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

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

Octubre, 2005, Dayona Beach, Florida

Marlene Gebauer H.

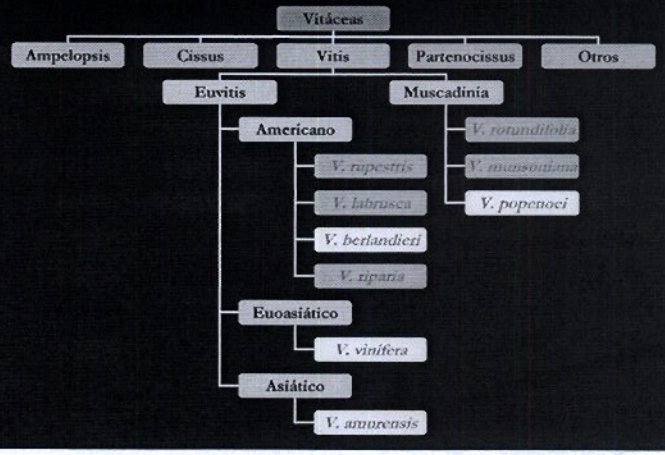
Trabajos presentados

- 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 Stylbene 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. Dhekney *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 vinifera*) and 'Tara' (*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. austrinis*
- *V. cinerea*
- *V. cordifolia*
- *V. palmat*
- *V. shuttleworthii*

Especies del grupo Euvitis poseen mayor resistencia que Muscadinia

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

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

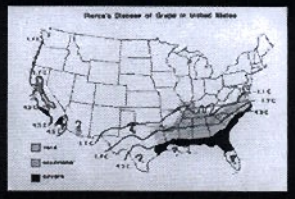
- Secuenciación de 30.000 ESTs
- Generación de 10.000 unigenes
- 7% correlacionados con resistencia
- 20% no tiene relación con *V. vinifera*
  - (170.000 ESTs y 24.000 unigenes)
- Detección de SNPs en los genomas de *V. vinifera* y *V. shuttleworthii*, muchos correlacionados con resistencia

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*



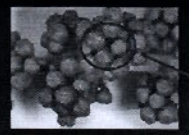
- Enfermedad de Pierce endémica del sureste de Norteamérica, de California y América Central
- Bacteria bloquea el paso del agua a través del xilema
- Vectores son insectos chupadores
- Especies nativas y algunos híbridos son resistentes
- Variedades de *V. vinifera* son susceptibles

Transformación genética

- Sistema de transformación indirecta mediante *A. tumefaciens*

- Construcción genética con promotor doble bidireccional (BDPC) y fusión de EGFP y NPTII
- Selección de 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*



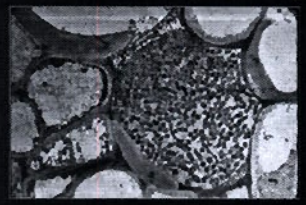
Yemas florales

Anteras

Material *in vitro*

Tejido embriogénico

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*

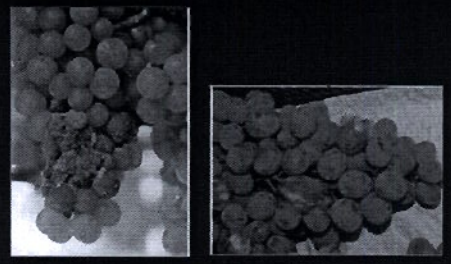
- Método
  - Inoculación mecánica de bacteria en el xilema de las plantas
  - Determinación de resistencia relativa
    - Se compara la severidad de la enfermedad entre líneas controles susceptibles y resistentes
  - Correlación de severidad con población de bacterias en el xilema
  - Comprobación de 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 Seedleess

Incorporación de nuevas variedades al sistema de transformación genética

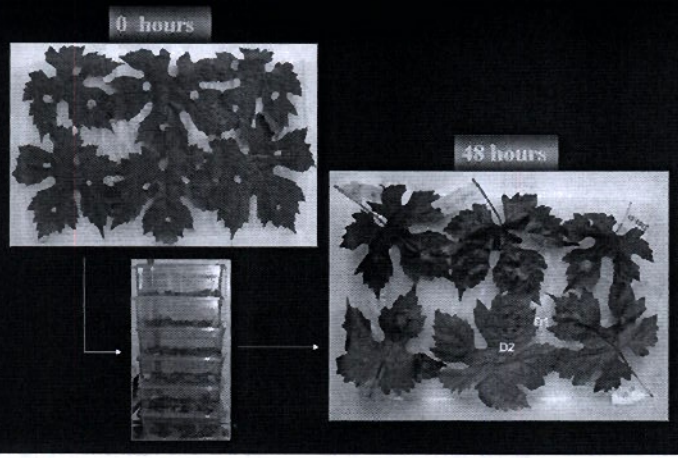
Somatic Embryogenic

Type	Varieties
Table grapes	Autumn Royal
	Carménere
	Crimson Seedless
	Flame Seedless
	Princess Seedless
	Red Globe
	Superior Seedless
Wine grapes	Cabernet Sauvignon
	Carmenere
	Merlot

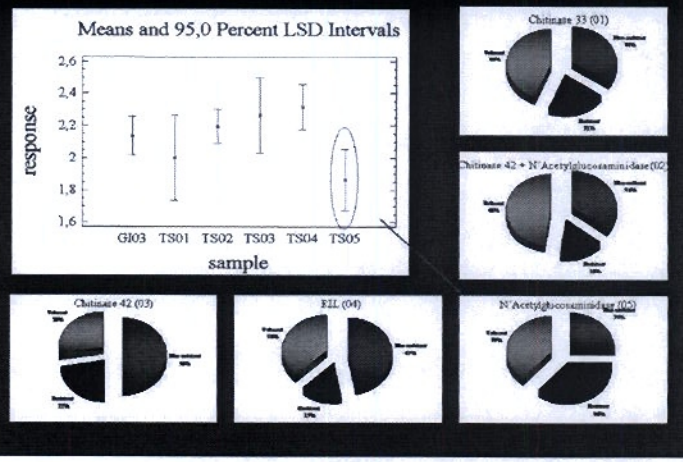
Transformation

Varieties	Embryos	Plants	Efficiency
Cabernet Sauvignon	200	2	1.0%
Carmenere	779	5	0.6%
Flame Seedless	8,495	74	0.9%
Red Globe	939	7	0.7%
	10,413	88	0.8%

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.

Obtención de resistencia a *Botrytis cinerea*

Conclusión

- Líneas transgénicas de Thompson Seedless preseleccionadas para resistencia a *B. cinerea*
- Resultados de ensayos de campo en frutos permitirán la selección de una nueva variedad

Genómica funcional para vides apirénicas

- Cultivares estenoespermocárpicos comprenden 85% del mercado mundial de vides de mesa (consumo fresco y pasas)
- Thompson Seedless representa el tipo de vides donde la fertilización ocurre pero las semillas abortan

Aborto de semillas de vides

Control Genético

Semilladas x Apirénicas

Varios grados de rudimentos seminales

Semilladas ⟷ Apirénicas

Control ambiental

En una segunda etapa de floración, la que ocurre a temperaturas elevadas, líneas apirénicas desarrollan bayas con semillas normales

Cuál sería la base molecular del aborto de semillas en vides estenoespermocárpicas

- El aborto de semillas podría estar correlacionado con diferentes niveles de expresión de ciertos genes durante el desarrollo de las flores y/o de las bayas

Diferentes estados de desarrollo floral: Th. seeded vs Th. Seedless

Etapas de floración

- Se colectaron racimos jóvenes de ambos cultivares previo a la antesis durante 2 años
- ARN se utilizó para desarrollar un perfil de transcripción usando el chip Affimetrix de Vinifera
- Se presentaron datos de análisis de Microarrays

Expresión de genes en estados de desarrollo floral de cv. semillados versus apirénicos

- Se presentaron datos de análisis de Microarrays
  - La expresión de 1.265 genes cambia significativamente durante el desarrollo floral
  - Patrones similares para cultivares semillados y apirénicos
  - 2 genes se expresan diferencialmente entre los cultivares semillados y aapirénicos

Expresión de genes en estados de desarrollo floral de cv. semillados versus apirénicos

- Estudio del patrón de expresión de los 2 genes seleccionados usando hibridación *in situ*
- Estado 1, 2 y 3
  - Pétalos
  - Anteras
  - Sépalos
  - Carpelos

Expresión de genes en estados de desarrollo floral de cv. semillados versus apirénicos

- Para análisis funcional se utilizó el sistema de silenciamiento génico postranscripcional mediado por ARN de TRV
- El silenciamiento de estos genes en tabaco y tomate resultó en leaf stunting, clorosis y aborto de semillas

Expresión de genes en estados de desarrollo floral de cv. semillados versus apirénicos

- La expresión de GFP intracelularmente verifica el rol de estos genes durante el cultivo *in vitro* bajo promotores inducibles y constitutivos

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

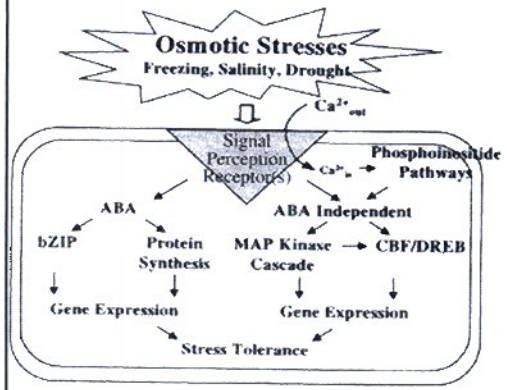
Juan Pablo Zoffoli
Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal
Pontificia Universidad Católica de Chile

Uso de la biotecnología para mejorar la resistencia de las plantas a las condiciones de Stress: Importancia del entendimiento de la fisiologia

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



Condición aflictiva

Receptores de la señal

Liberación de calcio

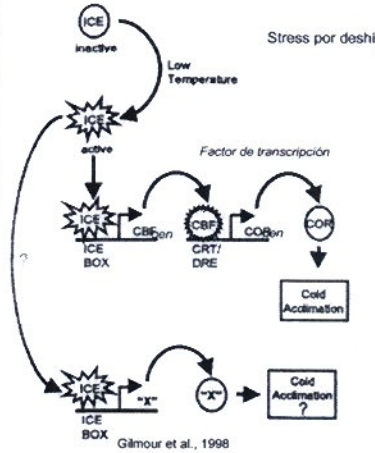
Activación de prot. Kinasa

Fosforilación de proteina

Factores de transcripción CBF

\+ Promotor (gen)

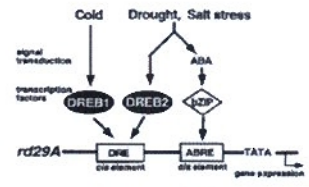
Expresión de los genes relacionados con la Tolerancia a Temperatura Bajas y Altas



Gilmour et al., 1998

Stress por deshidratación no estimula el gen CBF

Otros genes que generan FT. DREB2, que se asocian al promotor del gen COR



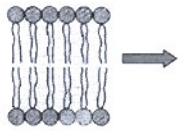
Liu et al., 1998

Temperatura crítica y tiempo de exposición (CONDICION DE STRESS)

Generación de compuestos activos de oxígeno

$O_2^{\bullet}$

$OH^{\bullet}$



Peroxidación de lípidos

$PUFA\text{-}H + O_2^{\bullet} \longrightarrow PUFA^{\bullet} + X\text{-}H$

$PUFA^{\bullet} + O_2 \longrightarrow PUFA\text{-}OO^{\bullet}$

$PUFA\text{-}OO^{\bullet} + PUFA\text{-}H \longrightarrow PUFA\text{-}OOH$

$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^{+} \Leftrightarrow 2H_2O_2 + O_2$ Dismutasa de Oxígeno radical (SOD)

$2H_2O_2 \Leftrightarrow O_2 + 2H_2O$ Catalasa

$2GSH + PUFA\text{–}OOH \Leftrightarrow GSSG + PUFA + 2H_2O$ Glutatión peroxidasa

$AA + H_2O_2 \Leftrightarrow DHA + 2H_2O$ Ascorbato peroxidasa (AP)

Sobre expresión de genes que codifican para enzimas Ascobato peroxidasa y SOD

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 (Palta). Actúan como chaperonas evitando la desnaturalización de otras proteínas.

Contacto: 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

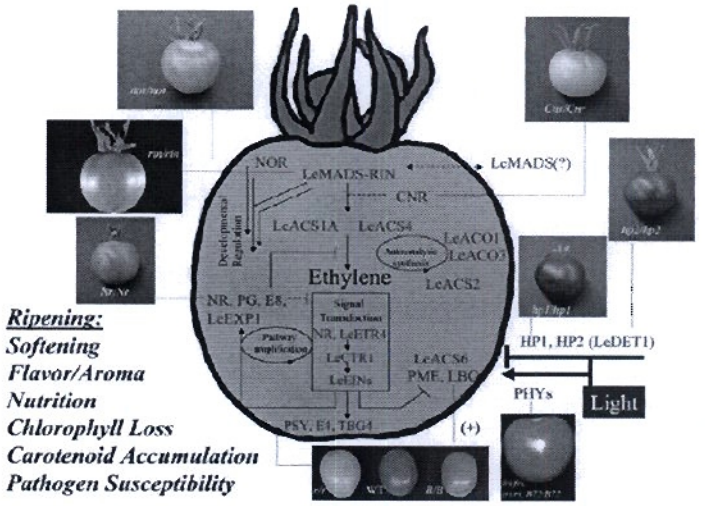
- Procedimiento
  - Desarrollo de plantas transgénicas de Royal Gala. Evaluación en relación a la resistencia de discos de hojas a exposición a alta y baja temperatura.
- RESULTADOS
  - El mejor resultado se encontró en aumentar la resistencia a temperaturas altas:
    - Plantas NO transformadas:, 70% 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

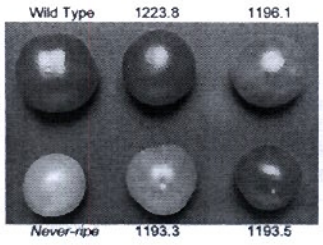
Enfoque genético para entender el control de maduración y aspectos de calidad en tomates

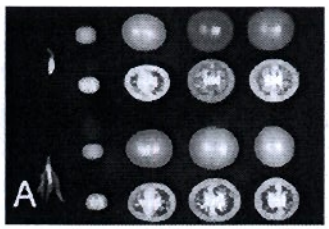
J. Giovannoni

- OBJETIVOS
  - Laboratorio liderado por Giovannoni (Cornell) en colaboración con *The Institute for Genome Research* (TIGR) han creado sobre 150,000 secuencias EST para mas de 23 tipos de tejidos de tomate.
    - http://ted.bti.cornell.edu
  - Estudio de los genes que participan en la maduración de tomate.
    - Genes que codifican para la síntesis de etileno, receptores de etileno, inhibidores de la maduración.

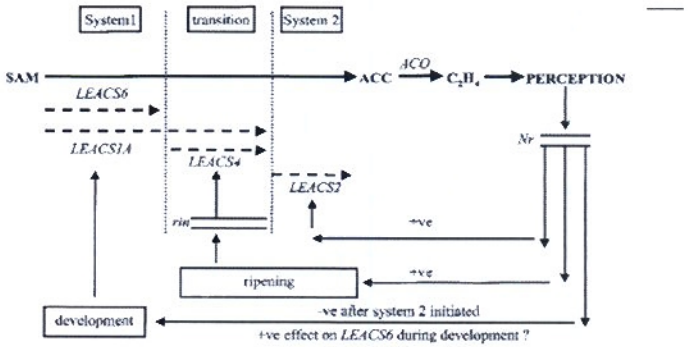


- Trabajos en mutantes de tomate *rin*, *Nr*, *nor*.
  - Mutante rin, tienen la madurez inhibida, debido a genes asociados a la síntesis de ACSintasa
  - Mutante Nr (*Never ripe*) y *nor* , mutado el receptor, insensible a etileno, no madura apropiadamente la fruta, la expresión fenotípica está asociada con la expresión floral (carpelos).





MODELO PROPUESTO PARA LA REGULACION DE LA SINTESIS DE ETILENO



BpMADS4-caja MADS induce floración en plantas de manzano

M-V. hanke, A.Elo, T. Sopanen 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 abedúl 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 ..

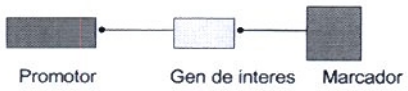
- Resultados
  - Se crearon 20 lineas transgénicas a través del promotor CAMV35S usando *Agrobacterium tumefaciens*.
  - *Características fenotípicas*
    - Producción de flores durante propagación *in vitro*.
    - Producción de flores en forma solitaria en la etapa *in vitro* posteriormente en racimos 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.

- Enforque
  - Desarrollar plantas transgénica sin marcadores
    - Marcadores son genes que se Introducen a las plantas transforamadas 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 transgénica 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. Artlip, 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 inaqualis* 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...

- 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...

- 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/TRAITS
Korban	Univ Illinois, USA	ESTs for the world
Norelli	ARS Kearneysvile, 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/

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 McFerson, WTFRC, WA, USA
15. Cecelia Muller, USDA-ARS, Lake Buena Vista, FL, USA
16. Iris Szankowksi, 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 Wisniweski, 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