

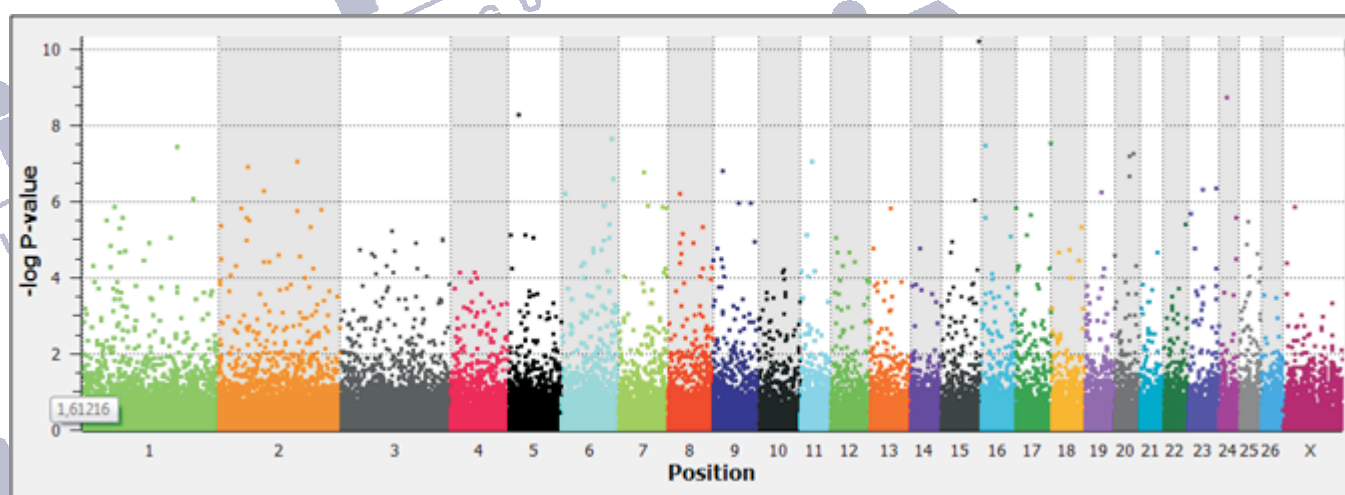


Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
URUGUAY

Jornada Técnica

VI Jornada de Agrobiotecnología INIA

Conocimiento Intensivo para el Sector Productivo:
Situación actual y perspectivas"



Unidad de Biotecnología INIA
Serie Actividades de Difusión N° 698
20 de Octubre de 2012

Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

Integración de la Junta Directiva

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

D.M.V., Dr. José Luis Repetto Capello - Vicepresidente



D.M.V. Álvaro Bentancur

D.M.V., MSc. Pablo Zerbino



Ing. Agr. Joaquín Mangado

Ing. Agr. Pablo Gorriti



VI Jornada de Agrobiotecnología INIA
Conocimiento Intensivo para el Sector
Productivo: Situación actual y perspectivas

Jornada Técnica

Unidad de Biotecnología INIA
25 de Octubre de 2012

Indice

Organización y Gestión del Banco de ADN Genómico Animal. Lic. Pablo Peraza.	1
Determinando el parentesco a través del uso de SNP. Ing. Agr. Ignacio Aguilar (PhD).	4
Nuevas herramientas moleculares para la selección en Ovinos: ejemplo de caso resistencia a parásitos gastrointestinales. Lic. Nicolás Grasso.	7
Plataforma en selección genómica enfocada en el progreso genético animal. Ing. Agr. Elly Navajas (PhD).	10
Algunas enfermedades hereditarias de los bovinos en Uruguay: ¿Qué nos enseñan la Osteopetrosis, el MSUD, la Cardiomiopatía crespá y la Epidermolisis bullosa? Med. Vet. Fernando Dutra.	13
Generación y caracterización de híbridos interespecíficos de <i>L. uliginosus</i> x <i>L. corniculatus</i> . Ing. Agr. Alicia Castillo MSc.	15
Ajuste, diseño e implementación de predicciones genómicas al programa de mejoramiento genético de trigo. Jari von Zitzewitz (PhD).	17
La Biotecnología en el campo: el ejemplo del arroz. Ing. Agr. Lic. Victoria Bonnacarrère MSc.	19
El BiotecSojaSur: el laboratorio de la soja del Mercosur. Dr. Atilio Castagnaro.	23
Evaluación de un panel de marcadores en genes candidatos de vías metabólicas en engorde de novillos Hereford. Lic. Andrea Branda	24
Estudio evolutivo del origen del arroz maleza de Uruguay Lic. Silvia Garaycochea	26
Aplicación de secuenciamiento de nueva generación al estudio de la domesticación de arroz y diferenciación genómica entre cultivares, biotipos con características de malezas y especies ancestrales de <i>Oryza sativa</i> . Lic. Silvia Garaycochea	27

La Metagenómica: nuevo abordaje para el estudio de la diversidad microbiana como indicador de calidad de suelos agrícolas y prospección de nuevas cepas y genes. Lic. María Teresa Federici.	28
Análisis de expresión de genes de un genotipo resistente de <i>Solanum commersonii</i> frente al patógeno <i>Ralstonia solanacearum</i> . Lic. Rafael Narancio	31
Peptidos antimicrobianos como alternativa al uso de fungicidas químicos Diego Alem	33

Organización y Gestión del Banco de ADN Genómico Animal

Peraza, P.^{1*}; Navajas, E.A.¹; Montossi, F.²; Branda Sica, A.¹; Ravagnolo, O.²; Ciappesoni, C.G.²; Dalla Rizza, M.¹

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Unidad de Biotecnología, Uruguay

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Carne y Lana, Uruguay

*pperaza@inia.org.uy

Introducción

El INIA ha llevado adelante iniciativas innovadoras junto al sector productivo y sus gremiales tendientes a brindar nuevas herramientas para la mejora genética animal. El Banco de ADN Genómico Animal es una iniciativa establecida en conjunto con la Asociación Rural del Uruguay (ARU) con el objetivo de conservar el material genético de ovinos y bovinos de nuestro país para su utilización en actuales y futuros proyectos de investigación y selección genómica. En forma complementaria, el INIA junto al Instituto Nacional de Mejoramiento Lechero (INML) y la Universidad de la República (UDELAR) a través de la Facultad de Veterinaria (FV) establecieron un convenio para la concreción de un Banco de ADN lechero, contribuyendo a brindar un mayor alcance a la conservación de material genético valioso existente en el país. A lo largo del tiempo, el INIA ha implementado trabajos de investigación y desarrollo metodológicos para el mejoramiento genético junto a la ARU, las sociedades de criadores de las diferentes razas involucradas y el INML. Por lo que este gran esfuerzo ha logrado importantes avances en los sistemas de evaluación en el mejoramiento genético animal, sustentados en parámetros cuantitativos, que modernizaron la genética animal en el país. Es importante destacar en todas estas iniciativas el rol fundamental de instituciones como el Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL) y la UDELAR.

Material genético en el Banco

Al día de hoy el Banco de ADN, ubicado en la Estación Experimental Las Brujas, cuenta con más de 10 mil muestras. Un punto importante es la definición de qué materiales deben ser conservados. La importancia y valor del material genético conservado dentro del Banco de ADN Genómico Animal está dado en gran medida por la información productiva asociada a cada muestra. La riqueza de la información a obtener realizando la asociación de las características de sus registros y la información genética es de un altísimo valor tanto para la generación de conocimiento sobre las características genéticas determinantes como para la aplicación de selección. Esto influye entonces, en la jerarquía o el valor que se le otorga a la conservación de las muestras cuando es posible contar con información caracterizada para de cada una de ellas.

En el Cuadro 1 se presentan algunos ejemplos de las muestras que hoy se conservan en el Banco de ADN las cuales se pueden clasificar en dos grandes grupos. Por un lado, muestras de poblaciones clave a la variación genética de diferentes razas y que están asociadas a la mejora genética de las mismas como son los núcleos de selección de la raza Merino o las centrales de conexiones de Corriedale y Texel. Dentro de este mismo enfoque y pensando en los desarrollos futuros en selección genómica, la conservación de las muestras de los animales más relevantes por su influencia en la genética de las razas es también material prioritario para el Banco. En ese sentido, ya se cuenta con muestras de la raza Hereford para estudios de asociación genómica. En forma complementaria a lo anterior, el Banco de ADN es también el reservorio de muestras provenientes de experimentos que provean información valiosa por la importancia de características consideradas. Las poblaciones

experimentales reúnen datos de atributos no solo relevantes sino de difícil y/o costosa medición cuyo valor puede ser estratégico para estudios futuros.

En términos generales, las muestras provienen tanto de proyectos coordinados por INIA como por otras instituciones, buscando siempre sumar esfuerzos que incluso permitan potencializar el uso de las mismas bases de datos con más de un objetivo. Por ejemplo, se conservan muestras de ADN de la central de conexión y prueba de progenie de la raza Texel que son parte de la evaluación genética realizada por el INIA y también forman parte de un proyecto INNOVAGRO de validación de marcadores para calidad de canal y carne liderado por la UDELAR.

Cuadro 1. Ejemplos de tipos de poblaciones consideradas en el Banco de ADN Genómico Animal tanto ovinas como bovinas. Se indica el número de muestras, proyecto a las que corresponden y las instituciones participantes del mismo.

Raza	Número muestras	Tipo de Población	Proyecto e Instituciones involucradas
Merino	~ 2100	Cabañas	Generación de una plataforma biológico-tecnológica de referencia, para estudios de selección genómica aplicada al mejoramiento en ovinos en Uruguay: énfasis en resistencia a parásitos INIA, SUL, UDELAR, Universidad de Davis, Sociedades de Criadores, ARU
Corriedale	~ 700	Experimental	Líneas de selección divergente por resistencia a parásitos gastrointestinales SUL, INIA
Hereford	~ 400	Cabañas	Estudios de asociación genómica para características de la evaluación genética INIA, SCHU, Iowa University
Holando	~ 1340	Tambos comerciales (experimental)	Uso de polimorfismos genéticos para la mejora en producción y fertilidad de la vaca lechera en condiciones pastoriles (FPTA) INML, UDELAR-FV, INIA

Es importante destacar que el Banco, cuenta con Comités de Coordinación o Administración constituidos por representantes de INIA y de ARU (convenio Banco de ADN) y por representantes del INIA, el INML y la UDELAR (convenio Banco de ADN lechero). Estos comités tienen como funciones definir los protocolos y los procedimientos de manejo y acceso a los datos en relación al material conservado. Estos procedimientos permiten asegurar a todas las instituciones y organizaciones participantes de esta iniciativa, no solo el ingreso de muestras de valor al Banco, sino también que el retiro de material genético ya almacenado será utilizado apropiadamente. La respuesta a las solicitudes de material que custodie el Banco, queda sujeta a la decisión que tomen los comités.

Gestión y conservación de las muestras

El Banco es un repositorio de muestras de ADN obtenidas de células nucleadas mantenidas en condiciones de no permitir su degradación para una posterior utilización, con las garantías de que éste se encuentre en excelentes condiciones. El Banco también incluye un laboratorio de procesamiento de muestras para la extracción del ADN, con potencial de conservar otros materiales biológicos como pueden ser órganos y semen también muy importantes para la aplicación tanto de técnicas de secuenciación como de genotipado para la I+D+i en genómica y selección genómica. La gestión del mismo es responsable tanto del ingreso y conservación del material genético, como de su administración y trazabilidad desde el momento de su llegada al laboratorio y durante su conservación.

La consolidación del Banco de ADN Genómico Animal es un elemento fundamental en la diferenciación, no solo del INIA sino del país, en la proyección hacia la Mejora Genética Animal y en la Investigación Genómica.

Agradecimientos

Se agradece el trabajo permanente en el Banco a Andrea Vergara y Carlos Monzalvo, y las valiosas colaboraciones de Virginia Goldberg, Nicolás Grasso y Wanda Iriarte.

Determinando el parentesco a través del uso de SNP

Aguilar, I^{1*}; Navajas, E.A.²; Ravagnolo, O.³; Peraza, P.²; Montossi, F.³; Dalla Rizza, M.²

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Leche, Uruguay. ² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Unidad de Biotecnología, Uruguay. ³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Carne y Lana, Uruguay
* iaguilar@inia.org.uy

Introducción

La determinación o confirmación de las relaciones de parentesco entre animales es importante desde el punto de vista del mejoramiento genético porque los errores en la genealogía tienen un efecto negativo en la tasa de progreso genético (Van Vleck, 1970; Israel and Weller, 2000), y además por permitir la asignación de paternidades en sistemas de apareamiento con múltiples toros (Van Eenennaam et al., 2007). Ya en la década de 1990 se diseñaron paneles de microsatélites como herramientas moleculares para la determinación de parentesco, siendo el método oficial avalado por la Asociación Internacional para la Genética Animal (ISAG, por su sigla en inglés). Más recientemente, la identificación de numerosos SNP distribuidos en todo el genoma y el salto tecnológico dado por el genotipado masivo de SNP (del inglés, *Single Nucleotide Polymorphism*), con tiempos y costos decrecientes, han hecho posible el uso de estos marcadores para asignar o verificar parentesco.

Marcadores del tipo SNP han sido seleccionados para la identificación y asignación de parentesco en bovinos (Heaton et al., 2002), y en la actualidad 120 SNP se encuentran incluidos en paneles comerciales de alta densidad (Matukumalli et al., 2009), como por ejemplo en el chip BovineSNP50 (Illumina, San Diego, CA). A nivel comercial están actualmente disponibles pruebas de ADN para paternidad basadas en un subconjunto de 96 SNP (ej, SeekSire™, GeneSeek, Lincoln, NE). Los diferentes paneles de marcadores pueden ser evaluados mediante su probabilidad de exclusión, que es función de la frecuencia alélica de los marcadores que los integran (Jamieson and Taylor, 1997). Hasta la fecha, estas herramientas para la determinación de parentesco aun no han sido analizadas con datos de poblaciones nacionales. En Uruguay, la raza Hereford cuenta con información genómica generada con el BovineSNP50 con vista a la implementación de la selección genómica en el marco de la evaluación genética panamericana junto a Argentina, Canadá y Estados Unidos. El objetivo del presente trabajo es cuantificar las frecuencias alélicas de los SNP y la efectividad de los mismos para la determinación del parentesco en base a información de la raza Hereford.

Materiales y métodos

Se consideraron dos bases de datos. La primera de ella corresponde a animales Hereford provenientes de un rodeo comercial nacidos en 2011, en el marco de un proyecto de investigación llevado por la Sociedad de Criadores Hereford y el INIA (**BD1**). Dichos animales fueron generados en base al apareamiento de ocho toros Hereford que integran la evaluación genética. Para la confirmación de parentesco muestras de ADN de 138 terneros, 127 vacas y los 8 toros fueron genotipados por la empresa GeneSeek (Lincoln, NE) utilizando el producto SeekSire™ (**SS**). En primer lugar se verificó el genotipo del par madre-progenie, para luego verificar y asignar el padre. Se obtuvo el genotipo de cada individuo para los 96 marcadores que fueron utilizados para los análisis. La segunda base de datos (**BD2**) se obtuvo de 395 machos Hereford genotipados con el panel BovineSNP50 (**50K**) (Illumina, San Diego, CA), de los cuales se extrajo la información de los 120 SNP identificados para la determinación de parentesco. Los ocho toros de la primera base de datos también fueron genotipados con el panel de 50k SNP. Para poder comparar los resultados de ambos paneles, se extrajeron los genotipos utilizando el “forward strand” del reporte proveniente del software GenomeStudio de Illumina.

La información genealógica proveniente de la Asociación Rural del Uruguay (ARU) de los 395 machos y sus ancestros (2416 animales), fue utilizada para establecer diferentes grupos de animales no emparentados seleccionando animales con coeficiente de parentesco menor a 0,25 y 0,125 (**BD2-0,25**, **BD2-0,125**). Se calcularon las frecuencias alélicas, expresadas en función del alelo de menor frecuencia (**MAF**) para cada uno de los SNP en cada uno de las bases de datos de manera de calcular la probabilidad de exclusión (PE) (Cuadro 1), asumiendo fórmulas para establecer paternidad desconociendo el genotipo materno (Jamieson y Taylor, 1997). De los 120 SNP disponibles en el 50K, se seleccionaron los 96 SNP con los mayores MAF (**BD2-0,125-MAF**).

Resultados

La comparación entre el genotipado **SS** y el **50K** indica que uno de los marcadores del **SS** (DQ916057) no se encuentra en la versión actual del panel (BovineSNP50.V2) y otro marcador (DQ786764) no se traduce bien entre las dos plataformas de genotipado, siendo necesario excluirlos en pruebas de paternidad con información de ambos paneles. De los ocho toros genotipados, solo uno mostró una discordancia entre los marcadores, lo que probablemente indicaría que esa muestra corresponde a otro individuo.

Cuadro 1. Frecuencias alélicas (MAF) para diferentes bases de datos

	N	n SNP	Min	Q25	Mediana	Media	Q75	Max	PE
BD1	272	94	0,097	0,250	0,373	0,342	0,437	0,483	0,99992
BD2	395	94	0,071	0,248	0,360	0,336	0,420	0,496	0,99990
BD2-0,25	154	94	0,082	0,253	0,362	0,338	0,428	0,494	0,99991
BD2-0,125	90	94	0,074	0,259	0,362	0,338	0,418	0,494	0,99991
BD2-0,125-MAF	90	96	0,247	0,313	0,400	0,380	0,438	0,494	0,99998

Conclusiones

Los valores encontrados para las MAF y PE para ambas poblaciones indican que es posible usar dicho panel de marcadores para la identificación de paternidad, y en base a la MAF estimada en base a una población de animales no emparentados, es posible obtener un panel de SNP con mejor probabilidad de exclusión. El análisis de los 120 SNP disponibles para parentesco indica la posibilidad de mejorar la efectividad del panel actual de 96 SNP, por un aumento de la PE, al reemplazar marcadores no informativos por otros que lo son para la población Hereford. En resumen, el uso de este tipo de herramientas rápidas de identificación de parentesco y de bajo costo relativo, permiten mejorar las precisiones de las estimaciones de mérito genético de los animales y dar seguridad en la comercialización en un mercado globalizado y competitivo de la genética animal.

Agradecimientos

Agradecemos a Mario Lema, Georgget Banchemo y Sergio A. Calistro por la coordinación en la toma de muestras; Andrea Vergara, Carlos Monzalvo, Eduardo Pérez y Juan José Uzuca de INIA por la toma de muestras y extracción de ADN, y a Nicolás Grasso por sus aportes en el análisis de los datos. Agradecemos al Ing. Agr. Diego Vila y a la Sociedad de Criadores de Hereford por el apoyo al trabajo realizado.

Bibliografía

Heaton, M.P., G.P. Harhay, G.L. Bennett, R.T. Stone, W.M. Grosse, E. Casas, J.W. Keele, T.P.L. Smith, C.G. Chitko-McKown, and W.W. Laegreid. 2002. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. Beef cattle. *Mammalian Genome* 13:272–281.

Israel, C. and J.I. Weller. 2000. Effect of misidentification on genetic gain and estimation of breeding value in dairy cattle populations. *Journal of Dairy Science* 83:181-187.

Jamieson, A. and C.S. Taylor. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics* 28: 397-400.

- Matukumalli, L.K., C.T. Lawley, R.D. Schnabel, J.F. Taylor, M.F. Allan, M.P. Heaton, J. O'Connell, S.S. Moore, T.P.L. Smith, T.S. Sonstegard, and C.P. Van Tassell. 2009. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. PLoS ONE 4: e5350.
- Van Eenennaam, A.L., R.L. Weaber, D.J. Drake, M.C.T. Penedo, R.L. Quaas, D.J. Garrick, and E.J. Pollak. 2007. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. Journal of Animal Science 85: 3159–3169.
- Van Vleck, L.D. 1970. Misidentification and sire evaluation. Journal of Dairy Science 53: 1697-1702.

Nuevas herramientas moleculares para la selección en ovinos: ejemplo de caso resistencia a parásitos gastrointestinales

Grasso, A.N.^{1*}; Goldberg, V.¹; Iriarte, W.¹; Gimeno, D.²; Castells, D.²; Rincon, G.³; Navajas, E.A.⁴; Ciappesoni, C.G.¹.

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Carne y Lana, Uruguay.
² Secretariado Uruguayo de la Lana, Uruguay. ³ University of California, Davis, USA. ⁴ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Unidad de Biotecnología, Uruguay.
[*nicograsso26@gmail.com](mailto:nicograsso26@gmail.com)

Introducción

La identificación de marcadores moleculares asociados a la variación de caracteres difíciles de medir como resistencia a enfermedades, resulta especialmente útil a través de su inclusión en esquemas de selección asistida por marcadores (MAS) que facilitan la identificación de animales superiores para dichos caracteres a partir de sus genotipos, aumentando la precisión de la selección (Beuzen et al., 2000). Sin embargo, la aplicación de MAS para características complejas de determinación poligénica es limitada, por la pequeña proporción de la variación fenotípica que explican cada uno de los marcadores (Hayes y Goddard, 2007), dado el escaso número de marcadores utilizados tradicionalmente. La secuenciación de genomas de varias especies ha permitido identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP), cuya abundancia y distribución en los genomas, conjuntamente con las nuevas herramientas moleculares capaces de genotipar miles de SNP a la vez, han hecho a estos marcadores la herramienta por excelencia para los estudios de asociación y selección genómica.

Genotipado masivo de SNP y técnicas de secuenciado de próxima generación (NGS)

En el 2009, se desarrolló el OvineSNP50 Beadchip con 54.241 SNP. La aplicación más impactante de esta tecnología en el mejoramiento animal es la selección genómica, que considera esta gran cantidad de información molecular, resultando en una estimación más exacta del mérito genético en animales jóvenes y en una mayor tasa de ganancia genética en comparación con la MAS y la selección clásica (Schaeffer, 2006). Otro beneficio de estas plataformas, es la detección de regiones de ADN (> 1 kb generalmente) que varían en el número de copias (CNV) (Rincón et al., 2011). Estudios recientes han demostrado que las CNV afectan la expresión de genes y están relacionados con la susceptibilidad a numerosas enfermedades. Las nuevas tecnologías de NGS analizan secuencias de ADN de forma aleatoria a lo largo de todo un genoma. En términos generales, el ADN genómico completo es fragmentado, para luego ser secuenciados a la vez. Hasta el momento, el resultado primario de las NGS son cortas secuencias hasta 500 pares de bases, llamadas *reads*. Estas tecnologías pueden ser utilizadas para el secuenciado *de novo* de genomas o para el re-secuenciado, y su ensamblado con un genoma de referencia. En la actualidad, el mayor uso de las NGS en el estudio de caracteres complejos involucra la identificación de SNP, y su posterior asociación con el fenotipo de interés (Day-Williams y Zeggini, 2011), y la caracterización de marcadores moleculares (CNV y SNP).

Aplicación de nuevas herramientas moleculares para selección de ovinos resistentes a parásitos

Las parasitosis gastrointestinales (PGI) son un problema mundial en la producción ovina, causando graves pérdidas económicas. En nuestro país, existen estrategias para la selección de animales resistentes a PGI a través de las evaluaciones genéticas en las razas Corriedale y Merino. Los animales resistentes (R) y susceptibles (S) son determinados por la diferencia esperada en la progenie (DEP) del recuento de huevos por gramo de materia fecal (HPG). Sin embargo, este proceso es engorroso y requiere de una infección avanzada de los animales, donde ya se estarían ocasionando pérdidas, lo que conlleva a la reticencia de los productores para la toma de registros del HPG. Asimismo, los PGI están adquiriendo resistencia a los diferentes antihelmínticos empleados. Es por todo esto, que el empleo de herramientas moleculares facilitaría la identificación de animales resistentes, pudiendo así también aumentar el progreso genético. Actualmente, el proyecto "Generación de una plataforma biológico-tecnológica de referencia, para estudios de selección genómica aplicada al mejoramiento en ovinos en Uruguay: énfasis en resistencia a parásitos" está haciendo uso de herramientas moleculares de última generación. Teniendo como criterio el DEP de HPG extremas para R y S, y un coeficiente de parentesco promedio menor a 0.04, se escogieron 100 animales Merino (50S y 50R) y 98 Corriedale (44S y 54R). Estos animales pertenecen, al Núcleo Merino Fino (INIA Glencoe) y a las líneas de selección divergentes Corriedale del SUL. Mediante el genotipado de estos animales con el OvineSNP50, se realizaron estudios de caso/control efectuando regresiones lineales de cada SNP con el DEP de HPG. De esta manera, se identificaron SNP que explicaron el mayor porcentaje de la varianza fenotípica. Asimismo, se realizó un análisis para identificar CNV que difieran entre R y S. Una segunda herramienta molecular del tipo NGS, fue empleada para secuenciar el genoma completo de animales R y S de cada una de las razas en estudio. El paso a seguir consistirá en la combinación de los resultados de ambas técnicas para la identificación de un mayor número de SNP en las regiones genómicas determinadas por el OvineSNP50. Los marcadores asociados serán validados en una población de 1500 animales por raza. Cabe destacar, que los resultados de estas técnicas generan nueva información que servirá de base para la generación de nuevos proyectos en el ámbito de herramientas moleculares aplicadas al rubro ovino (por ejemplo, análisis de paternidad por SNP).

Consideraciones finales

Si bien el costo de las herramientas moleculares está decreciendo constantemente, este sigue siendo la mayor limitante para incluirlas en los programa de mejora. Es por eso, que el diseño de paneles de un número reducido de marcadores, y por ende de menor costo, es una opción valiosa a investigar para que haya una mayor adopción de estas tecnologías. Asimismo, los altos requerimientos informáticos y la formación de recursos humanos para el procesamiento de los datos son aspectos restrictivos para muchos grupos de investigación.

Bibliografía

- Beuzen, N.D., Stear, M.J. y Chang, K.C. 2000. Review: Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal* 160: 42–52.
- Hayes, B.J., y Goddard, M.E. 2007. Genomic selection for accelerated genomic gain in livestock. *Proceedings of the NZ Society of Animal Production* 67: 143-146.

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

Rincon, G., Weber, K.L., Eenennaam, L.V., Golden, B.L. y Medrano, J.F. 2011. Hot topic: performance of bovine high-density genotyping platforms in Holsteins and Jerseys. *Journal of Dairy Science* 94: 6116-6121.

Day-Williams, A.G. y Zeggini, E. 2011. The effect of next-generation sequencing technology on complex trait research. *European Journal of Clinical Investigation* 41: 561-567.

Desarrollo de una plataforma en selección genómica enfocada en el progreso genético animal

Navajas, E.A.^{1*}; Ravagnolo, O.²; Aguilar, I.³; Ciappesoni, C.G.²; Peraza, P.¹; Dalla Rizza, M.¹; Montossi, F.²

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Unidad de Biotecnología, Uruguay

² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Carne y Lana, Uruguay

³ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Programa Nacional de Leche, Uruguay

*enavajas@inia.org.uy

Introducción

La selección genómica es una herramienta para acelerar el progreso genético y potenciar resultados económicos en las cadenas de valor, la cual ya está en aplicación a nivel internacional. Esta herramienta es el resultado de la convergencia de nuevas tecnologías como la genómica y la bioinformática en combinación sinérgica con los sistemas de evaluaciones genéticas donde se armonizan desarrollos en bioestadística y genética cuantitativa. Tomando como pilares fundamentales los sistemas nacionales de evaluación genética y el banco de ADN genómico animal, se ha iniciado la generación de una plataforma en selección genómica en base a iniciativas articuladas junto al sector productivo e instituciones públicas y académicas nacionales e internacionales y empresas conexas. Se describen a continuación los alcances de la propuesta y sus componentes principales.

Oportunidades a través de la selección genómica

Si bien la selección genómica puede entenderse como una forma de selección asistida por marcadores, la inclusión y evaluación simultánea de miles de marcadores le ha dado una dimensión diferencial que representa oportunidades para aportes significativos al mejoramiento genético. Las mismas surgen de la posibilidad incluir en la predicción de valores genómicos todos los genes o segmentos de cromosoma, incluso aquellos de efecto individual reducido pero cuyas sumatoria puede ser muy relevante en explicar la variabilidad genética de una característica productiva de importancia económica. Esto es muy importante ya que la mayoría de las características son el resultado de la acción de muchos genes de efecto de magnitud menor y sólo relativamente pocas tienen genes de efecto mayor. A través de los miles de marcadores y cubriendo una mayor proporción del genoma es posible lograr mejores precisiones al estimar el valor genómico de un animal, lo cual tiene particular relevancia en el caso de caracteres que no podemos medir directamente en el animal. Esto deriva en otra oportunidad que es la de mejorar genéticamente características que no se podían considerar previamente, a pesar de su importancia para las cadenas de valor, como son rendimiento de carne de una canal, el contenido de ácidos grasos saturados en la carne o en la leche o la resistencia genética a enfermedades de herencia poligénica.

Implementación de la selección genómica

La selección genómica implica disponer de predicciones de las diferencias esperadas en la progenie (DEP o EPD, del inglés *expected progeny difference*) en base a la información que proviene de miles de marcadores (DEP/EPD genómicos). Su predicción para cualquier animal requiere de dos insumos: a) el genotipo del animal para todos los marcadores que se obtiene del genotipado de una muestra de su ADN y b) el conocimiento de la contribución de cada marcador para la característica de interés, la cual dependerá de su asociación con los genes que determinan la característica. El genotipado es realizado principalmente por empresas especializadas a nivel mundial en brindar este servicio. El segundo insumo requiere de la conformación de poblaciones de entrenamiento o de referencia

integrada por volúmenes significativos de datos de las características de interés y del ADN de los animales respectivos.

La posibilidad de generar DEP/EPD genómicos nacionales depende de la capacidad de generar poblaciones de entrenamiento en el país. Es importante también considerar la importancia de la integración de esta información en los sistemas nacionales de evaluación genética en los cuales es factible integrar el componente genómico y así generar un DEP/EPD mejorado con mayor precisión. Esta mayor precisión, que además puede ser alcanzada a una edad más temprana del animal, está asociada a mayores tasas de progreso genético.

Desafíos de la selección genómica

Las oportunidades para el mejoramiento genético dadas por la posibilidad de contar con miles de marcadores también implican desafíos desde el punto de vista bioinformático tanto para el almacenamiento de datos y manejo de la información, como del análisis estadístico y predicción de DEP/EPD genómicos y mejorados. Estos desafíos no son específicos del Uruguay, sino una realidad existente en el mundo en casi todas las áreas de las “ómicas” y para los cuales existen alternativas y desarrollos científicos continuos. Podemos considerar desafíos a nivel país el profundizar la vinculación científica con el mundo a través del desarrollo de alianzas estratégicas con organismo de I+D+i que faciliten la actualización constante sobre los avances científicos significativos. Estas alianzas son clave para el fortalecimiento de la formación de técnicos e investigadores que puedan ser los interlocutores con el mundo y responsables de la I+D+i en el Uruguay.

Otro desafío muy significativo para la implementación de la selección genómica es la generación de las poblaciones de entrenamiento que permitan contar con DEP/EPD genómicos para las características de valor estratégico por su importancia económica en los sistemas de producción nacionales, la capacidad de diferenciar los productos pecuarios es un contexto internacional (de especial significado para un país orientado a la exportación de carnes), el mejoramiento del posicionamiento de la genética nacional y/o el impacto favorable en el medio ambiente. El país cuenta con infraestructura y procedimientos ya en marcha que permiten pensar en generar poblaciones de entrenamiento casi únicas en el mundo para características estratégicas. Un claro ejemplo en este sentido es la articulación trazabilidad-cajas negras-genómica-evaluación genética de manera de maximizar la mejora genética de la calidad de las canales que se producen. No menos importante es el potencial de las bases de datos existentes a nivel lechero, como de los sistemas de registros de enfermedades a través de los programas sanitarios y de vigilancia epidemiológica. La propuesta es trabajar en forma conjunta con las instituciones nacionales para lograr un potenciamiento recíproco de iniciativas valiosas para todos los actores de las cadenas de valor.

Desarrollo de una plataforma en selección genómica animal

La plataforma es un espacio de articulación de múltiples actores y en el cual convergen múltiples disciplinas con los objetivos de investigar, desarrollar e implementar la selección genómica integrada a los sistemas de evaluación genética en forma sustentable. Dicha articulación incluye vínculos y flujo de información ya existentes entre las sociedades de criadores e instituciones académicas que realizan las evaluaciones y la incorporación del banco de ADN genómico como otros de los pilares estratégicos de la plataforma. La generación de las poblaciones de entrenamiento es posible a través de la participación de los actores ya mencionados y la colaboración de nuevos socios de los sectores público y privado. El fortalecimiento de las capacidades bioinformáticas y la formación de los recursos humanos, son junto a las poblaciones de entrenamiento algunos de los componentes fundamentales a esta plataforma. En síntesis, la generación de la plataforma en selección genómica busca dar respuesta y resolver los desafíos con el objetivo de integrar las oportunidades que la selección genómica

representa en el mejoramiento genético animal como contribución al fortalecimiento de la competitividad de las cadenas de valor pecuarias.

Algunas enfermedades hereditarias de los bovinos en Uruguay: ¿Qué nos enseñan la Osteopetrosis, el MSUD, la Cardiomiopatía de pelo crespo y la Epidermolisis bullosa?

Dr. Fernando Dutra (DMVet., MSc-Pathol., MSc-Patol., FRVCSweden)

DILAVE Miguel C Rubino, Laboratorio Regional Este, Avelino Miranda 2045, Treinta y Tres, Uruguay, fdutra@mgap.gub.uy

Las enfermedades hereditarias son una causa de preocupación creciente en todo el mundo. Los métodos modernos de mejoramiento genético en bovinos se basan cada vez más en tecnologías reproductivas tales como la inseminación artificial, la ovulación múltiple, fertilización *in vitro* de embriones, transferencia de embriones y un creciente comercio internacional de germoplasma de toros y vacas de élite. Esto ha permitido propagar rápidamente en todo el mundo características productivas económicamente valiosas de unos pocos animales selectos. Pero como todo individuo es portador de algún gen recesivo defectuoso, -y estos pueden difundirse en la población durante años o décadas antes de expresarse-, el progreso genético ha ido acompañado en numerosos países de la aparición con alta incidencia de enfermedades genéticas letales, con gran impacto en la fertilidad de los rodeos y la salud animal. Uruguay no es ajeno a esto, ya que numerosas enfermedades hereditarias se han detectado en el país en los últimos años (Kelly y col. 2012).

Una lista de malformaciones congénitas letales diagnosticadas por nuestro laboratorio en la zona Este de Uruguay, una zona esencialmente criadora, se muestra en la Tabla 1. Las mismas ocurren en todas las razas, pero es característico que algunos defectos se asocien estrechamente con determinadas razas o líneas dentro de cada raza. La mayoría se han detectado en la raza Hereford y Polled Hereford, pero el número de casos observados está estadísticamente dentro de lo esperado teniendo en cuenta que esta es la raza mayoritaria del país. En la zona Este al menos, la raza Aberdeen Angus y Red Angus parecen estar sobrerrepresentadas en cuanto a la incidencia de problemas congénitos.

Las enfermedades más importantes son la Osteopetrosis Letal Congénita en la raza Red Angus y Aberdeen Angus negro ([OMIA 000755](#), Gen: SLC4A2), el Edema Neuroaxial Congénito o Maple Syrup Urine Disease (MSUD) en la raza Polled Hereford, Hereford y Shorthorn ([OMIA 000627](#), Gen: BCKDHA), la Epidermolisis Bullosa Simplex en la raza Hereford ([OMIA 000340](#), Gen: KRT5) y la Cardiomiopatía asociada al pelaje crespo en la raza Polled Hereford u Hereford ([OMIA 000161](#), Gen: PPP1R13L). Todas son enfermedades monogénicas, autosómicas recesivas, letales, que se expresan *in utero* o poco después de nacer, con un impacto directo en los índices reproductivos. Las mismas ocurren en cabañas y en rodeos de cría comerciales que manejan razas

puras o casi puras y que compran toros en distintas cabañas nacionales. Es típico que los casos aparezcan luego de la compra de algún toro en particular. La incidencia promedio (terneros afectados / vacas paridas) es de 5.0% para la Cardiomiopatía, 6.9% para la Osteopetrosis, 8.8% para la Epidermolisis bullosa y 15.5% para el MSUD. Aunque los datos se basan en pocos brotes, esta alta incidencia revela que la proporción de vacas portadoras asintomáticas en algunos rodeos es alta y que las mutaciones pueden estar difundidas en el país.

Se concluye que el conjunto de enfermedades hereditarias pueden ser una causa significativa de pérdidas reproductivas en nuestro país. Es necesario desarrollar métodos de diagnóstico genéticos apropiados y que se investigue la incidencia y difusión de los genes involucrados.

Malformaciones congénitas	Sistema afectado	OMIA	Raza/s
Hidrocéfalo interno	Nervioso	000489	Polled Hereford, Hereford
Semialopecía congénita	Piel	000541	Polled Hereford
Anencefalia / Craniosquisis	Nervioso	000044	Hereford
Espina bífida	Nervioso	000933	Holando
MSUD	Nervioso	000627	Polled Hereford, Shorthorn
Artrogriposis	Esquelético	000069	Varias
Epidermolisis bullosa simplex	Piel	000340	Hereford
Diplopagus / Diprosopus	Esquelético	000290	Varias
Braquignatia superior y artropatía	Esquelético	000150	A. Angus
Cardiomiopatía asociada al pelo crespo	Cardiovascular/Piel	000161	P. Hereford
Neurofibromatosis cutánea	Nervioso	000716	A. Angus (Red Angus)
Osteopetrosis letal hereditaria	Esquelético	000755	A. Angus (Red Angus)
Fibrosis hepática congénita	Hígado	000454	Red Angus

Tabla 1. Enfermedades congénitas y hereditarias de bovinos diagnosticadas en el Laboratorio Regional Este. Se indica el número fenotípico de la condición en OMIA (Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA. Faculty of Veterinary Science, University of Sydney, 14/10/2012. World Wide Web URL: <http://omia.angis.org.au/>)

Referencias

Kelly, L.; Dutra, F.; Llambí, S. Rivero, R.; Moraes, J.,Trenchi, G.; D' Agosto, S. Peraza, P.; Ravagnolo, O.; Dalla Rizza, M. (2012). Diagnóstico de enfermedades hereditarias bovinas en el Uruguay mediante técnicas moleculares. Veterinaria Uruguay, en prensa.

Generación y caracterización de híbridos interespecíficos de

L.uliginosus x *L. corniculatus*.

Castillo^{a*}, A.; Rebuffo M.^b; Dalla Rizza M.^a; García C.^c y Folle G.^d; Santiñaque, F.^d; Borsani O.^e Monza J.^e

^{a*} INIA, Unidad de Biotecnología.

^b INIA La Estanzuela, Programa de Pasturas y Forrajes.

^c INIA Las Brujas, Sección Suelos y Riego.

^d IIBCE, Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo (SECIF).

^e Facultad de Agronomía, Departamento de Biología Vegetal Laboratorio de Bioquímica, UdelaR.

Lotus uliginosus(4x) y *L. corniculatus*(4x) son leguminosas con alto valor agronómico, que se incorporan a las praderas, conformando pasturas mejoradas para aumentar la calidad del forraje en sistemas ganaderos, agrícola-ganaderos y lecheros. La productividad de estas especies está limitada por la falta temporal de agua que afecta la germinación, el establecimiento de las plántulas, y el crecimiento y producción de semilla. *L.corniculatus* y *L.uliginosus*, presentan diferentes estrategias de crecimiento y desarrollo tanto a nivel del sistema radicular como de la parte aérea. En este trabajo se generaron híbridos interespecíficos que permitirían la obtención de plantas que recombinen los mecanismos adaptativos presentes en las especies parentales y la generación de variabilidad genética que puede resultar de interés para los programas de mejoramiento de lotus. Los híbridos se obtuvieron mediante rescate de embriones, para lo que fue determinante el precultivo *in vitro* que permitió el desarrollo de los embriones hasta estados que permitieron la regeneración de plantas. La identificación de los híbridos se realizó mediante citometría de flujo y con marcadores moleculares que permitieron diferenciarlos de los padres.

Las respuestas fisiológicas y bioquímicas de los híbridos respecto a los parentales en condición de estrés se establecieron a través de diferentes criterios. La pérdida de agua por los folíolos no presentó diferencia significativa entre las especies parentales y los híbridos. Para evaluar la emisión de fluorescencia y cuantificar prolina se definieron cuatro tratamientos, con tres repeticiones; los tratamientos fueron: T1 (control con riego a capacidad de campo), T2 (suspensión del riego, estrés hídrico), T3 (plantas permanecieron 4h a 40°C con riego, estrés térmico) y T4 (plantas permanecieron 4h a 40°C sin riego). La emisión de fluorescencia, permitió monitorear el estado funcional del fotosistema II (PSII), indicó que *L.uliginosus* fue el más afectado cuando el estrés hídrico se combinó con altas temperaturas. En esta especie la relación Fv/Fm descendió hasta 0.71, lo que indica daño del PSII, mientras en *L.corniculatus* esta relación no varió respecto al control (0.86). Los híbridos mostraron un comportamiento intermedio entre los parentales, con valores situados entre 0.77 y 0.83. En cuanto a la respuesta a estrés hídrico a nivel celular mediada por la acumulación de un osmolito compatible como la prolina, la acumulación de ésta se incrementó 6 veces en *L.corniculatus* y en Lu se incrementó menos del doble respecto al control. En los híbridos la respuesta fue similar a la obtenida en *L.corniculatus*, con acumulación de prolina incrementada unas 5 veces en situación de estrés.

Una de las funciones asignadas a la prolina en situación de estrés es la de defensa antioxidante y la menor acumulación de prolina en Lu. podría estar relacionada al mayor daño del PSII. La eficiencia en el uso del agua estimada por el método gravimétrico, no presentó diferencias significativas, sin embargo cuando ésta fue estimada por la discriminación isotópica del carbono, en situación de estrés se observaron diferencias significativas entre las especies parentales. Los híbridos evaluados, tuvieron una discriminación isotópica intermedia entre ellos.

Se midió el crecimiento radicular en condiciones de estrés osmótico en el laboratorio utilizando PEG 8000 y se pudo establecer diferencias significativas en entre todos los genotipos. *L. corniculatus*, presentó el mayor incremento radicular a potenciales menores, los híbridos presentaron valores intermedios y *L. uliginosus*, fue el que creció menos. Las plantas F₂ se instalaron a campo con distinta disponibilidad de agua, cuando ésta no es limitante, la biomasa producida por los parentales y el híbrido, no manifestó diferencias significativas, en cambio en condición de 25% de la evapotranspiración potencial, el híbrido produce significativamente, más biomasa que los parentales. Además el 60% de los híbridos desarrolló rizomas.

Ajuste, diseño e implementación de predicciones genómicas al programa de mejoramiento genético de trigo

Bettina Lado¹, Silvia German¹, Paula Silva¹, Martin Quincke¹, Daniel Vazquez¹, Marina Castro¹, Alejandro del Pozo², Ivan Matus³, Luis Inostroza³, Jarislav von Zitzewitz¹.

(1) Programa Nacional de Investigación Cultivos de Secano, Instituto de investigación Agropecuaria, Est. Exp. La Estanzuela, Colonia 70000, Uruguay

(2) Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Casilla 747, Talca, Chile

(3) Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile

En el mejoramiento de cultivos, el interés de predecir comportamientos fenotípicos en el campo ha aumentado debido a los recientes avances en las tecnologías de análisis molecular. Por medio de tres proyectos, dos de financiación externa y uno INIA, estamos ajustando la implementación de la selección genómica al programa de mejoramiento de trigo de INIA “La Estanzuela”. En esta jornada estamos presentando los resultados de un proyecto del Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria (FONTAGRO) – 8038, titulado: “Aumento de la competitividad de los sistemas productivos de papa y trigo en Sudamérica ante el cambio climático”. Este proyecto permitió la aplicación de "Genotipado por Secuenciación" (GBS), un método desarrollado recientemente para la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), en el genoma de 384 genotipos de trigo (*Triticum aestivum*). GBS integra la construcción, la secuenciación y la identificación de polimorfismos de librerías genómicas en el menor número de pasos posibles. Es un método simple, de bajo costo y de aplicación directa a germoplasma experimental de programas de mejoramiento de cultivos. El ADN genómico de cada genotipo fue re-secuenciado para posteriormente realizar la identificación de SNPs a través de dos métodos diferentes de análisis bioinformáticos. Estos métodos alinean los fragmentos de ADN de las muestras secuenciadas entre sí o contra un genoma parcial de trigo como referencia para identificar SNPs. Se encontraron mejores resultados con el método que alinea los fragmentos de ADN re-secuenciados entre sí, siendo esta la opción a utilizar en todos los análisis posteriores. 28.199 SNPs fueron identificados en 382 muestras de trigo. Estos SNPs se utilizaron para predecir un fenotipo de baja heredabilidad (rendimiento) y un fenotipo altamente heredable (peso de mil granos). Estas características fenotípicas fueron evaluadas en dos ensayos con diferentes condiciones: bajo riego y bajo secano. Esto permitió la comparación de las predicciones genómicas con datos reales mediante la realización de validaciones cruzadas. Los datos fenotípicos mostraron variación espacial. Diferentes modelos fueron probados para corregir la tendencia encontrada en el campo. El modelo que mejor se ajustó a los datos incluyó medias móviles como covariable. La correlación de las predicciones con rendimiento ajustados para el diseño de bloques incompletos, fue de 0,354 y 0,311, y con ajuste espacial fue de 0,396 y 0,357 bajo riego y condiciones de secano, respectivamente. Para peso de mil granos, las correlaciones fueron de 0,751 y 0,748 ajustados para el diseño de campo y 0,787 y 0,799 con ajuste espacial con riego y secano respectivamente (Tabla 1). Se esperan resultados de un año más de evaluación en más ambientes y de más características agronómicas y fisiológicas.

Tabla1. Se muestran las correlaciones entre las predicciones y los valores ajustados, para rendimiento y peso de mil granos, con los 4 modelos planteados y para las medias sin ajustar. RR= Ridge Regression, GAUSS= Gaussean.

Modelo		Rend.Riego	P1000 Riego	Rend.SRsec	P1000g SRsec
Sin ajustar	RR	0.174±0.057	0.794±0.022	0.129±0.051	0.752±0.023
	GAUSS	0.337±0.090	0.794±0.022	0.285±0.108	0.754±0.025
FC	RR	0.221±0.061		0.171±0.068	
	GAUSS	0.341±0.084		0.315±0.092	
BI	RR	0.223±0.066	0.751±0.023	0.163±0.057	0.745±0.026
	GAUSS	0.354±0.084	0.751±0.031	0.311±0.082	0.748±0.027
BCA_MVNG	RR	0.251±0.065	0.752±0.022	0.198±0.063	0.764±0.019
	GAUSS	0.367±0.079	0.753±0.023	0.329±0.090	0.764±0.021
MVNG	RR	0.278±0.068	0.787±0.019	0.216±0.065	0.799±0.021
	GAUSS	0.396±0.070	0.787±0.020	0.357±0.084	0.799±0.02

Los otros dos proyectos son de un fondo ANII-INNOVAGRO, “Introduciendo nuevas herramientas para el mejoramiento genético por resistencia durable a roya de la hoja de trigo” y el otro de un proyecto INIA-L2, “Ajuste, diseño e implementación de selección genómica al programa de mejoramiento genético de trigo”. Recientemente se obtuvieron resultados de GBS para estos dos proyectos que permitieron analizar los tres proyectos en conjunto, así obteniendo una mejor cobertura de secuenciación y de genotipos (Figura 1). En conjunto los tres proyectos componen 1500 genotipos de trigo y en total se identificaron 111.765 SNPs polimórficos. Estos proyectos permitirán ajustar modelos de predicción más eficientes para características de importancia para el programa de mejoramiento genético de trigo del INIA.

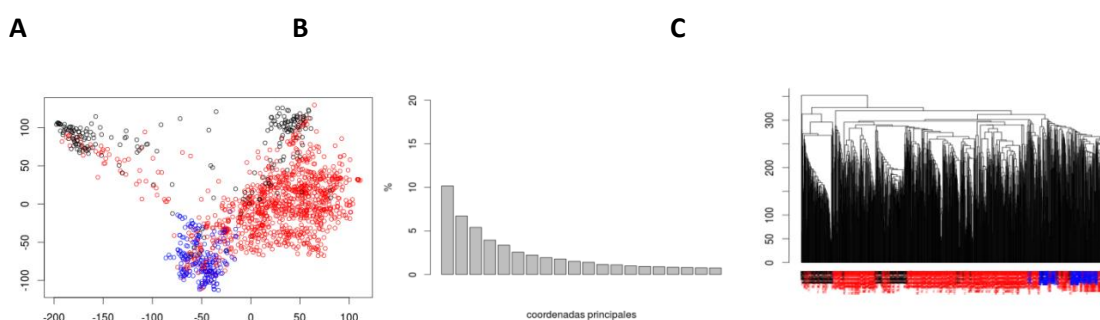


Figura 1. Estudio de la estructura poblacional del germoplasma de trigo de INIA secuenciado por medio de GBS hasta el momento. En el análisis PCOA (A) se observa el germoplasma de INIA (Rojo- proyecto FONTAGRO y INIA-L2, y Negro- INNOVAGRO) y el germoplasma de INIA-Chile (Azul-FONTAGRO), donde las dos primeras coordenadas del análisis de PCOA explican aproximadamente el 17% de la varianza total (B). El análisis de distancias euclidiana con un dendrograma UPGMA muestra resultados muy parecidos (C).

La Biotecnología en el campo: el ejemplo del arroz

Victoria Bonnacarrère^{1*}, Juan Rosas^{2*}, Manuel Diez¹, Alicia Castillo¹, Silvia Garaycochea¹, Sebastián Martínez², Fernando Perez de Vida², Nestor Saldain², Pedro Blanco².

¹ INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología

² INIA Treinta y Tres

*Ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo presentado

En los últimos años el Programa Nacional de Arroz y en particular el Proyecto de Mejoramiento Genético de Arroz, han utilizado diferentes técnicas biotecnológicas, como herramientas para apoyar el mejoramiento genético; así como otros proyectos de investigación vinculados al manejo y a la fitopatología del cultivo. Esta implementación concreta de la biotecnología, se ha logrado gracias a una estrecha vinculación y coordinación del Programa y de la Unidad de Biotecnología. El objetivo de este trabajo es describir resumidamente las principales actividades de investigación que se han realizado.

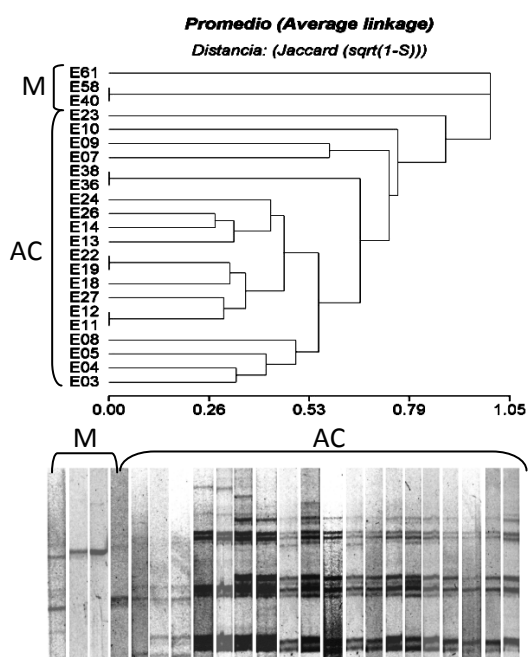
1. Incorporación de Genes de Resistencia a *Pyricularia oryzae* en El Paso 144 e INIA Olimar

Actualmente, una de los principales problemas del cultivo de arroz en Uruguay, es la enfermedad conocida como Brusone, la cual es causada por el hongo patógeno *Pyricularia oryzae*. Es por ello que el Programa de Mejoramiento de Arroz se ha propuesto como objetivo mejorar la resistencia a brusone de los cultivares *indica* más sembrados, El Paso 144 e INIA Olimar, sin modificar sus características agronómicas. Para ello se está llevando a cabo un programa de retrocruzamientos (RC) que involucra la incorporación de los genes Pi2 y Pi33 (previamente identificados como genes de resistencia para la población de *P. oryzae* presente en Uruguay) asistido por marcadores moleculares. Este sistema de RC se complementa con obtención de plantas Doble-haploides (DH) para fijar caracteres en una generación.

Los RC comenzaron en la zafra 2006/2007 donde se cruzó el donante (portador de los genes Pi2 y Pi33) con El Paso 144 e INIA Olimar. En las zafras sucesivas se hicieron las RC con El Paso 144 e INIA Olimar. A partir de la zafra 2008/2009 se comenzó la selección asistida por marcadores. Como marcadores se utilizaron microsatélites o SSR, localizados en regiones flanqueantes a los genes a incorporar. En la zafra pasada, además de la selección asistida por SSR, se generaron plantas DH por cultivos de anteras. Actualmente se cuenta con una línea DH denominada, 781-16 portadora del gen Pi2 y una línea DH 782-04, con inserciones de posible interés. Además, se generaron 3 líneas segregantes: una con aproximadamente 80 % similitud con INIA Olimar y portadora del gen Pi2, una con aprox. 85 % similitud con El Paso 144 y portadora del gen Pi-2 y una con aprox. 70 % similitud con El Paso 144 y portadora de los genes Pi2 y Pi33.

2. Caracterización de la Población de *Pyricularia oryzae* en Uruguay

La variabilidad genética del patógeno *P. oryzae* se relaciona con su capacidad para quebrar resistencias en el cultivo. En este trabajo se estudió la variabilidad del patógeno utilizando marcadores moleculares conocidos como Pot2 rep-PCR. La región Pot2 es uno de los muchos transposones que tiene *P. oryzae*. El objetivo de este trabajo fue la determinación de la estructura actual de la población del patógeno a partir de aislamientos de arroz y malezas y la adopción de estas metodologías para el monitoreo anual en laboratorio regional de INIA Treinta y Tres.



Se obtuvieron 23 aislamientos de diferentes cultivares (AC) de la región Este en las zafas 2010-11 y 2011-12 y 3 aislamientos obtenidos de malezas (M). Se cultivaron en placas para la obtención de micelio, a partir del cual se extrajo ADN, se amplificaron las regiones Pot2 y se agruparon según similitud genética (distancia Jaccard), utilizando el programa infoGen.

De la Figura se concluye que: la estructura poblacional es homogénea, no se identifican linajes específicos de tipo de cultivar ni variación entre zafas, se diferencian aislamientos de malezas y del cultivo. Además, se ajustaron las metodologías para monitoreo rutinario de la población de *P. oryzae*.

3. Identificación de marcadores para tolerancia a frío en etapas vegetativas tempranas

Las bajas temperaturas son el principal factor abiótico que afecta el cultivo de arroz en Uruguay, particularmente durante la etapa vegetativa temprana y los estadios reproductivos. En el primer caso, el frío disminuye la germinación, produce amarillamiento de las hojas y ralentización del crecimiento, generando problemas de establecimiento del cultivo. Uno de los objetivos del programa de mejoramiento es seleccionar genotipos tolerantes, en plántulas, a las bajas temperaturas, por lo que la identificación de marcadores moleculares asociados a dicha característica es fundamental para llevar a cabo el mejoramiento asistido. En este trabajo se utilizó un enfoque de genes candidatos para la búsqueda de marcadores SSR (del inglés, Simple Sequence Repeat) asociados a la tolerancia al frío. Se identificaron genes

candidatos reportados (validados en trabajos previos) y por medio de herramientas bioinformáticas de búsqueda en bases de datos de ESTs (del inglés, Expressed Sequence Tag). Luego se identificaron aquellos que presentaban SSR en su secuencia (SSR génicos). Estos SSR fueron amplificados en 134 genotipos de arroz (población elite del programa de mejoramiento) para obtener la información genotípica. Se evaluaron tres indicadores fenotípicos asociados a la tolerancia al frío: emisión de fluorescencia de clorofila (fotoinhibición), apreciación visual del daño e integridad de membrana. Las pruebas de asociación fueron realizadas con modelos lineales mixtos en TASSEL 2.1 teniendo en cuenta la estructura de la población (Q) y el parentesco (K). Se encontraron 4 SSR génicos asociados a los fenotipos analizados.

4. Identificación de marcadores para rendimiento y enfermedades del tallo: Proyecto Mapeo Asociativo

Considerando la importancia de los marcadores en los nuevos modelos de mejoramiento vegetal, el Programa de Arroz apostó en el último plan estratégico de INIA a financiar un proyecto cuyo objetivo es la identificación de un gran número de marcadores asociados a las principales características que son objeto de mejoramiento: rendimiento, resistencia a enfermedades de tallo y calidad culinaria e industrial.

Este proyecto se denomina Mapeo Asociativo en Arroz. El mapeo asociativo es una metodología que permite asociar marcadores distribuidos por todo el genoma con las características fenotípicas de interés. Para ello se están determinando marcadores del tipo SNP (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism) utilizando la metodología de “Genotipado por Secuenciación” o GBS (del inglés, Genotyping by Sequencing). La población de mapeo involucra 650 líneas de arroz que forman parte de la población en evaluación del programa de mejoramiento.

5. Validación de una herramienta bioquímica para la identificación de malezas resistentes a inhibidores de la enzima ALS en el arroz

Una de las limitantes del cultivo de arroz es la existencia de malezas como arroz rojo o arroz maleza (AM). El AM es de la misma especie que el arroz cultivado (*Oryza sativa*) lo cual dificulta su control con herbicidas. Una respuesta comercial a este problema es el Sistema de Producción de Arroz Clearfield®, de reciente adopción en Uruguay. Esta tecnología combina el uso de herbicidas imidazolinonas (IMI) con variedades de arroz cultivado portadoras de una mutación puntual en la enzima acetolactato sintasa (ALS) que les otorga resistencia al herbicida: arroz resistente a IMI (ARI).

Los herbicidas inhibidores de la ALS cuando son aplicados de manera frecuente seleccionan rápidamente biotipos resistentes de la maleza. En Uruguay han sido aplicados una gran cantidad de IMI por lo que las poblaciones de malezas han sido sometidas a una fuerte selección en contra de los individuos susceptibles a estos herbicidas. En el arroz maleza, se han

descripto diversas mutaciones que disminuyen la afinidad de la interacción ALS:herbicida por medio de una sustitución aminoacídica, sin provocar la pérdida de actividad catalítica. Por otro lado, recientemente se ha detectado por primera vez en el país una planta de *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv (capin) que sobrevivió la aplicación de IMI, luego de utilizada la tecnología Clearfield. El capín es una de las cinco malezas más problemáticas del arroz debido a su rápido crecimiento y su gran habilidad competitiva

El objetivo general de este trabajo es contar en el país con una herramienta bioquímica que permita detectar rápidamente biotipos resistentes a los inhibidores de ALS de manera de definir un plan de manejo racional de las malezas en el arrozal. Para ello se ajustó una metodología de determinación de actividad de la enzima ALS en arroces Clearfield®, se determinaron las curvas de dosis respuesta para cada combinación herbicida inhibidores de ALS/variedad de arroz Clearfield®, se ajustaron los modelos no lineales correspondientes utilizando el paquete R. Este procedimiento también fue realizado para capin. En este trabajo se demostró una respuesta diferencial de las malezas a los herbicidas analizados, comprobando la diferencia en la actividad.

“El BiotecSojaSur: el laboratorio de la soja del Mercosur”.

Resumen: la charla sobre el BiotecSojaSur muestra la conformación, el funcionamiento y los resultados de un consorcio constituido por 14 instituciones de los 4 países originales del Mercosur, entre las cuales hay 2 empresas privadas, que posteriormente evolucionó hacia un verdadero laboratorio en red, perfectamente programado y articulado. Este laboratorio mediante un trabajo coordinado y sinérgico que implica innumerable cantidad de acciones reticulares, está llevando a cabo investigación científica y tecnológica tendiente a que la región no sólo lidere mundialmente la producción de soja, sino también el desarrollo biotecnológico integral que subyace y hace posible esta importante agroindustria, contribuyendo a incrementar cada vez más su sostenibilidad ambiental, económica y social.

Evaluación de un panel de marcadores en genes candidatos de vías metabólicas en engorde de novillos Hereford

Branda Sica, A.^{1*}; Ravagnolo, O.²; Brito, G.²; Baldi, F.²; LaManna, A.²; Banchemo, G.²; Navajas, E.A.¹; Montossi, F.²; Rincón, G.³

¹ Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Unidad de Biotecnología, Uruguay. ² Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Programa Nacional de Carne y Lana, Uruguay. ³ Departamento de Ciencia Animal, Universidad de California, Davis, USA. *Correo electrónico: abranda@inia.org.uy

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue realizar una evaluación de validación de un panel de marcadores SNP seleccionados de genes candidatos, relacionados al eje endócrino que regulan la hormona de crecimiento GH/IGF1, y con la formación y desaturación de ácidos grasos SCD/SREBP1, con características de composición de carcasa, calidad de carne y perfil de ácidos grasos de la grasa intramuscular en novillos Hereford.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon 237 novillos Hereford que fueron engordados a 8 diferentes tratamientos de alimentación durante la etapa de recría y engorde intensivo, del experimento de F. Baldi *et al.* (2010). Estos novillos provenían de un solo origen y estuvieron sujetos a condiciones experimentales desde el post-destete hasta el momento de la faena y cuentan con toda la información recolectada en el transcurso del ensayo. Se ajustaron las variables por el efecto de los 8 tratamientos nutricionales y se calcularon los valores residuales para los análisis de asociación (*HelixTree* SVS) con los marcadores SNP. El genotipado fue llevado a cabo utilizando la plataforma *Sequenom MassARRAY®*, en *GeneSeek* Inc. (Lincoln, NE, USA). Se determinaron los genotipos en estos novillos utilizando un panel de 58 *tag*-SNP en los genes GHR (receptor de la hormona de crecimiento), IGF1 (factor de crecimiento para la insulina), IGFBP6 (proteína 6 de enlace del IGF), PMCH (hormona concentradora de pro-melanina), SOCS2 (supresor de las citoquinas 2), STAT6 (transductor de señal y activador de transcripción 6), SCD1 (delta-9-desaturasa 1), SCD5 (delta-9-desaturasa 5), SREBP1 (proteína 1 de unión al elemento regulador del estero), SCAP (clivaje de activación por la proteína SREBP), INSIG1 (proteína 1 inducida por la insulina), INSIG2 (proteína 2 inducida por la insulina), MBTPS1 (peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 1), MBTPS2 (peptidasa del factor de transcripción de membrana, sitio 2) y SRPR (receptor de reconocimiento de señal de partículas –proteína de acoplamiento) que fue desarrollado previamente por Rincón *et al.* (2009, 2012).

RESULTADOS

De los 36 SNP polimórficos quedaron 12 que pueden ser de interés para determinar el nivel de significancia y conocer el efecto sobre de las variables, de los cuales 8 en los genes STAT6, INSIG2, GHR, SCD5, SCD1, PMCH, INSIG1 y SCAP estuvieron asociados significativamente con marmoleado (MARBL), área de ojo de bife (AOB), terneza medida luego de 21 días de maduración (Terneza21d), porcentaje de ácidos grasos saturados y poli-insaturados (SFA, PUFA, OMEGA36) (Tabla I). Los efectos de los genotipos con los marcadores para las características se muestran en la tabla II. Serían necesarios otros estudios adicionales para confirmar sus efectos en estas características. Sin embargo, este trabajo nos permitió describir el comportamiento de los diferentes marcadores que fueron informativos para Hereford en nuestras condiciones.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Baldi, F., Banchemo, G., LaManna, A., Fernández, E. y Pérez, E. 2010. Efecto del manejo nutricional post-destete y durante el período de terminación sobre las características de crecimiento y eficiencia de conversión en sistemas de recría y engorde intensivo. Producción de Carne desde una Invernada de Precisión. Serie Actividades de Difusión N°609, INIA.
- Rincón, G., Farber, E.A., Farber, C.R., Nkrumah, J.D. and Medrano, J.F. 2009. Polymorphisms in the STAT6 gene and their association with carcass traits in feedlot cattle. *Anim. Genet.* 40: 878-882.
- Rincón, G., Islas-Trejo, A., Castillo, A.R., Bauman, D.E., German, B.J. and Medrano, J.F. 2012. Polymorphisms in gene in the SREBP-1 signalling and SCD are associated with milk fatty acid composition in Holstein cattle. *Journal of Dairy Research* 79: 66-75.

TABLA I. ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE LOS MARCADORES Y LAS CARACTERÍSTICAS EN ENGORDE DE NOVILLOS HEREFORD.

Característica	Marcador (Gen/UCD ID) ¹	Significancia de ESA (p)	Efecto de Sustitución Alélica (ESA)	Call Rate	Alelo Menor	MAF	HWE P	DD	Dd	dd
SFA	SCD1 15001	0,019	0,737	0,99	G	0,303	0,848	20	88	103
SFA	SCAP 35941	0,038	0,861	0,99	C	0,229	0,740	12	73	126
PUFA	SCD1 15001	0,003	-0,842	0,99	G	0,303	0,848	20	88	103
PUFA	SCD5 173914	0,037	-0,564	1	T	0,488	0,133	56	95	61
OMEGA36	PMCH 867	0,026	0,029	0,82	T	0,371	0,355	27	76	72
OMEGA36	INSIG1 599	0,038	0,045	0,96	A	0,259	0,535	12	82	111
MARBL	INSIG2 93277	0,014	-27,850	0,97	A	0,403	0,840	36	103	78
MARBL	GHR 125351	0,021	-21,392	0,98	G	0,354	0,447	30	95	94
Terneza21d	SCD5 173914	0,024	-0,223	1	T	0,489	0,228	57	101	62
AOB	STAT6 14636	0,024	2,255	0,99	C	0,411	0,622	39	103	78

TABLA II. EFECTOS Y MEDIAS DEPENDIENTES DE LOS GENOTIPOS CON LOS MARCADORES PARA LAS CARACTERÍSTICAS EN ENGORDE DE NOVILLOS HEREFORD.

Marcador (Gen/UCD ID) ¹	Característica	n	Medias dependientes de Genotipos			Efecto de Sustitución Alélica (ESA)
			GG	GA	AA	
SCD1 15001	PUFA (%)	211	0,38	-0,25	0,16	-0,84
	SFA (%)		0,18	0,34	-0,31	
SCD5 173914	PUFA (%)	212	TT -0,28	TC 0,02	CC 0,28	-0,56
	Terneza21d (Kg)	220	-0,13	0,07	0,07	-0,22
SCAP 35941	SFA (%)	211	CC 0,26	CT 0,04	TT -0,04	0,86
PMCH 867	OMEGA36 (%)	175	TT 0,05	TA -0,01	AA -0,01	0,03
INSIG1 599	OMEGA36 (%)	205	AA 0,09	AT -0,01	TT -0,003	0,05
INSIG2 93277	MARBL (escala USDA)	217	AA -8,04	AC -0,45	CC 3,92	-27,85
GHR 125351	MARBL (escala USDA)	219	GG -26,88	GA -5,86	AA 14,05	-21,39
STAT6 14636	AOB (cm ²)	220	CC 0,50	CG -0,13	GG -0,37	2,26

¹El marcador designado es el gen seguido con el número de identificación implementado por el laboratorio de la Universidad Davis, California (Rincón *et al.*, 2009, 2012).

Estudio evolutivo del origen del arroz maleza de Uruguay

S. Garaycochea¹, F. Capdevielle, F. Álvarez - Valín².

1 - Unidad de Biotecnología de INIA; 2 - Sección de Biomatemática, Facultad de Ciencias, UdelaR.

El “arroz rojo” es una de las malezas que más perjudican el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Se denomina bajo este nombre genérico una serie de biotipos de arroz salvaje muy emparentados con el arroz cultivado, cuya principal característica distintiva es la de poseer pericarpio de color rojizo, negro o marrón. El esclarecimiento del origen del arroz tipo maleza es aún complejo, los procesos principales que podrían estar involucrados son: Pre – adaptación, evolución e introgresión. En este trabajo se planteó el estudio el origen evolutivo de arroz maleza de Uruguay a través de aproximaciones de genómica evolutiva/comparativa y se buscó la generación de nuevas herramientas que puedan contribuir al abordaje del problema arroz maleza en Uruguay conociendo la diversidad existente y su dinámica poblacional.

A partir de la secuenciación de 1/4 de placa de 454/Roche se obtuvo 96 Mb de secuencias del biotipos de arroz maleza AM356-8, donde se contenían una cobertura del 0.1X del genoma nuclear, 10X del mitocondrial y 87X del cloroplástico. La secuencia completa de los genomas de organelos (cloroplastos y mitocondrias) proveen de recursos valiosos e información para el estudio la ecología y la evolución molecular de las plantas. Por ello, mediante estrategias de genómica comparativa se logró la obtención de un conjunto de reads que contenían el cloroplasto del biotipo secuenciado. El establecer un método para la obtención de secuencias de los genomas de los organelos a partir de la secuenciación del ADN total de una planta, representa una gran ventaja ya que se evita las dificultades que conllevan la separación de los ADN de los 3 genomas contenidos en una célula vegetal (nuclear, mitocondrial y cloroplástico). Siempre que se consideren dos aspectos fundamentales para la obtención del conjunto de reads cloroplásticos. Uno es inherente a la estructura muy conservada cuatripartita de los cloroplastos: dos regiones de simple copia (larga LSC; corta SSC) y dos regiones invertidas repetidas (IR), éstas últimas regiones pueden generar conflicto a la hora del ensamblado de novo. El otro aspecto se debe considerar al momento de la obtención de las secuencias cloroplásticas a partir de un conjunto de reads de ADN total. Puede generarse dificultad en la diferenciación de reads verdaderos de origen cloroplástico de las copias del mismo en el núcleo, debido a que existen transferencias de regiones de ADN de los organelos al núcleo.

A partir de la obtención del conjunto de reads cloroplásticos se logró determinar el haplotipo del cloroplasto del biotipo secuenciado. Mediante herramientas de genómica comparativa se identificaron sitios variantes del tipo SNP e INDELS, entre cuatro de los genomas cloroplásticos publicados más cercanos al biotipos secuenciado (*O. rufipogon*; *O. nivara*; *O. sativa ssp japonica*; *O. sativa ssp indica*). Por comparación de los indels identificados con el conjunto de reads del cloroplasto AM356-8 fue posible establecer que al arroz maleza en estudio presentaba el haplotipo del genoma cloroplástico de *O. sativa ssp japonica*.

Por otro lado fue posible realizar comparaciones entre los tres genomas de la célula vegetal y el conjunto de reads del cloroplasto de AM356-8 e identificar regiones de ADN cloroplástico inserto en el núcleo. A través de estas comparaciones se logró establecer una pipeline para la identificación de regiones de ADN cloroplásticos insertos en el genoma nuclear e identificar insertos exclusivos del genoma nuclear del biotipo de arroz maleza.

Aplicación de secuenciación de nueva generación al estudio de la domesticación de arroz y diferenciación genómica entre cultivares, biotipos con características de malezas y especies ancestrales de *Oryza sativa*

S. Garaycochea¹, F. Álvarez - Valín².

1 - Unidad de Biotecnología de INIA; 2 - Sección de Biomatemática, Facultad de Ciencias, UdelaR.

El arroz es uno de los principales componentes de la competitividad económica del sector agroexportador de Uruguay, siendo objeto de esfuerzos nacionales en investigación e innovación apoyados en el programa de mejoramiento genético de INIA. Este proyecto que ya a comenzado a ejecutarse (por la unidad de Biotecnología del INIA) en forma de proyecto piloto con recursos muy limitados (se han secuenciado en BIOPOLIS 100 megabases utilizando un secuenciador 454), plantea la utilización de técnicas de NGS para la obtención de información genómica en biotipos de la especie *Oryza sativa* con características de maleza respecto a los cultivares de arroz utilizados en Uruguay. El interés aplicado inmediato para la diferenciación de biotipos de arroz rojo expresando características ancestrales del proceso de domesticación respecto a cultivares de arroz se vincula con la importancia de identificar fuentes de variabilidad que puedan presentar riesgos de mayor flujo génico con germoplasma cultivado ó incluso ser fuentes de heterogeneidad para loci genéticos asociados con fenotipos inaceptables en cultivos (color, tipo de panoja, etc.). Desde una perspectiva opuesta, asimismo existe el potencial de utilizar esta información genómica de los biotipos de arroz rojo adaptados a diversas condiciones edafoclimáticas para ampliar en forma consistente la base de diversidad genética explorable respecto a su contribución al desarrollo de nuevos cultivares que pueden valorizarse a nivel regional e internacional al ampliarse la preocupación por la adaptación de los cultivos a las condiciones propias del cambio climático global.

Es en este marco que planteamos secuenciar el genoma completo de 6 variantes de arroz maleza de nuestro país los cuales representarán el primer mapa detallado a escala genómica de la variabilidad de estos organismos a nivel nacional.

La Metagenómica: nuevo abordaje para el estudio de la diversidad microbiana como indicador de calidad de suelos agrícolas y prospección de nuevas cepas y genes

Evaluación de la diversidad microbiana en suelos agrícolas y rizósfera de maíz transgénico.

Federici, M.T.¹, Bajsa, N.⁴, Laugurara, P.⁴, Garaycochea, S.¹, Giannone, N.⁵, Zerbino, S.², García, C.¹, Leoni, C.¹, Terra, J.³, Dalla Rizza, M.¹

- 1- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental Las Brujas
- 2- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental La Estanzuela
- 3- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental Treinta y Tres.
- 4- Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)
- 5- Facultad de Ciencias

Dada la importancia de los microorganismos para el funcionamiento de los ecosistemas naturales y sistemas agrícolas, la evaluación del impacto de la agricultura sobre su biodiversidad se hace esencial para su conservación. La metagenómica tiene el potencial de responder algunas preguntas fundamentales de ecología microbiana y es especialmente útil para estudios de suelos. Entre los ecosistemas de la tierra, los suelos presentan la mayor diversidad microbiológica, estimándose de 5.000 a 10.000 especies de microorganismos por gramo de suelo. Además, permite determinar el potencial genético y bioquímico de microorganismos no cultivables identificando genes desconocidos directamente relacionados con la biosíntesis de numerosos compuestos bioactivos. En particular, en los últimos años las técnicas "Next Generation Sequencing" han revolucionado esta disciplina.

En 2011, en INIA Las Brujas se instaló un ensayo con maíz transgénico con el objetivo de iniciar estimaciones sobre el impacto ambiental a nivel local. Además, desarrollar e implementar nuevas técnicas y herramientas de análisis de la estructura de las comunidades microbianas a través de la metagenómica y la bioinformática. Este ensayo evalúa los eventos transgénicos de maíz MON810xNK603 (resistencia a lepidópteros y con tolerancia a glifosato) y NK603 (tolerancia a glifosato) en un diseño en bloques distribuidos al azar con 4 repeticiones.

Diferentes muestras de suelo se tomaron previo a la siembra, de suelos cultivados y de suelos con vegetación natural (debajo del alambrado). A su vez, también se tomaron muestras de rizósfera de maíz en los distintos estadios fenológicos del cultivo: elongación, floración y madurez. Se extrajo el ADN metagenómico de todas ellas y actualmente se están analizando por la técnica de DGGE en el Laboratorio de Ecología Microbiana (IIBCE). También se han enviado algunas muestras al servicio de pirosecuenciación ("amplicon sequencing") del Instituto de Agrobiotecnologías (INDEAR) en Rosario (Argentina). Los datos obtenidos serán utilizados para analizar la diversidad microbiana y su relación con la variedad de maíz, estadio fenológico o manejo agrícola, así como para la prospección de grupos de microorganismos benéficos con potencial uso en el desarrollo de bioinsumos, o de genes con potencial biotecnológico. Esta información también será utilizada para buscar posibles indicadores biológicos de impacto ambiental contribuyendo de este modo a la búsqueda de alternativas de manejo para un desarrollo sustentable.

***Bacillus thuringiensis*: prospección, caracterización y análisis de diversidad de cepas nativas asociadas a cultivos de maíz transgénico.**

Federici, M.T.¹, Rivas, F.¹, Giannone, N.³, Altier, N.¹, Zerbino, S.²; Dalla Rizza, M.¹

1- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental INIA Las Brujas

2- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental La Estanzuela

3- Facultad de Ciencias

Las proteínas cry, producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis*, pueden usarse como un insecticida biológico o bien expresarse en plantas transgénicas. El interés por estas proteínas como alternativa al uso de insecticidas, ha llevado a que se obtengan más de 50.000 cepas de *B. thuringiensis* a partir de insectos muertos, plantas, suelos y ambientes marinos.

Actualmente en INIA Las Brujas se están procesando muestras de suelo y de rizósfera de maíz transgénico para la obtención de cepas nativas de *Bacillus*. A los efectos de eliminar otros géneros bacterianos las muestras, durante su procesamiento, fueron sometidas a un tratamiento térmico. A la fecha se identificaron varias cepas candidatas por medio de la tinción de Gram, observación morfológica y determinación de movilidad. Para la confirmación de género está previsto el uso de pruebas bioquímicas, mientras que la identificación a nivel de especie se realizará por biología molecular a través de la amplificación del gen ribosomal 16S, secuenciación y apareamiento de secuencias en el GenBank-NCBI. Posteriormente, la colección de cepas se caracterizará por la presencia de los distintos grupos de genes cry con el fin de determinar el potencial de uso contra insectos plaga en programas de control biológico: cry1 y cry2 (Lepidópteros y Dípteros), cry3 (Coleópteros), cry4 (Dípteros), cry7 y cry8 (Coleópteros). Este trabajo además incluye una tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias (UDELAR) con actividades desarrolladas en el Laboratorio de Bioproducción y en la Unidad de Biotecnología.

Adicionalmente, está previsto extraer el ADN metagenómico de suelos y rizósfera que se analizará por pirosecuenciación ("amplicon sequencing"). Los resultados generados aportarán conocimiento original sobre diversidad microbiana en relación a distintos manejos agrícolas y variedades de maíz, y orientarán la prospección de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.

Utilización de metagenómica y secuenciación de última generación en la identificación de microorganismos y genes asociados a la movilización del fósforo en el suelo

Federici, M.T.¹; Garaycochea, S.¹, Beyhaut, E.¹, Dalla Rizza, M.¹, Altier, N.¹

1- Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental INIA Las Brujas

A nivel mundial, la agricultura muestra un creciente interés en el desarrollo y uso comercial de bioinsumos de origen microbiano. En ese sentido, se ha puesto énfasis en la acción de los microorganismos en los procesos de fijación biológica del nitrógeno, solubilización y mineralización de fósforo, así como también estrategias de control biológico de insectos plaga. Los suelos cultivables contienen generalmente una importante reserva de fósforo no disponible para las plantas. Esta reserva incluye gran parte del fósforo nativo del suelo y también el que proviene a partir del agregado de fertilizantes fosfatados, rápidamente inmovilizado luego de la aplicación. En el marco de la propuesta "Identificación de microorganismos y genes asociados a la movilización del fósforo en el suelo", se plantea el uso de la metagenómica para la prospección de nuevas cepas de bacterias que aumenten la fracción disponible para las plantas del fósforo total del suelo. Asimismo, se pretende determinar los mecanismos involucrados en la transformación de las distintas formas de fósforo. Los microorganismos, tanto cultivables como no cultivables, de géneros

conocidos con capacidad de solubilización del fosfato se identificarán a través de la secuenciación del fragmento 16S rDNA. Además se profundizará en el conocimiento de las vías metabólicas involucradas en la movilización del fósforo mediante la prospección de enzimas asociadas a dichos procesos en bibliotecas metagenómicas, metatranscriptómicas o en el propio metagenoma secuenciado a través de la bioinformática.

Análisis de expresión de genes de un genotipo resistente de *Solanum commersonii* frente al patógeno *Ralstonia solanacearum*.

R. Narancio¹, F. Vilaró¹, C. Pritsch², M. Dalla Rizza¹

1 - Unidad de Biotecnología de INIA; 2 – Facultad de Agronomía.

Solanum commersonii es una especie emparentada con la papa cultivada nativa del Uruguay. Algunos genotipos de *S. commersonii* muestran resistencia a la bacteria patogénica *Ralstonia solanacearum*, la cual causa grandes daños en el cultivo de papa y en otros cultivos de importancia económica. Con el fin de transferir la resistencia de *S. commersonii* a *R. solanacearum* en el germoplasma de papa, *S. commersonii* está siendo utilizada en el programa de mejoramiento de INIA en cruzamientos con *S. tuberosum*, y se han obtenido híbridos *S. commersonii* x *S. tuberosum* con buena resistencia. En este trabajo se realizó un análisis de expresión de genes de un genotipo resistente de *S. commersonii* en respuesta a la infección con *R. solanacearum* utilizando el Potato Oligochip Initiative (POCI) array, el cual es la representación del transcriptoma de papa más actualizada hasta el momento. El objetivo del presente trabajo fue desentrañar los procesos moleculares involucrados, establecer el momento de la respuesta e identificar genes relacionados con la resistencia con el fin de desarrollar herramientas que apoyen la introgresión de la resistencia de *S. commersonii* en el germoplasma de papa. Se demostró que la respuesta de defensa se inició a las 6 horas post-inoculación (hpi), donde un alto número de genes (figura 1) se expresó diferencialmente y una alta proporción están asociados a procesos de oxidación-reducción (figura 2), indicativo de que la respuesta ya se encuentra inducida en este momento. A las 24 hpi se sobreexpresaron varios genes de defensa como Pathogenesis related proteins (PR), factores de transcripción WRKY, y proteínas con similitud a genes R.

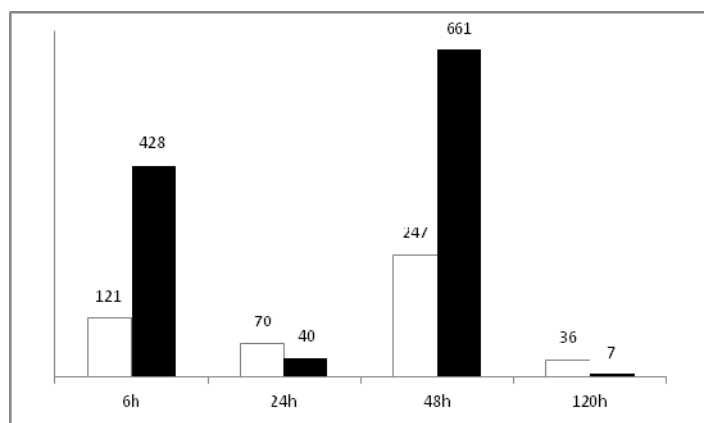


Figura 1. Número de genes diferencialmente expresados en los diferentes tiempos analizados luego de la inoculación con *Ralstonia solanacearum*. Las barras blancas representan genes inducidos y las barras negras representan genes reprimidos. Sólo los genes con fold-changes mayores a 2 y p-valores menores a 0,05 fueron considerados.

También se observó la inducción de proteínas PR1 a las 24 y 48 hpi, lo que indica que la vía del ácido salicílico está implicada en la respuesta de defensa. Varios genes asociados a la vía del etileno también fueron inducidos, lo que sugiere que también la vía del etileno se indujo en respuesta a la infección. Se validó mediante real time PCR la expresión diferencial de 4 genes con similitud a genes previamente reportados como asociados a una respuesta de defensa. Este trabajo confirma que la base de la resistencia

de *S. commersonii* frente a *R. solanacearum* es genética y potencia a la especie como un recurso genético valioso para el mejoramiento por resistencia a la marchitez bacteriana en papa.

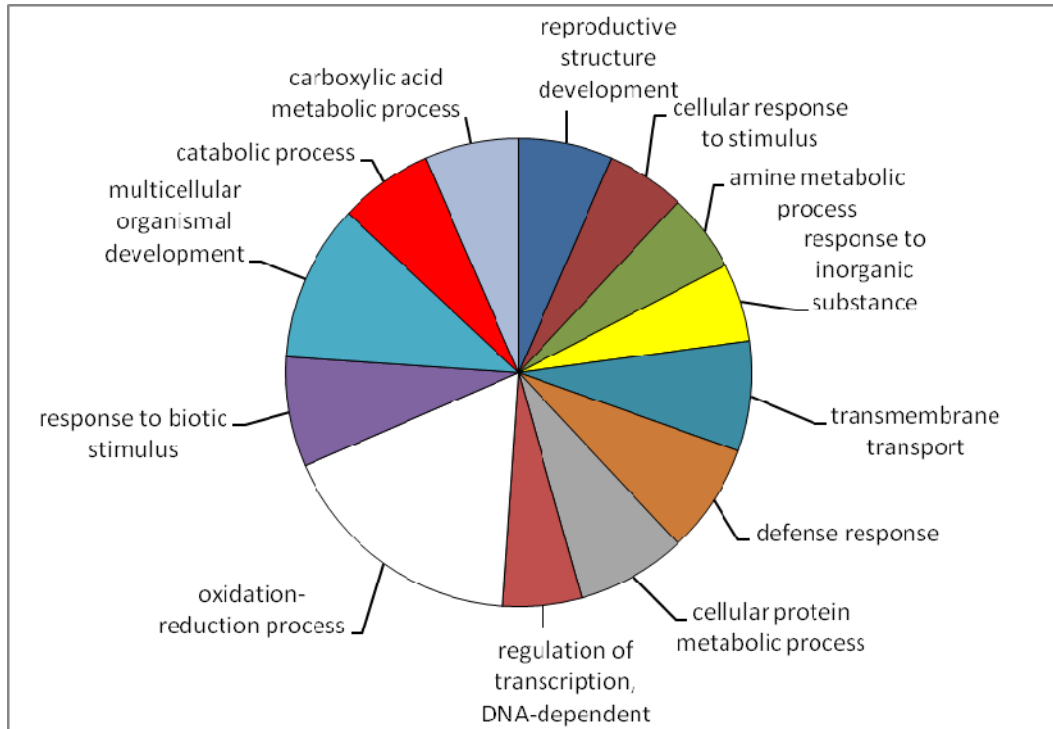


Figure 2. Gráfico de varios niveles que representa los porcentajes de los genes diferencialmente expresados asociados a los diferentes procesos biológicos (de acuerdo al sitio web Gene Ontology).

Peptidos antimicrobianos como alternativa al uso de fungicidas químicos

Diego Alem, Matías Maidana, Marco Dalla Rizza
 Unidad Biotecnología, INIA Las Brujas.

Las pérdidas en cultivos y postcosecha debido a patógenos vegetales en la agricultura, y considerando los inconvenientes en el tratamiento de enfermedades causados por microorganismos, son causa de preocupación tanto a nivel agrícola como de salud. La mayoría de los métodos de control de enfermedades en la agricultura están basados en el uso de productos de síntesis que son costo-efectivos, formulados con estrictos estándares de producción pero muchas veces inespecíficos, generan problemas de resistencia en los microorganismos que se desea controlar, poco amigables con el medio ambiente y la salud. La investigación de enfoques alternativos para su control en ambos campos de aplicación, es creciente y necesario. Esto ha llevado a la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana con posibilidades de desarrollos biotecnológicos. Es deseable que los compuestos de control posean ciertas características: que sean más activos (eficaces a dosis más bajas que las actuales), que presenten mayor especificidad (que no afecten a otros organismos no blanco), que no generen resistencia y sean biodegradables.

Los Péptidos Antimicrobianos (PAMs) forman parte de los mecanismos de defensa conservados a lo largo de la evolución y están presentes en organismos de muy distinta escala filogenética, desde procariotas hasta animales y plantas superiores. Son un grupo amplio de moléculas que contienen generalmente de 15 a 50 residuos de aminoácidos, en su gran mayoría son catiónicos a pH fisiológico (debido a la presencia de residuos de arginina y lisina) y anfipáticos. Pueden presentar actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos como bacterias gram positivas y gram negativas, micobacterias, hongos, levaduras, protozoos, virus e incluso células tumorales (Broekaert et al., 1997, Zasloff, 2002; Brogden, 2005; Hancock and Sahl, 2006).

En esta línea de investigación, una actividad es la búsqueda de nuevos PAMs, focalizado en la búsqueda de extractos activos a partir de semillas, la purificación mediante diversas técnicas cromatográficas y la posterior caracterización.

Una vez identificado una biomolécula con características para ser aplicada en cadena agroalimentaria se evalúan sistemas de escalado como la expresión heteróloga en distintos sistemas de expresión como ser microorganismos (*E. coli*, *P. pastoris*) o en plantas (granjas moleculares) y la optimización del proceso (Figura 1).

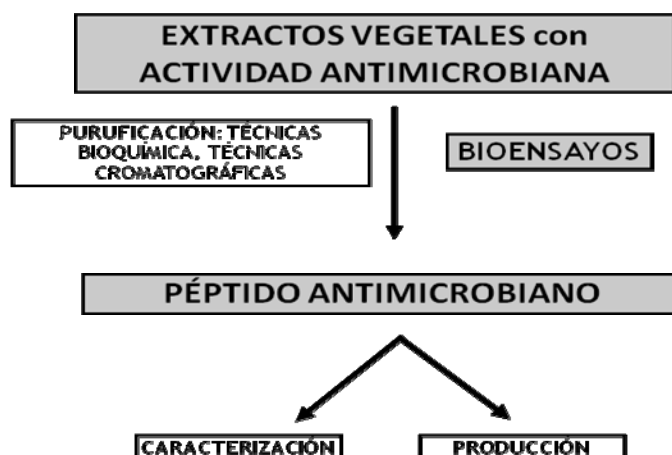


Figura 1. Esquema de trabajo.

En la Tabla 1, se presentan resultados preliminares para el péptido recombinante de *Amaranthus quitensis*, unido a una proteína de fusión (AqAMP-Trx). Se observa una buena actividad frente a tres hongos fitopatógenos medido a través de mínima concentración inhibitoria (MIC) y mínima concentraciones fungicida (MFC) expresada en uM, así como una gran estabilidad frente a variables fisicoquímicas y enzimas proteolíticas, lo que lo hace un buen candidato a emplear en pruebas de ensayo *in vivo*.

A) <i>F. oxysporum</i>		<i>P. digitatum</i>		<i>A. Niger</i>	
MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
4	NF	4	NF	4	8

B)				
pH 3	-	Tratamiento térmico (100°C, 60 minutos)		+
pH 5	+	Tratamiento con enzimas proteolíticas		
pH 7	+	Proteinasa K, 60 minutos		+
pH 9	+	Pronase E, 60 minutos		+
pH 11	+	Tripsina, 60 minutos		+

Tabla 1. Resultados parciales para el péptido recombinante de AqAMP-Trx. A) Actividad frente a tres hongos fitopatógenos; NF, no fungicida. B) Estudios de actividad fisicoquímica y enzimas proteolíticas; + activo; - sin actividad.

INIA Dirección Nacional
INIA La Estanzuela
INIA Las Brujas
INIA Salto Grande
INIA Tacuarembó
INIA Treinta y Tres

Andes 1365 P. 12, Montevideo
Ruta 50 Km. 11, Colonia
Ruta 48 Km. 10, Canelones
Camino al Terrible, Salto
Ruta 5 Km. 386, Tacuarembó
Ruta 8 Km. 281, Treinta y Tres

Tel: 5982902 0550
Tel: 5984574 8000
Tel: 5982367 7641
Tel: 5984733 5156
Tel: 5984632 2407
Tel: 5984452 2023

Fax: 5982902 3633
Fax: 5984574 8012
Fax: 5982367 7609
Fax: 5984732 9624
Fax: 5984632 3969
Fax: 5984452 5701

iniadn@dn.inia.org.uy
iniale@le.inia.org.uy
inia_lb@lb.inia.org.uy
inia_sg@sg.inia.org.uy
iniatbo@tb.inia.org.uy
iniatt@tyt.inia.org.uy