



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY



INIA Las Brujas
1964 - 2014

Jornada Técnica

IX Jornada de Agrobiotecnología

“Apostando a la innovación para un futuro innovador”



Unidad de Biotecnología
Serie Actividades de Difusión N° 755
30 de octubre de 2015

LAS BRUJAS 

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

Ing. Agr., MSc., PhD. Álvaro Roel - Presidente

D.M.T.V., PhD. José Luis Repetto - Vicepresidente



Ing. Agr. Jorge Peñaricano

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino



Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti



IX Jornada de Agrobiotecnología INIA

Apostando a la investigación para un futuro innovador

**30 de octubre de 2015
Montevideo, Uruguay**

CONTENIDO

P3. - Mesa microbiana: ciclo de nutrientes y fertilidad del suelo.

Altier, N.

P4. – Caracterización de la colección nacional de cepas de rizobios: multifuncionalidad.

Barlocco, C.; Cerecetto, V.; Mattos; Mortalena, M.; Mayans, M.; Beyhaut, E; Altier, N.

P8. – Fijación biológica de Nitrógeno: nuevos desafíos.

Beyhaut, E.; Nuñez, A.; Terra, J.

P.9. – Evaluación de la respuesta de genotipos transgénicos de papa *Solanum tuberosum L.* con el receptor EFR inoculados con *Ralstonia solanacearum*

Boschi, F.; Vilaró, F.; Galván, G.; Siri, M.; Menoni, M.; Murchio, S.; Ferenczi, A.; Dalla Rizza, M.

P.14 – Utilización del panel GGP-LD ENESEEK GENOMIC PROFILER 26K para el genotipado de enfermedades hereditarias del bovino.

Branda Sica, A.; Federici, M.T.; Llambí, S.; Briano, C.; Romero, A.; Dalla Rizza, M.; Dutra, F.

P.17 – Puesta en marcha del proyecto: producción de haploidesduplicados de arroz, trigo y cebada.

Esteves, P.; Murchio, S.; Ceppa.; M. Bonilla, B.; Dieppa, D.; Bentancor, M.; Castillo, A.; Dalla Rizza, M.

P.20 – Enfoque metodológico para el estudio de la diversidad microbiana de suelos de Uruguay.

Garaycochea, S.; Altier, N.

P.21 – Estudios de asociación genética, resultados nacionales y aplicaciones concretas.

Grasso, A.N.; Macedo, F.; Ciappesoni, G.; Brito, G.; Navajas, E.A.

P. 25 – Algunas aplicaciones de genómica en poblaciones con y sin genealogía conocida.

Macedo, F.; Pieruccioni, F.; Ciappesoni, G.; Navajas, E.A.

P.30 – Búsqueda, caracterización y producción heteróloga de Péptidos Antimicrobianos.

Maidana, M.; Murchio, S.; Schwartzman, C.; Leoni, C.; Blumwald, E.; Dalla Rizza, M.

P. 33 – Estudio de la expresión genética en ovinos resistentes a parásitos gastrointestinales mediante RNA-Seq.

Peraza, P.; Rincón, G.; Sotelo-Silveira, J.; Dalla Rizza, M.

P. 34 – Variabilidad genética global y por segmentos cromosómicos en razas ovinas comerciales y criollas.

Pieruccioni, F.; Ciappesoni, G.; Navajas, E.A.

MESA MICROBIANA: CICLO DE NUTRIENTES Y FERTILIDAD DEL SUELO

Altier, N

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay,

E-mail: naltier@inia.org.uy

En Uruguay, diversas instituciones cuentan con laboratorios y grupos de investigación que trabajan con colecciones de recursos genéticos microbianos de importancia agrícola, ambiental y agroindustrial. Un ejemplo lo constituye la Colección Nacional de Cepas de Rizobios de Uruguay (CNCRU), que se inició en la década del sesenta, y es gestionada actualmente en el marco de un convenio de cooperación interinstitucional entre el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) y el INIA. Por este convenio, el MGAP conserva la titularidad de la colección e INIA realiza la curaduría de la misma y la tarea de suministrar las cepas oficialmente recomendadas por el MGAP a las industrias fabricantes de inoculantes. En Uruguay, la Fijación Biológica de Nitrógeno es eficientemente explotada mediante el uso de inoculantes para leguminosas, en base a cepas de rizobios específicas. Está sostenida por el Sistema Nacional de Fiscalización de Inoculantes y su marco normativo, el cual establece los requerimientos para el registro, el uso de la cepa recomendada, y el control de calidad de cada lote de inoculante comercial. Anualmente, las pasturas y la soja inoculadas aportan Nitrógeno proveniente de la atmósfera en cantidades que equivalen aproximadamente a US\$ 850 millones (equivalente urea). Recientemente, la CNCRU fue indexada en la WFCC (WDCM-CCINFO 1082), constituyendo la primera colección registrada para Uruguay. Se está evaluando la multifuncionalidad de las cepas, siendo caracterizadas por su capacidad de mineralizar Fósforo orgánico. Otros abordajes están siendo considerados para el estudio de la diversidad microbiana estructural y funcional; la metagenómica permite ampliar el conocimiento sobre las comunidades microbianas no cultivables, aunque plantea desafíos metodológicos. INIA y las demás instituciones nacionales han priorizado la valorización de los microorganismos para su uso en la promoción del crecimiento vegetal (fijadores de nitrógeno, solubilizadores/mineralizadores de fósforo), el control biológico de enfermedades y plagas agrícolas y forestales, la protección vegetal, la salud animal, la alimentación, los procesos agroindustriales, la bioremediación y el uso como indicadores de calidad ambiental. Las principales líneas de acción promueven la cooperación para la preservación y la caracterización de los recursos genéticos microbianos, tareas indispensables para darle funcionalidad y valor a las colecciones como base de sistemas de producción sostenibles. Las presentaciones de la mesa microbiana profundizarán en el rol de los microorganismos asociados a los ciclos biogeoquímicos de los principales nutrientes, N y P.

CARACTERIZACIÓN DE LA COLECCIÓN NACIONAL DE CEPAS DE RIZOBIOS: MULTIFUNCIONALIDAD

Barlocco, C^{1*} Cerecetto, V¹ Mattos, N¹, Mortalena, M¹ Mayans, M² Beyhaut, E¹ Altier, N¹

¹Laboratorio de Microbiología de Suelos, Plataforma Bioinsumos, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

²Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Uruguay.

* E-mail: cbarlocco@inia.org.uy

Palabras claves: Colección Nacional de Cepas de Rizobios, WFCC, Convenio INIA-MGAP

Introducción

En la década del sesenta, el Estado uruguayo creó la Colección Nacional de Cepas de Rizobios. Inicialmente en el ámbito del Plan Agropecuario, y transferida luego al Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP), fue concebida como una colección abierta y sin fines de lucro. Se integra con cepas de referencia de Instituciones Internacionales y con aislamientos provenientes de diversos proyectos de investigación. Esta colección constituyó, por muchos años, la base de los Programas de Selección de Cepas para leguminosas de interés agronómico, de donde surgieron las recomendaciones oficiales de cepas para la Industria Nacional de Inoculantes. En el 2012 se firmó un convenio entre el MGAP y el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), donde se establece que el MGAP otorga a INIA la curaduría de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios y la tarea de suministrar las cepas oficialmente recomendadas por el MGAP a las industrias fabricantes de inoculantes y a otras instituciones. Por su parte, la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) del MGAP conserva las potestades que la ley le confiere de fiscalizar el registro y el control de calidad de los inoculantes comercializados en el país. En una decisión que potencia un área de conocimiento relevante para el uso sustentable del suelo y para el ambiente, se consolida una alianza basada en las complementariedades interinstitucionales. En este marco, el Laboratorio de Microbiología de Suelos de INIA, tiene el cometido de mantener y valorizar la Colección Nacional de Cepas de Rizobios, e identificar cepas eficientes para nuevas leguminosas de interés agronómico. INIA asimismo, lleva a cabo investigación sobre microorganismos benéficos para la nutrición y protección de cultivos y forrajes, que posibiliten sistemas de producción más sustentables.

Puesta en valor

La Colección Nacional de Cepas de Rizobios está identificada con el código de Uruguay “U” y está constituida con más de 300 cepas, de las cuales 20 son cepas comerciales que se recomiendan a la industria de inoculantes previa evaluación *in planta* de las características simbióticas originales (cuadro 1). A partir del 2012, se comenzó con la evaluación de viabilidad en medio YEM y pureza en medio AS y TSA de toda la Colección. Las cepas evaluadas positivamente, fueron conservadas en tubos conteniendo medio YEM-agar inclinado a 4°C (4 réplicas) y en criotubos con glicerol al 20% a -20 y -80°C (4 réplicas). A su vez, las 20 cepas comerciales también se almacenaron liofilizadas a 4°C (2 réplicas).

Huésped	Código de las cepas	Especie de rizobio	Otras designaciones
<i>Medicago sativa</i>	U-143	<i>Sinorhizobium melloti</i>	MCH3
<i>Trifolium pratense</i> , <i>T. repens</i> , <i>T. subterraneum</i> , <i>T. incarnatum</i>	U-204	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	U-28
<i>Trifolium alexandrinum</i>	U-206	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	NA 120
<i>Trifolium vericulosum</i>	U-276	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	TAC 8
<i>Trifolium fragiferum</i>	U-262	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	SEMIA 235
<i>Trifolium balansae</i>	U-2082	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	T Bal
<i>Ornithopus compressus</i> y <i>O. sativus</i>	U-612 + U620	<i>Bradyrhizobium</i> <i>sp.</i>	OR 1 + CAL 22
<i>Vicia sativa</i>	U-331	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>viceae</i>	INTA D 53
<i>Lotononis bainesii</i> Baker	U-1205	<i>Methylobacterium</i> <i>sp.</i>	XCT 16
<i>Lotus corniculatus</i> y <i>L. glaber</i>	U-510	<i>Mesorhizobium huakuii</i>	U-226
<i>Lotus subbiflorus</i>	U-531	<i>Mesorhizobium loti</i>	NC3
<i>Lotus uliginosus</i> Maku	U-1401	<i>Bradyrhizobium loti</i>	NZP 2309
<i>Pisum sativum</i>	U-315	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>viceae</i>	SEMIA 335
<i>Phaseolus vulgaris</i>	U-808 + U-809	<i>Rhizobium tropici</i>	SEMIA 4077 + SEMIA 4080
<i>Glycine max</i>	U-1301 + U-1302	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	SEMIA 587 + SEMIA 5019
<i>Trifolium resupinatum</i>	U-223	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>trifolii</i>	NA 146
<i>Vicia villosa</i>	U-344	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>bv.</i> <i>viceae</i>	WISM 1131

Cuadro 1.- Lista de las 20 cepas comerciales pertenecientes a la Colección Nacional de Cepas de Rizobios. Se indica para cada cepa; el huésped, el código, la especie y otra designación en colecciones internacionales.

Teniendo en cuenta la importancia de las 20 cepas comerciales para la industria de inoculantes, se continuó con la caracterización, evaluando la eficiencia simbiótica *in planta* y realizando el perfil genético por BOX-PCR (foto 1).

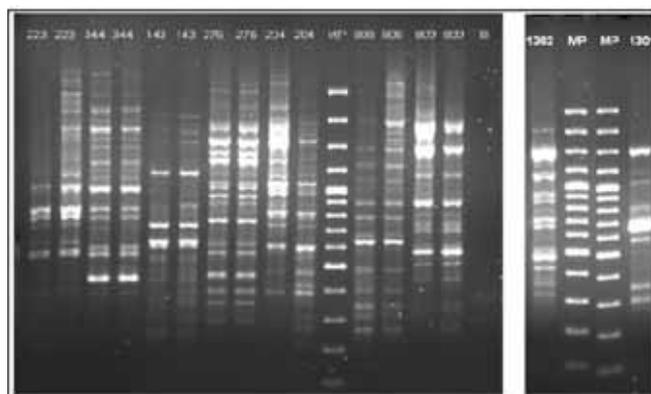


Foto 1.- Perfil genético obtenido por BOX-PCR de las cepas U-223, U-344, U-143, U-276, U-204, U-808, U-809, U-1301, U-1302. B: blanco. MP: marcador de peso molecular (100 pb, Fermentas)

A partir del año 2014, INIA asumió nuevos desafíos, logrando ingresar las 20 cepas comerciales en la base de datos de la World Federation for Culture Collections (WFCC), destacándose que es la primera Colección del Uruguay en ser indexada (foto 2). A su vez, se finalizó con la presentación de la documentación correspondiente para el guardado de las 20 cepas comerciales en el Banco de Recursos genético Microbianos de Chile (CChRGM), logrando a mediano plazo un respaldo de las cepas en un banco con permiso de Autoridad Internacional de Depósito (IDA).

Latin America	Cuba	BAMFA	Acronym:	CNCRU
			Full Name:	Colección Nacional de Cepas de Rizobium
North America	Mexico	CM-CNRG	WDCM Number:	1082
	USA	FGSC, IMC, UCDavis	Country:	Uruguay
			Contact person:	Claudia Barroco
			Email of Contact:	cbarroco@inia.org.uy
			Director:	Elena Seydoux
South America	Argentina	INM, DMI	Number of Species:	Bacterium Total 10 10
	Brazil	Flora CIQOC, IAL	Number of Strains:	Bacterium Total 20 20
	Uruguay	CNCRU	Online Homepage Updated:	Registration Date: 2014-12-19
	Venezuela	CVCA	Information Updated Date:	2014-12-30
			Online Catalogue Updated:	Bacterium Total 20 20
			Home Page:	http://gen.wia.int/1082

Foto 2.- Las 20 cepas comerciales de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios del Uruguay (CNCRU) indexada en la World Federation for Culture Collections (WFCC).

Actualmente, la Colección Nacional de Cepas de Rizobios está siendo caracterizada por la capacidad de mineralizar/solubilizar fósforo. Primero se realizaron ensayos cualitativos en medio sólido, donde se evaluó la capacidad de las cepas de mineralizar fitato de sodio y de solubilizar FePO_4 , AlPO_4 y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ observando la producción o no de halos. A su vez, se verificó la capacidad de mantener estos fenotipos luego de 3 repiques sucesivos. Las cepas halo positivas fueron seleccionadas para realizar ensayos cuantitativos en medio sólido, donde se midió el diámetro del halo con respecto al diámetro del inóculo a través del tiempo. Por último se están realizando ensayos cuantitativos en medio líquido, donde se mide la concentración de fosfato solubilizado/mineralizado a través del tiempo por las cepas, de acuerdo al método del vanado-molibdato.

Según los ensayos cualitativos, el 37% de las cepas de la Colección fueron capaces de mineralizar fitato de sodio incluyendo 6 cepas comerciales (foto 3), 8 cepas presentaron capacidad solubilizadora de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y ninguna cepa fue capaz de solubilizar FePO_4 y AlPO_4 .

Hasta la fecha, las cepas evaluadas cuantitativamente en fitato de sodio más auspiciosas son U331, U664, U801/U802 y U1302 (foto 4), aunque aún hacen falta realizar ensayos cuantitativos en medio líquido. Las cepas más propicias serán utilizadas para realizar bioensayos en condiciones controladas.

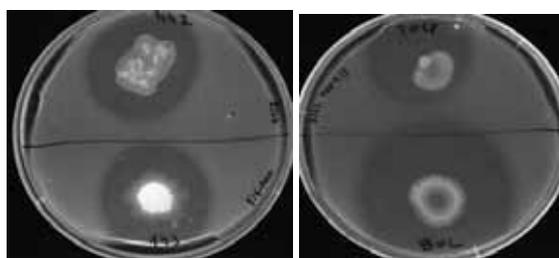


Foto 3.- Halo de mineralización de cepas de rizobios a los 28 días de inoculación en medio sólido Angle + fitato de sodio.

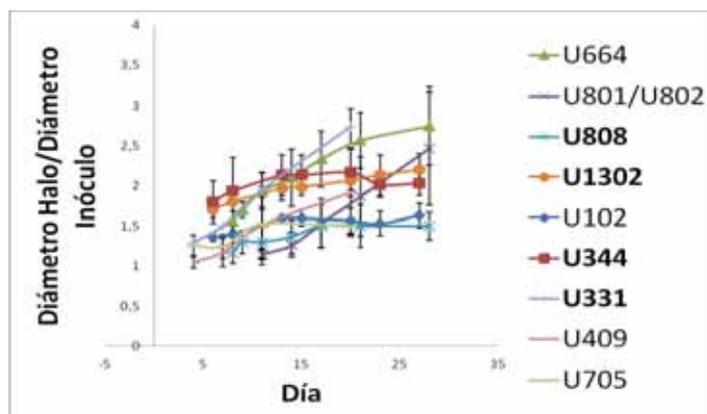


Foto 4.- Relación entre el diámetro del halo y el diámetro del inóculo a través del tiempo de las cepas de rizobios que mineralizaron fitato de sodio. Las cepas en negrita son cepas comerciales.

Conclusiones

Los avances en la caracterización y puesta en valor alientan a continuar con el estudio de la Colección Nacional de Cepas de Rizobios. La conservación de recursos genéticos microbianos representa una importante oportunidad para generar tecnologías de innovación para el manejo de la fertilización en base a microorganismos y la conservación del recurso suelo.

Bibliografía

Altier N, Beyhaut E, Pérez CA. 2013. Root Nodule and Rhizosphere Bacteria for Forage Legume Growth Promotion and Disease Management. En: Maheshwari DK, Saraf M, Aeron A. (Eds.). Bacteria in Agrobiolgy: Crop Productivity. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. p. 167-184.

Lindström K, Murwira M, Willems A, Altier N. 2010. The biodiversity of beneficial microbehost mutualism: the case of rhizobial. *Research in Microbiology*, 161:453-463.

Real D, Labandera CA, Howieson JG. 2005. Performance of temperate and subtropical forage legumes when over-seeding native pastures in the basaltic region of Uruguay. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 45:279-287.

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO: NUEVOS DESAFÍOS

Beyhaut, E^{1*} Nuñez, A² Terra, J³

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental Wilson Ferreira Aldunate, Ruta 48, km 10, Canelones, Uruguay

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental La Estanzuela, Ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay

³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación Experimental del Este, Ruta 8 km 281, Treinta y Tres, Uruguay

* E-mail: ebeyhaut@inia.org.uy

Palabras claves: Glycine max, nitrógeno que deriva de atmósfera (Ndda)

La fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) juega un rol clave en la competitividad económica internacional de la producción de soja de Uruguay y de otros países del Cono Sur de América. A su vez, la FSN contribuye significativamente a la conservación del suelo y a la sostenibilidad de los sistemas de producción, reduciendo el impacto negativo asociado al uso de fertilizantes de síntesis. En este trabajo se presentan estimaciones del nitrógeno que derivan de la atmósfera (% Ndda) los cultivos comerciales de soja. La metodología utilizada se basa en la abundancia natural de ¹⁵N. Se tomaron muestras en 33 sitios representativos del Litoral Norte, Litoral Sur y del Este del país. Se registró información sobre método de inoculación, uso de cura semillas (producto comercial y dosis) y tiempo transcurrido entre inoculación y siembra. Los suelos fueron analizados para determinar pH, carbono (C) orgánico, nitrógeno potencialmente mineralizable (NPM) y fósforo (P) disponible (Bray I). En términos aproximados, el % Ndda fue menor al 33% en el 25% de los sitios, entre 33% y 66% en el 50% de los sitios, y mayor al 66% en el restante 25% de los sitios. Los análisis de componentes principales revelaron que éste % Ndda está fuerte y negativamente asociado al NPM. No se observó asociación del % Ndda con el P disponible ni con el C orgánico del suelo. Se analizaron los impactos del método de inoculación sobre el % Ndda. Los resultados se discuten con el objetivo de contribuir a un uso más eficiente de la FSN a nivel de campo, y se señalan los desafíos actuales.

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA DE GENOTIPOS TRANSGÉNICOS DE PAPA *Solanum tuberosum* L. CON EL RECEPTOR EFR INOCULADOS CON *Ralstonia solanacearum*

Boschi, F.^{1*} Vilaró, F.² Galván, G.³ Siri, M. Menoni, M. Murchio, S. Ferenczi, A. Dalla Rizza, M.²

¹Área Evaluación y Registro de cultivares. Instituto Nacional de Semillas (INASE)

²Unidad de Biotecnología. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA)

* E-mail: fboschi@inase.org.uy

Introducción

La papa (*Solanum tuberosum*) se encuentra entre los cuarto cultivos alimenticios más importante a nivel mundial, conjuntamente con el arroz, trigo y maíz (FAO, 2012). Con una producción aproximadamente de 300 millones de toneladas por año (Centro Internacional de la papa, CIP 2011) y su tasa de crecimiento es mayor que otros cultivos importantes (CIP, 2009).

La bacteria *Ralstonia solanacearum* es agente causal de la marchitez bacteriana, una de las enfermedades más destructivas nivel mundial. Este patógeno abarca un amplio rango de hospederos (más de 200 especies) y ataca un gran número de cultivos de importancia económica entre ellos la papa, plátano, pimiento, tomate y especies forestales. Está reportado en regiones tropicales, subtropicales y templadas (Hayward, 1994).

En el cultivo de papa la marchitez bacteriana afecta más de 80 países en un área aproximada de 3,75 millones de acres (aproximadamente 1,5 millones de ha), lo que ocasiona un daño económico estimado anual de 950 millones de dólares (Floyd, 2007). Cuando la enfermedad se da puede haber comenzado por la semilla infectada o a partir del suelo, generalmente la infección ingresa a nivel radicular por raíces secundarias o por heridas causadas en el manejo (Genin, 2010). El principal efecto negativo es que después que ingresa el patógeno al campo dependiendo de la raza puede permanecer latente durante años, asociado a especies malezas o silvestres hospederas, restos vegetales y cursos de agua, por lo tanto ese campo productivamente queda inapropiado para futuros cultivos ocasionando un daño actual en el cultivo presente y un daño a futuro restringiendo las opciones productivas (Wenneker *et al.*, 1999; Hayward, 1991).

Es una de las enfermedades más difíciles de controlar debido a la falta de tratamientos curativos, la gran diversidad genética del patógeno, la capacidad de sobrevivencia a distintas condiciones climáticas, los diversos mecanismos de diseminación, persistencia y de patogenicidad (Saddler, 2005). Dada la baja efectividad en el control de la enfermedad en el manejo del cultivo, los esfuerzos están dirigidos hacia el mejoramiento genético. Desde hace más de 40 años se han buscado fuentes de resistencia en especies cercanas a *Solanum tuberosum*, como por ejemplo *S. phureja*, *S. chacoense*, *S. raphanifolium*, *S. sparsipilum* y *S. multidissectum* en distintos programas de mejoramiento. El programa de mejoramiento genético de INIA ha introgresado genes de resistencia de *Solanum comersonii* al germoplasma base de mejoramiento (Gonzalez, 2010).

A nivel molecular las plantas reconocen patógenos potenciales a través de dos modos de percepción: Inmunidad Inducida por Efectores (ETI) o la Inmunidad inducida por PAMP (PTI). Esta última reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o daño (DAMP), a través de receptores de reconocimiento (PRRs) (Jones y Dangl, 2006). Chisholm *et al* (2006)

ilustran el reconocimiento vegetal al PAMP bacteriano y la reacción en cadena de las MAP Kinasas y reprogramación transcripcional mediada por factores de transcripción WRKY de la planta. Las bacterias patógenas utilizan el sistema de secreción de tipo III para liberar proteínas efectoras que se dirigen a múltiples proteínas del huésped para suprimir la respuesta inmune basal (PTI), lo que permite una acumulación significativa de bacterias en el apoplasto de la planta. Las Proteínas R de la planta reconocen la actividad efectora y restauran la resistencia a través de las respuestas inmunes efectoras activadas (ETI).

Lacombe *et al.*, (2010) reportaron que la expresión del receptor de membrana EFR de *Arabidopsis thaliana* en tomate y tabaco le confiere resistencia basal PTI a un amplio rango de bacterias entre las cuales se encuentra *Ralstonia solanacearum*.

En 2012 el Programa de mejoramiento genético de papa y la Unidad de Biotecnología enviaron a transformar el cultivar de papa INIA Iporá y el clon 09509.6 que tiene introgresado gens de *Solanum comersonii* al Laboratorio del profesor Zypfel, The Saynsbury Lab, Norwich, Inglaterra.

Este trabajo se encuentra en el marco de la tesis de maestría de Federico Boschi y tiene como objetivo general: Evaluar la respuesta de los genotipos de papa-efr obtenidos por ingeniería genética a *Ralstonia solanacearum* implementando el protocolo de Bioseguridad para su aplicación en programas de mejoramiento genético.

Metodología

Se trabajó con diez líneas de INIA Iporá y diez líneas del clon 09509.6 transformadas con el receptor EFR y sus respectivos testigos sin transformar. El estudio consistió en realizar la caracterización molecular para determinar la presencia del inserto, el número de copias del gen efr en cada genotipo y la respuesta a la inoculación con el patógeno.

Se presentan los resultados del primer ensayo de dos ensayos consecutivos que se realizaron en las mismas condiciones para la tesis. Para determinar la respuesta a la resistencia cada parcela constó de 16 plantas en un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. Se estudió el índice de enfermedad (IE) en una escala del 0 a 4 (0= sin síntomas y 4= muerte de planta) cada 7 días hasta el día 28 después de la inoculación. Además, se realizó el estudio del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC).

La inoculación se realizó con daño de raíz con la cepa de *R. solanacearum* UY031 (Siri, 2010) a una concentración de 10^7 ufc/ml (Figura 1).



Figura 1. Daño de raíz e inoculación con *R. solanacearum*

Resultados Preliminares

Caracterización molecular

Se detectó la presencia del inserto en las 10 líneas estudiadas de INIA Iporá y en 7 líneas del clon 09509.6 transformadas con el receptor EFR. Se determinó el número de copias del gen efr empleando como gen endógeno de copia única en el genoma de papa UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPasa), (Cuadro 1).

Líneas	Número de copias
INIA IPORA S/TRANSF	0
INIA Iporá-EFR 2	1
INIA Iporá-EFR 3	1
INIA Iporá-EFR 4	1
INIA Iporá-EFR 8	1
INIA Iporá-EFR 11	1
INIA Iporá-EFR 12	1
INIA Iporá-EFR 16	4
INIA Iporá-EFR 27	2
INIA Iporá-EFR 53	4
INIA Iporá-EFR 54	1

Líneas	Número de copias
Clon 09509.6 S/TRANSF	0
Clon 09509.6-EFR 31	0
Clon 09509.6-EFR 32	1
Clon 09509.6-EFR 34	1
Clon 09509.6-EFR 35	0
Clon 09509.6-EFR 36	0
Clon 09509.6-EFR 37	3
Clon 09509.6-EFR 38	12
Clon 09509.6-EFR 39	10
Clon 09509.6-EFR 40	1
Clon 09509.6-EFR 41	3

Cuadro 1. Número de copias de las líneas transformadas de INIA Iporá y del Clon 09509.6.

Estudio del primer ensayo de la respuesta de resistencia a *R. solanacearum*

Se detectaron diferencias significativas en el área bajo la curva del progreso de la enfermedad entre los diferentes tratamientos. Los testigos sin transformar fueron los tratamientos más susceptibles y se enfermaron en mayor medida que todas las líneas transformadas.

En la Figura 2 se presenta las cinco líneas transformadas con el receptor EFR más resistentes y los testigos sin transformar del cultivar INIA Iporá y el Clon 09509.6

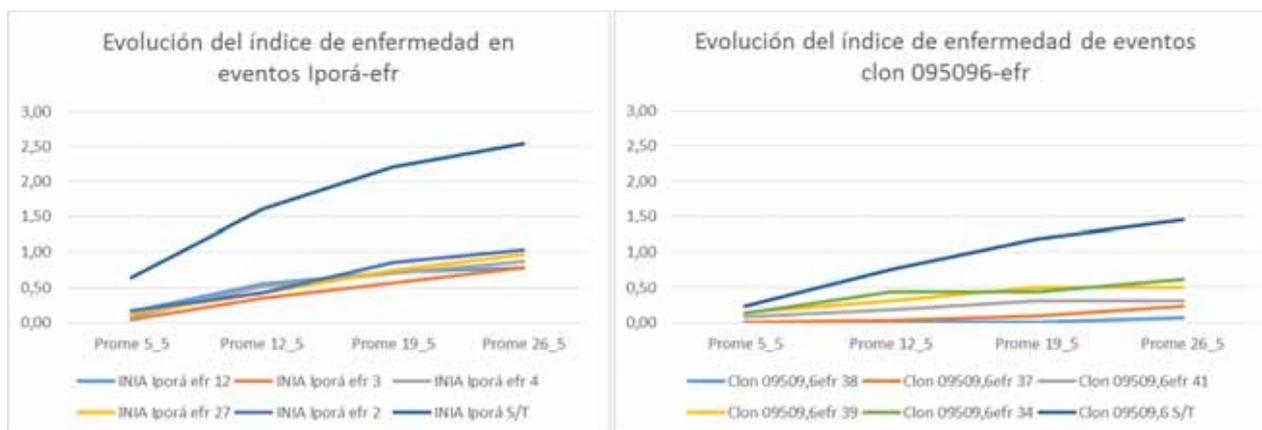


Figura 2. Evolución del índice de enfermedad para los 5 tratamientos más resistentes del clon 09509.6-EFR y los 5 tratamientos más resistentes del cultivar INIA Iporá-EFR con sus respectivos testigos sin transformar.

El área bajo la curva del progreso de la enfermedad para este primer ensayo en el cultivar INIA Iporá sin transformar fue 40.20 diferentemente significativo para los 5 tratamientos transformados que fueron desde 9.41 a 13.78. Para el clon 09509.6 sin transformar el área bajo la curva fue de 20.29, diferentemente significativo de los 5 tratamientos transformados más resistentes donde se observó una variación comprendida entre 0.22 hasta 9.13.

Perspectivas

Se realizará el estudio de la expresión proteica mediante la técnica de western blot y la expresión de las especies reactivas del oxígeno (ROS).

Se realizó el ensayo nuevamente en las mismas condiciones y los resultados observados fueron similares, restando realizar el análisis conjunto de los datos.

Estos estudios involucraron plantas genéticamente modificadas y fueron implementados bajo norma de bioseguridad en el Uruguay con el propósito de desarrollar herramientas agrobiotecnológicas *apostando a la investigación para un futuro innovador*.

Bibliografía

- 1) CIP (Centro Internacional de la Papa). 2011. Potato. <http://www.cipotato.org/potato/>. Accedido en 2015.
- 2) CIP (Centro Internacional de la Papa). 2009. Potato. <http://www.cipotato.org/potato/>. Accedido en 2015.
- 3) CIP (Centro Internacional de la Papa). 2007. Potato Bacterial wilt. http://www.cipotato.org/potato/pests_diseases/bacterial_wilt/. Accedido en 2015.
- 4) Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B. J. (2006). "Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response." *Cell*, 124(4), 803-14.
- 5) Dangl, J. L., and Jones, J. D. 2006. "The plant immune system" *Nature* Vol: 444.

- 6) **FAO.** 2012. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo – Alcance, causas y prevención. Roma.
- 7) **Genin S.** 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*.
- 8) **González, M.** 2010. La resistencia a la marchitez bacteriana de *Solanum commersonii* Dun. y su utilización en el mejoramiento genético de papa. Master Thesis, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- 9) **Hayward A.C.** 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward y G.L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- 10) **Hayward, A.C.** 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology.
- 11) **Lacombe, S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E., Peeters N., Dahlbeck D., van Esse P., Smoker M., Rallapalli G., Thomma B.P.H.J., Staskawicz B., Jones J.D.G., y Zipfel C.** 2010. Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. Nature biotechnology. doi:10.1038/nbt.1613
- 12) **Saddler G.S.** 2005. Management of bacterial wilt disease. Pages 121-132 in: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, y A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

UTILIZACIÓN DEL PANEL *GGP-LD GENESEEK GENOMIC PROFILER 26K* PARA EL GENOTIPADO EN ENFERMEDADES HEREDITARIAS DEL BOVINO HOLANDO

Branda Sica, A.^{1*} Federici, M.T.¹ Llambí, S.² Briano, C.³ Romero, A.³ Dalla Rizza, M.¹ Dutra, F.³

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

² Cátedra de Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

³ DILAVE “Miguel C. Rubino”, Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay.

*E-mail: abranda@inia.org.uy

Introducción

Las deficiencias en la adhesión leucocitaria bovina (BLAD), en la uridina monofosfato sintasa (DUMPs) y en la enzima arginosuccinato sintetasa (Citrulinemia) son enfermedades de herencia autosómica recesiva que han sido descritas en la página web OMIA (<http://omia.angis.org.au/>), la cual recopila toda la información sobre estas tres enfermedades en bovinos de raza Holando.

La enfermedad DUMPs es provocada por una mutación puntual (transición C-T), se da en el sitio *Aval* del codón 405 del gen UMPS (Schwenger *et al.*, 1993). Esta enfermedad fue reportada en USA. En Uruguay no hay reportes de presencia de portadores DUMPs, habiéndose realizado monitoreos de la mutación desde el año 2002 no identificándose portadores mediante PCR-RFLP (Llambí, 2002).

La enfermedad hereditaria BLAD es causada por una mutación puntual A→G, nucleótido 383 en el exón 4 de la subunidad beta-2 integrina del gen CD18 (Shuster *et al.*, 1992) (ahora conocido como ITGB2) donde se produce una sustitución de un aminoácido por otro, del ácido aspártico por glicina en la posición 128 de la proteína del receptor (D128G). Esta enfermedad está ampliamente difundida a nivel mundial siendo responsable de grandes pérdidas económicas por mortalidad de terneros (Llambí *et al.*, 2003; Llambí *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2010; Kelly *et al.*, 2012; Meydan *et al.*, 2010; Adamov *et al.*, 2014).

Citrulinemia es causada por una mutación que provoca un cambio de arginina (CGA/arginina) por un codón stop (TGA/codón stop) con pérdida de un sitio de restricción (*Aval*) en el codón 86 del gen ASS1 (Dennis *et al.*, 1989). Esta patología se ha diseminado en la raza Holando de Australia, EEUU y Europa por la importación del semen de un toro de pedigrí conocido mundialmente como “*Linmarck Kriss King*” (LKK, en siglas), de EE.UU. (Healy *et al.*, 1990, 1991). En nuestro país hay sospechas clínicas y patológicas de Citrulinemia, aunque no se ha confirmado para lo que se requieren estudios poblacionales y pruebas de laboratorio.

Objetivo

Realizar un *screening* de individuos portadores de BLAD, DUMPs y Citrulinemia en una población representativa de terneras Holando de la cuenca lechera de Cerro Largo, Uruguay, mediante nuevas tecnologías de genotipado.

Metodología

Se utilizaron 181 ADN de terneras de cría (cohortes representativas de la cuenca lechera de Cerro Largo, Uruguay) del trabajo de Branda Sica *et al.*, (2015) para la realización del genotipado utilizando el panel *GGP-LD GeneSeek Genomic Profiler 26K* (GeneSeek, Lincoln, NE, USA).

Resultados

De la población de 181 terneras de recría genotipadas (*call rate* >0,95), se detectó la presencia del alelo mutante para BLAD en una sola ternera de recría. No se encontraron alelos mutantes para DUMPS y Citrulinemia en la población analizada.

Enfermedad hereditaria letal	Total de individuos genotipados (<i>call rate</i> >0,95)	Número de individuos obtenido de cada genotipo	
		Normales	Portadores
BLAD	179	178	1
Citrulinemia	181	181	0
DUMPS	181	181	0

Tabla 1: Número de animales genotipados normales y portadores utilizando el panel *GGP-LD GeneSeek Genomic Profiler 26K* (GeneSeek, Lincoln, NE, USA)

Conclusiones

Mediante el análisis del genotipado utilizando el panel *GGP-LD GeneSeek Genomic Profiler 26K* se reveló la existencia del alelo mutante recesivo para la enfermedad BLAD en la población estudiada confirmando que la mutación permanece en rodeos lecheros de nuestro país después de 15 años del primer diagnóstico. En las otras dos enfermedades hereditarias DUMPS y Citrulinemia las terneras de recría analizadas presentaron un genotipo normal no identificándose alelos mutantes.

Bibliografía

1. Adamov N, Mitrov D, Esmerov I, Dove P. (2014). Detection of recessive mutations (BLAD and CVM) in Holstein-Friesian cattle population in Republic of Macedonia. *Mac Vet Rev* 37 (1): 61-68.
2. Branda Sica A., Federici MT., Dutra F., Romero A., Briano C., Dalla Rizza M., Llambí S. (2015) Identificación de terneras Holando portadoras de BLAD y Citrulinemia en la región Este de Uruguay por PCR-RFLP y secuenciación. Artículo enviado y en revisión a *Revista Veterinaria* (Montevideo).
3. Dennis J, Healy P, Beaudet A, O'Brian W. (1989). Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proc Natl Acad Sci* 86: 7947-7951.
4. Healy P, Dennis J, Camilleri L, Robinson J, Stell A, Shanks R. (1991). Bovine citrullinaemia traced back to the sire of linmack Kriss King. *Austr. Vet J* 68: 155-157.
5. Healy P, Harper P, Dennis J. (1990). Bovine citrullinaemia: a clinical, pathological, biochemical and genetic study. *Austr Vet J* 67 (6): 255-258.

6. Kelly L, Dutra F, Trenchi G, Llambí S, Rivero R, Moraes J, D'Agosto S, Peraza P, Ravagnolo O, Dalla Rizza M. (2012). Diagnóstico molecular de enfermedades bovinas hereditarias presentes en el Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48(188) 3-11.
7. Kelly L, Trenchi G, D'Agosto S, Ravagnolo O, Peraza P, Llambí S, Rivero R, Moraes J, Solares E, Dutra F. (2010). Molecular diagnosis of inherited diseases. World Buiatrics Congress XXVI. Santiago de Chile, Chile. Session Genetic and Breeding. p.31.
8. Llambí S, Guevara K, Rincón G, Zaffaroni R, de Torres E, Barrera J, Arruga MV, Rodríguez V, Postiglioni A. (2003). Frecuencia da deficiência na adesão leucocitaria em uma população de bovinos da raça holandesa, no Uruguai. *Ars. Veterinaria*. 19:52–56.
9. Llambí S, Nicolini P, Kelly L, de Torres E. (2007). Frecuencia de la enfermedad hereditaria BLAD en vacas Holando-Uruguayo con control de mastitis. *Jornadas Técnicas Veterinaria-UdelaR V*, Montevideo. Uruguay, páginas 26-27.
10. Llambí S. (2002). Estudios citogenéticos-moleculares de la fragilidad del cromosoma sexual X y enfermedades hereditarias monogénicas en bovinos de la raza Holando Uruguayo (*Bos taurus*). Tesis PhD. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.
11. Meydan H, Yildiz MA, Agerholm JS. (2010). Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Vet Scand* 52:56.
12. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA). Reprogen, Faculty of Veterinary Science, University of Sydney. World Wide Web URL: <http://omia.angis.org.au/>
13. Schwenger B., Schoeber S., Simon D. (1993): DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics*, 16, 241–244.
14. Shuster DE, Bosworth BT, Kehrli ME. (1992). Sequence of the Bovine CD18-Encoding cDNA Comparison with the Human and Murine Glycoproteins. *Gene* 114:267-271.

PUESTA EN MARCHA DEL PROYECTO: PRODUCCIÓN DE HAPLOIDES-DUPLICADOS DE ARROZ, TRIGO Y CEBADA

Esteves, P *. Murchio, S. Ceppa, M. Bonilla, B. Dieppa, D. Bentancor, M. Castillo, A. Dalla Rizza, M

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

*E-mail: pesteves@inia.org.uy

Palabras claves: haploides-duplicados, arroz, trigo, cebada, cultivo in vitro

Resumen

Desde abril de 2015, en la Unidad de Biotecnología del INIA-Las Brujas se están generando las capacidades (equipo de trabajo e infraestructura) para la producción de Haploides-duplicados de arroz, trigo y cebada. Los trabajos tienen como objetivo generar material vegetal para acelerar el proceso de obtención de variedades de los programas mejoramiento genético de las especies mencionadas.

Descripción del proyecto de investigación

En vegetales, el cultivo de anteras (CA) o de microsporas aisladas (CMA) permite regenerar individuos completos a partir de granos de polen inmaduro. Por embriogénesis gamética en cultivo in vitro las microsporas pueden convertirse en embriones (Figura 1), que al germinar brindan plantas fisiológicamente normales, aunque genéticamente peculiares, ya que son 100% homocigotas. Las plantas generadas a partir de gametas en las que se ha doblado el número básico de cromosomas se denominan Haploides-duplicados (HDs).

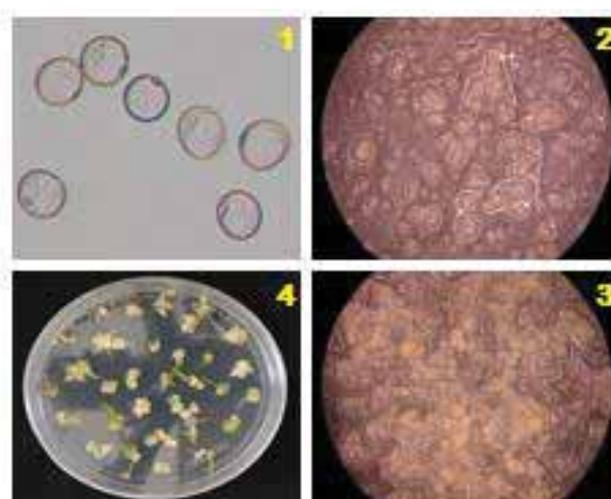


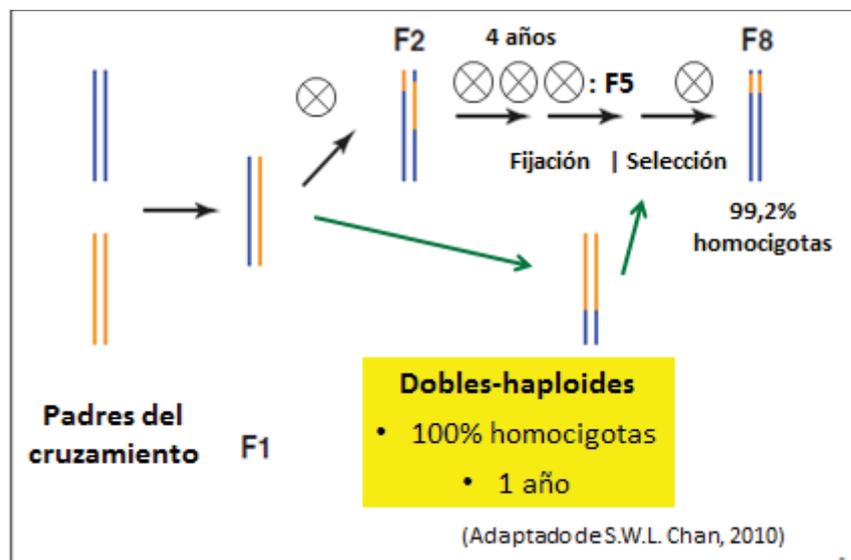
Figura 2: Etapas del CMA (arriba-izq.): 1) Cultivo de plantas-madre, 2) Cosecha de espigas, 3) Pre-tratamiento, 4) Aislamiento de microsporas, y purificación, 5) Siembra in vitro (inducción), 6) Regeneración de HDs.

En efecto, durante el proceso de regeneración de los HDs, en forma espontánea o inducida, el número básico (gamético) de cromosomas de las microsporas se duplica copiándose a sí mismo. Cuando los HDs se producen a partir de plantas-madre altamente heterocigotas (p.ej., cruza F1), el genotipo de cada individuo regenerado es una muestra aleatoria de las posibles recombinaciones génicas de la planta dadora. Los HDs son totalmente homocigotas su genotipo permanecerá estable en generaciones futuras de autofecundación.

Los avances extraordinarios que ocurrieron en los últimos años en las técnicas de secuenciado del genoma y en la velocidad de los procesadores, impulsan hoy en día una revolución en la investigación y en el mejoramiento genético vegetal. En este ámbito, poblaciones compuestas por individuos HD se convierten en materiales ideales para estudios de mapeo genética y de genómica en general (Sood & Dwivedi, 2015).

Simultáneamente, las plantas HD son extremadamente valoradas en planes de mejoramiento genético, ya que su producción en laboratorio toma alrededor de 6 meses, en lugar de 6 u 8 ciclos de autofecundación (p.ej., 6 u 8 años) que se requieren por el método tradicional para formar líneas homocigotas. De este modo, los HDs permiten acortar en varios años la duración del programa de mejoramiento, y reducir marcadamente sus costos (Cuadro 1). Los HDs suelen apodarse “líneas instantáneas”, y la mayoría de empresas e instituciones líderes mundiales en mejoramiento de cereales poseen programas para producirlos.

Cuadro 1: Mejoramiento convencional en arroz (arriba), y asistido por HDs (abajo). El programa se reduce 3-4 años, y la homocigosis de las plantas es completa.



Idealmente, para que los HDs sean exitosamente utilizados en planes de mejoramiento su producción debe ser abundante, eficiente, y reproducible. En la práctica, usualmente se observan varios factores que condicionan y limitan la regeneración de plantas a partir de microsporas, donde los más importantes son: la falta de respuesta embriogénica y un alto grado de albinismo. Estos factores limitantes suelen considerarse ligados al genotipo de las plantas dadoras (Devaux & Kasha, 2009), pero simultáneamente numerosas referencias dan cuenta de mejoras en la regeneración obtenidas a partir de cambios en factores del cultivo, p.ej. del tipo de pre-tratamiento, y de las hormonas de inducción y de regeneración (Esteves *et al.*, 2014).

En el presente proyecto de investigación se ha propuesto como objetivo general establecer un sistema de producción de HDs de alta eficiencia en INIA para abastecer los programas de mejoramiento de cereales de INIA. En nuestro Grupo de trabajo consideramos que existe un potencial importante para innovar y hacer más eficiente la producción de HDs por CMA en arroz, trigo y cebada. Por esta razón, simultáneamente realizaremos investigaciones en el tema para intentar aportar algunas soluciones a los problemas más frecuentes.

Los objetivos particulares de este proyecto son:

- Adaptar un protocolo de CMA para arroz
- Evaluar el impacto de distintos pre-tratamientos y nuevas hormonas vegetales en inducción y regeneración de plantas HD en arroz, trigo y cebada
- Mejorar la regeneración de plantas verdes HD de arroz, especialmente de la raza indica
- Formar recursos humanos locales en esta especialidad.

Para establecer un grupo de producción de HDs en el INIA-Las Brujas las tareas se han planificado en dos etapas: en una primera instancia se ha completado el equipamiento y se han obtenido los reactivos de laboratorio necesarios. En simultáneo, se están realizando pruebas para poner a punto protocolos mejorados de CA y CMA para arroz, trigo y cebada con genotipos provistos por los Responsables de los Programas de Mejoramiento de INIA. Además, se está trabajando para adaptar una cámara de cría de plantas-dadoras de microsporas, de modo que las mismas puedan cultivarse todo el año en condiciones óptimas y estandarizadas de iluminación, temperatura y nutrición. La segunda instancia consiste en la fase de producción misma de HDs, y ella dará comienzo en cuanto se haya completado la fase previa.

Bibliografía

- Devaux P, Kasha KJ (2009) Overview of Barley Doubled Haploid Production. In: Touraev A *et al* (eds) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*, Springer Science+Business Media BV
- Esteves P., Clermont I., Marchand S. and F. Belzile (2014): Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. *Plant Cell Reports: Volume 33, Issue 6*, pp 871-879
- Sood S. & S. Dwivedi. (2015). *Doubled Haploid Platform: An Accelerated Breeding Approach for Crop Improvement*. Chapter III, pages 80-111, *Plant Biology and Biotechnology. Volume II: Plant Genomics and Biotechnology* Springer.

ENFOQUE METODOLÓGICO PARA EL ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA DE SUELOS DE URUGUAY

Garaycochea, S¹ Altier, N²

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

² Programa de Producción y Sustentabilidad Ambiental, Plataforma de Bioinsumos, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria INIA Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

* E-mail: sgraycochea@inia.org.uy.

Palabras claves: Metagenómica, fitodisponibilidad, fósforo.

Los métodos independientes del cultivo son esenciales para comprender la diversidad genética, estructura poblacional y roles ecológicos de la mayoría de los microorganismos. La metagenómica tiene el potencial de responder las preguntas fundamentales de la ecología microbiana, especialmente de los ecosistemas de suelos, los cuales contienen la mayor diversidad de microorganismos en la tierra (se estiman de 5000 - 10000 especies de microorganismos por gramo de suelo) (Ghazanfar *et al.*, 2010). Sin embargo, ¿hasta qué punto estos enfoques nos ofrecen una imagen fiel de la diversidad existente en el suelo? El suelo es un entorno difícil de estudiar, debiendo considerar diversos factores que pueden afectar el estudio de las comunidades cuando son utilizadas herramienta de alta procesividad como la metagenómica. Se debe de tener en cuenta el sesgo inherente a las propiedades físico-químicas del suelo que condicionan la estructura y función de las comunidades microbianas así como la diversidad biológica presente en el ambiente, ambas características deben ser consideradas al momento de establecer el diseño experimental de estudio. Además, se deben considerar los sesgos introducidos por las metodologías utilizadas para su análisis, tal como el diseño y metodología de muestreo, método de extracción del ADN del metagenoma y tecnología de secuenciación. En este trabajo analizamos cómo la metodología de muestreo y la tecnología de secuenciación elegidas condicionó los resultados obtenidos en el estudio de diversidad estructural de las comunidades microbianas de cuatro suelos seleccionados en el marco el proyecto “Identificación de microorganismos y genes asociados a la fitodisponibilidad del fósforo”.

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA, RESULTADOS NACIONALES Y APLICACIONES CONCRETAS

Grasso, A.N.^{1*} Macedo, F.¹ Ciappesoni, G¹ Brito, G² Navajas, E.A.¹

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Tacuarembó, Uruguay.

E-mail: nicograsso26@gmail.com

Palabras claves: SNP, chips, caracteres de interés productivo

Genotipado masivo de alto rendimiento con SNP

La secuenciación de genomas de varias especies ha permitido identificar polimorfismos de nucleótido simple o SNP (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP). Estas variaciones son las más comunes en las secuencias de DNA. Su abundancia y distribución en los genomas, y las nuevas tecnologías capaces de genotipar miles de SNP a la vez, han hecho a estos marcadores una herramienta por excelencia para los estudios de asociación, selección genómica, estructura genética, conservación entre otros estudios. (Ding y Jin, 2009).

Las tecnologías de genotipado masivo de alto rendimiento, fueron puestas a disposición de los investigadores por las compañías Illumina y Affymetrix. Estas, en un principio, lanzaron plataformas para humano, pero hoy en día existen para numerosas especies de interés productivo, tanto animales como vegetales.

Selección asistida por marcadores: SNP

Para caracteres difíciles de medir, como la resistencia a enfermedades, la identificación de marcadores moleculares asociados a la variación del carácter resulta especialmente útil, ya que su aplicación en esquemas de selección asistida por marcadores o MAS (de su sigla en inglés, Marker Assisted Selection) facilita la identificación de animales resistentes directamente a partir de sus genotipos, aumentando la eficiencia de la selección (Beuzen et al., 2000). Sin embargo, la aplicación de MAS para características complejas, ha estado limitada por la pequeña proporción de la variación fenotípica que explican la mayoría de los marcadores moleculares identificados (Kemper et al., 2011).

La aplicación más impactante de esta tecnología en el mejoramiento animal es la Selección Genómica (SG), que considera esta gran cantidad de información molecular para caracterizar la variación genética total de los individuos, resultando en una estimación más exacta del mérito genético en animales jóvenes y en una mayor tasa de ganancia genética en comparación con la MAS y la selección clásica (Meuwissen et al., 2001; Schaeffer, 2006).

Métodos de asociación genómica

Los estudios de asociación buscan encontrar marcadores o regiones que capturen una parte substancial de la varianza de la característica de interés.

Existen diversas metodologías, en las cuales podemos encontrar aquellas basadas en regresiones lineales y metodologías Bayesianas. La metodología más sencilla es realizar regresiones lineales simples marcador por marcador, tomando estos últimos como covariables. Aun cuando presenta ventajas desde el punto de vista de la realización de test de significancia

estos modelos tienden a presentar un ajuste menor en comparación con las metodologías que usan simultáneamente toda la información de los marcadores (Wang et al, 2012).

Con la intención de tomar toda la información disponible de los marcadores se han desarrollado métodos bayesianos, de múltiples pasos pre-procesando los datos fenotípicos de un solo paso juntando registros fenotípicos, genealógicos y genotípicos (De los Campos et al., 2013; Mizstal et al., 2009).

Ejemplos de resultados nacionales y sus aplicaciones

Estudios de calidad de la canal y la carne en Hereford.

Se inició la formación de la población de entrenamiento para calidad de canal y de carne en la raza Hereford a través de la conjunción de: a) las bases de datos de dos experimentos con novillos Hereford que realizaron un registro exhaustivo y amplio de características de canal y carne que son costosas y difíciles de medir b) las muestras de ADN de los animales de estos experimentos, conservadas en el Banco de ADN Genómico en INIA Las Brujas.

Se ha completado los estudios de asociación genómica de 21 características de crecimiento, y de calidad de canal y de carne realizados diferentes métodos estadísticos (regresiones lineales, ssGWAS, Bayes B y C).

Se genotiparon 22 toros y 512 novillos con el GeneSeek Genomic Profiler BeadChip (HD-GGP) que cuenta con aproximadamente con 78.000 SNP. Para las diferentes características evaluadas, se identificaron regiones candidatas donde se encuentran genes de efecto mayor ya conocidos, así como también genes que no han sido identificados previamente en la literatura.

Estudios de resistencia a parásitos gastrointestinales en Corriedale

Las parasitosis gastrointestinales (PGI) son un problema mundial en la producción ovina, causando graves pérdidas económicas. En nuestro país, existen estrategias para la selección de animales resistentes a PGI a través de las evaluaciones genéticas en las razas Corriedale y Merino. Los animales resistentes (R) y susceptibles (S) son determinados por la diferencia esperada en la progenie (DEP) del recuento de huevos por gramo de materia fecal (HPG). Sin embargo, este proceso es engorroso y requiere de una infección avanzada de los animales, donde ya se estarían ocasionando pérdidas productivas, lo que conlleva a la retención de los productores para la toma de registros del HPG. Asimismo, los PGI están adquiriendo resistencia a los diferentes antihelmínticos empleados. Es por todo esto, que el empleo de herramientas moleculares facilitaría la identificación de animales resistentes, pudiendo así también aumentar el progreso genético. El proyecto "Generación de una plataforma biológico-tecnológica de referencia, para estudios de selección genómica aplicada al mejoramiento en ovinos en Uruguay: énfasis en resistencia a parásitos" hizo uso de herramientas moleculares de última generación. Teniendo como criterio el DEP de HPG extremas para R y S, y un coeficiente de parentesco promedio menor a 0.04, se escogieron 100 animales Merino (50S y 50R) y 98 Corriedale (44S y 54R). Estos animales pertenecen, al Núcleo Merino Fino (INIA Glencoe) y a las líneas de selección divergentes Corriedale del SUL, respectivamente. Mediante el genotipado de estos animales con el OvineSNP50, se realizaron estudios de caso/control efectuando regresiones lineales de cada SNP con el DEP de HPG. De esta manera, se identificaron SNP que explicaron el mayor porcentaje de la varianza fenotípica.

Consideraciones finales

Si bien el costo de las herramientas moleculares está decreciendo constantemente, este sigue siendo la mayor limitante para incluirlas en los programas de mejora. Es por eso, que el diseño de paneles de un número reducido de marcadores, y por ende de menor costo, es una opción valiosa a investigar para que haya una mayor adopción de estas tecnologías. En efecto paneles o chips de SNP que están siendo puestos en plaza están reduciendo su número de marcadores, contando con SNP que se encuentran en genes de efecto mayor para enfermedades, para caracteres de interés económico, sirven para imputar microsatélites para parentesco, entre otros.

Agradecimientos

El proyecto “Implementación de herramientas genómicas en la mejora genética de la calidad de la canal y la carne en Hereford: desarrollo de poblaciones de referencias y métodos de análisis” fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FMV_1_2011_1_6671). Agradecemos a Alejandro LaManna, Georgette Banchemo, Olga Ravagnolo, Mario Lema, Juan Clariget, Fernando Baldi y María Paz Tieri por sus invaluable aportes a través del diseño e implementación de los experimentos con la raza Hereford llevados a cabo en INIA La Estanzuela. Agradecemos también la colaboración de los equipos técnicos de los Laboratorio de Carne (INIA Tacuarembó) y del Banco de ADN genómico Animal (INIA Las Brujas).

Bibliografía

Beuzen ND, Stear MJ y Chang KC. 2000. Review: Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal* 2000, 160, 42–52.

De los Campos G, Hickey JM, Pong-wong R, Daetwyler HD, Calus MPL. 2013. Whole Genome Regression and Prediction Methods Applied to Plant and Animal Breeding. *Genetics*, vol. 193, 327 – 345.

Ding C y Jin S. 2009. Single Nucleotide Polymorphisms. 578, 245-254. Humana Press: Totowa, NJ.

Kemper K, Emery D, Bishop S, Oddy H, Hayes BJ, Dominik S, Henshall J y Goddard M. 2011. The distribution of SNP marker effects for faecal worm egg count in sheep, and the feasibility of using these markers to predict genetic merit for resistance to worm infections. *Genetics Research* 93: 203-219.

Meuwissen TH, Hayes BJ, Goddard ME. 2001 Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157, 1819–1829.

Misztal I, LegarraA, Aguilar I. 2009. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92: 4648–4655.

Schaeffer LR. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 123, 218–223.

Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Muir WM. 2012. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genet. Res., Camb.*, 94, pp. 73–83.

ALGUNAS APLICACIONES DE LA GENÓMICA EN POBLACIONES CON Y SIN GENEALOGÍA CONOCIDA.

Macedo, F. ¹ Pieruccioni, F. ² Ciappesoni, G. ²; Navajas, E.A. ²

¹ Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay

* E-mail: fmacedo@fvvet.edu.uy

Palabras claves: SNP, parentesco, conservación, paternidad, ganancia genética

Introducción

Los SNP son marcadores que pueden presentar un cambio en apenas una base en la secuencia del ADN lo que resulta generalmente en dos posibles nucleótidos para determinada posición (Vignal et al., 2002). Son útiles por que se encuentran en gran número en el genoma, son genéticamente estables en mamíferos y permiten su incorporación a procesos automatizados de alto rendimiento (Heaton et al., 2002).

Los SNP han permitido la incorporación de información genómica en las evaluaciones de reproductores mejorando la precisión de individuos jóvenes y disminuyendo el intervalo generacional de forma importante (Wiggans et al., 2011). Por otro lado, son usados en programas de conservación de recursos genéticos, principalmente monitoreando la diversidad genética de las poblaciones bajo riesgo de extinción (Kristensen et al., 2015).

A nivel nacional, la incorporación de información genómica en programas de selección y de conservación de recursos genéticos ha sido objeto de varios estudios. En este trabajo se presentan algunas experiencias en las que los autores han trabajado con la asistencia de paneles de SNP.

Aportes de la genómica a poblaciones con genealogía conocida

El uso de paneles densos de SNP permite determinar las relaciones de parentesco de los individuos y estructuras subyacentes de las poblaciones. Tradicionalmente, los registros genealógicos se confeccionan en base a la comprobación de parejas de madre e hijo y registros de apareamiento. De esta forma, al conocer con que macho se aparee determinada hembra y cuál es su hijo se puede registrar padre y madre del hijo. La correcta asignación de padres tiene un efecto positivo sobre la ganancia genética efectiva. Se han estimado pérdidas en la ganancia genética de 4,3% anual y 3,5% en 20 años para un porcentaje de error de 10% en ganado lechero (Israel y Weller, 2000). Dependiendo de la especie y el sistema de producción, los registros genealógicos pueden variar en precisión; pero aún en condiciones muy intensivas como los sistemas lecheros se pueden detectar errores de asignación de paternidad de entre el 3 y 30% (Heaton et al., 2002; Ron et al., 1996). En producción de ovinos se citan errores de 5 a 30% aproximadamente (Rosa et al., 2013; Brien et al., 2010). A pesar de los errores y la reducción de la ganancia potencial, la selección vigente al momento es responsable de tasas de progreso genético significativas (figura 1).

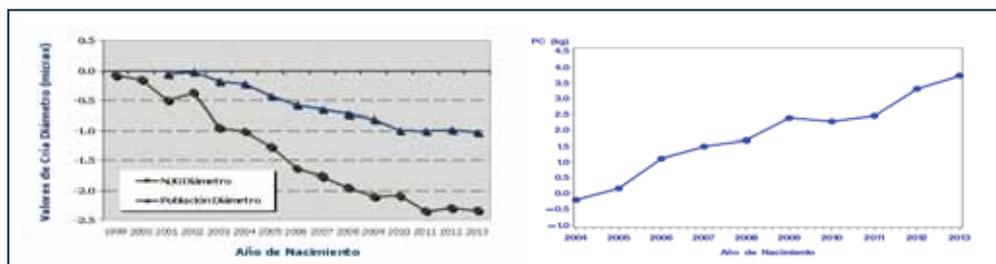


Figura 1. Tendencia genética para peso diámetro de fibra de lana en Merino (izquierda) y para peso corporal (derecha) en la raza Romney Marsh. Fuente: www.geneticaovina.com

La implementación de la información genómica permite reducir los errores de registro en comparación con el sistema tradicional.

El INIA ha trabajado en el desarrollo de un panel de SNP de baja densidad para pruebas de exclusión de paternidad. El punto de partida fue la información de 200 individuos de las razas Corriedale y Merino Australiano genotipados con el chip *OvineSNP50 BeadChip* de Illumina®. Con esta información se trabajó sobre la elección de SNP que presentaran alta variación en la población. Los principales criterios de elección fueron la mínima frecuencia alélica (MAF) y la distribución en el genoma.

La validación de los marcadores se realizó sobre una muestra de 1439 individuos Corriedale y 1535 Merino. Las pruebas de exclusión de paternidad se realizaron con un panel completo de 258 SNP y 4 sub-sets del mismo. Se observaron errores en la asignación de padres de 12,1% y 7,0% en promedio de los 5 paneles para las razas Corriedale y Merino respectivamente, mientras que errores de asignación de madres se encontraron 8,7% y 5,7% respectivamente para Corriedale y Merino. Los resultados están dentro de los rangos esperados según la bibliografía mencionada en los párrafos anteriores. Próximos estudios se centrarán en las pérdidas de ganancia genética asociadas a estos errores y en nuestros sistemas de cría (proyecto Fondo María Viñas FMV_2_2011_1_6356).

Aportes a poblaciones sin genealogía conocida

Los estudios realizados por los autores en la población de ovinos Criollos del Parque Nacional de San Miguel ejemplifican el uso de información genómica en poblaciones sin registros genealógicos. Esta población representa una de las majadas más numerosas de este recurso genético naturalizado que se encuentra en peligro de extinción (Pieruccioni, 2012; MGAP, 2003).

Debido a que la majada se encuentra en una zona de monte nativo y bañado, manejada en condiciones extensivas, resulta muy difícil llevar a cabo la identificación de padres para la confección de buenos registros genealógicos.

Sin embargo, en el año 2011 se comenzó a realizar la identificación de los individuos y se logró conformar registros genealógicos por vía materna (Pieruccioni, 2012). Posteriormente, con financiamiento internacional se genotipó con un chip de alta densidad (606.000 marcadores SNP) a 158 individuos de la población incluyendo 21 carneros, 60 ovejas y 77 corderos y corderas (Macedo et al., 2014).

Pruebas de exclusión de maternidad

Entre los objetivos del estudio, se planteó probar los SNP preseleccionados para exclusión de paternidad en las razas Corriedale y Merino como una forma de detectar errores en las asignaciones empíricas de maternidad y la posibilidad de completar los registros genealógicos con la asignación de padres a un costo relativamente reducido. Del cruce de información de los SNP preseleccionados para paternidad con los SNP del panel de alta densidad se separaron 278 SNP que luego se dividieron en dos sets tomando solamente los marcadores más informativos. Se usaron para pruebas de exclusión de maternidad dos paneles finales de 72 y 93 SNP (probabilidad de exclusión de 0,9999 y 0,99999, respectivamente), así como también el panel completo de alta densidad como forma de contrastar los resultados. De 34 pares de madre-hijo testeados los tres paneles se comportaron de igual forma encontrando un 5,9% de errores en la asignación de madres. Por un lado, esto demuestra que los paneles de baja densidad pueden ser usados en esta población para la asignación de paternidad en la medida que el genotipado sea rutinario. Por otro lado la cantidad de errores (2 en 34) resulta baja, indicando que el sistema de identificación de madres resulta satisfactorio, aunque mejorable (Macedo et al., 2014).

Uso de Parentesco Genómico

Otro de los objetivos del grupo de trabajo fue desarrollar un sistema de apareamientos que minimizaran la pérdida de variación genética de la población mediante la optimización de apareamientos. Sin embargo al no contar con registros genealógicos completos no es posible determinar aquellos apareamientos entre individuos menos emparentados de la población.

Una forma de aprovechar la información genómica es justamente plantear algún tipo de matriz de parentesco basada en los genotipos de los individuos. La bibliografía plantea varios métodos de estimar las relaciones de parentesco (Toro et al., 2011) pero en este caso se realizó el parentesco genómico como $f_{M_{ij}} = (1/L) \sum_{l=1}^L \left[\frac{(\sum_{k=1}^2 \sum_{m=1}^2 I_{lk(i)m(j)})}{4} \right]$ donde L es la cantidad de marcadores e I una función de identidad entre el k -ésimo alelo del individuo i y el m -ésimo alelo del individuo j para el locus l (Saura et al., 2013). La confección de una matriz de parentesco genómico permitió luego plantear diferentes posibilidades de apareamientos desde la elección al azar y apareamientos al azar hasta apareamientos optimizados. En la figura 2 se representa un ejemplo de los resultados obtenidos usando simulaciones en las que se eligen y aparean al azar 9 machos, se seleccionan 9 machos menos emparentados con las hembras y se aparean al azar y la realización de apareamientos optimizados. Para este estudio se usaron 17 machos y 118 hembras. En la figura 2 se representa el parentesco promedio entre los machos y las hembras apareados (Macedo et al., 2015).

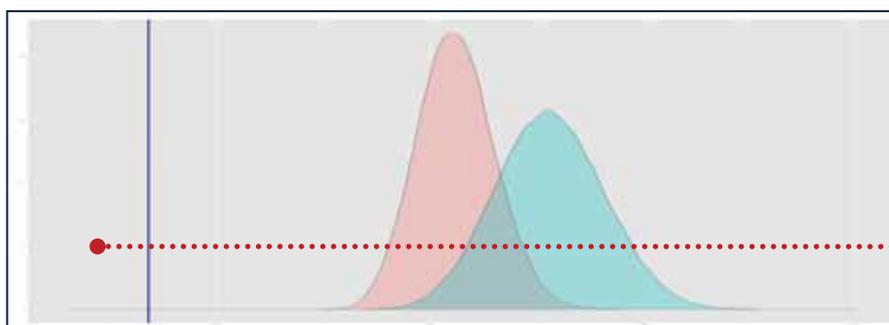


Figura 2. Parentesco promedio obtenido por apareamientos optimizados (línea azul, 0,667), distribución de parentescos promedios de simulación de apareamientos cuando se usa 9 machos menos emparentados y apareamientos al azar (distribución roja, media 0,681) y cuando se seleccionan al azar 9 machos y se realiza apareamientos al azar (distribución azul, media 0,685). La línea punteada roja indica todo el espectro de posibilidades de promedios de apareamientos dónde el mínimo promedio corresponde a 0,661 y el máximo 0,741 (el máximo se encuentra fuera de los límites del gráfico).

Conclusiones

El uso de paneles de baja densidad de SNP permite detectar y corregir errores en la asignación de padres a costos reducidos. En poblaciones bajo programas de selección sería posible disminuir las pérdidas en la ganancia genética gracias a esta incorporación. En poblaciones sin registros genealógicos o con registros genealógicos parciales los paneles de SNP de baja densidad permiten completarlos, mientras que el uso de paneles de alta densidad de SNP permite estimar el parentesco genómico, ampliando las posibilidades de manejo de la población.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo María Viñas por el financiamiento del proyecto “Panel de SNP para identificación de parentesco en ovinos” (FMV_2_2011_1_6356); a la Organización de las

Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) por el financiamiento del proyecto “Caracterización Productiva y conservación de ovinos criollos del Uruguay” y al Servicio de Parques del Ejército por el apoyo necesario que brindan para la realización de las actividades de campo con los ovinos Criollos.

Bibliografía

Barendse W, Armitage SM, Kossarek LM, Shalom A, Kirkpatrick BW, Ryan AM, Clayton D, Li L, Neibergs HL, Zhang N. 1994 A genetic-linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6, 227–235.

Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Stone RT, Sunden SL, Hawkins GA, Toldo SS, Fries R, Grosz MD, Yoo J. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136, 619–639.

Brien FD, Hebart ML, Smith DH, Edwards JEH, Greeff JC, Hart KW, van der Werf JHJ. 2010. Opportunities for genetic improvement of lamb survival. *Animal Production Science*, 50(12),

Heaton MP, Harhay GP, Bennett GL, Stone RT, Grosse WM, Casas E, Keele JW, Smith TPL, Chitko-McKown GC, Laegreid WW. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 13(5), 272–81.

Israel C, Weller JI. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science*, 83(1), 181–187.

Kristensen TN, Hoffmann AA, Pertoldi C, Stronen AV. 2015. What can livestock breeders learn from conservation genetics and vice versa? *Frontiers in Genetics*. 6:38.

Macedo F, Pieruccioni F, Villanueva B, Navajas EA. 2015. Uso de información genómica para optimizar apareamientos en ovinos criollos. Trabajo aceptado. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Chile.

Macedo F, Navajas EA, Aguilar I, Grasso AN, Pieruccioni F, Ciappesoni G. 2014. New Parentage Testing SNP Panel for Commercial Breeds will be a Useful Tool for Conservation of Creole Sheep. *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*. Vancouver, Canada.

MGAP, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. 2003. Recursos Zoogenéticos. Informe Uruguay. 64pp

Pieruccioni, F. 2012. Descripción cuantitativa del crecimiento pre-destete de los ovinos Criollos del Parque Nacional de San Miguel. http://www.fvet.edu.uy/sites/default/files/biblioteca-archivos/Tesis-de-grado-2012/biblio_pieruccioni.pdf

Ron M, Blanc Y, Band M, Ezra E, Weller J I. 1996. Misidentification rate in the Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. *Journal of Dairy Science*, 79(4), 676–681.

Rosa A, Sardina M, Mastrangelo S, Tolone M, Portolano B. 2013. Parentage verification of Valle del Belice dairy sheep using multiplex microsatellite panel. *Small Ruminant Research*, 113(1), 62–65.

Saura M, Fernández A, Rodríguez MC, Toro MA, Barragán C, Fernández AI, Villanueva B. 2013. Genome-Wide Estimates of Coancestry and Inbreeding in a Closed Herd of Ancient Iberian Pigs. Tinker NA, ed. PLoS ONE. 8(10):e78314.

Toro MA, García-Cortés LA, Legarra A. 2011. A note on the rationale for estimating genealogical coancestry from molecular markers. *Genetics Selection Evolution*. 43:27

Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* 34(3), 275–305.

Wiggans GR, VanRaden PM, Cooper TA. 2011. The genomic evaluation system in the United States: Past, present, future. *Journal of Dairy Science*. 94:3202-3211.

BÚSQUEDA, CARACTERIZACIÓN Y PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Maidana, M.¹ Murchio, S.¹ Schvartzman, C.¹ Leoni, C.² Blumwald, E.³ Dalla Rizza, M.¹

¹Laboratorio de proteínas, Unidad Técnica de Biotecnología, INIA Las Brujas

²Unidad de Fitopatología, INIA Las Brujas

³Department of Plant Science, University of California

* E-mail: matiasmaidana@gmail.com

Palabras claves: Fito patógenos, péptidos antimicrobianos, bio reactores.

Introducción

En el Laboratorio de Proteínas (LP) de la Unidad Técnica de Biotecnología (UTBio) en INIA Las Brujas, se desarrolla un proyecto de búsqueda y caracterización de péptidos antimicrobianos (AMP) como alternativa para el control de fitopatógenos de poscosecha. Los AMP son efectores de la inmunidad innata que están presentes en una amplia variedad de organismos que van desde bacterias y hongos hasta mamíferos y plantas superiores (Yokoyama et al. 2009). Los organismos blanco reportados son bacterias, hongos, virus, protozoarios y células tumorales. Esta línea de investigación descansa sobre una base de tres componentes esenciales: la identificación de potenciales fuentes de péptidos, la purificación y caracterización de los mismos, y la producción heteróloga de los AMP (Dalla Rizza et al. 2008).

Búsqueda y caracterización

A la fecha el laboratorio ha identificado más de 20 extractos proteicos de diferentes especies vegetales con actividad antimicrobiana con valores de MIC (Mínima concentración inhibitoria) de 1,5 a 125 µg/ml (Larrañaga et al. 2012).

A partir de semillas de *Amaranthus quitensis*, se identificaron péptidos antimicrobianos pertenecientes a la familia de heveínas, Aq-AMP1 y Aq-AMP2. Ambos péptidos tienen una masa de 3 kDa aproximadamente, con actividad biológica frente a diferentes hongos filamentosos mostrando valores de MIC menores a 10 µM. Particularmente Aq-AMP2, es un péptido antimicrobiano de 3181 Da, su estructura tridimensional de dos hojas β y una hélice α está estabilizada por 3 puentes disulfuros, con un dominio de unión a quitina. Durante la biosíntesis del péptido existe un precursor pre-propéptido de 86 aminoácidos (aa) con tres regiones bien identificadas; un péptido señal de 25 aa en amino terminal (N-ter) de transporte a retículo endoplásmico (ER), la región codificante del péptido maduro de 30 aa y en carboxilo terminal (C-ter) una señal de 26 aa de transporte a vacuola (Bolte et al. 1993). Este péptido presenta actividad antifúngica reportada contra 18 especies de hongos filamentosos de interés agropecuario con valores de MIC entre 4 y 8 µM, no presenta actividad hemolítica ni fitotóxica. Otras características interesantes de este AMP son su estabilidad térmica y resistencia a la degradación proteolítica. Debido a su baja biodisponibilidad en la fuente natural la producción heteróloga se vuelve fundamental para poder evaluar su comportamiento *in-vivo*.

Producción heteróloga

Dentro del proyecto se busca abordar diferentes plataformas de expresión con el fin de poder evaluar la relación costo-producción de cada una. Las plataformas planteadas para trabajar son *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, células de insecto y plantas como biorreactores.

En colaboración con la unidad de proteínas recombinantes (UPR) del Instituto Pasteur de Montevideo (IPMont) se comenzó trabajando en la plataforma procariota *E. coli*, siendo

necesario el empleo de proteínas de fusión para obtener un correcto plegamiento debido a la carencia de sistema endomembranoso de la bacteria. Se logró producir péptido activo fusionado a tioredoxina (Aq-AMP2-Trx) que mostró similar actividad a la observada *in-vitro* con el péptido purificado, con valores MIC de 4µM y no observándose actividad inhibitoria en la proteína de fusión. El comportamiento de Aq-AMP2-Trx *in-vivo* fue evaluado mediante el control del hongo *Penicillium digitatum* en la planta de empaque de naranjas en Salto Grande. El péptido fusionado a tiorredoxina a una concentración 64 µM logró controlar el 62% de las infecciones con respecto al grupo control conteniendo solo Trx (Alem & Díaz-Dellavalle 2014). Si bien la actividad antifúngica observada *in-vivo* resultó promisorio, sería esperable que su eficiencia mejore sin la proteína de fusión.

Con el fin de buscar una plataforma de expresión eucariota y teniendo en cuenta que Aq-AMP2 proviene de semilla, se analizó el empleo de plantas como biorreactores. Se diseñaron construcciones en vectores plasmídicos para la producción tejido específica en plantas de *Brachypodium distachyon* comúnmente empleado como modelo de transformación en cereales. El endosperma de semilla es un órgano de almacenamiento que brinda condiciones óptimas para la acumulación y conservación activa de proteínas de reserva. Con este fin se identificaron promotores que difieren en la expresión y momento de desarrollo de la planta: un promotor de ubiquitina de *B.distachyon* BdUbi-10, un promotor de glutelinas de *B.distachyon* BdGlu-1 y un promotor de glutelinas de arroz OsGt13a^s. El gen de interés consiste en la región codificante completa del pre-propéptido antimicrobiano Aq-AMP2 y como gen reportero se empleó *gusA*, codificante de β-Glucuronidasa. En colaboración con el grupo del Dr. Eduardo Blumwald de la Universidad de Davis se generaron 6 construcciones diferentes las que se utilizaron para transformar *B. distachyon*. Se obtuvieron 18 eventos de BdUbi-10-Aq-AMP2, 43 eventos de BdUbi-10-*gusA*, 23 eventos de BdGlu-1-Aq-AMP2, 5 eventos de BdGlu-1-*gusA*, 2 eventos de OsGt13a-Aq-AMP2 y 41 eventos de OsGt13a-*gusA*. A partir de éstos eventos primarios se colectaron semillas (T1) para su evaluación bajo condiciones de bioseguridad en el laboratorio de la UTBio. Las plantas T1 fueron crecidas en agar-agua con

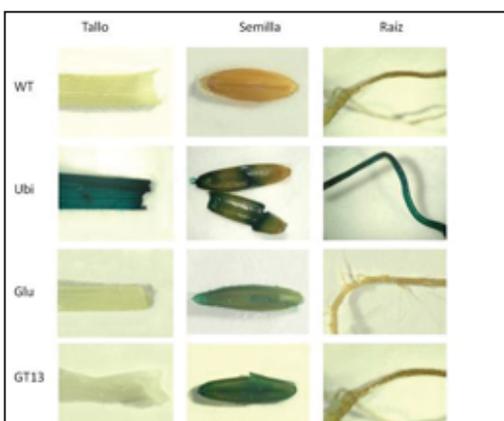


Figura 1. Detección de actividad β-Glucuronidasa en tallo, semilla y raíz de distintas líneas transgénicas de *B. distachyon*, según promotor empleado.

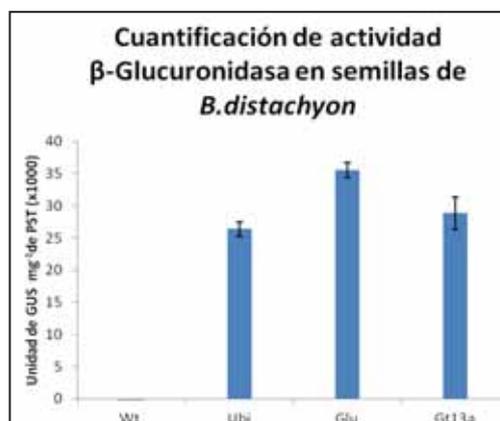


Figura 2. Cuantificación de acumulación de β-Glucuronidasa en endosperma de semilla en función del promotor empleado .

Higromicina 25µg/ml con el fin de seleccionar sólo aquellas resistentes las que fueron posteriormente confirmadas por PCR. La evaluación cualitativa de los eventos correspondientes al gen reportero se realizó empleando el sustrato artificial X-glc que genera un compuesto azul al ser clivado por la enzima, tomando como grupo control plantas *B. distachyon* sin transformar (WT) (Fig. 1)(Jefferson et al. 1987). Los resultados confirmaron la

expresión tejido específica del reportero. Se observó actividad en tallo, raíz y semillas en distintos eventos con el promotor BdUbi10 mientras que los eventos con el promotor BdGlu-1 y OsGt13a solo mostraron coloración en las semillas. Cabe destacar que el grupo control (WT) no desarrolló coloración en ningún tejido. Para determinar el nivel de expresión en función de los promotores empleados se realizó el ensayo de cuantificación de actividad glucuronidasa en proteínas solubles totales (PST) de semillas (Kabbage et al. 2011). Como sustrato se utilizó 4-MUG, (4-Metilumbelliferil- β -D-glucuronido) que se convierte en un fluoróforo capaz de absorber a 355nm y emitir a 450nm luego de ser clivado por la enzima. Los resultados preliminares indican que los eventos con mejor acumulación de β -Glucuronidasa en semilla son los que se encuentran regulados por el promotor específico de glutelinas pBdGlu1, mientras que tanto pBdUbi-10 como pOsGt13a presentaron menor nivel de acumulación, y no se observó actividad en el WT (Fig.2). Se continuará con la evaluación de los eventos transformados con el péptido antimicrobiano Aq-AMP2, seleccionando aquellos eventos con mejores niveles de expresión.

Bibliografía

- Alem, D. & Díaz-Dellavalle, P., 2014. In Search of Topical Agricultural Biofungicides: Properties of the Recombinant Antimicrobial Peptide Trxaq-AMP Obtained from *Amaranthus quitensis*. *J Microb Biochem ...*, 6(5), pp.268–273. Available at: <http://omicsonline.org/open-access/in-search-of-topical-agricultural-biofungicides-properties-of-the-recombinant-antimicrobial-peptide-trxaqamp-obtained-from-amaranthus-quitensis-1948-5948.1000155.pdf>.
- Bolle, M.F.C. et al., 1993. Cloning and characterization of a cDNA encoding an antimicrobial chitin-binding protein from amaranth, *Amaranthus caudatus*. *Plant Molecular Biology*, 22(6), pp.1187–1190.
- Dalla Rizza, M. et al., 2008. Biomolecules as host defense weapons against microbial pathogens. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 2(2), pp.82–96.
- Jefferson, R. a, Kavanagh, T. a & Bevan, M.W., 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), pp.3901–3907.
- Kabbage, M., Ek-Ramos, M. & Dickman, M., 2011. A β -glucuronidase (GUS) based cell death assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (May), pp.4–7.
- Larrañaga, P. et al., 2012. Activity of Naturally Derived Antimicrobial Peptides against Filamentous Fungi Relevant for Agriculture. *Sustainable Agriculture Research*, 1(2), pp.211–221.
- Yokoyama, S. et al., 2009. The chitin-binding capability of Cy-AMP1 from cycad is essential to antifungal activity. *Journal of Peptide Science*, 15(7), pp.492–497.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN OVINOS RESISTENTES A PARÁSITOS GASTROINTESTINALES MEDIANTE RNA-Seq

Peraza, P.^{1*} Rincón, G.² Sotelo-Silveira, J.³ Dalla Rizza, M.¹

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

² Departamento de Genómica Animal, Pfizer, USA.

³ Departamento Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguay.

*E-mail: pperaza@inia.org.uy

Palabras claves: Ovis Aries, transcriptómica, secuenciación

Las parasitosis gastrointestinales (PGI) tienen un gran impacto sanitario-económico y contaminante en la producción ovina del Uruguay. Actualmente se utilizan tratamientos antihelmínticos, los que han llevado al desarrollo de resistencia de los parásitos a los químicos utilizados y por consiguiente su pérdida de efectividad. Otra opción es la de realizar una selección de ovinos resistentes mediante el DEP (Diferencia Esperada en la Progenie) del recuento de huevos de parásitos/gramo de heces (HPG). En nuestro país, si bien esto es aplicado en algunas cabañas, es una característica compleja de medir que además presenta valores de heredabilidad moderados.

Este tipo de trabajos intenta estudiar el perfil de expresión de genes mediante el análisis del transcriptoma (parte del genoma que es transcrito) en tejidos directamente relacionados con la invasión y defensa a PGI. Los animales utilizados fueron provenientes de líneas divergentes de ovinos de la raza Corriedale del Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) sometidos a una selección de más de 15 años a la resistencia/susceptibilidad genética a PGI. La técnica de secuenciación utilizada (RNA-Seq) permite obtener un perfil de expresión, el cual, mediante la utilización de herramientas bio-informáticas es posible determinar las características de sus secuencias y la abundancia relativa para cada tejido. El análisis del transcriptoma de estos tejidos contribuye al entendimiento de su expresión y regulación diferencial provenientes de distintos tipos celulares de individuos con respuestas fisiológicas diferentes ante iguales condiciones ambientales. Esta técnica, permite a su vez buscar marcadores en genes expresados permitiendo un análisis con alta resolución del transcriptoma con el fin de comprender funcionalmente los genes que intervienen en la expresión de fenotipos.

VARIABILIDAD GENÉTICA GLOBAL Y POR SEGMENTOS CROMOSÓMICOS EN RAZAS OVINAS COMERCIALES Y CRIOLLAS

Pieruccioni, F.^{1*}, Macedo, F.², Ciappesoni, G.¹, Navajas, E.A.¹

¹Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Las Brujas, Canelones, 90200, Uruguay.

²Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, Montevideo, 11600, Uruguay.

* E-mail: florpieruccioni@gmail.com

Palabras claves: tramos de homocigosis, consanguinidad, diversidad genética, Ovis aries

Introducción

La adaptación de una especie a los cambios del medio ambiente depende de la variabilidad genética que posea (FAO, 2010). La consanguinidad lleva a un aumento de la homocigosis con la consiguiente reducción de la diversidad genética y posible reducción del desempeño productivo y reproductivo (depresión endogámica). El estudio de este parámetro resulta fundamental tanto en poblaciones criollas como comerciales.

Si bien, la consanguinidad tradicionalmente se calculaba en base a información genealógica, el desarrollo de los chips de alta densidad de polimorfismo de un nucleótido simple (SNP) generó nuevas oportunidades para el estudio del genoma y las poblaciones a nivel genómico. La información genómica que puede estar disponible actualmente ha llevado a la implementación de nuevas formas de análisis. Una de ellas es la determinación del coeficiente de consanguinidad, a partir de la proporción del genoma explicado por tramos de homocigosis (ROH). Los ROH son segmentos contiguos de genotipos homocigotas que permiten la estimación del coeficiente de consanguinidad (F_{ROH}) tanto a lo largo de todo el genoma como por cromosoma (Karimi, 2013). Esto posibilita la caracterización de los patrones de ROH y la identificación de regiones con un mayor acúmulo de homocigotas, denominadas “islas de ROH”. El estudio de los efectos de las mismas permitirá evaluar la asociación de estas con caracteres de importancia productiva. A su vez, existe una correlación entre la longitud de los ROH y la tasa de recombinación. Los segmentos largos (> 10000 kb) indican una consanguinidad reciente. En cambio los segmentos cortos (< 5000 kb) informan de la presencia de consanguinidad cuyo origen es lejano (Purfield et al., 2012; Bjelland et al., 2013).

El objetivo de este trabajo es presentar las potencialidades de los ROH aplicados al estudio de razas ovinas comerciales y Criollos.

Materiales y Métodos

Se analizaron los datos genómicos obtenidos de paneles de SNP de 606k y 50k de marcadores. El número efectivo de SNP en el primer caso fue de 426.923 SNP, luego de remover SNP que no cumplieran con los controles de calidad (call rate 90%) y de retirar los marcadores fijados (mínima frecuencia alélica de cero igual a 135.351 SNP). En el caso del panel de menor densidad, el número final de SNP, fue 32.916 SNP. Son los SNP en común entre los paneles de 606k y 50k SNP, y se utilizó en los ovinos Criollo, Merino y Corriedale.

Para la determinación de los ROH se deben establecer una serie de parámetros: cantidad mínima de SNP homocigotas consecutivos, cantidad de heterocigotos permitida, longitud mínima (kb) y la distancia máxima entre marcadores en el ROH (kb). Estudios preliminares

mostraron un posible efecto sobre los resultados y se decidió evaluar cómo influyen estos parámetros en la longitud de ROH, número de ROH y F_{ROH} , por y entre paneles de SNP.

El coeficiente de consanguinidad (F_{ROH}) se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$F_{ROH} = \sum_k \text{longitud (ROH}_k\text{)}/L$$

donde, k es el número de ROH identificado para cada animal y L la longitud total del genoma (Bjelland et al., 2013).

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos evidencian que la densidad de marcadores en el panel y los parámetros establecidos para la determinación de los ROH condicionan la identificación de ROH, la longitud promedio de los mismos y la estimación de la consanguinidad.

Para una alta densidad de marcadores, la longitud mínima para la identificación de los ROH tiene relación directa e inversa con la longitud media y el número de los mismos, respectivamente. Es decir, al aumentar el umbral se incrementa la longitud media de los ROH, pero se reduce el número de ROH identificados y la consanguinidad promedio estimada.

En el panel de baja densidad no es factible utilizar gap menores a 250 kb ya que no se identificaron o la cantidad es mínima. Al contrario de lo que sucede en el panel de alta densidad, en este tipo de panel el aumentar la longitud mínima de los ROH tiene una influencia mínima en el número de ROH, longitud promedio y la consanguinidad estimada es mínima.

En la población de ovinos Criollos analizada, se encontró que la F_{ROH} estimado con el panel de alta densidad es diez veces mayor respecto al valor estimado con baja densidad.

La consanguinidad de los Criollos estimada por los ROH es tres veces mayor a la de las razas comerciales consideradas en este estudio. La determinación de los ROH ha permitido además estudiar la variación entre cromosomas y la identificación de “islas de ROH”.

Conclusiones

Los ROH son una herramienta nueva para el estudio de la variabilidad genética y la consanguinidad en base a información genómica. Pero se deben definir adecuadamente los parámetros para su determinación de manera que las comparaciones entre diferentes estudios sean posibles.

Estos permiten medir la homocigosidad por cromosomas o en regiones específicas, las cuales pueden tener relación con caracteres de interés productivo. Se continuará trabajando y profundizando sobre los ROH debido al valor que presentan, y por su aplicabilidad a nivel de las razas comerciales.

Agradecimientos

Al Servicio de Parques del Ejército por la colaboración en las tareas con los ovinos Criollos. A la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) por el financiamiento del proyecto “Caracterización productiva y conservación de ovinos Criollos del Uruguay”.

Bibliografía

Bjelland D, Weigel K, Vukasinovic N, Nkrumah J. 2013. Evaluation of inbreeding depression in Holstein cattle using whole-genome SNP markers and alternative measures of genomic inbreeding. *Journal Dairy Science*, 96:4697– 4706.

FAO. 2010. La situación de los recursos zogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Comisión de recursos genéticos para la alimentación y la agricultura. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación Roma.

Karimi Z. 2013. Runs of Homozygosity patterns in Taurine and Indicine cattle breeds [Major thesis animal breeding and genetics] European Master in Animal Breeding and Genetics.

Purfield D, Berry D, McParland S, Bradley D. 2012. Runs of homozygosity and population history in cattle. *BioMed Central Genetics*, 13(70).