

CONTENIDO DEL INFORME TÉCNICO

PROGRAMA DE FORMACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA

1. Antecedentes Generales de la Propuesta

Nombre: Plant & Animal Genome XII Conference

Código: BIOT-FP-L-2003-2-BIOT-016/

(14)

Nombre Postulante Individual: Humberto Godofredo Prieto Encalada

Lugar de Formación (País, Región, Ciudad, Localidad): San Diego, California, EE.UU.

Fecha de realización: 10-14 de Enero de 2004

Objetivos de su participación en la actividad: Actualización sobre los proyectos genoma que se están realizando en el mundo y sus efectos en la Iniciativa Genoma Chile..

2. Antecedentes Generales: describir si se lograron adquirir los conocimientos y/o experiencias en la actividad en la cual se participó (no más de 2 páginas).

La asistencia al Plant and Animal Genome XII se enmarca en el contexto de trabajos del Proyecto Genoma de Vides, correspondiente a la iniciativa Genoma Chile. Estos trabajos se refieren en forma específica al proyecto que estudia la interacción vid-*Botrytis* desde la perspectiva de la generación de ESTs en estadios específicos de la infección.

El suscrito ha participado en las tres últimas ediciones de esta reunión, siendo la de más alta convocatoria y calidad en el ámbito de Genómica de Plantas y Animales en el mundo.

En forma particular, la participación se concentró preferentemente en el análisis del estado del arte de las iniciativas genoma de vides y frutales de carozo, según prioridades pre-establecidas dentro de INIA-La Platina y como pudiera ser de interés de los grupos de post-cosecha, biotecnología y mejoramiento.

Para la asistencia a esta reunión, se aplicó a Concurso para el Financiamiento de Asistencia a Congresos Específicos de FIA. Los resultados de este concurso abierto, posibilitaron la asistencia de dos investigadores de INIA-La Platina a este evento.

Al respecto, se presenta un informe detallado del estado de avance de ambos temas.

Sábado 10 de enero:

- Sesión "Fruit and nut crops" (Andrew Paterson (U. Georgia); Daniel Peterson (Mississippi State Univ.)).

Conferencias destacadas:

1. "Development of a physical and a transcript map for peach: a model tree species for Rosaceae". Renate Horn (Clemson University)

Principales aspectos:

- **Objetivo específico 1:** Desarrollo de una base de datos de ESTs (6000 ESTs únicos) de tejido vegetativo y reproductivo de duraznos y almendras.

Principales resultados:

1. Genoteca cDNA de duraznos: mesocarpo de frutos en desarrollo ("mature picking" y "cating ripe", además de una selección doble haploide (P-21-5-2N)



2. Genoteca en almedros: embriones
3. secuencias leídas: duraznos 9.984 (502 bases promedio); almendro 2794 (541 bases promedio).
4. Peach Unigene Set (secuencias): se encuentran en NCBI, códigos de acceso BU039022 a BU49005.
5. Anotación para estas secuencias:
 - para función molecular: esencialmente corresponden a proteínas de unión a ligandos, transportadores celulares y enzimas.
 - para procesos biológicos. Esencialmente, se encontraron para comunicación celular, crecimiento celular y mantención celular.
 - para componentes celulares. Esencialmente para célula, estructura externa y medio extracelular.
- **Objetivo específico 2.** Establecimiento de una red de trabajo para el mapeo físico y el transcriptoma de durazno.

Principales resultados:

- El mapa físico de *Prunus*. A través de hibridación de genotecas BAC Nemared con 143 sondas y 153 marcadores. Se ha obtenido un mapa de anclaje de estos marcadores (marcadores correspondientes a RFLP, SSR y AFLP de durazno; RFLP de *P. ferganensis*, cerezo y almendro). Espaciamiento de los marcadores anclados: 4 cM. 69 marcadores en copia simple y 72 en copia múltiple. 679 clones BAC anclados en el mapa general de *Prunus*. Se han "fingerprinted" más de 20 mil clones BAC.
- Genotecas de inserto de tamaño grande. Se cuenta con dos librerías BAC: a) para la variedad Nemared con digestión *HindIII* (44160 clones) estimándose cubrir 8,8 veces el genoma y b) variedad Haploid levell (PLOV 2 1 N) con digestión *Sau3AI* (34560 clones) estimándose cubrir 9,2 veces el genoma.
- **Objetivo específico 3.** Desarrollo de un mapa transcripcional a partir del mapeo de 3000 ESTs únicos en el mapa físico de estadíos desarrollo en duraznos.

Principales resultados:

- Localización (saturación) del mapa físico desarrollado en el Objetivo Específico 2. Se han ubicado 180 ESTs en 86 locaciones en este mapa saturado de marcadores. 3,8 clones BAC por EST localizado. Gran porcentaje de ESTs se localizaron entre 1 y 3 veces en el mapa de ligamiento.
- **Objetivo específico 4.** Desarrollo de una base de datos genómica para *Rosaceae*.

Principales resultados:

- conjunción de los datos de: datos de secuencia de EST, mapeo de los ESTs en el mapa físico, datos del mapeo, datos del "fingerprinting" de BACs, formación de "contigs" en el mapa físico.

2. "Genome-wide expression analysis in grape". Pamela Gatto, ISMAA, Italia.

Proyecto de ESTs dentro del marco de "gene discovery" y "gene expression profile" para vides. A su vez, estos engranan en la iniciativa de mapeo físico y de mejoramiento asistido por SNPs.

Se trabaja con las variedades Pinot noir y Regent, para esto, se han obtenido 6 librerías cDNA para granos, hojas, brotes y raíces en Pinot noir (procedencia IASA) y desde flores y tallos de 1 cm en Regent (procedencia alemana).

Resultados y orientaciones:

Este grupo ha obtenido un "set" de datos constituidos por 4233 ESTs no redundantes, de los que se han anotado 3522 (84%). De estos, la anotación en NCBI ha mostrado que un 28% de los singletons tiene un alto grado de conservación (>80%) con ORFs descritos, 36% entre un 60-80% de conservación, 27% entre 40-60% de conservación y 11% entre 20 y 40%.

Con estos resultados (ver <http://www.ismaa.it>), se han seguido las siguientes líneas de investigación: estudios de "gene expression profiling" de diferentes estadíos de desarrollo para *veraison*, maduración y post-maduración. En todos estos estadíos, para materiales con altos y bajos contenidos de resveratrol y altos y bajos contenidos de antocianinas. Para abordar esto, se han

desarrollado además, librerías substractivas desde hojas, raíces y frutos, lográndose la amplificación por PCR de 4224 clones de cada genoteca, los que se han ordenado en microarreglos, para estudios funcionales (“transcriptional profiling”) para síntesis de compuestos fenólicos y mecanismos defensivos. En este último caso, se han implementados cultivos celulares para análisis metabolitos y de transcritos para clones de *Vitis amurensis*, *V. riparia* x *V. berlandieri* y *V. vinifera* cv. Pinot noir y cv. Merzling, utilizando distintos estímulos tales como infección por *Botrytis* en distintos tejidos y el uso directo de elicitors. Todo esto último se reporta como trabajo en marcha.

Domingo 11 de enero:

- Sesiones destacadas:

1. “International Grape Genome Project Workshop” (D. Cook, U. of California).

- “Introduction”. D. Cook.

Estado actual del proyecto ESTs de vides:

Para *Vitis vinifera*: ESTs = 135542, BAC end sequences = 1075, STS sequences = 12, Otras secuencias (cDNAs completos/parciales) = 497.

Para *Vitis* (no *vinifera*): secuencias DNA = 899, mRNAs parciales = 240, ESTs = 9476, total = 9615.

2. “Update on the Affymetrix grape microarray”. John Cushman, U. of Nevada-Reno.

Presentó el estado actual de las conversaciones para el desarrollo, en marzo '04, del chip de oligos de Affymetrix para vides (*Vitis* Gene chip). El flujo del trabajo se definió según el siguiente “pipeline”: se definió un congelamiento temporal de los datos en Octubre '03, luego de esto se procedió a una agrupación de los datos en Diciembre '03, la selección de oligos y síntesis de las máscaras para el gene-chip se realizó en Enero '04, los ensayos de evaluación del chip serán en Febrero de '04, finalmente la liberación comercial del chip será en marzo de '04. Las fases de definición de datos y sondas a incluir en el desarrollo de los oligos se basaría preferentemente en la experiencia del International Grape Genome Project (IGGP).

La lista de sondas a incluir en el grape-gene chip, la lista de genes y transcritos y la lista de controles a incluir en el chip Affymetrix, se anexan al final del presente informe.

3. “Proteomic analysis of grapevine responses to water deficit and salt stress”. Delphine Vincent, U. Nevada-Reno.

Proyecto cuyo objetivo es reconocer las proteínas sintetizadas en respuesta al estrés salino.

Principales resultados. La variación de la cantidad de proteínas tiene relación con el día de cosecha. El estrés abiótico afecta la fisiología de la vid así como la síntesis proteica en el tiempo. Estudios de proteómica a través de electroforesis bidimensional ha permitido identificar proteínas, las que se intentan correlacionar con ESTs previamente reportados. Proteínas identificadas como de respuesta a estrés biótico (SOD y APX) no son necesariamente afectadas por estrés abiótico en las condiciones de este estudio.

4. “Transcriptional responses of grapevine to *Xylella fastidiosa* infection”. D. Cook.

Proyecto cuyo objetivo es identificar los genes de vid cv. Cabernet Sauvignon cuya expresión alterada por la infección por *Xylella fastidiosa*.

Principales resultados. Se ha utilizado el concepto de que la frecuencia de ESTs por contig es válido como un reflejo de del nivel de expresión. Las relaciones entre librerías de ESTs y de contigs son determinadas a través de diferentes técnicas de mining de datos, utilizando la correlación, agrupamiento y análisis de componentes principales. Utilizando la información de ESTs en bases públicas (en realidad base www.cgf.ucdavis.edu/grape), se ha realizado análisis ontológico de posibles ESTs alterados durante la infección por *X. fastidiosa*, los que luego se han confirmado por análisis utilizando real-time PCR.

5. “Analysis of grape berry development during nitrogen stress based on analysis of metabolites, proteins and transcripts. Alberto landolino, U. California-Davis.

Proyecto cuyo objetivo es relacionar los mensajeros, las proteínas y los metabolitos producidos o alterados en condiciones de estrés por N₂. Se trabajó con 8 librerías cDNA, específicas de 8 estados distintos de desarrollo de vid cv. Cabernet Sauvignon clon 8 (prebloom, bloom, Stage I (según

Eichom y Lorenz, 1977), Stage II (x2), Stage III, madurez). Este trabajo implica dos actividades destacadas: a) identificación *in silico* de putativos genes expresados diferencialmente en flores y frutos de vid y b) análisis por microarrays y por metabolómica de hojas y frutos de plantas de vid sometidas a estrés de N₂.

Este trabajo utilizó los mismos principios básicos del trabajo anterior, es decir, la frecuencia de ESTs por contig es válido como un reflejo de del nivel de expresión. Las relaciones entre librerías de ESTs y de contigs son determinadas a través de diferentes técnicas de mining de datos, utilizando la correlación, agrupamiento jerárquico y análisis de componentes principales.

Principales resultados. Del establecimiento de ESTs se han encontrado 105 contigs inducidos preferencialmente en el desarrollo: 28% de genes asociados a metabolismo, 3% de factores de transcripción, 18% resistencia a enfermedad, 23% estrés/senescencia, 19% de función desconocida y 9% de no hits. En la actualidad se espera la aplicación del Affymetrix gene-chip para estudios de: expresión diferencial y constitutiva bajo ausencia y presencia de N₂; también se espera correlacionar la presencia de metabolitos entre ambas situaciones.

6. "cDNA microarray analysis of developing *Vitis vinifera* cv. Shiraz berry skin". Dan Waters, Southern Cross University, Australia.

Proyecto cuyo objetivo es analizar, desde la perspectiva de la regulación de genes, los cambios de niveles en la expresión a través del desarrollo de la inflorescencia/fruto hasta el estado de madurez completa. En los estados de desarrollo desde la semana 5 de desarrollo, se analizaron ESTs correspondientes a la piel de los frutos de vides.

Principales resultados. Para los análisis se utilizaron 4 sondas correspondientes a bayas completas en maduración, como RNAs blanco se utilizaron inflorescencias completas y piel de frutos maduros, se desarrollaron dos tipos de experimentos: cinética de niveles de RNAs y comparación *veraison* (ripening) con fruto maduro. Mostraron disminución de niveles los ESTs: 13 de fotosíntesis, 3 de metalotioneína-like tipo 2, 2 de proteínas precursora de transferencia de lípidos, 1 de sacarosa sintetasa, 6 de proteínas desconocidas, 5 miscelaneas. ESTs con niveles máximos a la semana dos de desarrollo: 1 EST para chalcone sintetasa, 1 EST para citocromo b5, 1 para flavonona 3 hidroxilasa, 1 de antocianidina reductasa, 4 miscelaneos. ESTs con máxima expresión a la semana 5: 13 para proteínas híbridas ricas en prolina, 1 de tubulina, 1 para MAD-box transcription factor, 5 miscelaneos, 6 desconocidos. ESTs relacionados a proteínas similares a flavonona-3-hidroxilasa: 1 chalcone sintetasa, 1 para 4 cumarato-CoA-ligasa, 1 para chalcone isomerasa, 2 para flavonona-3-hidroxilasa, 2 para antocianidina reductasa. ESTs con máxima expresión entre las semanas 2-10: 3 para fotosíntesis, 3 para metabolismo de carbohidratos, 5 desconocidos y 3 miscelaneos. ESTs con máxima expresión a la semana 12: 4 para proteínas de pared ricas en prolina, 1 para proteínas relacionada con ripening, 37 cDNAs mostraron up-regulation, 21 ESTs desconocidos y 6 miscelaneos. ESTs que mostraron inducción de 3x o más: 5 de transcripción, 4 de metabolismo de proteínas, 4 de metabolismo energético, 7 miscelaneos, 66 desconocidos. ESTs que mostraron una disminución de 3x o más: 1 de proteína ribosomal 60S, 2 de RUBISCO, 1 de invertasa vacuolar. En resumen, el proceso de *veraison*/ripening es uno complejo, hay una relación coordinada de la síntesis de flavonoides para la producción de taninos y upregulation de genes de pared celular durante la fase de crecimiento rápido.



3. Itinerario Realizado: entregar una relación de actividades de acuerdo al siguiente cuadro:

Fecha	Actividad	Objetivo	Lugar
Sábado 10 de enero	Sesión “Fruit and nut crops” (Andrew Paterson (U. Georgia); Daniel Peterson (Mississippi State Univ.). Sesión “National Citrus Genomic Workshop” (José Chaparro (USDA-ARS). Sesión “Plant interaction with pests and pathogens workshop” (Christie Williams (USDA-ARS).	Evaluar en detalle el avance en el proyecto genoma de duraznos Evaluar en detalle trabajos de interacción planta patógeno	
Domingo o 11 de enero	Sesión International Grape Genome Project Workshop” (D. Cook, U. of California).	Evaluar detalladamente el estado de avance de los trabajos en vides.	
Lunes 12 de enero	Sesiones plenarias: 1. “Maize genome organization and its implications for applied genetics”. Scott Tingey, Du Pont Company. 2. “Analysis of the chicken genome”. Wes Warren, Washington University. Sesión “Plant transgene genetics workshop”. Gan-Yuan Zhong, Pioneer Hi-Breed International.	Evaluar el estado de avance de investigación en transgénicos.	
Martes 13 de enero	Visita a sesión de posters.	Contactar grupos de interés, evaluar posibles grupos competencia.	



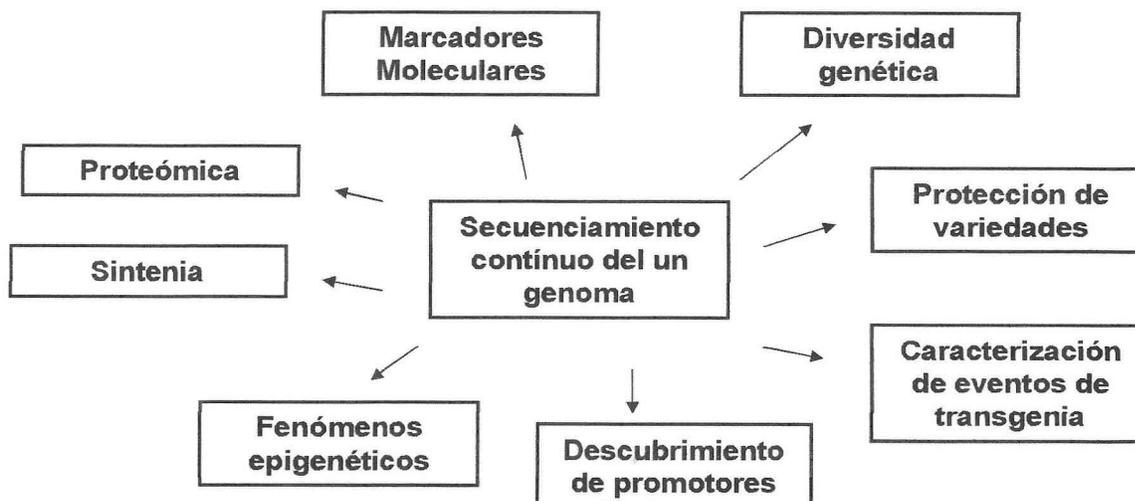
<p>Miércoles 14 de enero</p>	<p>Sesiones plenarias:</p> <ul style="list-style-type: none"> - "The genes are out there: molecular breeding of wheat and barley". Meter Langridge, U. of Adelaide. - "Toward the computable plant: new methods for análisis of the shoot apical peristem". Elliot Meyerowitz, Cal. Tech. <p>Sesión "Host-microbe interactions workshop". Andy Potter, VIDO, Canada y Michael Sadowsky, U. of Minnessota.</p>	<p>Evaluar estado de trabajos en interacción planta patógeno.</p>	
------------------------------	---	---	--

Señalar las razones por las cuales algunas de las actividades programadas no se realizaron o se modificaron.

4. Resultados Obtenidos: descripción detallada de los conocimientos adquiridos. Explicar el grado de cumplimiento de los objetivos propuestos, de acuerdo a los resultados obtenidos. Incorporar en este punto fotografías relevantes que contribuyan a describir las actividades realizadas.

Se ha colectado un completo estado del arte de los proyectos genoma en el mundo, que potencialmente tienen trascendencia en los trabajos que actualmente se desarrollan en Chile. De la misma forma, se logró ratificar contactos técnicos ya establecido, programar asistencias a nuevas reuniones y establecer nuevos contactos. Sobre la importancia de desarrollar proyectos genoma en Chile, la perspectiva internacional de este tipo de temas es concebida según el flujo de información que se describe en la figura aquí incluida. A partir de este diagrama, se han incluido recomendaciones en el ítem Aplicabilidad del presente Informe.

Revelar el complemento genético completo de un organismo permite:



5. Aplicabilidad: explicar la situación actual de los temas en Chile (región), compararla con la tendencias y perspectivas en el país (región) y feria visitados y explicar la posible incorporación de los conocimientos adquiridos, 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).

Dentro del marco de los trabajos de genómica de la Iniciativa Genoma Chile y en los que está involucrada La Platina, ésta actividad constituye un área que no debe abandonarse por ningún motivo en el corto y mediano plazo (ver cuadro de relaciones entre el conocimiento de un genoma completo y las posibilidades que ofrece esto). En este sentido, se deberán reforzar los actuales programas de mejoramiento genético (al menos en el caso de frutales), de modo de potenciar las ventajas que posee La Platina como Centro de Investigación. Herramientas clave son los programas de mejoramiento convencional y de mapeo físico de las variedades o especies en estudio. Se deberían reforzar estas áreas para dar algún sentido integrado a los trabajos moleculares que se desarrollan. A su vez, estos últimos pierden competitividad sin los primeros. Como puede desprenderse de las presentaciones aquí expuestas. De este modo, se propone, fomentar la discusión para abordar de manera decidida, la generación de proyectos o programas de mapeo físico en todas sus instancias (generación de librerías de gran tamaño de insertos, grupos de estudio con experiencia en genética molecular y sintenia, saturación de mapas genéticos (mapas de anclaje de marcadores y ESTs) y "bioinformática" que apoye estas labores (entendido como el manejo lineal de secuencias)). Del mismo modo, se propone el estudio de mecanismos que permitan potenciar el uso del mejoramiento genético como herramienta no sólo de desarrollo de productos finales (variedades), sino también de poblaciones que apoyen los estudios genéticos en cultivos clave.

6. Contactos Establecidos: entregar una relación de contactos establecidos de acuerdo al siguiente cuadro:

Institución/Empresa	Persona de Contacto	Cargo/Actividad	Fono/Fax	Dirección	E-mail
University of Wisconsin-Madison	Hasan Khatib	Assistant Professor	6082633 484	632 Animal Sciences Bldg. 1675 Observatory Drive, Madison, WI 53706	hkhatib@wisc.edu
Cornell University	José Vidal	Post Doctoral Associate	3157872 221	Horticultural Sciences Dpt. Hedrick Hall 630 W. North St. Geneva, NY	Jrv7@cornell.edu
Kansas State University	Jehron López-Gerena	Ph. D. Student		Department of Plant Pathology Manhattan, KS 66506	Jlg3366@ksu.edu
Ankara University	Ali Ergul	Researcher	9031231	Institute of	Aliergul

			70550/16 58 ext	Biotechnology, 06110 Diskapi, Ankara, Turkey	2001@yahoo.com
University of Minnesota	Mitchell Abrahamsen	Associate Professor/Director of Graduate Studies	6126241 244	College of Veterinary Medicine 235D Animal Science/Veterinary Medicine Bldg. 1988 Fitch Avenue, St. Paul Minnesota	abe@tc.umn.edu
CIMMYT, Int.	Marilyn Warburton	Senior Researcher		Apdo Postal 6-641 06600 Mex. DF.	m.warburton@cgiar.org
Hokkaido Green-Bio Institute	Atsushi Torada	Wheat Project Leader	8112389 2046	Higashi-5 Kita-15 Naganuma, Hokkaido 069-1317, Japan	torada@mb.infoweb.ne.jp

7. Detección de nuevas oportunidades y aspectos que quedan por abordar: señalar aquellas iniciativas detectadas en la actividad de formación, que significan un aporte para el rubro en el marco de los objetivos de la propuesta, como por ejemplo la posibilidad de realizar nuevos cursos, participar en otras ferias y establecer posibles contactos o convenios. Indicar además, en función de los resultados obtenidos, los aspectos y vacíos tecnológicos que, a la luz de los conocimientos adquiridos en esta actividad, aún quedan por abordar para la modernización del tema en el país.

8. Material Recopilado: junto con el informe técnico se debe entregar un set de todo el material recopilado durante la actividad de formación (escrito y audiovisual) ordenado de acuerdo al cuadro que se presenta a continuación (deben señalarse aquí las fotografías incorporadas en el punto 4):

Tipo de Material	Nº Correlativo (si es necesario)	Caracterización (título)
Ej.:		
Artículo CD de fotos		Fotografías ponencias relevantes, sin editar
Copias impresas de posters		Posters disponibles
Papers de trabajos in extenso (proporcionadas por		Nuevos papers



GOBIERNO DE CHILE
FUNDACION PARA LA
INNOVACION AGRARIA

contactos)

9. Aspectos Administrativos

9.1. Organización previa a la actividad de formación

a. Apoyo de la Entidad a cargo de la organización del viaje

bueno regular malo

(Justificar)

b. Información recibida durante la actividad de formación

amplia y detallada aceptable deficiente

c. Trámites de viaje (visa, pasajes, otros)

bueno regular malo

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

10. Conclusiones Finales: entregar las conclusiones finales del participante de la actividad de formación, incluyendo el nivel de satisfacción de los objetivos personales.

En cierta medida, este Congreso es Fundamental para las actividades anuales de los proyectos genoma en marcha en nuestro país. Según el estado de arte evaluado en él, se pueden "direccionar" rápidamente los proyectos locales, así, tomar decisiones fundamentales para el buen fin de estas iniciativas.

Además, desde un punto de vista competitivo y a modo de reflexión personal, nuestra participación en él debería ser incrementada a través de presentación de resultados en la próxima temporada.

Esto implica comenzar a mostrar resultados competitivos en cada uno de los proyectos locales, teniendo como base los antecedentes presentados en este informe respecto de los grupos que realizan proyectos afines.

Fecha: 08/03/04

Nombre y Firma beneficiario de la beca: Humberto Prieto

