



## INFORME TÉCNICO

OFICINA DE PARTES - FIA RECEPCIONADO	
Fecha	28 FEB. 2006
Hora	13:32
Nº Ingreso	913

Fecha de entrega del Informe

Nombre del coordinador de la ejecución

Humberto Prieto Encalada

Firma del Coordinador de la Ejecución

### 1. ANTECEDENTES GENERALES DE LA PROPUESTA

Nombre de la propuesta

***Asistencia al:***  
***“2005 ISHS Symposium” y “Simposio Internacional sobre Biotecnología del Cultivo de Frutas de Zonas Templadas y Especies Tropicales”***

Código

FIA-CD-V-2005-1-A-092

Entidad responsable

Instituto de Investigaciones Agropecuarias

Coordinador(a)

Humberto Prieto

Tipo de Iniciativa(s)

Gira

Beca

Evento

Consultores

Documentos

Fecha de realización (inicio y término)

9 al 14 de Octubre de 2005



## 2. RESUMEN DE LA PROPUESTA

Resumir en no más de una página la justificación, actividades globales, resultados e impactos alcanzados con la propuesta completa. Cuando exista más de una iniciativa, cada una de ellas debe ser resumida en forma específica. Estos resúmenes deben sintetizar los aspectos principales de la propuesta y cada una de sus iniciativas en forma general.

### EVENTOS

La Reunión trató el Primer Simposio Internacional sobre Árboles Frutales Transgénicos y el Tercer Simposio Internacional de Biotecnología de Especies Tropicales. Este Simposio Internacional de Biotecnología de Especies Tropicales se ha celebrado a intervalos de cuatro años, con reuniones anteriores en Taipei, Taiwán (2001) y en Brisbane, Australia (1997). La Sociedad Internacional de Ciencia Hortícola (ISHS, por sus siglas en inglés: International Society of Horticultural Science) patrocina este simposio conjunto.

**Objetivo Inicial.** El objetivo fue reunir a investigadores de biotecnología de laboratorios de los sectores gubernamental, universitario y privado que trabajan con frutas de árboles de zonas templadas y con cultivos ornamentales, de vegetales y de frutas tropicales y subtropicales. Se registraron participantes que representaron a muchos países desarrollados, con programas de investigación avanzados y países en desarrollo de América del Sur, América Central, África, Sur y Sureste de Asia y la región del Mediterráneo.

El Simposio Internacional sobre Biotecnología del Cultivo de Frutas de Zonas Templadas y Especies Tropicales reunió a investigadores que están activos en el desarrollo de herramientas de biotecnología para el cultivo de frutas en áreas templadas y tropicales y a aquellos que trabajan con una gama de especies de cultivos hortícolas en los trópicos.

**Temas Abordados.** Los temas presentados incluyeron:

1. Métodos transgénicos para mejorar: la calidad del producto, la resistencia a las enfermedades, los insectos y el estrés abiótico, el crecimiento y desarrollo de las plantas para mejorar el rendimiento del cultivo.
2. Adelantos recientes en el estudio del genoma de las especies de árboles frutales y de cultivos hortícolas tropicales y subtropicales y aplicaciones específicas a: a) identificación de genes y b) programas de cultivos aplicados.
3. Entrada de cultivos transgénicos en el mercado, incluyendo: a) derechos de propiedad intelectual, b) asuntos reguladores para la comercialización, c) evaluación de los riesgos
4. Tecnologías facilitadoras: a) cultivo de tejidos, b) regeneración, c) transformación genética, d) embriogénesis somática.
5. Workshops específicos: APPLE, CITRUS, GRAPE, MUSA, PAPAYA, PRUNUS

**Resultados.** Las actividades desarrolladas en el Simposio resultaron de gran éxito para el grupo de INIA-La Platina. Se presentaron tres trabajos específicos de área (transformación de vides, transformación de carozos y pardeamiento en chirimoya), los que fueron extensamente discutidos y comparados con aquellos de los pares internacionales presentes. También se logró un posicionamiento e interacción muy altos en esta jornada, con activa participación en reuniones extra-evento en University of Florida (Campus Apopka) y con personal USDA-ARS.



### 3. ALCANCES Y LOGROS DE LA PROPUESTA GLOBAL

#### Problema a resolver, justificación y objetivos planteado inicialmente en la propuesta

Se planteó asistir, participar y generar enlaces de trabajo entre los participantes internacionales, en el Simposio Internacional sobre Biotecnología del Cultivo de Frutas de Zonas Templadas y Especies Tropicales. De acuerdo a la experiencia recogida y a excelente acogida de nuestro grupo de trabajo, se ha logrado un posicionamiento muy interesante en el medio internacional. Desde esta perspectiva, se ha dado a conocer el trabajo de gran escala que este laboratorio realiza en el ámbito de la transformación genética de vides y frutales de carozo. Asimismo, se ha medido el real estado de nuestra investigación en el concierto internacional, y mejor aún, en el concierto específico de la transformación genética de especies frutales.

#### Objetivos alcanzados tras la realización de la propuesta

Se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el estado del arte mundial en la biotecnología frutícola de zonas templadas (y tropicales).
- Presentar y apoyar tres trabajos del área, desarrollados en el laboratorio de biotecnología y post-cosecha de INIA-La Platina.
- Participar activamente en rondas de generación de enlaces y proyectos relacionados o de continuación.

Tras la realización de la propuesta, podemos decir que el concierto internacional de la biotecnología frutícola presenta un par de buenos ejemplos: papaya y ciruelas. Estos dos son los ejemplos utilizados profusamente como modelos de desarrollo técnico, en donde la transformación genética ha sido exitosamente adoptada por el sistema productivo. Otro gran rubro aparece con muy buenas expectativas: las vides. De manera estratégica, nuestro grupo posee trabajos en los usualmente interactúa con los actores involucrados en todas estas tecnologías exitosas. Además, tras este análisis, podemos decir que nuestro grupo también posee líneas importantes de desarrollo a escala internacional, como lo constituye el trabajo masivo para generar vides con resistencia a *Botrytis* y las plataformas de transformación de *Prunus salicina* y *persica*.

Los tres trabajos se presentaron exitosamente, en sus formatos respectivos. Todos ellos generaron impacto a diferentes escalas.

Finalmente, se logró la creación de una “serve list” para transformación genética de frutales



de carozo, la que ha quedado ubicada en  
<http://www.mainlab.clemson.edu/gdr/MailingList.shtml>.

### Resultados e impactos esperados inicialmente en la propuesta

La participación en las reuniones científicas especificadas tuvo como meta fundamental, posicionar el grupo de investigación en transformación genética de vides y carozos en el concierto mundial. Esta posición ya es, en cierta forma, conocida para algunos núcleos internacionales (como USDA-ARS, Cornell University y AgriFood Canada).

Así, los resultados esperados fueron:

1. Presentar resultados técnicos.
2. Establecer redes de trabajo con grupos de genoma y transformación genética.
3. Establecer redes de trabajo con grupos de trabajo en Plum Pox Potyvirus.
4. Establecer grupos de trabajo para otros tipos de frutales (Anona cherimola, H. Prieto co-investigador).

### Resultados obtenidos

Descripción detallada de los conocimientos y/o tecnologías adquiridos y/o entregados. Explicar el grado de cumplimiento de los objetivos propuestos, de acuerdo a los resultados obtenidos. Para consultorías es necesario anexar el informe final del consultor.

#### 1. Posicionamiento internacional.

Sin duda que uno de los aspectos más destacados derivados de la asistencia y presentación de trabajos por el suscrito es el posicionamiento alcanzado dentro de los pares internacionales. Esto ha quedado demostrado en las interacciones específicas posteriores con distintos grupos internacionales, lo que en su mayoría han requerido información basada en nuestra experiencia.

#### 2. Incorporación a una red específica de trabajo.

Más que Chile (y en particular nuestro grupo) quedar inserto en una red específica de trabajo, la situación real ha sido que, en forma conjunta entre los actores más relevantes del área (incluido nuestro grupo), se han tomado las mayores medidas posibles para generar una red activa de contacto y de discusión de resultados en marcha.

#### 3. Acuerdo de trabajo en Chile para expertos de visita durante 2006.

La visita de Ralph Scorza en los próximos meses de invierno 2006 es ya un hecho. Él se incorporará a los trabajos emprendidos por el grupo INIA-La Platina, de manera de apoyar los proyectos que ya están en marcha. De forma adicional, este investigador, debido a su alto background de genetista y mejorador, vendrá a aportar no sólo a



programas tecnológicos como el de la transformación genética, sino también, a los programas de mejoramiento convencional de frutales de carozo.

### Resultados adicionales

Describir los resultados obtenidos que no estaban contemplados inicialmente como por ejemplo: formación de una organización, incorporación de alguna tecnología, desarrollo de un proyecto, firma de un convenio, entre otros posibles.

### Aplicabilidad

Explicar la situación actual del sector y/o temática en Chile (región), compararla con las tendencias y perspectivas presentadas en las actividades de la propuesta y explicar la posible incorporación de los conocimientos y/o tecnologías, en el corto, mediano o largo plazo, los procesos de adaptación necesarios, las zonas potenciales y los apoyos tanto técnicos como financieros necesarios para hacer posible su incorporación en nuestro país (región).

Uno de los aspectos más destacables derivados de la asistencia a este Simposio es el alto nivel de experiencia que presenta nuestro país en relación a otros grupos internacionales. Chile se ha posicionado junto a USA, Canadá, Italia y España como uno de los grupos de más alto nivel de experiencia y trabajo en desarrollo en el área de transformación genética de especies frutales templadas y leñosas. En esto, destacan de sobremanera las experiencias y nivel alcanzados en las especies *Vitis vinifera*, *Prunus persica*, *Prunus salicina* y *Prunus domestica*.

A esta altura, estos trabajos son ampliamente conocidos y difundidos en el ámbito específico de la ciencia básica. Un reflejo de ello es la preparación de un especial de transformación genética de vides por la revista *Nature Biotechnology*, en donde el grupo de INIA-La Platina está cooperando de manera muy importante y especial.

### Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar

Señalar aquellas iniciativas que surgen como vías para realizar un aporte futuro para el rubro y/o temática en el marco de los objetivos iniciales de la propuesta, como por ejemplo la posibilidad de realizar nuevas actividades.

Indicar además, en función de los resultados obtenidos, los aspectos y vacíos tecnológicos que aún quedan por abordar para ampliar el desarrollo del rubro y/o temática.

- Transformación de genética de frutales de carozo:

Sin duda que donde más esfuerzos se necesitarán será en esta área donde la mayor parte de la interacción y trabajo en forma conjunta deberán focalizarse. No existen protocolos



reproducibles para la transformación de *P. persica*, por lo que ésta es la meta internacional y nacional a lograr. Para ello recuenta con una activa red de comunicaciones entre diversos grupos, entre los que se cuenta también a equipos y personal nacional.

- Transformación genética de vides:

Ésta es un área en donde claramente el grupo Chileno posee ventajas mundiales. Es la plataforma de trabajo más consistente, numéricamente más eficaz y también con ya una buena trayectoria. El lanzamiento de esta plataforma como herramienta de intercambio y cooperación es una oportunidad que se está manejando como tal, existiendo desde ya numerosos contactos e interacciones en marcha.



#### 4. ASPECTOS RELACIONADOS CON LA EJECUCIÓN DE LA PROPUESTA

##### Programa Actividades Realizadas

Nº	Fecha	Actividad	Iniciativa
1	9/10/05	Participación en el "Moderador Meeting"	
2	10/10/05	Inscripción	
3	10/10/05	Defensa Poster	
4	11/10/05	Defensa Poster	
5	10-14/10/05	Participación en Comité Científico Simposio	
6	13/10/05	Moderador Concurrent Crop sessions 1:30-3:30 PM « Stone fruits »	
7	14/10/05	Presentación oral	

**Detallar las actividades realizadas en cada una de las Iniciativas**, señalar y discutir las diferencias con la propuesta original, y rescatar lo más importante de cada una de ellas. Por ejemplo, en el caso de Giras discutir las actividades de cada visita; Becas, analizar las exposiciones más interesantes; Consultores, detallar el itinerario y comentarios del consultor; Eventos, resumir y analizar cada una de las exposiciones; y Documentos, analizar brevemente los contenidos de cada sección.

##### EVENTOS

El día 09/10/05 se participó en el meeting inicial de organización de moderadores. En él se dieron las instrucciones básicas de funcionamiento de los equipos empleados para las presentaciones y de la dinámicas que éstas tendrían.

Durante 10 y 11 /10/05 se presentó en la sesión ordinaria de posters los trabajos "Study of browning development in fresh-cut cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) during storage: a biotechnological approach" (Campos-Vargas, R., Defilippi, B, Robledo, P., Gonzalez, H. y Prieto, H.) y "Technology platform for genetic engineering of stone fruits: Transformation of *Prunus salicina*" (Prieto, H., Urtubia, C., Devia, J., Ojeda, R., Dell'Orto, P. and Moynihan, M.R).

El día 13/10/05 se participó en la sesión específica tipo workshop de "Stone Fruits". Junto con Dan Brown (AgriCanada), se elaboró una plan de temas que agruparan las principales inquietudes del ámbito de la transformación genética de carozos. Brevemente: a) sistemas celulares y de regeneración, b) genómica y c) networking. (mayores antecedentes se adjuntan en CD, presentación específica H. Prieto).



El día 14/10/05 se presenta en forma oral el trabajo “A mid-scale platform for genetic transformation of different grapevine varieties: Use of Thompson Seedless as a model” ( Reyes, F., Reyes, M.A., Castro, A., Araya, S., Dell’Orto, P., Moynihan, MR., Muñoz, C., Prieto, H. and Hinrichsen, P.). Este trabajo fue ampliamente discutido en pasillo y posteriores, debido al gran impacto de los resultados presentados.

En líneas generales, las actividades esperadas fueron superadas enormemente por el impacto que causaron los trabajos presentados.

## DOCUMENTOS

### Contactos Establecidos

Presentar los antecedentes de los contactos establecidos durante el desarrollo de la propuesta (profesionales, investigadores, empresas, etc.), de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución Empresa Organización	Persona de Contacto	Cargo	Fono/Fax	Dirección	E-mail
AgriFood Canada	Daniel Brown	Señor Researcher, Crop Protection Coordinator.	519-457-1470 ext. 228	Southern Crop Protection and Food Research Centre 1391 Sandford Street London ON, N5V 4T3 Canada	<a href="mailto:browndc@agr.gc.ca">browndc@agr.gc.ca</a>
University of Ontario	Anna Kalinina	Ph. D. Student		Southern Crop Protection and Food Research Centre 1391 Sandford Street London ON, N5V 4T3 Canada	annakalinina@yahoo.com



CSIC-IRTA.	Pere Arús			Laboratori de Genètica Molecular Vegetal. CSIC-IRTA. Carretera de Cabrils s/n, Cabrils (Barcelona), Spain; Phone:34937507511; Fax: 34937533954;	pere.arus@irta.es
------------	-----------	--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------

### Material elaborado y/o recopilado

Entregar un listado del material elaborado, recibido y/o entregado en el marco de la propuesta. Se debe entregar adjunto al informe un set de todo el material escrito y audiovisual, ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación.

También se deben adjuntar fotografías correspondientes a la actividad desarrollada. El material se debe adjuntar en forma impresa y en un medio electrónico (disquet o disco compacto).

### Elaborado

Tipo de material	Nombre o identificación	Preparado por	Cantidad
Presentación oral	Presentación vides GM Chile	H. Prieto	1
Póster 1	Póster transgenia P. salicina	H. Prieto	1
Póster 2	Póster chirimoya	R. Campos – H. Prieto	1

### Recopilado

Tipo de Material	Nº Correlativo (si es necesario)	Caracterización (título)
Artículo		
Foto		
Libro	Resúmenes 3	Resumen del Simposio en formato .pdf
Diapositiva		
CD		



### **Programa de difusión de la actividad**

En esta sección se deben describir las actividades de difusión de la actividad, adjuntando el material preparado y/o distribuido para tal efecto.

En la realización de estas actividades, se deberán seguir los lineamientos que establece el "Instructivo de Difusión y Publicaciones" de FIA, que le será entregado junto con el instructivo y formato para la elaboración del informe técnico.

#### **- 16 de Diciembre de 2005:**

Charla de difusión el día 16 de Diciembre entre las 10:00 y la 12:30 horas en el Auditorium de la Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Campus San Joaquín, ubicado en Vicuña Mackenna 4860.

1. Introducción y alcances generales de simposio. M. Ayala
2. Adelantos en biotecnología del manzano. J.P. Zoffoli
3. Adelantos en biotecnología de la vid. M. Gebauer.
4. Adelantos en biotecnología de carozos. H. Prieto.
5. Mesa redonda.

#### **- 5 de Enero de 2006:**

Charla de difusión para el día 05 de Enero de 2006 a las 10:00 hrs., Sala 1, en el CRI La Platina, ubicado en Santa Rosa 11610, par. 33 La Pintana, Santiago.

La misma estructura.



## 5. EVALUACIÓN DE LA PROPUESTA

### Evaluación de la actividad para cada INICIATIVA

En esta sección se debe evaluar la actividad en cuanto a los siguientes ítems:

#### a) Efectividad de la convocatoria (cuando corresponda)

Las actividades de extensión tuvieron en promedio una respuesta media a baja de asistencia. Desde este punto de vista, el actual mecanismo de transferencia no está siendo todo lo efectivo que se desea.

Se deben buscar métodos diferentes para obtener mayor convocatoria, por ejemplo, seminarios o coloquios periódicos (semestrales, trimestrales) en donde se sumen las iniciativas.

#### b) Grado de participación de los asistentes (interés, nivel de consultas, dudas, etc)

La participación, en cambio de media alta, pues los asistentes son personas realmente interesadas en las materias.

#### c) Nivel de conocimientos adquiridos por los participantes, en función de lo esperado (se debe indicar si la actividad contaba con algún mecanismo para medir este punto y entregar una copia de los instrumentos de evaluación aplicados)

Las actividades no contaban con sistemas de medición o evaluación.

#### d) Problemas presentados y sugerencias para mejorarlos en el futuro (incumplimiento de horarios, deserción de participantes, incumplimiento del programa, otros)



### Aspectos relacionados con la postulación al programa de Captura y Difusión

a) Información recibida por parte de FIA para realizar la postulación

amplia y detallada                       aceptable                       deficiente

Justificar: FIA posee los procesos y documentos ya con amplio rodaje en este tipo de asignaciones.

b) Sistema de postulación al Programa de Formación o Promoción (según corresponda)

adecuado                       aceptable                       deficiente

Justificar:

c) Apoyo de FIA en la realización de los trámites de viaje internacionales (pasajes, seguros, otros) (sólo cuando corresponda)

bueno                       regular                       malo

Justificar:

d) Recomendaciones (señalar aquellas recomendaciones que puedan aportar a mejorar los aspectos administrativos antes indicados)

La emisión o requerimiento de este tipo de Informes debería ser ponderado dependiendo de la actividad. Al mismo tiempo, gastos en ítems como viáticos son **EXTREMADAMENTE** incómodos de manejar de manera documentada en el exterior. Esto debe considerarse.



## **6. Conclusiones Finales de la Propuesta Completa**

En el caso de Giras Tecnológicas, en lo posible presentar conclusiones individuales por participante.

**El apoyo a la participación de este grupo de investigación fue realmente provechoso y justificó plenamente la inversión de FIA (y personal) para que esto ocurriera.**

**Los trabajos y experiencias expuestas frente a nuestros pares internacionales se valoraron en extremo por la comunidad internacional. Elogiosos comentarios, reuniones y consideraciones se recibieron desde ésta.**

**Fue una excelente experiencia.**

## Grapevine transformation project

### Tissue Culture

- María Antonieta Reyes
- Catalina Araya
- Blanca Olmedo
- Marisol Gonzalez

### Molecular Biology, Bioassays and Analysis

- Fernando Reyes
- Álvaro Castro
- Ramón Pérez
- Merlene Rosales

### Greenhouse and Field management

- Mario Pastén

### Antenna, Tech administration

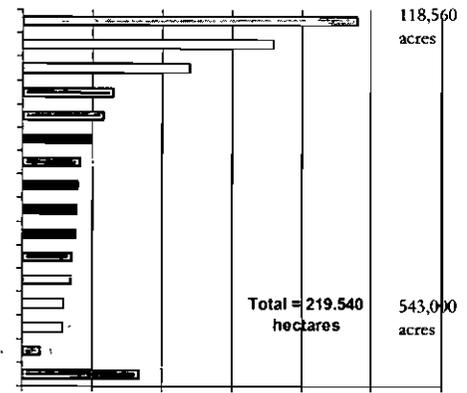
- Patricio Hinrichsen
- Mike R. Moynihan
- Paola Dell'Orto
- Carlos Muñoz

### International Cooperation

- Dennis Gray (U. Florida)
- Bruce Reisch (Cornell U.)

### Funding and Supporting

- FONDEF - Chile
- Agrícola Brown



## The Problem: *Botrytis cinerea*



## Somatic embryogenesis



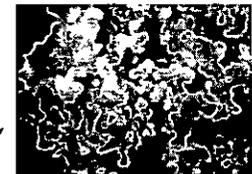
Field Material



Floral bud cultures

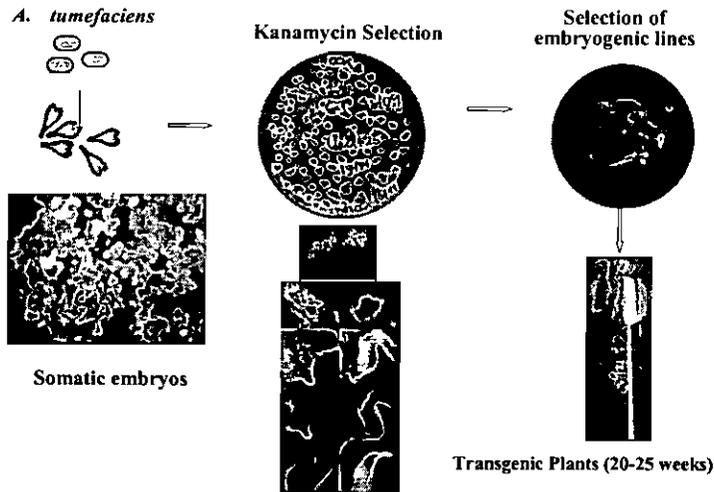


In vitro material



Embryonic callus

## Genetic Transformation Pipeline



## The genes:

Genes	Source
Endo Chitinase (two)	<i>T. harzianum</i>
Exo Chitinase	<i>S. aureus</i>
N <sup>o</sup> acetyl glucosaminidase	<i>T. harzianum</i>
Glucanase (two)	<i>T. harzianum</i>
Reverse indolycine	Synthetic peptide
Magainin	Synthetic peptide

**20 vectors of single and multiple combination of genes**

## Scheduling of transformations: database

Registro y Planificación de Experimentos de Transformación Genética de Vid.

id Experimento de Transformación: 115 Nombre Investigador: Caza

id Vectores: 25 Número de embrións Transformados: 1000

id Variedad: 15 Número de callos embriogénicos: 23

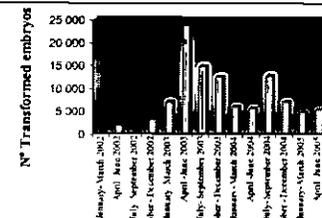
id Embrións: 1 Número de callos totales: 22

Actividades	Fecha Planificada	Fecha Realización	Días de Realización	Planificación de Callos
Infección <i>A. tumefaciens</i>	Miércoles 17 de Diciembre de 2003	Miércoles 17 de Diciembre de 2003	0	0
Lavado <i>A. tumefaciens</i>	Viernes 19 de Diciembre de 2003	Viernes 19 de Diciembre de 2003	0	0
Medio de Selección	Marzo 25 de Diciembre de 2003	Marzo 25 de Diciembre de 2003	0	0
Embriogénesis 1 (MS)	Marzo 13 de Enero de 2004	Jueves 15 de Enero de 2004	2	0
Embriogénesis 2 (MS)	Jueves 05 de Febrero de 2004	Jueves 01 de Abril de 2004	55	0
Embriogénesis 3 (MS)	Jueves 22 de Abril de 2004	Miércoles 03 de Junio de 2004	43	0
Embriogénesis 4 (MS)	Miércoles 30 de Junio de 2004	Marzo 24 de Agosto de 2004	55	0

Comentarios:

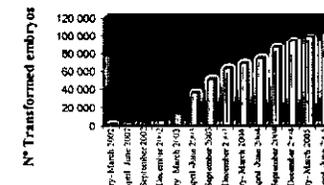
Recibes: 11/11/04 11:23:11 AM de 2004

## Transformation Scaling-Up

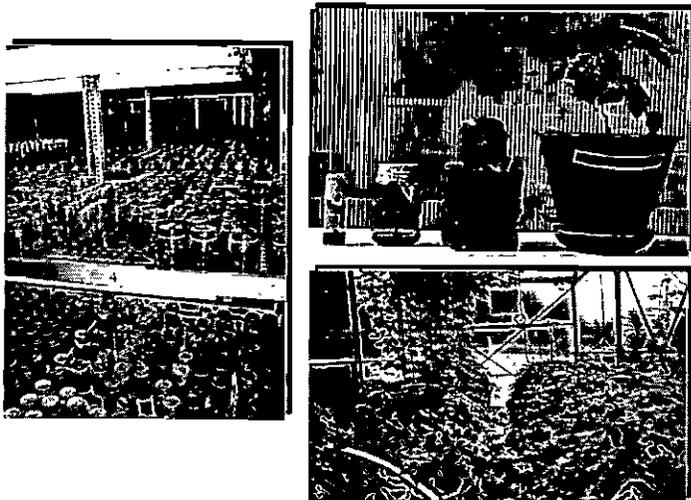


Average of 2,500 transformed embryos monthly

Over 100,000 transformed embryos, in 200 experiments.



## The System



## Identification and management of Plants

TS0416 2

Fecha de Identificación: Martes 11 de Marzo de 2003    Última Planta Identificada: Exp 11

Primera Germinación:     Segundo Germinación:     Tercera Germinación:

Agregar Germinación

Número de Embriones Germinados: 18

Fecha Germinación: 19-Jun-03

Número de Plantas: Primera Germinación: 2

Agregar Planta

---

TS0416.02

Número de Frascos In-Vitro: 0 1 2 3 4

Observaciones: Planta Normal

Nº Invernadero: 0

Fecha Identificación: 24-12-2003

Última Actualización: 27-03-2005

Fecha Último Rápido: 01-01-2001

Ensayo Kanamicina

No Realizado (0)

Casi No crece (1)

Crece poco (2)

Crece Normal sin raíz (3)

Crece Normal con raíz (4)

Pendiente

**Until now 4,168 Transgente Plants**

## Kanamycin Tolerance



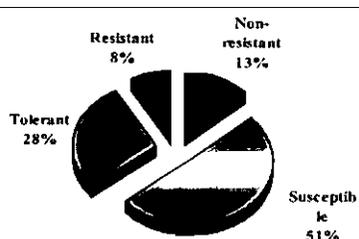
Non-Resistant

Susceptible

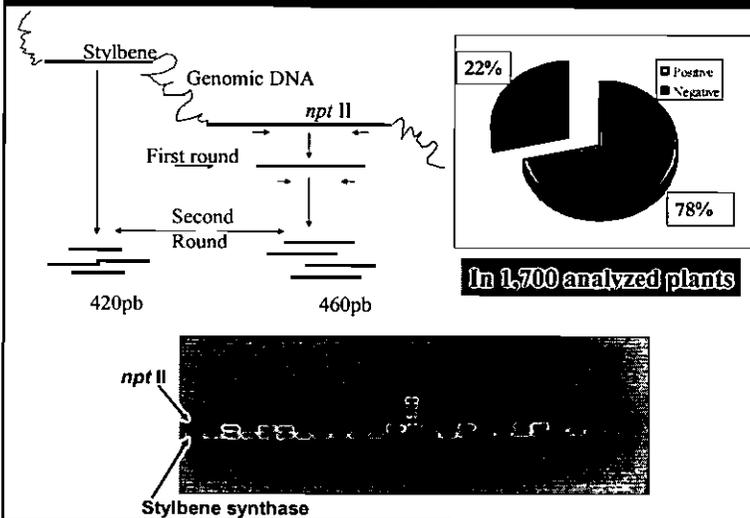
Tolerant

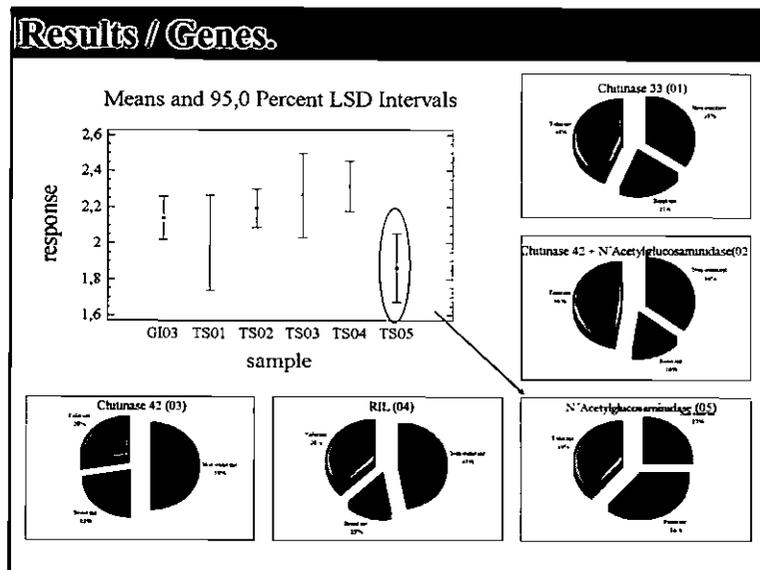
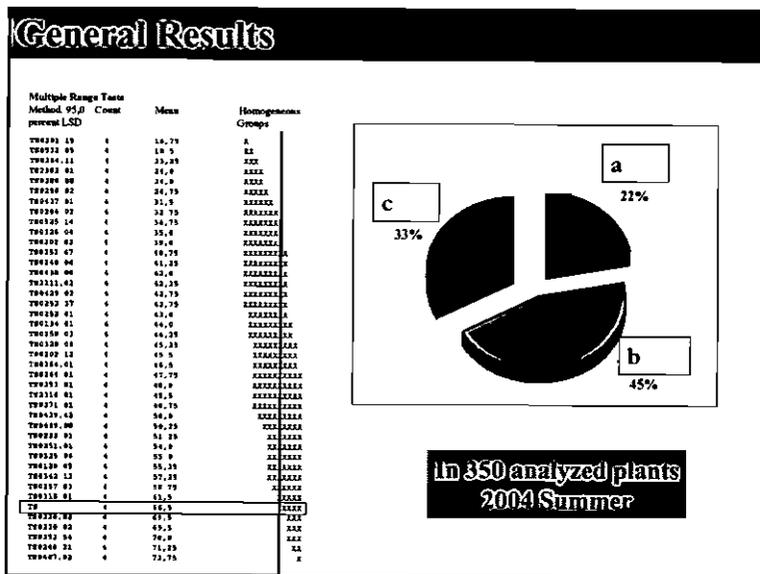
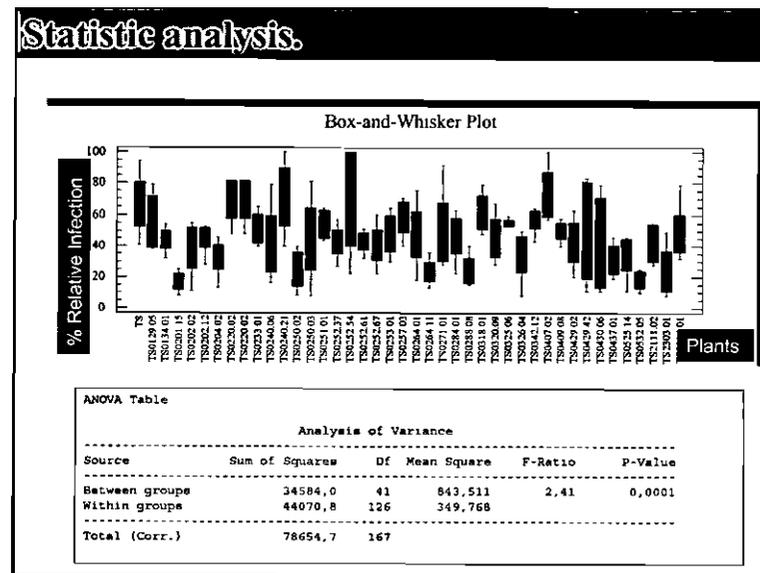
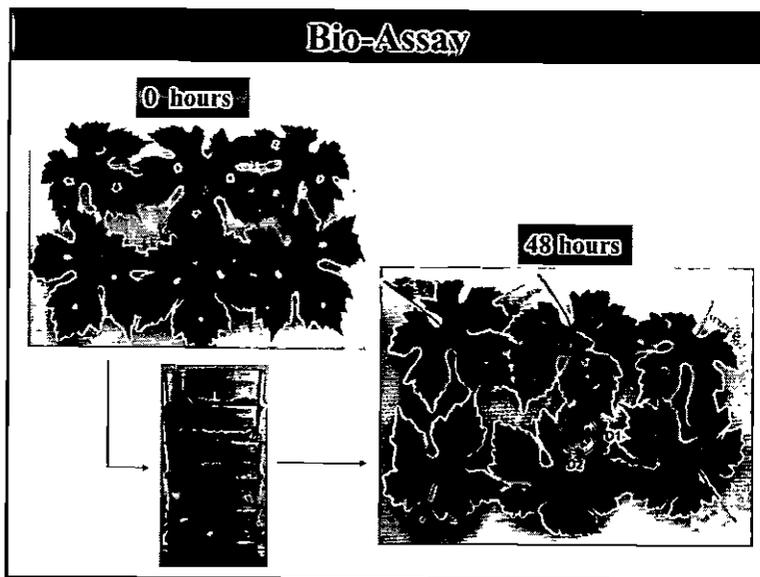
Resistant

**In 1,400 Analyzed Plants**



## PCR detection

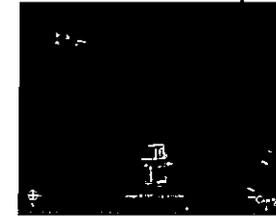




## Other varieties incorporated

Somatic Embryogenic		Transformation					
Type	Varieties	Varieties	Embryos	Plants	Efficiency		
Table grapes	Autumn Royal	Cabernet Sauvignon	200	2	1.0%		
	Carménère		779	5	0.6%		
	Crimson Seedless		Flame Seedless	8,495	74	0.9%	
	Flame Seedless			939	7	0.7%	
	Princess Seedless			Red Globe	10,413	88	0.8%
	Red Globe						
Wine grapes	Superior Seedless						
	Cabernet Sauvignon						
	Carménère						
	Merlot						

## Starting Field Trials...



On September '05  
600 Thompson  
seedless GM lines  
were planted at La  
Platina Station.



September



November

## Platform extension (started on 2005):

- Complementation with functional genomic studies:

a) *Botrytis* – grape interaction (genes and promoter validation from arrays experiments)

b) Use of GA and JA synthesis homologue genes (silencing vectors)

c) Multi-viral resistance.

## Daytona 13/10/2005

### 1. Stone fruits' workshop (Dan Brown)

#### a) Regeneration:

- "primary thought speakers": Ana Santos (Portugal), Stefano Tartarini (Italy)

#### Platforms:

- Roots (somatic embryogenesis development; almond, apricot),
- leaves (plums; Russian cultivar),
- cotyledons (INIA-OBI),
- Embryo segments (peach (Spain))
- Hypocotyls, nodal segments..

- Efficiencies (actually nothing)
- Selectable markers (km, PMI, Hyg)
- field management (not discussed in the end ..).

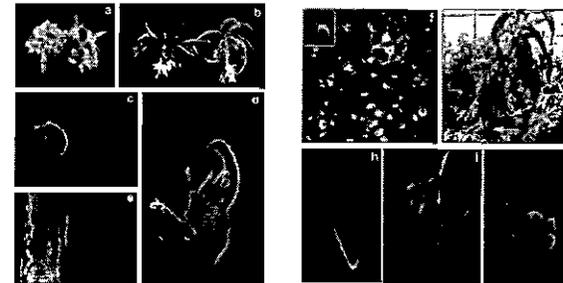
Molecular Breeding 26: 476-477 (2004)  
© 2004 Elsevier Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Transgenic peach plants (*Pristis persica* L.) produced by genetic transformation of embryo sections using the green fluorescent protein (GFP) as an *in vivo* marker

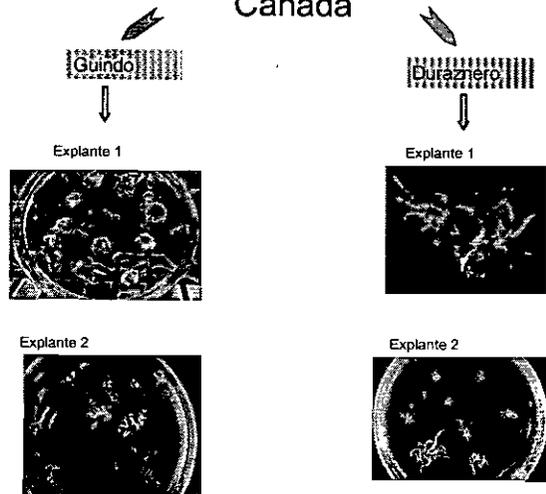
Rosa M. Pérez-Clemente<sup>1</sup>, Amparo Pérez-Sanjudo<sup>1</sup>, Lorenzo García-Ferriz<sup>2</sup>,

José-Diogo Beltrán<sup>1</sup> and Luis A. Calfas<sup>1\*</sup>

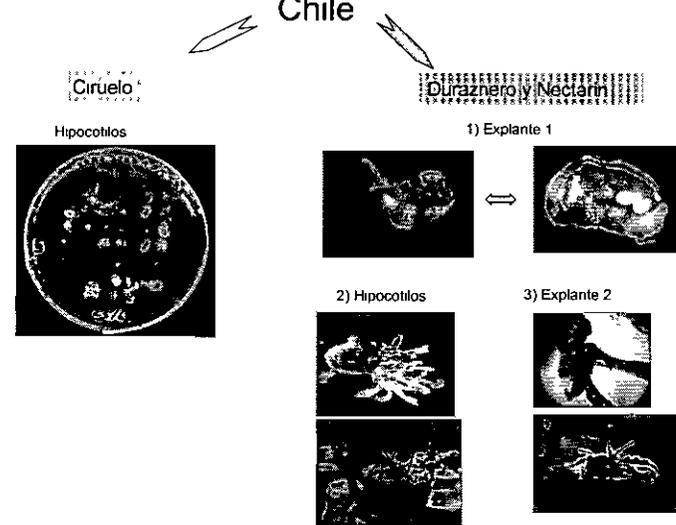
<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV) Departamento de Biología del Desarrollo, Campus de la Universidad Politécnica de Valencia, Av. de los Naranjos s/n, 46100, Burjassot, Spain; <sup>2</sup>Comercial Frutas y Huesos S.L. Ctra. Nal. 340 Km. 873, 1. Albaladejo, 46250 Mátiz, Spain.  
\*Author for correspondence: e-mail: jcalfas@upv.es



### Canadá



### Chile



## Daytona 13/10/2005

### 1. Stone fruits' workshop (D. Brown)

#### b) Genomics:

- prim speakers: Pere Arús (Spain), Stefano Tartanni (Italy), Clemson's people.  
 genome initiatives: Chile (closed) and Clemson (open policy).  
 promoters and genes, heterologous systems.

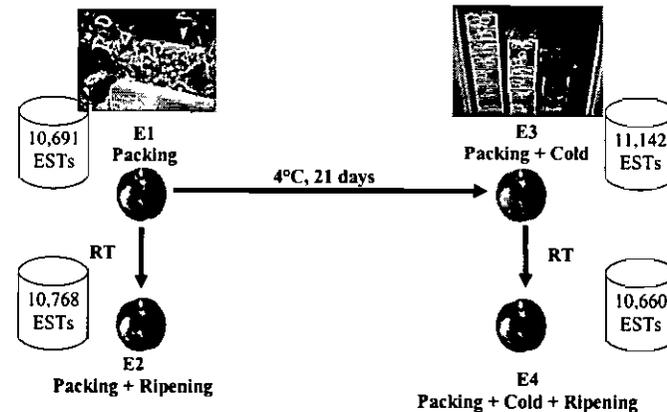
#### Abbott PP\_LEa Project Description

Processing Summary	
Number of ESTs sequenced	13331
Number of successful sequences	9984
Average Success Rate	74.9 %
Average Base Count	502
Average Number of HQ Bases	347
Average Phred Quality Value	26
Number of Contigs (CAP3 Assembly -p 95 -d 60)	1306
Number of Singletons	2500
Number of Putative Unigenes	3843

#### CRA ISF PP\_YE Project Description

Processing Summary	
Number of ESTs sequenced	1907
Number of successful sequences	1667
Average Success Rate	87.4%
Average Base Count	573
Average Number of HQ Bases	443
Average Phred Quality Value	37
Number of Contigs (CAP3 Assembly -p 90 -d 60)	233
Number of Singletons	883
Number of Putative Unigenes	1116

## Chilean Nectarine Functional Genomics Consortium



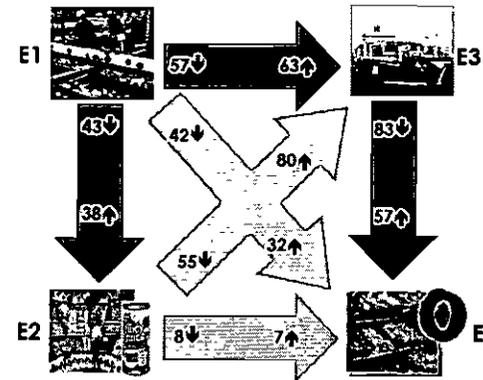
## Full length cDNAs

-predicted using Eugene'Hom-

Data	Average length Contig	Max / Min Length Contig	Total	%
5'UTR ORF 3'UTR	991	2845/565	1,044	20.98
5'UTR ORF 3'UTR	916	2784/326	1,116	22.42
5'UTR ORF 3'UTR	774	1822/246	136	2.73
5'UTR ORF 3'UTR	966	3113/369	1,174	23.59
5'UTR ORF 3'UTR	907	3073/170	976	19.61
5'UTR ORF 3'UTR	770	1384/102	358	7.19
5'UTR ORF 3'UTR	786	2029/111	173	3.48

Fornace et al NAR (2003)31:3742-3745

## Identification of contigs with differential digital expression (winflat - Audic and Claviere)



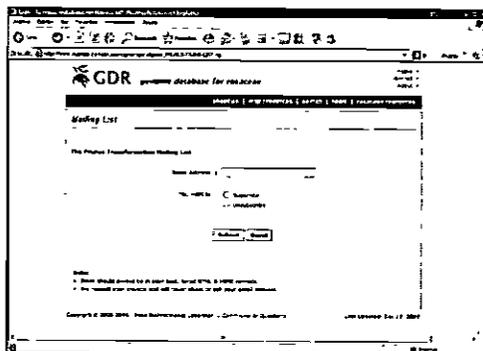
Out of 1795 contigs, 247 showed differential expression between any two stages

## Daytona 13/10/2005

### c) Networking

- prim. speakers: (Ralph, Spanish people):

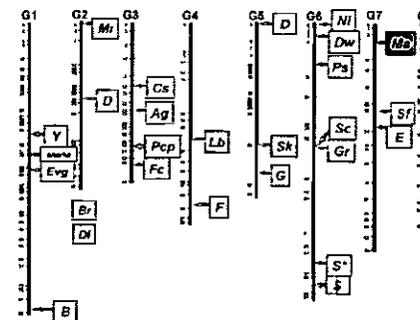
formal networking (something more active): mail serve upcoming.



## 2. Trabajos relevantes

- Integrating Genomics into Rosaceae Tree Fruit Breeding Programs

P. Arús, Laboratori de Genètica Molecular Vegetal, CSIC-IRTA, Cabrils (Barcelona), Spain

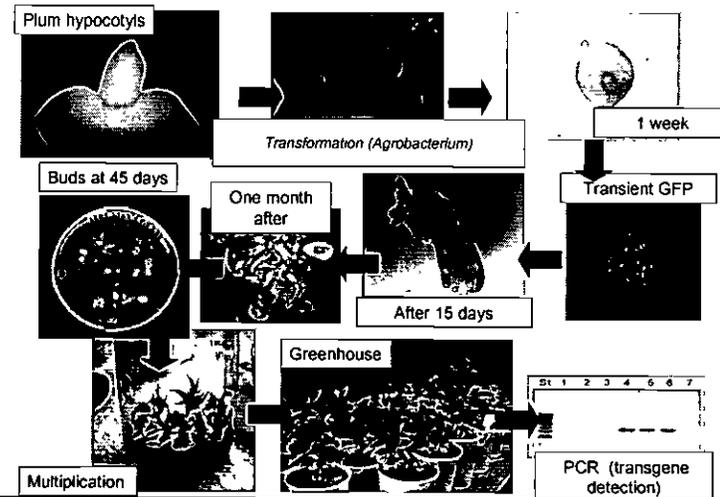


LG*	Character	Species	Symbol
G1	Fruit flesh color (red/yellow)	Peach	Y
	Stitcha verticillata	Apricot	Stu12
	Brightening	Peach	Yp
	Flower color	Almond + peach	F
	Leaf trait (magnolia red/rose)	Peach	Le1
G2	Seed hardness	Almond	D
	Seedling for (soft) growth habit	Peach	Dr
	Double flower	Peach	Df
G3	Flesh color (around the stone)	Peach	Cl
	Leaflet color (yellow - red/white)	Almond + peach	Cl
	Poly-oval	Peach	Op
	Flower color	Peach	Fl
	Blossoming time	Almond	St
	Flesh adhesion	Peach	F
G4	Stinginess/numbness		
	Impaired fruit	Peach	O
	Central taste (bitter/neutral)	Almond	St
	Leaf hardness (prickles/soft)	Peach	G
G5	Leaf shape (narrow/wide)	Peach	Dr
	Fruit height (tall/short)	Peach	St
	Leaf serration	Peach	St
	Fruit shape (flat/round)	Peach	T
	Self-compatibility	Almond	T
G6-G8	Fruit skin color	Apricot	S
	Leaf color (red/green)	Peach	Dr
G7	Back-leaf (magnolia red/rose)	Apricots (stem)	St
	Resistance to powdery mildew	Peach	St
	Leaf gland (purple/green)	Peach	F

**- Effects of a Peach Antisense ACC Oxidase gene on Plum Fruit Quality**  
**A. Callahan and R. Scorza**

- Plum hypocotyls transformed with an antisense construct of a peach ACC oxidase gene (responsible for the last step in ethylene formation) that was driven by the 35S promoter.
- Eighteen lines were derived from four genetically different hypocotyls from 'Bluebyrd' and three from 'Stanley'. DNA blot data indicated that the majority of these had a single insertion of the peach antisense ACO gene.
- Analyses of the data (firmness, color, date of ripening, brix, size and titratable acids as well as ethylene rates) suggested that in some transgenic lines, ethylene production was delayed relative to the 'bluebyrd' parental line and that softening was also delayed. Sugar levels were lower in most of those while color and size were not affected.
- The correlation of levels of plum ACO mRNA with phenotypes are currently being examined.

**Prunus domestica transformation**



**-Running Research to Improve Regeneration and Transformation of Prunus at ISF.**

-C. Damiano<sup>1</sup>, A. Gentile<sup>1</sup>, S. Monticelli<sup>1</sup>, E. Todorovska<sup>2</sup>, I. Kamenova<sup>2</sup>, I. Badjiakov<sup>2</sup>, A. Atanassov<sup>2</sup> and V. Kondakova<sup>2</sup>  
 1C.R.A. – ISF – Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Rome, Italy  
 2AgroBioInstitute, Sofia, Bulgaria

-A method for adventitious shoot regeneration from leaves of many micro-propagated peach varieties was developed (Gentile et al., 2002, Plant Cell Reports 20:1011-1016).

Plant Cell Rep (2002) 20:1011–1016  
 DOI 10.1007/s002990200441-2

**CELL BIOLOGY AND MORPHOGENESIS**

A. Gentile · S. Monticelli · C. Damiano

**Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]**

**Table 1** Salts and hormonal content of proliferation and regeneration media used in the different experiments

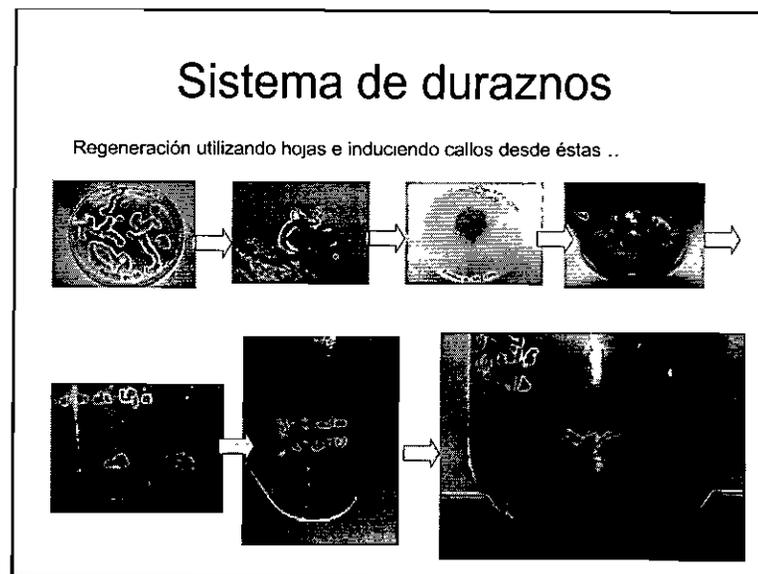
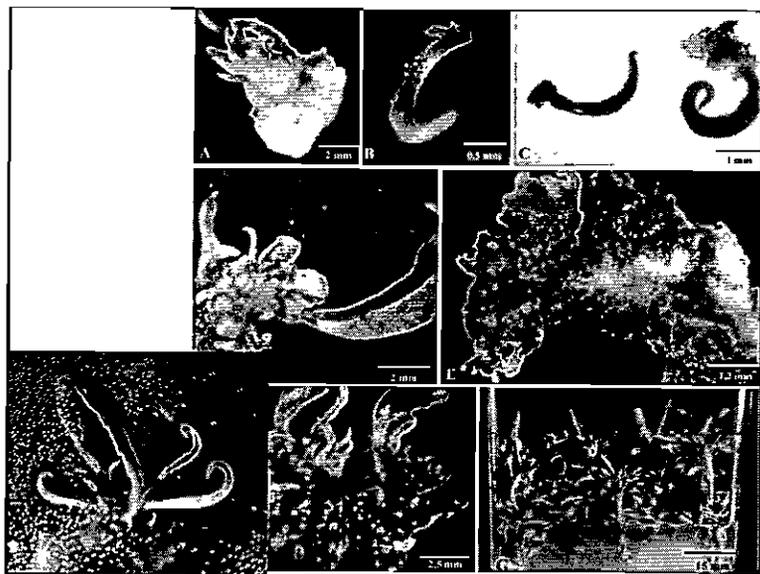
	Proliferation medium	LP <sup>a</sup>	A <sup>b</sup>	LP <sup>c</sup>	LP <sup>d</sup>	LP2 <sup>e</sup>
Macrocklements <sup>f</sup>	LP	LP	MS 2	MS	mod	LP
Macrolements	MS	LP	MS 2	MS	MS	LP
FeNa <sub>2</sub> EDTA	MS	MS	MS	MS	MS	MS
Nicotinic acid (mg l <sup>-1</sup> )	0.5	0.5	0.5	0.5	–	0.5
Pyridoxine (mg l <sup>-1</sup> )	0.5	0.5	0.5	0.5	–	0.5
Thyamine (mg l <sup>-1</sup> )	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Thiamine-HCl (mg l <sup>-1</sup> )	0.1	0.5	0.1	0.1	1.0	0.5
Myo-inositol (mg l <sup>-1</sup> )	100	150	100	100	100	150
Ca-pantothenate (mg l <sup>-1</sup> )	–	1.0	–	–	–	1.0
Biotin (mg l <sup>-1</sup> )	–	0.1	–	–	–	0.1
Riboflavin (mg l <sup>-1</sup> )	–	0.5	–	–	–	0.5
NAA (mg l <sup>-1</sup> )	–	0.2	–	–	0.1	–
IBA (mg l <sup>-1</sup> )	0.025	–	–	0.1	–	–
BA (mg l <sup>-1</sup> )	0.25	2.0	–	2.0	–	2.0
[DZ (mg l <sup>-1</sup> )	–	–	3.0	0.5	1.0	–
G <sub>3</sub> (mg l <sup>-1</sup> )	0.1	–	–	–	–	–
Sucrose (g l <sup>-1</sup> )	25	20	20	20	20	20

<sup>a</sup> Cabou et al. (1999)

<sup>b</sup> Rugini and Muganu (1998)

<sup>c</sup> This medium was only used following dark incubation on medium P1

<sup>d</sup> LP, Salts of Quorin et al. (1977); MS, salts of Murashige and Skoog (1962); MS-2, half-strength macerals; mod, macerals of Rugini and Muganu (1998); 0.50 mg l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, 2.30 mg l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 5.80 mg l<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 3.70 mg l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.70 mg l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>



### Regeneration from leaves of preconditioned shoot apices [1][2]

**Protocol for shoots regeneration**

**Regeneration percentages**

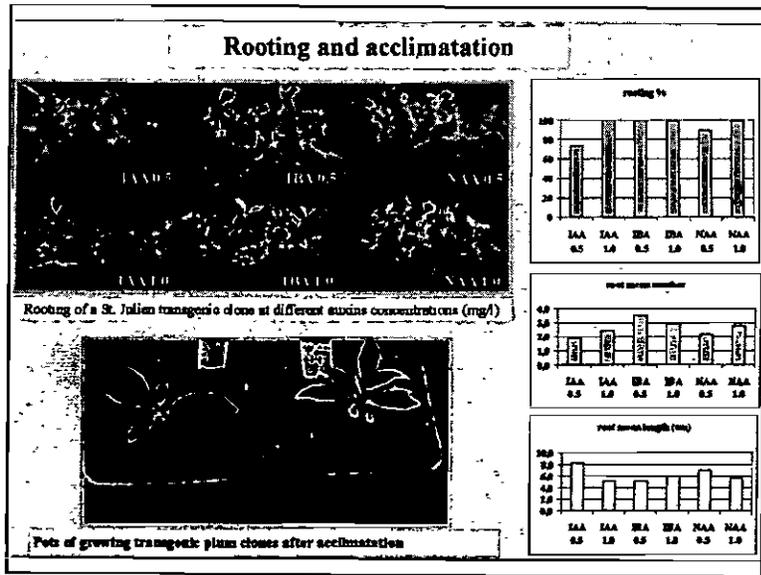
Shoot apices	Regeneration percentages
Whitefields	30.00
Yanqueong	22.35
San Giorgio	16.78
PAFCO	17.39
Marylin	25.43
BPreston	32.92
Convolvus	9.56
Robygold II	33.01
Pharos	27.00
Laplan	36.00
Parrot	30.00

### Regeneration from seeds [3]

Regenerations from longitudinal sections of seeds of San Castrese (A) and Missouri (B)

Species	Cultivar	Hypocotyl sections		Leaves from epicotyls		Seed longitudinal sections		Sections from elongated epicotyls	
		%	medium	%	medium	%	medium	%	medium
<i>P. armeniacum</i>	San Castrese	23.1	B	42.0	E	96.9	B	58.3	A
	Half Half	14.3	G	28.9	A	-	-	-	-
	Villo	5.5	A	35.0	E	-	-	-	-
	Boccuccia Spinosa	1.8	E	4.1	E	-	-	-	-
<i>P. persica</i>	Palumella	44.6	H	-	-	-	-	-	-
	Pereco di Tarsi	7.4	A	-	-	-	-	-	-
	Nemaguard	0.0	all	10.9	A	-	-	-	-
	Montclair	0.0	all	10.2	A	-	-	-	-
<i>P. domestica</i>	Missour	34.8	H	6.3	A	8.3	A, B	-	-
	Romestar	35.6	H	-	-	-	-	-	-
<i>P. domestica</i>	Stanley	74.3	A	-	-	-	-	-	-
<i>P. insubrica</i>	St Julien	67.3	A	-	-	-	-	-	-

Best regeneration for each genotype are reported.  
% = regeneration percentage

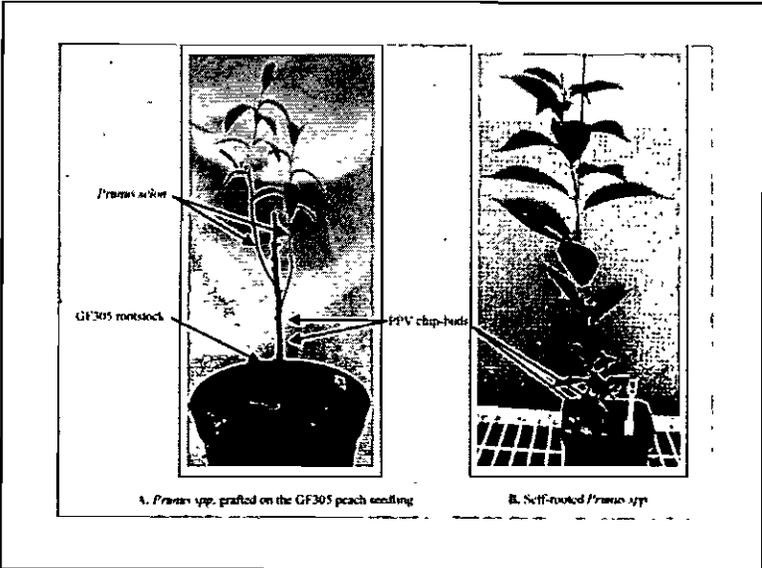
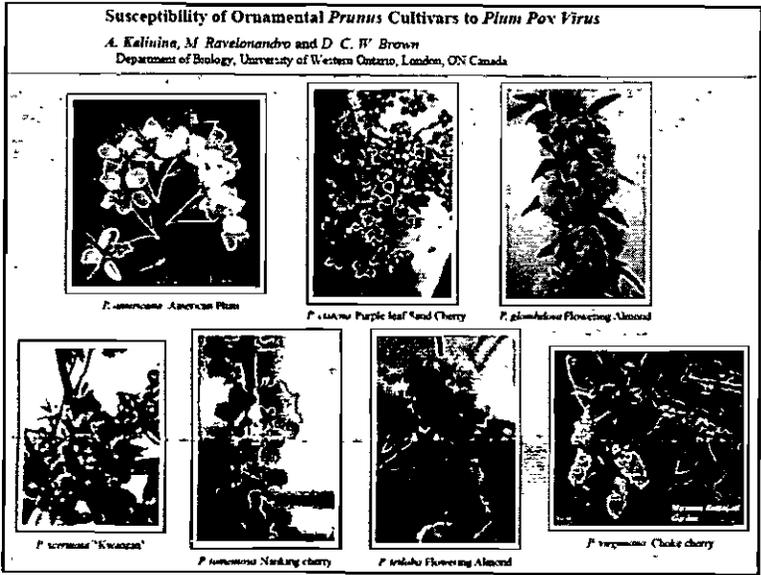


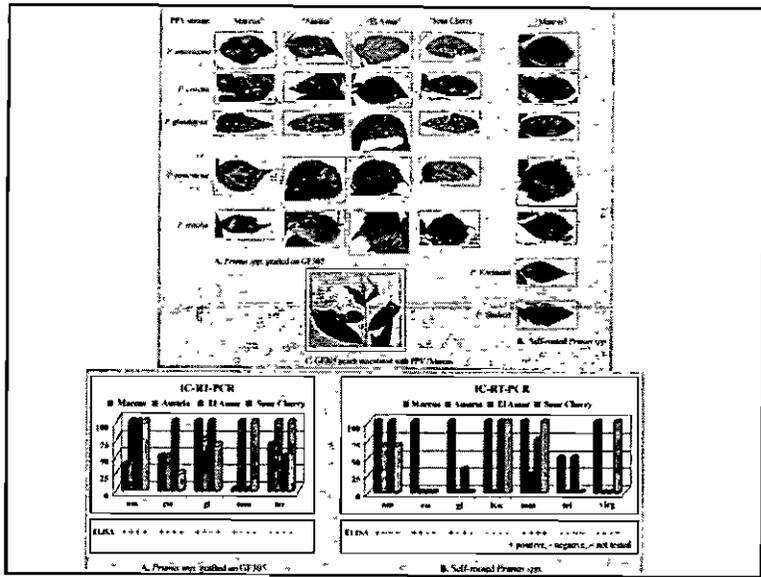
### - Genetic Engineering Approach in Stone Fruits Breeding

**S. V. Dolgov<sup>1,2</sup>, R. V. Mikhailov<sup>1</sup> and O. A. Shulga<sup>2</sup>**  
<sup>1</sup>Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Puschino, Moscow Region, Russia  
<sup>2</sup>All-Russia Institute of Agricultural Biotechnology, RAAS, Moscow, Russia.

An efficient protocol for adventitious shoot regeneration from leaf tissues was established by manipulating phytohormone types and concentrations, explant pretreatment and physiological age of explants.

Regeneration of plant cultures from leaf explants





### RNA Interference of *Plum pox virus* P1 and HC-Pro Genes for Efficient and Predictable Resistance to the Virus

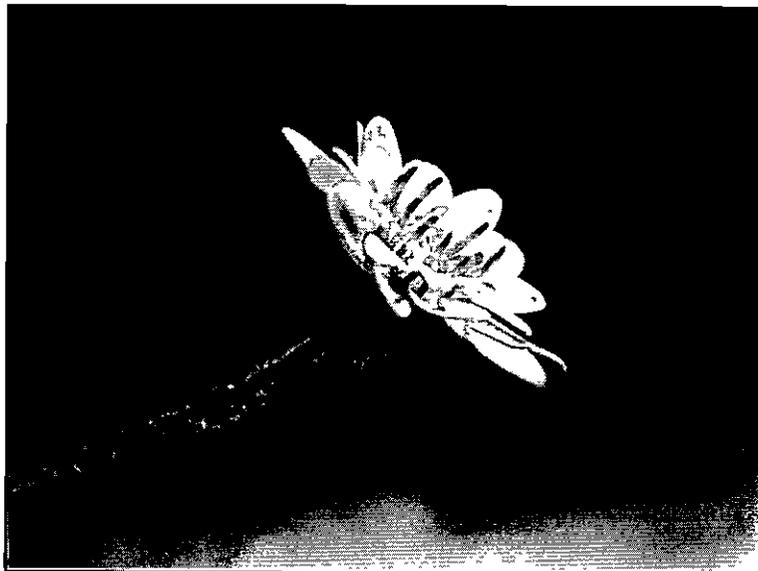
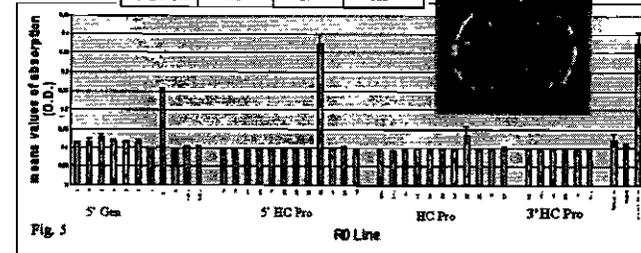
V. Ilardi<sup>1</sup>, E. Di Nicola-Negri<sup>1</sup>, A. Brunetti<sup>1</sup>, V. Kondakova<sup>3</sup>, A. Gentile<sup>2</sup>, S. Moncelli<sup>2</sup> and C. Damiano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy

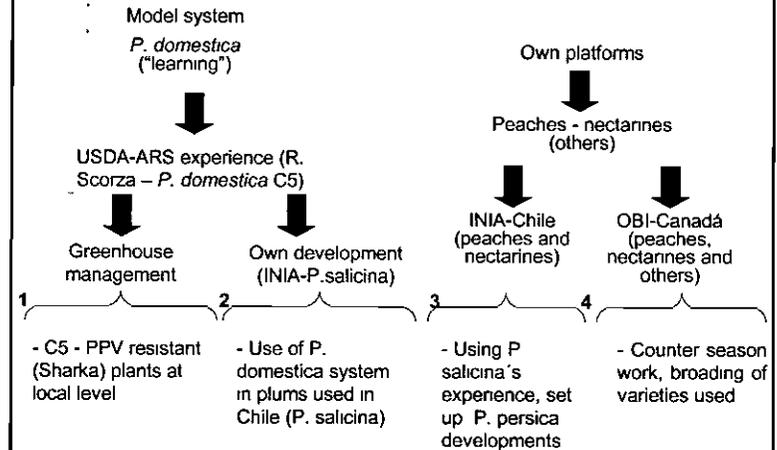
<sup>2</sup>C.R.A. - Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Rome, Italy

<sup>3</sup>AgroBioInstitute, Sofia, Bulgaria

PPV genome region	length (nt)	difference in between DfM	Min length homolog by between DfM
5' Gen	730	17	207
5' HC-Pro	647	27	65
HC-Pro	707	18	120
3' HC-Pro	685	17	120

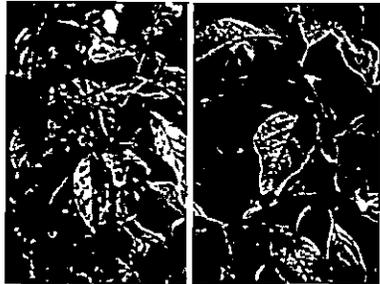


### STRATEGY for Stone Fruit transformation systems



## C5 Plum

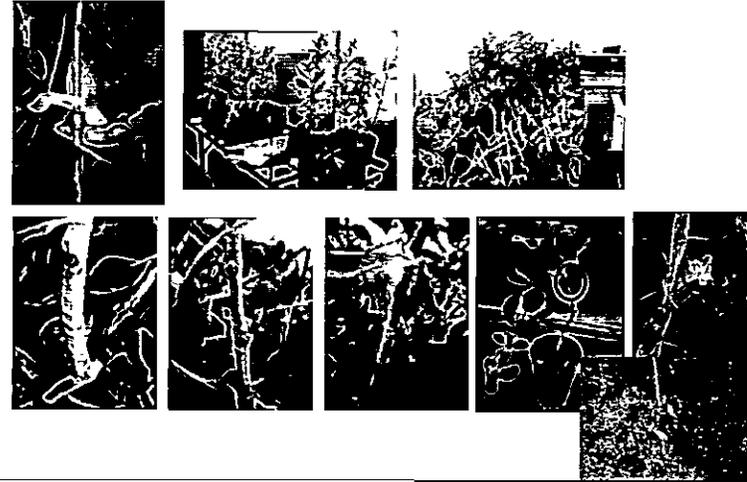
- PPV resistant
- Registered as BlueByrd (USA)



PPV Sensible

C5

## Greenhouse management of C5 (*P. domestica*)



## Evaluations started on December '05:

... 6 local PPV isolates previously characterized



Symptoms on GF305



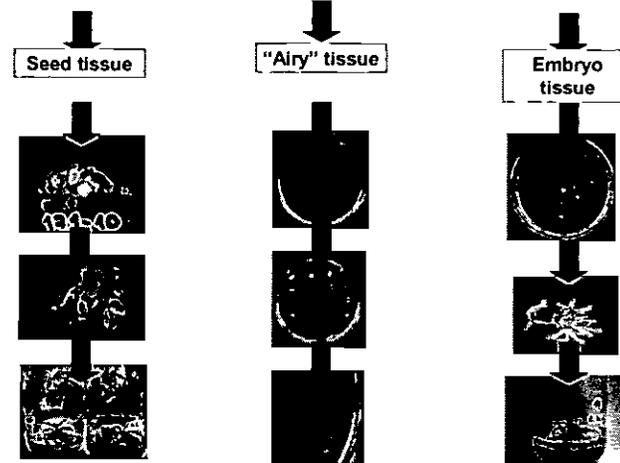
... chip-budding inoculations

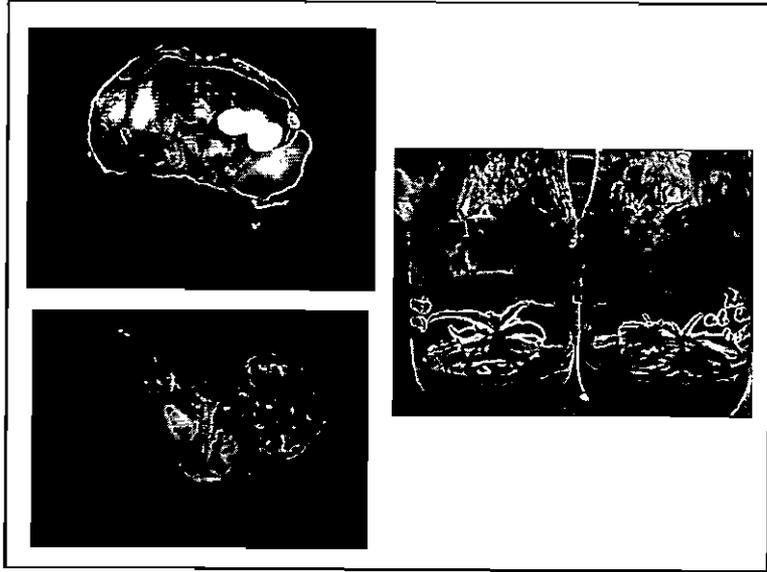
## *Prunus persica* platforms

Platform 1 (4-7 months)

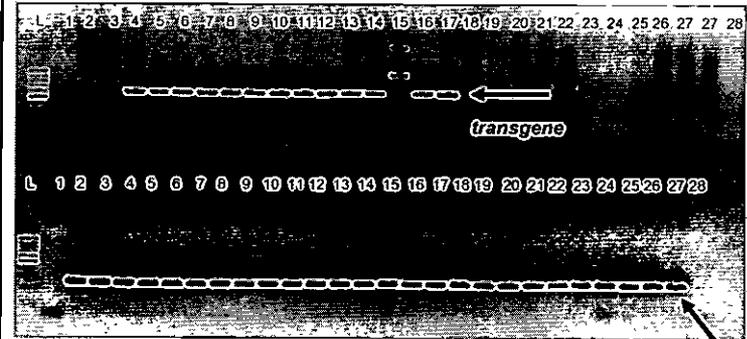
Platform 2 (4 months)

Platforma 3 (3-5 months)





Molecular analysis of regenerated plants: (specific PCR for transgene (upper panel) and internal (PPO, lower panel))



Línea	tipos derivados	Nº total brotes	Km	PCR	estado
104	4	135	40	positivos	verde
105	1	3,9	40	positivos	verde, amarillo
115	1	2,2	40	ND	verde, amarillo
85	1	2,22	40	positivos	verde, amarillo



## 'Simposio Internacional sobre Biotecnología del Cultivo de Frutas de Zonas Templadas y Especies Tropicales'

Marlene Ayala Z.  
Enero, 2006

## Marco del Simposio

- Primer Simposio Internacional sobre Arboles Frutales Transgénicos y Tercer Simposio Internacional de Biotecnología de Especies Tropicales.
- Investigadores activos en el desarrollo de herramientas de biotecnología para el cultivo de frutas y hortalizas en áreas templadas y tropicales.



## Propósito del Simposio

- Presentación e intercambio de información biotecnológica de especies frutales y cultivos hortícolas de origen templado, tropical y subtropical.
- Fomentar interacciones entre investigadores, colaboraciones, intercambio de nuevas ideas e interacciones con agencias reguladoras y representantes de la industria.

## Principales Áreas

- **Métodos transgénicos:**
  - Calidad del producto.
  - Resistencia a enfermedades, insectos y estrés abiótico.
  - Crecimiento y desarrollo de las plantas (rendimiento).
- **Estudio del genoma en especies frutales y cultivos hortícolas:**
  - Identificación de genes.
  - Programas de mejoramiento aplicados.
- **Comercialización de cultivos transgénicos:**
  - Derechos de propiedad intelectual.
  - Regulaciones para la comercialización.
  - Evaluación de los riesgos.
- **Biotecnologías No GM:**
  - Variación somaclonal.
  - Hibridación somática.
- **Tecnologías Facilitadoras:**
  - Cultivo celular
  - Regeneración

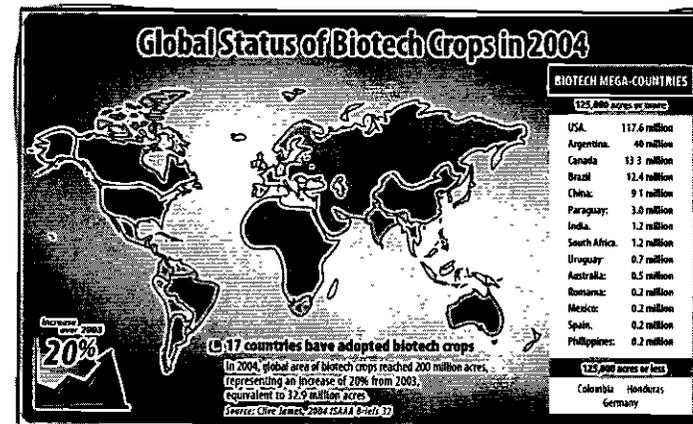
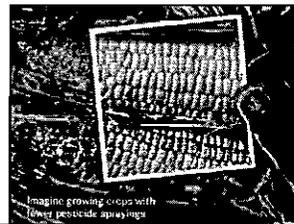
## Principales Sesiones

- Avances biotecnológicos: OGM y no OGM.
- Resistencia al estrés biótico y abiótico.
- Integración de la genómica y la biología molecular en programas de mejoramiento.
- Comercialización de transgénicos.
- Mejoramientos en la metodología biotecnológica.

Especie	Presentaciones y posters
Cítricos	23
Manzano	22
Vid	12
Duraznero	8
Papaya	7
Ciruelo japonés y europeo	6
Peral	5
Banana	5
Damasco	4
Cerezo	3
Higuera	3
Palma datilera	3
Mango	3
Piña	2
Almendro	2
Chirimoya	2
Nogal, palto	1

## Estadísticas de Monsanto

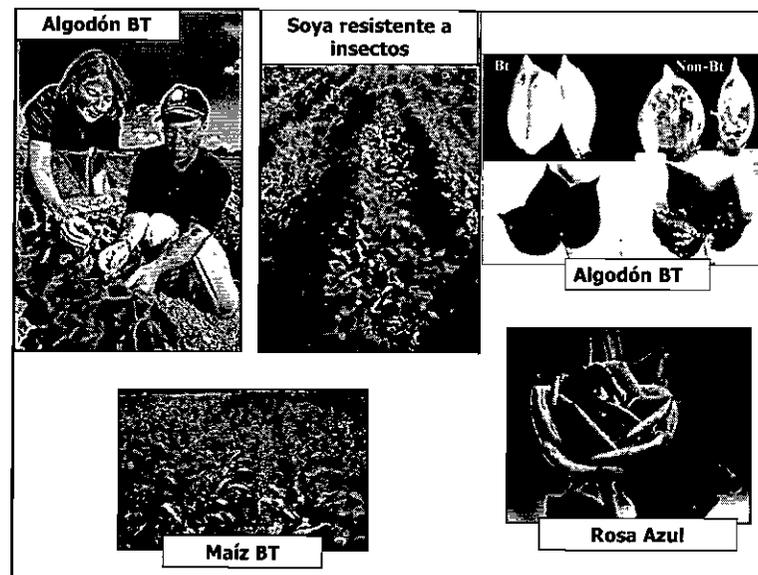
- 81 millones de has plantadas en los últimos 10 años en 17 países. Adopción global.
- Principales países: USA, Argentina, Canadá, Brasil, China, Paraguay, India y Sudáfrica.
- Soya (56%), algodón (28%), canola (19%), maíz (14%).



## Tiempo estimado para la obtención de un transgénico

Paso	Duración
Descubrimiento del gen Gene → secuenciación → función → producto	24 a 48 meses
Transformación del cultivo de interés	12 a 24 meses
Desarrollo de la variedad comercial	12 a 36 meses
Producción de semilla	12 a 36 meses
<b>'Venta'</b>	

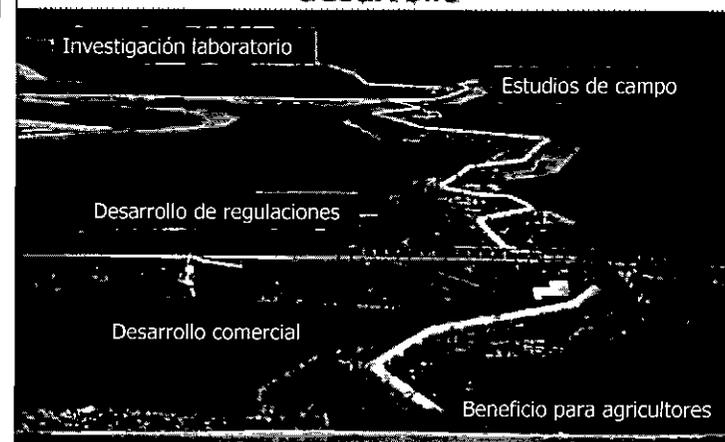
5 a 12 años



## ¿Cuánto cuesta liberar un producto transgénico al mercado?

Ítem de inversión	COSTO (millones de dólares)
Descubrimiento del gen	2 a 5
Transformación y testeo inicial	5 a 10
Transformación a mayor escala y trabajo de campo	10 a 15
Desarrollo rápido de la variedad y experimentos de campo extensivos	15 a 30
Proceso y trámites regulatorios	20 a 40
<b>TOTAL</b>	<b>~ 50 a 100</b>

## Biología Agrícola: investigación y desarrollo

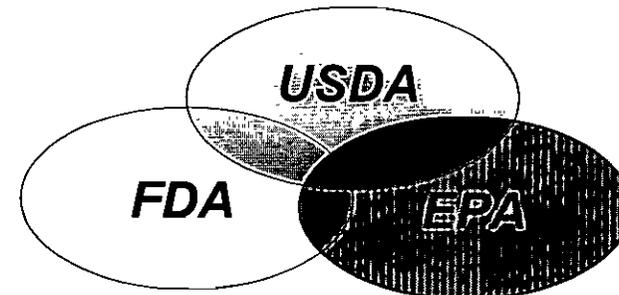


## Desafíos más allá del laboratorio...

- Ensayos de campo.
- Derechos de propiedad intelectual.
- Desarrollo y aprobación de regulaciones.
- Comercialización y aceptación pública.



## Regulación coordinada en biotecnología en U.S.



Nueva característica-organismo	Organismo regulador	Control
Resistencia a virus en cultivos alimenticios	USDA EPA FDA	- Seguridad en producción agrícola. - Seguridad para el medio ambiente. - Seguridad en su consumo.
Modificación del color en flores.	USDA	- Seguridad en producción agrícola

## Caso de estudio #1 Papaya transgénica (USA/Japón)



Papaya Ringspot Virus (PRSV)  
Hawaii 1992



In 1998, una papaya transgénica resistente a PRSV fue entregada a agricultores en Hawaii.

## Papaya resistente a virus a Japón

- Japón el mayor mercado para la papaya americana (2,500 ton, \$6.2 mill/año).
- Se requiere separar la cadena de marketing para papaya libre de biotecnología.
- Sistema de verificación transgénica exigente.

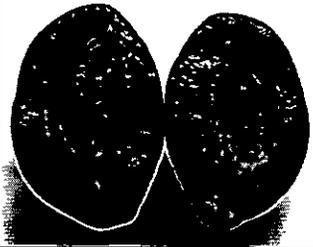
## Papaya resistente a virus a Japón

- Aprobación en proceso desde 1998.
- Desarrollando estrategia de etiquetado y marketing.
- Se espera que si el proceso de aprobación sigue su curso se estará exportando a Japón en Noviembre del 2006.

## Caso de estudio #2 Ciruelo transgénico 'Honeysweet' resistente a Plum Pox Virus (PPV)

- ARS Appalachian Fruit Research Station, USA
- INRA-Bordeaux, Francia
- ISK, Skierniewice, Polonia
- IVIA, Valencia, España
- Fruit Research Station, Bistrita, Romania
- Res. Inst. Crop Production, República Checa

### Síntomas PPV

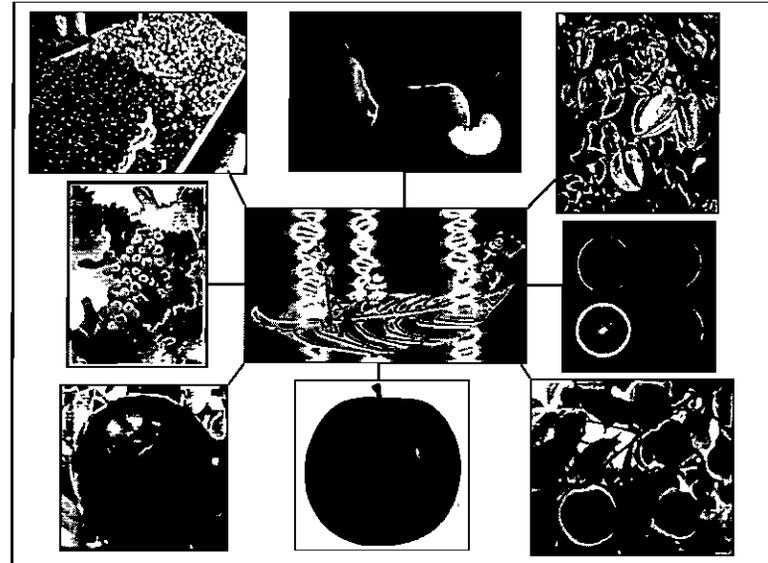


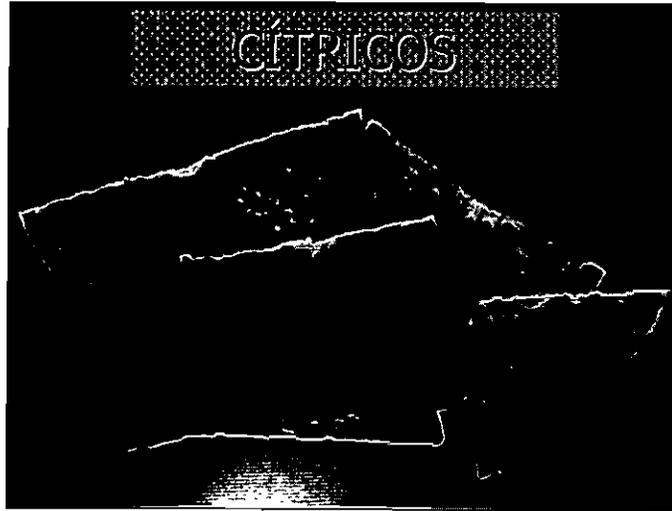
### Ciruelo 'Honeysweet' - USA

- Se pretende asegurar la producción ante posibles brotes de PPV que pueden ser devastadores.
- Se necesitará de aprobación internacional si es adoptado por agricultores (\$40-60 millones mercado de exportación).

### Ciruelo 'Honeysweet': Situación en materia de regulaciones

- Actualmente ensayos de campo en Europa.
- Desregulación APHIS casi completa.
- Análisis de la composición nutricional de la fruta.
- En discusiones con la EPA.



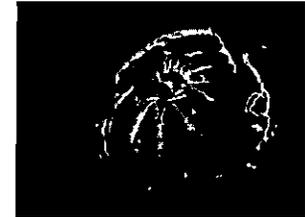


#### ■ **Calidad:**

- Identificación y expresión de genes involucrados en el contenido y acumulación de *ác. cítrico* en *naranja dulce*.
- Estudio de la *ruta metabólica* de *carotenoides* en *frutos de naranja dulce y pomelo*.

#### ■ **Producción:**

- *Acortamiento* del período de *juventud* en *naranja dulce* con el uso de la *transgenia* (*sobreexpresión* de *Apeta1*).
- Comportamiento en *terreno* de *plantas transgénicas* de *naranja dulce* y *Carrizo citrange*.

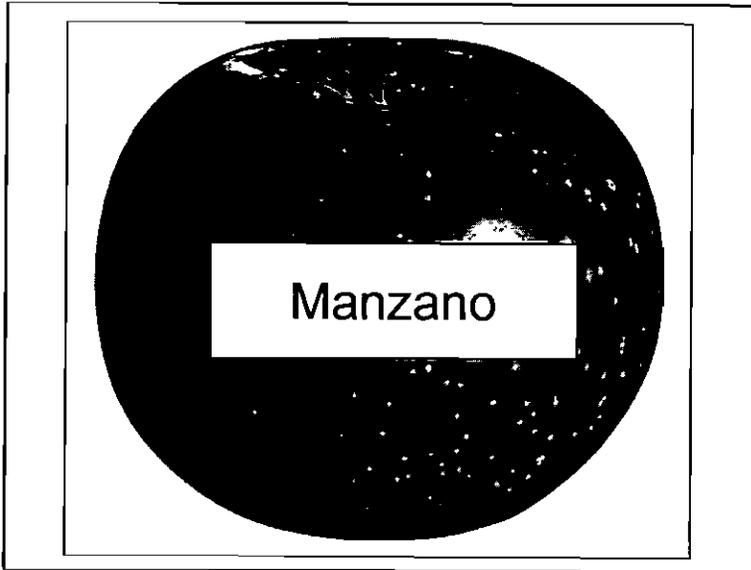


#### ■ **Tecnologías facilitadoras:**

- Uso de *embriogénesis somática* para acelerar propagación clonal en *Mandarina Satsuma*. Uso de *óvulos inmaduros*.
- Uso de *hibridación somática* entre *protoplastos* *naranja Navel* y *Mandarina Satsuma* para desarrollar *variedades mejoradas* con mayor *resistencia a frío* y *enfermedades* e híbridos *sin semilla*. M.Parental.
- Uso de *hibridación somática* para obtención de *portainjertos resistentes* a *enfermedades*, *insectos*, *tipos de suelo* y *tamaño de árbol*. M.Parental.

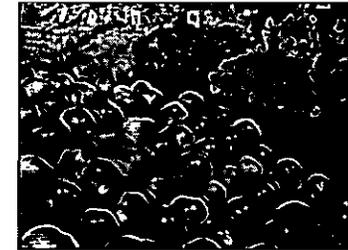
#### ■ **Transformación genética:**

- Desarrollo de *vector binario* con *gen reportero GFP* para *identificar plántulas transgénicas* de *Carrizo citrange*, *naranja dulce* y *pomelo*.
- *Transformación de callos embriogénicos* de *mandarina Satsuma* mediante *Agrobacterium*. Uso *semillas inmaduras*. *GUS*.
- *Transformación y regeneración de protoplastos* de *naranja dulce* con *gene de resistencia a Xanthomona*.
- Producción de *plantas transgénicas libres de marcadores de selección*. Vectores *MAT* (*genes ipt, iaam* y *iaaH*). *Selección positiva*.



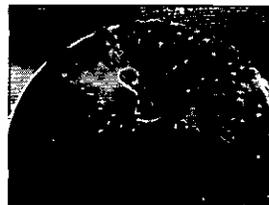
### ■ Calidad:

- Monitoreo de la expresión diferencial de genes durante la maduración y almacenaje de frutos en la piel y pulpa. Encontrar genes candidatos para desarrollar una manzana de calidad superior. Expresión, marcadores y QTLs.



### ■ Producción y estrés biótico:

- Uso de MADS Box genes de abedul induce floración precoz y acortar juvenilidad.
- Uso de los genes Vfa1 y Vfa2 confieren resistencia a Venturia inaequalis ('Mc Intosh' transgénico).
- Obtención de portainjertos transgénicos ('M9' y 'M26') con mayor capacidad de enraizamiento y menor tamaño (rolB). Ensayos campo.
- Sobreexpresión de la ascorbato peroxidasa citosólica (APX) de arveja ('Royal Gala' transgénica) aumenta resistencia a bajas y altas temperaturas.
- Uso del gen de resistencia Rab aumenta resistencia a Alternaria ('Mc Intosh').

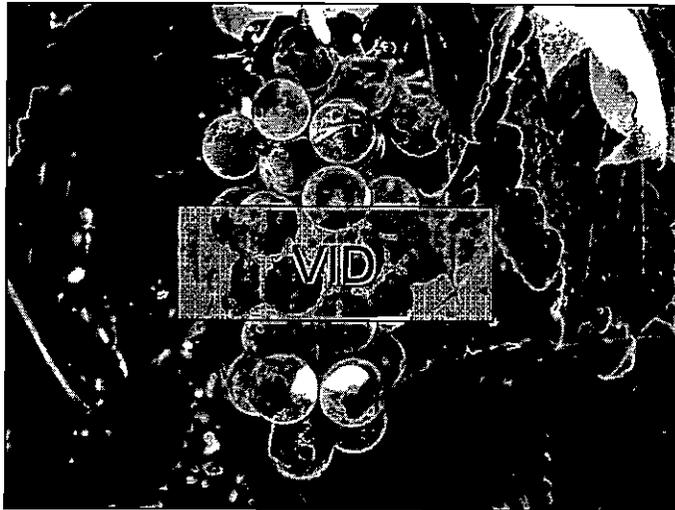


### ■ Tecnologías facilitadoras:

- Uso de QTLs para evaluar parámetros de calidad en frutos de los cvs. 'Braeburn' y 'Talamon' (frutos después de cosecha, durante almacenaje y comercialización). JUGOSIDAD, FIRMEZA, CRUJENCIA.
- Métodos alternativos para selección (sin antibióticos) de plantas transformadas (azúcares no metabólicos, *pmi* y *galT*). \*

### ■ Transformación genética:

- Transformación de portainjerto 'M26' y el cv 'Galaxy' sin el uso de marcadores de selección para antibióticos. Marcador eliminado después de la transformación. GUS, NPR1.
- Protocolo de transformación con Agrobacterium para la obtención de portainjertos transgénicos 'M26' y 'M9' con mayor resistencia Fuego Bacteriano.
- Estimación del flujo de polen previo a la etapa de liberación de plantas transgénicas.



■ **Calidad:**

- Producción de uva Muscadinia transgénica sin semilla.

■ **Producción:**

- Producción y transmisión de proteínas bioactivas desde portainjertos transgénicos a la variedad. 'Thompson seedless' transgénicos usado como portainjerto.

■ **Tecnologías facilitadoras:**

- Obtención de embriones somáticos a partir de óvulos, anteras, peciolo y hojas (*V. rotundifolia*).

- Identificación de marcadores moleculares asociados a la ausencia de semilla utilizando técnicas RAPD y AFLP.

- Uso de genómica funcional para entender las bases de la apirenia en cv. 'Thompson seedless'. Microarreglos y silenciamiento. Búsqueda de genes candidatos.

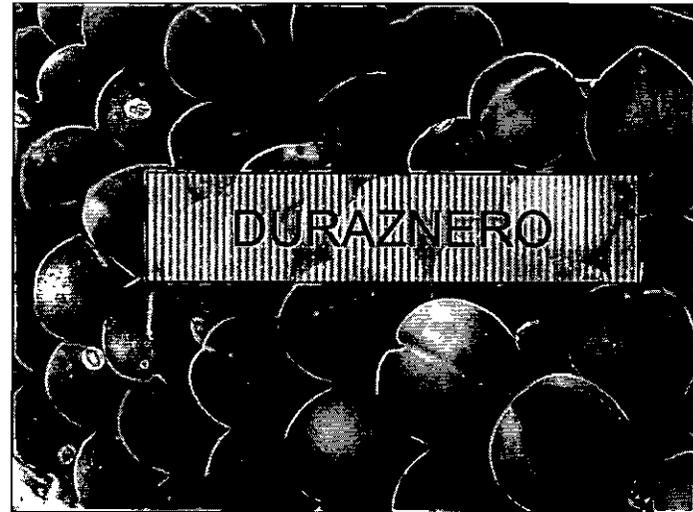
■ **Transformación genética:**

- Desarrollo de plataforma transgénica para distintos cvs. de vid: 'Thompson seedless' como modelo.

'Red Globe', 'Flame', 'Cabernet sauvignon', 'Carmenere'.

- Transformación genética de células embrionarias y recuperación de plantas transgénicas (*V. vinifera*, *V. rotundifolia* e híbridos).

'Cabernet Franc', 'Chardonnay', 'Merlot', 'Pinot Noir', 'Shiraz', 'Thompson seedless' etc.



### ■ Calidad:

- Estudio de la genética molecular asociada al daño por frío (mapa de ligamiento e identificación de QTLs).

- Estudio de la variación genotípica del gene EndoPG y su rol en ablandamiento.

### ■ Producción:

- Estudio del locus 'Evergrowing, evg' en mutante revela genes candidatos en el control del letargo invernal.

- Estudio de las bases de datos de genómica estructural y funcional en búsqueda de regiones del genoma con genes asociados a:

- Arquitectura de árbol
- Resistencia a nemátodos
- Calidad de fruta

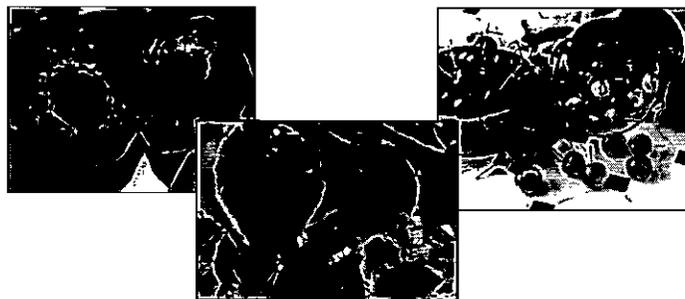
### ■ Tecnologías facilitadoras:

- Desarrollo de nuevos protocolos de cultivo para la obtención y propagación de plantas libres de virus (ej. PPV, PDV, PNRSV).

- Estudio de la influencia del genotipo en la regeneración de embriones somáticos a partir de embriones zigóticos de distintos cultivares. 23 genotipos.



## Otros Carozos



### ■ Calidad:

- Uso de antisentido para la ACC oxidasa en *Prunus domestica* reduce producción y respuesta al etileno.

### ■ Producción:

- Uso de transgenia (*Agrobacterium rhizogenes*) en el portainjerto de cerezo para fomentar desarrollo radicular ('rol').

- Desarrollo de líneas transgénicas de *Prunus domestica* y *Prunus salicina* con resistencia a PPV.

- Ensayos de campo para el cv. de ciruelo 'HoneySweet' resistente al PPV.

■ **Tecnologías facilitadoras:**

- Desarrollo de protocolos de regeneración para quindo ácido y ciruelo a partir de hojas para obtener plantas resistentes al PPV, pmr y GFP.
- Protocolo de regeneración para plantas transformadas de damasco con resistencia al PPV a partir de hojas.
- Construcción de un mapa genético para damasco e identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a PPV, AFLP y SSRs.

■ **Transformación genética:**

- Plataforma de transformación y regeneración de *Prunus salicina*.
- Desarrollo de plataforma de transformación para portainjertos y variedades de *Prunus domestica* con resistencia a PPV.
- Plataforma de transformación para cerezo: cv. Montmorency y portainjerto Gisela 6.





## Biotecnología y mejoramiento genético de *Vitis vinifera* y especies silvestres

International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species. ISHS

Octubre, 2005, Daytona Beach, Florida

Marlene Gebauer H.

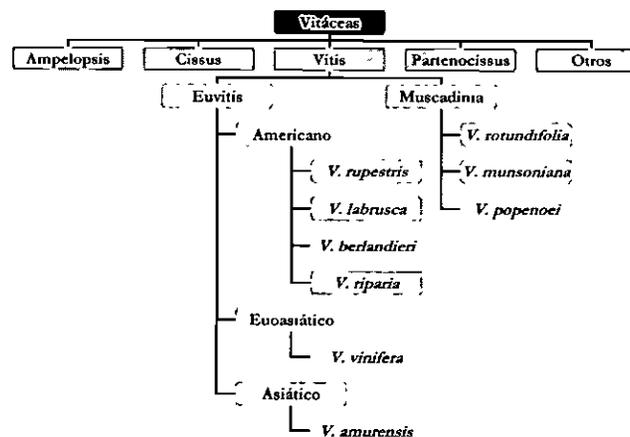
## Trabajos presentados

- Presentaciones orales
- Búsqueda de nuevos genes en especies silvestres de vides
  - Towards Identification, Isolation and Characterization of Disease Resistance Genes from Native North American Grape (*Vitis* L.) Species. J. Lu et al. Florida A&M University, USA
- Transformación genética en vides
  - Screening Transgenic Grapevines for Pierce's Disease Resistance. D. J. Gray et al. University of Florida/IFAS, USA
  - A Mid-Scale Platform for Genetic Transformation of Different Grapevine Varieties: Use of Thompson Seedless as a Model. F. Reyes et al. INIA, Chile
- Genómica funcional
  - Functional Genomics of Grape Seedlessness. U. Hanania et al. Volcani Center, Israel

## Trabajos presentados

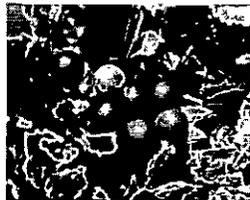
- Presentaciones en Posters
- Búsqueda de nuevos genes
  - Comparative Sequence and Functional Analysis of Stilbene Synthase Genes among *Vitis* Species. H. Huang et al. Florida A&M University, USA
  - Isolation and Characterization of the 2S albumin Gene and Promoter from Grapevine. Z. T. Li et al. University of Florida/IFAS, USA
- Transformación genética en vides
  - Transgenic Approach for Seedlessness of large Fruit Muscadine Grapes. V. Colova et al. Florida A&M University, USA
  - Genetic Transformation of Embryogenic Cultures and Recovery of Transgenic Plants in *Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia* and *Vitis* Hybrids. S. A. Dheeksey et al. University of Florida/IFAS, USA
  - Transgenic Rootstocks Protein Transmission in Grapevines. M. Dutt et al. University of Florida/IFAS, FL, USA
- Cultivo *in vitro*
  - Establishment of an efficient Somatic Embryogenesis and regeneration System in Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia*). J. Lu et al. Florida A&M University, USA
  - Isolation and Culture of Grape Protoplasts from Somatic Embryos of 'Autumn Royal Seedless' (*Vitis unifera*) and 'Taca' (*Vitis rotundifolia*). X. Xu et al. Florida A&M University, USA

## Identificación, aislamiento y caracterización de genes de resistencia en especies de vides nativas de Norteamérica



### Identificación, aislamiento y caracterización de genes de resistencia en especies de vides nativas de Norteamérica

- *V. vinifera* es susceptible a enfermedades
- Germoplasma de especies silvestres posee genes de resistencia biótica y abiótica



**Euvitis Planch. (Florida)**

- *V. aestivalis*
- *V. cinaria*
- *V. cordifolia*
- *V. palmata*
- *V. shuttleworthii*

### Especies del grupo Euvitis poseen mayor resistencia que Muscadinia

	Euvitis	Muscadina
Anthraco	+++	+
Armillaria root-rot	+++	+
Black rot	+++	+++
Botrytis bunch rot	++	+
Crown gall	+++	+++
Dagger nematode	+++	o
Root-knot nematode	+++	o
Downy mildew	+++	o
Eutypa dieback	+++	o?
Fanleaf degeneration	+++	+
Pierce's disease	+++	+
Powdery mildew	+++	+++?
Phomopsis	++	o
Angular leaf spot	o	+++

### Identificación, aislamiento y caracterización de genes de resistencia en especies de vides nativas de Norteamérica

- Mecanismos y base genética de la resistencia en *Vitis* son poco conocidos
- 2002, se inició proyecto de genómica para identificar genes de resistencia (Center of Viticulture and Small Fruit Research, Florida A&M University en colaboración con USDA-ARS Horticultural Research Laboratory at Fort Pierce, Florida)
- *V. shuttleworthii* y *V. rotundifolia*, especies con mayor resistencia a enfermedades y plagas para secuenciación de ESTs

### Identificación, aislamiento y caracterización de genes de resistencia en especies de vides nativas de Norteamérica



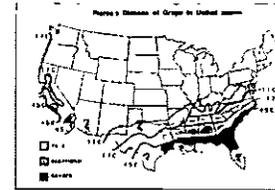
- Secuenciación de 30.000 ESTs
- Generación de 10.000 unigenes
- 7% correlacionados con resistencia
- 20% no tiene relación con *V. vinifera*
  - (170.000 ESTs y 24.000 unigenes)
- Detección de SNPs en los genomas de *V. vinifera* y *V. shuttleworthii*, muchos correlacionados con resistencia

## Identificación, aislamiento y caracterización de genes de resistencia en especies de vides nativas de Norteamérica

### Conclusiones

- Gran impacto en el mejoramiento genético tradicional y transgenia de *V. vinifera* dado por:
  - Combinación del análisis de expresión de genes y la asistencia por marcadores moleculares (SNPs)
  - Aislamiento y caracterización de genes de resistencia de la planta

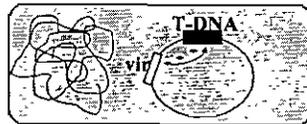
## Obtención de plantas de *V. vinifera* resistentes a *Xylella fastidiosa*



- Enfermedad de Pierce endémica del sureste de Norteamérica, de California y América Central
- Bacteria bloquea el paso del agua a través del xilema
- Vectores son insectos chupadores
- Especies nativas y algunos híbridos son resistentes
- Variedades de *V. vinifera* son susceptibles

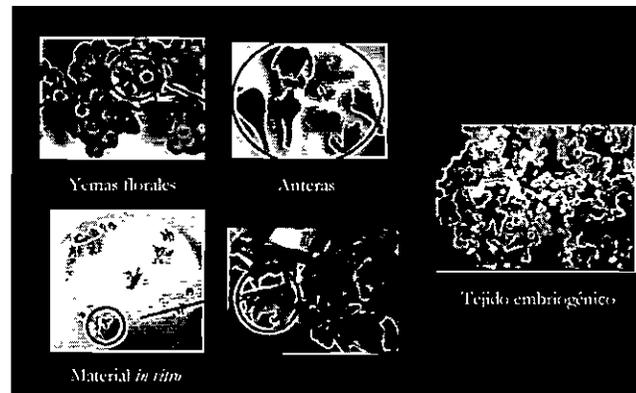
## Transformación genética

- Sistema de transformación indirecta mediante *A. tumefaciens*



- Construcción genética con promotor doble bidireccional (BDPC) y fusión de EGFP y NPTII
- Selección de plantas transgénicas mediante expresión transiente de GFP
  - Se visualiza por 1ª vez a los 2 días
  - Expresión estable a los 20 días

## Embriogénesis somática de *V. vinifera*



## Selección de plantas transgénicas para resistencia a *Xylella fastidiosa*



- Desafíos:
  - Método para producir un gran número de líneas transgénicas
  - ELISA para identificar plantas que expresen péptidos en el xilema
  - Producción de líneas transgénicas seleccionadas
  - Líneas resistentes y susceptibles como controles de pruebas poblacionales

## Evaluación de plantas transgénicas para resistencia a *Xylella fastidiosa*

- Método
  - Inoculación mecánica de bacteria en el xilema de las plantas
  - Determinación de resistencia relativa
    - Se compara la severidad de la enfermedad entre líneas controles susceptibles y resistentes
  - Correlación de severidad con población de bacterias en el xilema
  - Comprobación de que la resistencia se debe a supresión bacteriana dada por la transproteína

## Selección de plantas transgénicas para resistencia a *Xylella fastidiosa*

### Conclusión

- Líneas transgénicas con altos niveles de resistencia en *Vitis vinifera* a *Xylella fastidiosa*
- Transgenes que otorgan mayor resistencia seleccionados

## Resistencia a *Botrytis cinerea*



*V. vinifera* cv Thompson Seedless



- 48.000 ha de vides de mesa en Chile
- Pudrición gris causada por *Botrytis cinerea*
- Se asocia a grandes pérdidas

## Resistencia a *Botrytis cinerea*

### ■ Genes

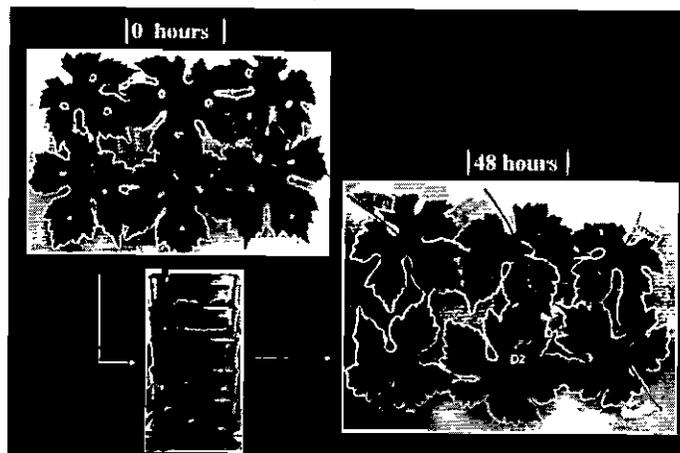
- Endo quitinasa *T. harzianum*
- Exo quitinasa *S. aureus*
- N' acetyl glucosaminidasa *T. harzianum*
- Glucanasa *T. harzianum*
- Indolycina reversa Péptido sintético
- Magainina Péptido sintético

- 20 vectores y varias combinaciones de genes
- Transformación genética de *V. vinifera* var Thompson Seedless

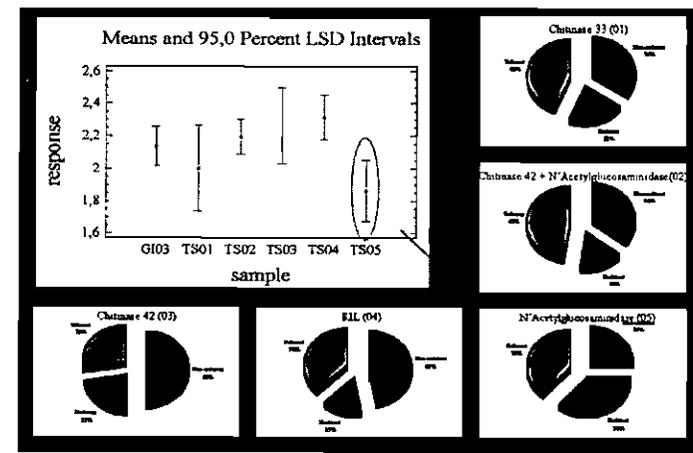
## Incorporación de nuevas variedades al sistema de transformación genética

Somatic Embryogenesis		Transformation			
Type	Varieties	Varieties	Embryos	Efficiency	
Table grapes	Autumn Royal	Cabernet Sauvignon	209	2	1.0%
	Carmenere				
	Crimson Seedless				
Wine grapes	Flame Seedless	Carmenere	779	5	0.6%
	Princess Seedless	Flame Seedless	8,495	74	0.9%
	Red Globe	Red Globe	939	7	0.7%
	Superior Seedless				
	Cabernet Sauvignon		10,413	88	0.8%
	Carmenere				
	Merlot				

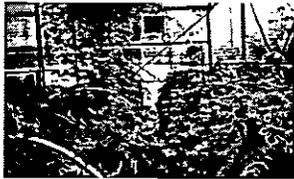
## Bioensayos para determinación de resistencia a *Botrytis cinerea*



## Obtención de resistencia a *Botrytis cinerea*



## Ensayos de campo para determinación de resistencia a *Botrytis cinerea*



Líneas seleccionadas en invernadero

- Septiembre 2005, INIA, La Platina
- 600 líneas transgénicas de Th. Seedless en campo



Septiembre, 2005



Noviembre, 2005

## Conclusiones finales

- Mejoramiento genético vía transformación genética para obtención de resistencia a enfermedades
- Desarrollo de protocolos de regeneración *in vitro* para utilización en transformación genética en variedades de *V. vinifera* y especies nativas
- Utilización de genes naturales de especies nativas de *Vitis* L.

International Symp. on Biotech. of  
Temperate Fruit Crops and Trop.  
Species.  
APPLE Group

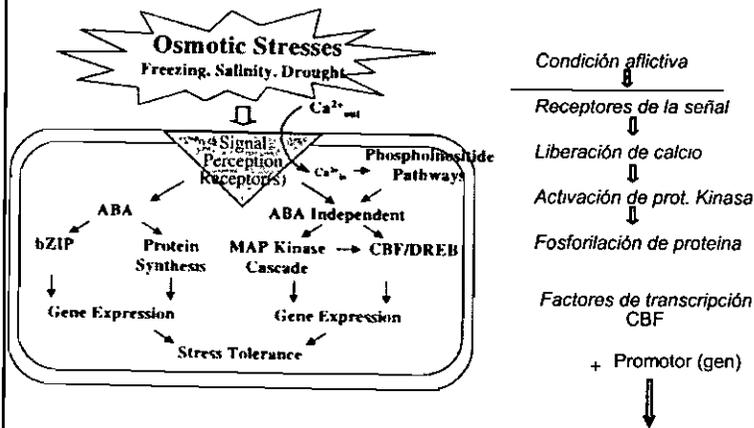
Juan Pablo Zoffoli  
Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal  
Pontificia Universidad Católica de Chile

Uso de la biotecnología para mejorar la resistencia  
de las plantas a las condiciones de Stress:  
Importancia del entendimiento de la fisiología  
M. Wisniewski, C. Bassett, T. Artlip y J. Renaut

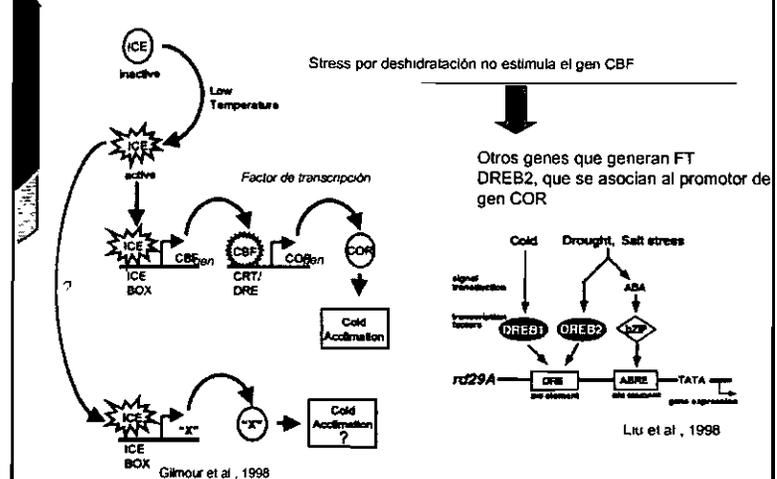
Objetivos

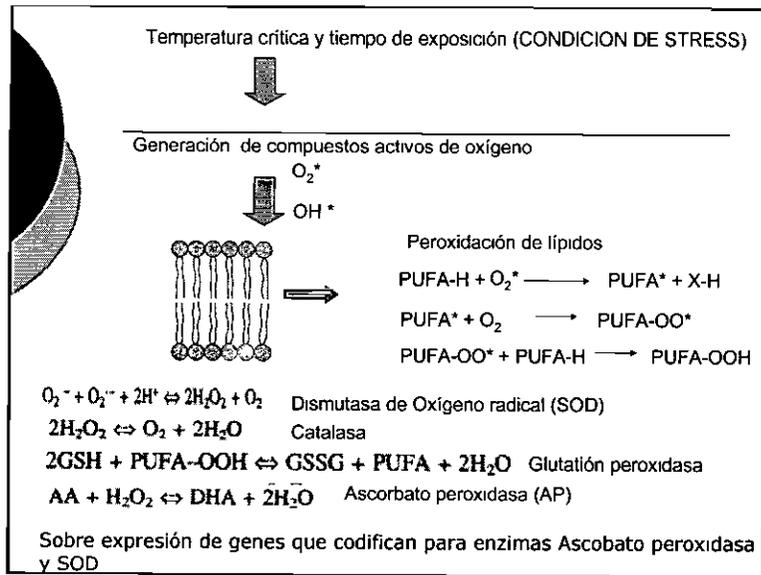
- Estudio de los genes asociados a condiciones de Stress
  - Aclimatación al frío invernal.
  - Alta temperatura.
  - Sequía
- Aislamiento y caracterización de los genes regulados por temperaturas bajas (*cor*) y los factores de transcripción inducidos por bajas temperaturas.
- Genes que codifican para las enzimas detoxificantes de radicales.

EN PLANTAS



Expresión de los genes relacionados con la Tolerancia a Temperatura Bajas y Altas





**Expresión de proteínas con exposición a alta temperatura (35-40°C) en manzanas**

Proteínas que se expresan a altas temperaturas y protegen condiciones de stress no solo por temperaturas altas sino también asociadas a daño por frío (Palla). Actúan como chaperonas evitando la desnaturalización de otras proteínas.

Contacto: [mwisniewski@afrs.ars.usda.gov](mailto:mwisniewski@afrs.ars.usda.gov)

**Sobre-expresión del gen para la enzima Ascorbato peroxidasa en Manzanos y su resistencia al Stress ambiental**

MT Artlip, M. Wisniewski, J. Norelli, C. Minngang y L. Fuchigami

- Objetivo
  - Aumentar la resistencia natural de plantas de manzanas a condiciones aflictivas de alta y baja temperatura.
- Enfoque
  - Condiciones de Stress biótico o abiótico inducen compuestos radicales de Oxígeno que son altamente reactivos, generando daños celulares que producen síntomas de senescencia y daños fisiológicos)
  - Sobre-expresión de genes que codifican para enzima Ascorbato peroxidasa.

**Sobre-expresión del gen para la enzima Ascorbato peroxidasa en Manzanos y su resistencia al Stress ambiental**

Continuación

- Procedimiento
  - Desarrollo de plantas transgénicas de Royal Gala. Evaluación en relación a la resistencia de discos de hojas a exposición a alta y baja temperatura.
- RESULTADOS
  - El mejor resultado se encontró en aumentar la resistencia a temperaturas altas:
    - Plantas NO transformadas: 70% de daño después de 6 horas a 44°C, y en plantas transformadas el daño varió entre 10 y 50%.

CONTACTO: [tartlip@afrs.ars.usda.gov](mailto:tartlip@afrs.ars.usda.gov)



## BpMADS4-caja MADS induce floración en plantas de manzano

M-V. hanke, A Elo, T. Sopenan y H. Flachowsky

- **Objetivo**
  - Inducir floración en forma temprana en plantas de manzano.
  - Acortar el periodo de juvenilidad
- **Enfoque**
  - Utilizar la información genética desarrollada en *Arabidopsis* y *Arabidopsis* en relación a los genes que regulan la expresión floral
    - LEAFY (LFY), APETALA1 (AP1), TERMINAL FLOWER (TFL1)
  - Silenciamiento de genes
  - Sobre-expresión de genes: BpMADS4 (similar a FRUITFULL de *Arabidopsis*).

## BpMADS4-caja MADS induce floración en plantas de manzano continuación ..

### ○ Resultados

- Se crearon 20 líneas transgénicas a través del promotor CAMV35S usando *Agrobacterium tumefaciens*.
- *Características fenotípicas*
  - Producción de flores durante propagación *in vitro*.
  - Producción de flores en forma solitaria en la etapa *in vitro* posteriormente en racimos de 5 flores.
  - Aparición de flores anormales y los brotes tipo enredaderas.

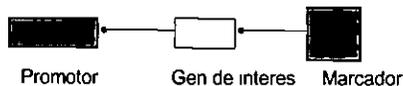
Contacto: h.flachowsky@bafz.de

## Transformación genética de manzanos sin el uso de marcadores específicos

M Malnoy, e e Wysocka, P Abbott, S Lewis, J Norelli, M. Flaishman, D. Gidoni y H. Aldwinckle

### ○ Enfoque

- Desarrollar plantas transgénicas sin marcadores
  - Marcadores son genes que se introducen a las plantas transformadas para reconocer que la transformación ha ocurrido, generalmente resistencia a antibióticos o herbicidas.
  - Mercado no quiere plantas con estos marcadores.
  -



## Transformación genética de manzanos sin el uso de marcadores específicos *Continuación.*

### ○ Objetivo

- Desarrollar plantas transgénicas sin marcadores
- Eliminar los genes marcadores inmediatamente después de la transformación.
- Desarrollar transformación sin marcadores.

### ○ Procedimientos

- Portainjerto M-26 de manzanos.
- Construcciones pwiAtt35Sgus y pinMpNPR1 sin el gen de resistencia a Kanamicina.

Transformación genética de manzanos sin el uso de marcadores específicos Continuación.

### ○ RESULTADOS

- De las 1500 plántulas, se seleccionaron 250 a 300 para verificar presencia de transgenes (promotor, GUS, NPR1) a través de PCR de las cuales 22 - 25,4% mostraban transformación.

## Transformación de manzanas incluyendo métodos alternativos de selección

J. Szankowski y J. Degenhardt

### ○ Objetivos

- Desarrollar métodos alternativos para la selección rápida de plantas transformadas
  - La transformación de plantas requieren métodos rápidos de selección de las plantas transformadas.
  - Actualmente la selección a través de la introducción de genes de resistencia a antibiótico y herbicidas no es aceptada.
- Enfoque
  - Selección positiva de plantas transformadas de manzanas
    - Sistema se basa en la incapacidad natural de la planta para metabolizar ciertas moléculas de azúcares, como el caso de manosa y galactosa.
    - Plantas con el gen (*pmi*) de la enzima fosfato isomerasa, son capaces de metabolizar manosa y
    - Plantas con el gen (*galT*) enzima UDP-glucosa:galactosa-1-fosfato uridiltransferasa metaboliza la galactosa.

Transformación de manzanas a través de métodos alternativos de selección

J. Szankowski y J. Degenhardt

### ○ Procedimiento

- Se crearon plantas de manzanas transformadas con el plasmidio pNOV2819 de Syngenta con el gen *pmi* y el gen *galT* se clonó en el vector pBI121.
- Las plantas que crecieron en medio con manosa o galactosa eran aquellas transformadas

## Genes Vfa1 y Vfa2 confieren resistencia a *Venturia inaequalis* en plantas transgénicas de manzano cv McIntosh.

MT Artip, M. Wisniewski, J. Norelli, C. Minngang y L. Fuchigami

### ○ Objetivo

- Aumentar la resistencia de plantas de manzano a *Venturia inaequalis* a través del gen Vf derivado de *Malus floribunda*.

### ○ Enfoque

- Existen diferentes genes Vf que otorgan resistencia a la sarna del manzano, sin embargo existen diferentes razas de *Venturia inaequalis* que podrían explicar la diferencia sensibilidad a la enfermedad.

Genes Vfa1 y Vfa2 confieren resistencia a *Venturia inaequalis* en plantas transgénicas de manzano cv McIntosh.

Continuación...

#### o Procedimiento

- Genes Vf1, Vf2, Vf3 y Vf4 fueron separadamente clonados en el vector pCAMBIA2301 e incorporados en manzanas cv. McIntosh a través de *Agrobacterium tumefaciens*.
- Plantas transgénicas fueron inoculadas con una mezcla de 5 razas de *V. inaequalis*.

Genes Vfa1 y Vfa2 confieren resistencia a *Venturia inaequalis* en plantas transgénicas de manzano cv McIntosh.

Continuación

#### o RESULTADOS

- La línea transgénica que expresó el gen Vfa4 fue la mas susceptible.
- Las líneas con el gen Vfa1 o Vfa2 fueron mas resistentes que el control.

Contacto: mam262@cornell.edu

PI	LOCATION	TISSUES/TRAFTS
Korban	Univ Illinois, USA	ESTs for the world
Norelli	ARS Kearneysville, WV, USA	fire blight
McNellis	Penn State Univ, USA	Rootstock scion interactions
VanNocker	Michigan State Univ, USA	flowering and fruiting
Gardiner	HortResearch, NZL	General tree and fruit tissues/traits
Paulan	INRA, Angers, FRA	300 ESTs fire blight
Zhu	ARS Wenatchee, WA USA	harvest and postharvest (planned)
Wisniewski	ARS Kearneysville, WV, USA	cold acclimatization, bark tissue, sequencing, aim for micro array
Gianfranceschi	Collaborative EU under Univ Milan, ITA	differential expression during ripening, maturation, not really EST project
Tartarini	Univ Bologna, ITA	Scab resistance, subtractive hybridization, small effort
Dreesen	Leuven, BEL	ripening
Zoffoli	Univ Catolica, Santiago, CHL	Scab and heat stress (planned)

<http://www.hidras.unimi.it/index.html>

[http://www.itb.cnr.it/estree\\_quality/](http://www.itb.cnr.it/estree_quality/)

#### PARTICIPANTES ASOCIADOS A INVESTIGACIÓN EN POMACEAS

- 1 Peggy Abbott, Cornell Univ, Geneva, NY USA
- 2 Herb Aldwinkle, Cornell Univ, Geneva, NY, USA
- 3 Tim Artlip, USDA-ARS Kearneysville, WV, USA
- 4 Richard Bell, USDA-ARS Kearneysville, WV, USA
- 5 Eva Borejsza-Wysocka, Cornell Univ, Geneva, NY, USA
- 6 Elisabeth Chevreau, INRA-Angers, Beaucouze, France
- 7 Rozemarijn Dreesen, KU Leuven, Heverlee Vlaarms-Brabant, Belgium
- 8 Moshe Flaishman, Volcani Center, Bet Dagan, Israel
- 9 Magda-Viola Hanke, Fed Ctr Breeding Res, Dresden, Germany
- 10 Martin Hoehule, Univ Hohenheim, Stuttgart, Germany
- 11 Johan Keulemans, KU Leuven, Heverlee Vlaarms-Brabant, Belgium
- 12 Dolores Lomberk, USDA-ARS, Lake Buena Vista, FL, USA
- 13 Mickael Malnoy, Cornell Univ, Geneva, NY, USA
- 14 Jim McPerson, WTFRC, WA, USA
- 15 Cecelia Muller, USDA-ARS, Lake Buena Vista, FL, USA
- 16 Iris Szankowski, Univ Hannover, Hannover, Germany
- 17 Stefano Tartarini, Bologna Univ, Bologna, Italy
- 18 Kwan Jeong Sung, Cheju Natl Univ, Jeju, Korea
- 19 Narander Nira, ArborGen, Summerville, SC, USA
- 20 Michael Wisniewski, USDA-ARS Kearneysville, WV, USA
- 21 Li-Hua Zhu, Swedish Univ Ag Sci, Alnarp Skane, Sweden
- 22 Yanmin Zhu, USDA-ARS Wenatchee, WA, USA
- 23 Juan Pablo Zoffoli, Univ Católica de Chile, Santiago, Chile