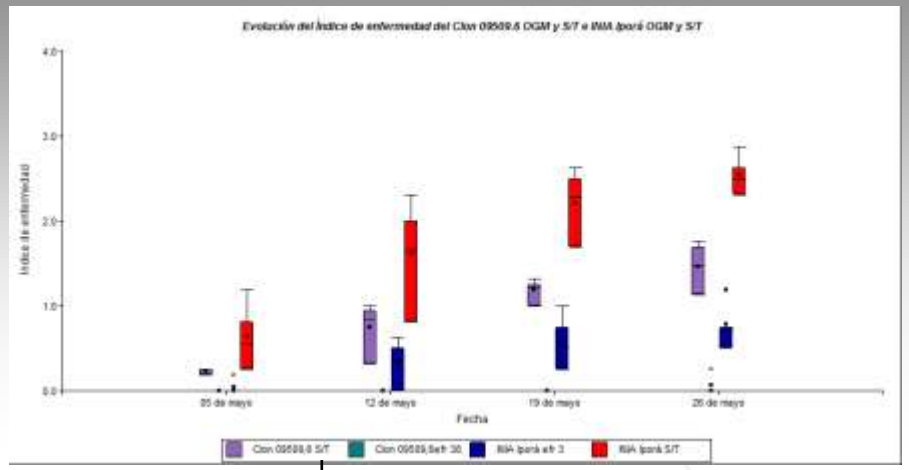


INIA Iporá vs Clon 09509.6-EFR

- el receptor EFR en la papa está reconociendo la presencia de *R. solanacearum*
- el ABC es sensiblemente inferior en al clon-EFR
- en las diferentes líneas transformadas del clon existe una tendencia muy diferente de respuesta: presencia de múltiples genes de defensa introgresados vs inserciones diferentes vs expresión diferencial vs número de copias
- el ABC en el clon c/s transformar es inferior en relación a INIA Iporá c/s transformar

- existe otra proteína de membrana similar a BAK1 en papa para la activación del gene EFR?
- EFR potencia el background genético de la planta

Biotecnología: extendiendo los recursos genéticos y tecnológicos en la defensa de plantas



EVALUACIÓN DE LATENCIA, resultados preliminares

LATENCIA EN TALLO	REPETICIONES	PCR	COLONIAS CRECIDAS
Ipora efr_3	1	-	< 10 ufc/ml de extracto
	2	-	< 10 ufc/ml de extracto
	3	-	< 10 ufc/ml de extracto
	4	-	< 10 ufc/ml de extracto

LATENCIA EN TALLO	REPETICIONES	PCR	COLONIAS CRECIDAS
09.509.6 efr_38	1	+	$1{,}0 \times 10^2$ ufc/ml de extracto
	2	+	$3{,}8 \times 10^2$ ufc/ml de extracto
	3	-	< 10 ufc/ml de extracto
	4	-	< 10 ufc/ml de extracto

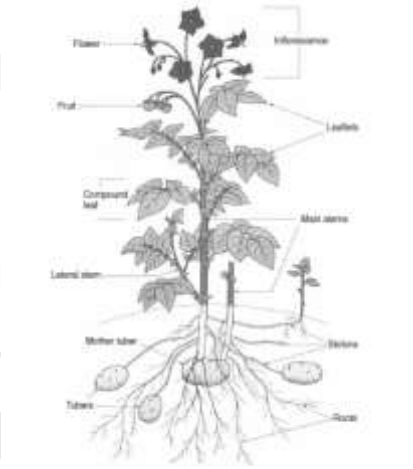


FIGURE 1.1. Stylized illustration of a cultivated potato plant. Drawing courtesy of the International Potato Center. See Plate 1.1 in the color gallery.

Latencia en el tallo:

- marcada disminución de presencia bacteria cercana a la zona de inoculación
- comportamiento similar en INIA Iporá y el clon
- la bacteria no logra la densidad de población celular para la expresión de factores de virulencia (EPS-EDPC)

- existe un comportamiento diferencial de respuesta entre INIA Iporá y el clon?
- el clon 'tolera' más la presencia del patógeno?

ATN/KF-13883-UR, ´VINCULACIÓN DE LA DIÁSPORA CALIFICADA CON SECTORES INTENSIVOS EN CONOCIMIENTO, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN DE URUGUAY´

Argentinien/Argentina, Mendoza, Parque General San Martín (Prov. Mendoza), Franz Xaver

Estrategias moleculares de resistencia al hongo *Claviceps paspali* en *Paspalum dilatatum* cv 'Estanzuela Chirú' para viabilizar su cultivo en Uruguay.

Grupo de trabajo:

Héctor Oberti (Estudiante de Maestría)
Matías Maidana (Estudiante de Doctorado)
Claudia Schvartzman (MSc.)
Sara Murchio (Técnico)
Silvia Garaycochea (Estudiante de Doctorado)
Fernando Lattanzi (PhD)
Rafael Reyno (PhD)
Marco Dalla Rizza (PhD)
Germán Spangenberg (PhD)

INIA URUGUAY

Agriculture Victoria
Department of Economic Development, Jobs, Transport and Resources

Paspalum dilatatum Poir. (Dallisgrass, pasto miel, pata de gallina)

http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/SSD/Malezas/Paspalum_distichum/Index.html

- Giordano et al. (2014b): El biotipo predominante encontrado tiene anteras púrpuras y reproducción apomíctica (2n = 50) ampliamente dispersado en Sud América, y otras partes del mundo incluyendo China, USA, India, Japón, Nueva Zelanda, Australia y Sud Africa.

- El biotipo monoclonal Chirú pertenece al grupo Dilatata (*Paspalum*, *Poaceae*), es facultativa apomíctica, cuya fórmula genómica hexaploide es 2n = 6x = 60 (IIJJXX) (Millot, 1977; Burson, 1991). *P. dilatatum* cv. Primo es un cultivar tetraploide sexual (IIJJ) con resistencia a *C. paspali* proveniente de *P. urvillei*, y *P. dilatatum* cv. Relincho, es un cultivar sexual pentaploide (IIJJX).

- En la reproducción apomictica, las semillas son producidas sin la fertilización sexual, generando progenies uniformes que son genéticamente idénticas a sus padres.

- Giordano et al. (2014a): la calidad del forraje de *Paspalum dilatatum* (dallisgrass) es mayor que la de otras especies de pasto C4. Dallisgrass produce rendimientos de hasta 15 toneladas de materia seca por hectárea (Cook et al., 2005) con concentraciones de proteína cruda de hasta 18.6% (Barea et al., 2007). Puede soportar un pastoreo intenso y es algo tolerante a heladas y al estrés hídrico (Hutton y Nelson, 1968, Robinson et al., 1988).

- Susceptible al ergot, *Claviceps paspali*, que a menudo conduce a un bajo número de semillas y la intoxicación por ganado.

Paspalum dilatatum Poir. (Dallisgrass, pasto miel, pata de gallina)

http://www.plantasyhongos.es/herbarium/fungi/Claviceps_paspali_01.jpg

Componentes de la interacción polen-pistilo vegetal como modelo para la infección por *Claviceps-Paspalum*

TUDZYNSKI AND SCHEFFER (2004)

- *Claviceps purpurea* es un patógeno ubicuo de cereales y pastos

- Muestra estricta especificidad de órganos, atacando exclusivamente ovarios jóvenes de gramíneas.

- *Probablemente por mimetismo de los tubos de polen:* no se conocen genes de resistencia, y no se pueden detectar reacciones de resistencia eficaces en los primeros pasos de la infección.

- Podrían utilizar componentes específicos de la señal de la interacción polen-estigma para evitar el reconocimiento por la planta

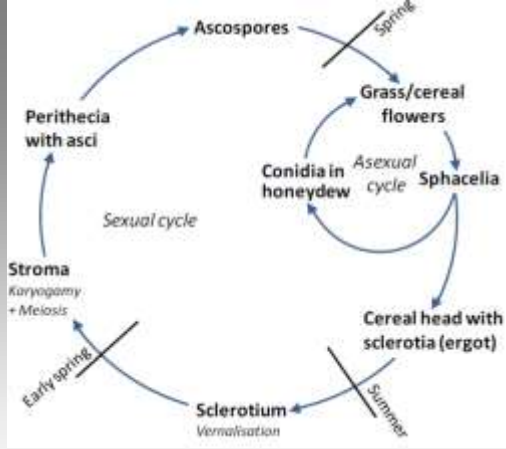
- El hongo muestra un crecimiento dirigido, casi sin ramificaciones hacia la base del ovario.

- El hongo se comporta como un verdadero biotrofo en planta: la secreción de las enzimas que degradan las paredes celulares (CWDE) está bien controlada.

WÄLI ET AL., (2013)

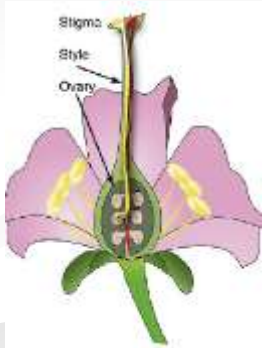
- Ergot puede servir como un mutualista defensivo condicional para su pasto huésped, y la interacción patógena puede variar de antagónica a mutualista dependiendo de la situación.

Paspalum dilatatum Poir. (Dallisgrass, pasto miel, pata de gallina)



Biología de la infección con Ergot

THOMAS MIEDANER AND HARTWIG H. GEIGER (2015)



- El ciclo de vida de *Claviceps purpurea* comienza cuando las ascosporas dispersadas por el viento en la primavera aterrizan en los estigmas plumosos de gramíneas silvestres y forrajeras susceptibles.

- Las ascosporas son el inoculo inicial que germina e infecta el ovario en 24 h.

- Las hifas invaden y colonizan *exclusivamente* el ovario, creciendo hasta la punta del eje del ovario.

- En el ovario infectado, crece un estroma produciendo masas de conidios haploides unicelulares que se exudan en un líquido pegajoso, similar a jarabe, conocido como ‘miel’.

- La producción de ‘miel’ continúa hasta que comienza la formación de esclerocios. Los esclerocios maduran dentro de cuatro a cinco semanas, reemplazando la semilla.

- Los cereales se infectan principalmente con inoculo secundario.

- Los esclerocios son las estructuras de supervivencia / invernación de *Claviceps*.

Estrategias moleculares de resistencia al hongo *Claviceps paspali* en *Paspalum dilatatum* cv 'Estanzuela Chirú' para viabilizar su cultivo en Uruguay.

Argentinien/Argentina, Mendoza, Parque General San Martín (Prov. Mendoza), Franz Xaver

Dos enfoques moleculares:

1. Expresión de péptido antifúngico

2. Edición genómica de la interacción planta-patógeno

http://www.plantasyhongos.es/herbarium/fungi/Claviceps_paspali_01.jpg

P. dilatatum :

- Hay muchos citotipos sexuales (4X, 5X, 6X, 7X), X= 10

- Están comúnmente limitados por su sistema de reproducción asexual.
- El biotipo predominante encontrado tiene anteras púrpuras y reproducción apomíctica (2n = 50).

- Los biotipos sexuales se caracterizan típicamente por anteras amarillas.

- En reproducción apomíctica, las semillas se producen sin fertilización, generando progenies uniformes que son genéticamente idénticas a sus progenitores, limitando la variación genética disponible para los programas de mejoramiento convencionales.

Resoluciones del **Gabinete Nacional de Bioseguridad** (Setiembre de 2014)

GABINETE NACIONAL DE BIOSEGURIDAD

Resolución Nº 65 Asunto Nº

solicitante presente:

a. El formulario "Solicitud de Registro de Instituciones que

b. El

c. La labora

1°) Autori

3- Que la Comisión Int

a la CGR previo al i

y/o manipulación d

a través del formula

EL GABINETE NACIONAL DE BIOSEGURIDAD

RESUELVE

EL GABINETE NACIONAL DE BIOSEGURIDAD

RESUELVE

1°) Autorizar la solicitud para ensayos de investigación a escala de laboratorio de tomate (variedad El Milongón) con el evento EFR al INIA.

Incorporando medidas de Bioseguridad para investigación en OVGM en INIA

Según la Resoluciones del Gabinete Nacional de Bioseguridad (Setiembre de 2014):

- Designar un **Representante legal** de INIA*

- Nombrar una **Comisión Interna de Bioseguridad***

- Desarrollar un **Manual de Bioseguridad****

- Implementar los **Protocolos de Bioseguridad** en Laboratorio e Invernáculo**

-* Resol JD 4375-Dic 2014

-** Presentados a la CGR y aprobados

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCIÓN!

Marco Dalla Rizza
Coordinación Unidad de Biotecnología
INIA
mdallarizza@inia.org.uy