



Impactos Productivos y Ambientales del Uso de Cultivos Transgénicos de Vides:

AVANCES TECNOLÓGICOS, IMPACTO PRODUCTIVO Y FLUJO GÉNICO

H. Prieto, C. Muñoz, P. Hinrichsen et al.



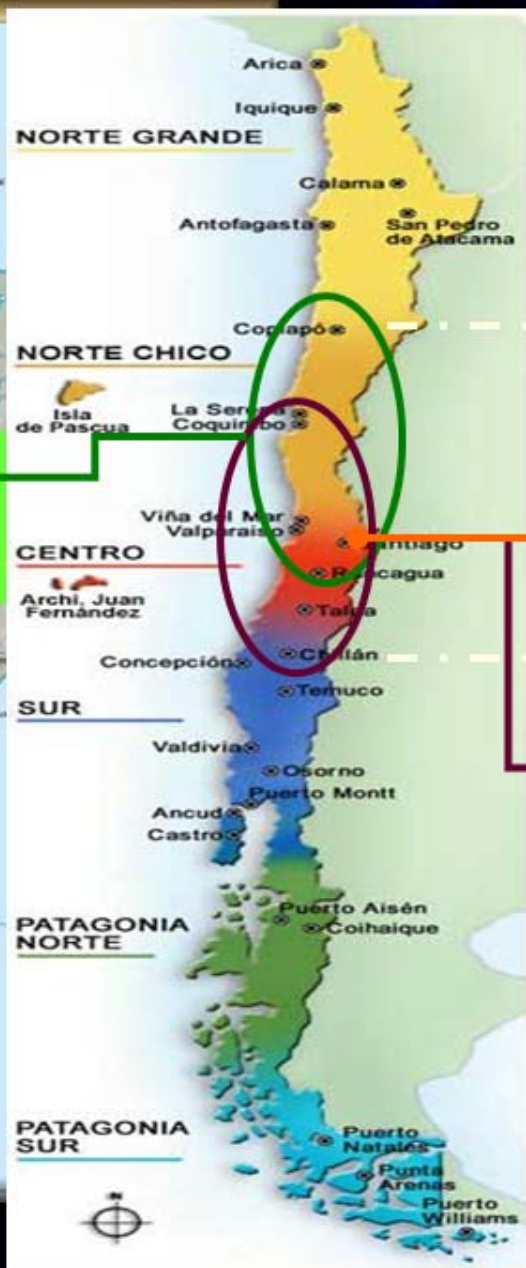


Índice

- Aspectos del cultivo y sus problemas
- Caracteres de interés para mejorar
- Programa de mejora genética
- Interacción programa convencional y herramientas biotecnológicas
- Optimización de sistema de transformación genética
- Evaluación de Flujo Génico en vides
- Conclusiones, Preguntas, Discusión



Uva de mesa
Cepas de Pisco



800 Kms

Santiago

600 Kms

Cepas de vino



Grapes statistics in Chile

	“Wine” grapes	Table grapes	Grapes for Pisco
Acreage (Ha)	104.000*	51.000*	10.000*

(*) Catastro SAG 2000

- **Chile is the second world exporter of table grapes (number one among Southern hemisphere countries)**
- **Grapes represent 20% of the fruit crops in the country**
- **Table grape most commonly planted is still Sultanina (over 30% of acreage and exportations)**
- **In the case of wines the most relevant is Cabernet Sauvignon (ca. 50.000 Hs), then Merlot, Carmenère, etc.**
- **Exportations of fine wines have raised to more than US\$ 700 millions, raising to ca. 4% of world exportations; average per bottle price of over US\$ 3**



Programa de Breeding de Uva de Mesa

Iniciado hace ca. 20 años

Objetivos principales:

- Calidad de fruta
- Mejorar vida de poscosecha
- Reducir requerimientos de arreglo de racimo y dependencia de GA3
- Ampliación de tiempo de cosecha (tempranas, tardías)
- Tolerancia a estrés biótico (hongos, virus) y abióticos (salinidad, sequía)

Grapevine Breeding Program: current status



Early ripening selections

Selection ID	Parents	°Brix (%)	Ripening time	First evaluation	Main characters.
H8P24 (2)	Flame- Perlette	18,0 17 18-16	11/12 Vicuña 8/01 Llay-Llay 29/01 Platina	1995/96	60% seeded, moscatel, 18-22mm , oidio (S)
H16P13 (5)	Red-Dawn	18	23/01 Llay-Llay	1998/99	Seedless, 17-22 mm, crocante, GA3 resp. oidio (R)
H1P9 (1)	Ruby- Perlette	16,7 17	8/01 Vicuña 8/01 Llay-Llay	1991/92	Seedless, GA3 resp. 16-17 mm



Mid-season ripening selections

Selection	Parents	°Brix (%)	Ripening	First evaluation	Main
H15P18 (4)	Ruby-Superior	16	6/02 Platina	2002	Seedless, GA3 resp., excelent organoleptic behavior
H3P14 (23)	Ruby-Centennial	17	5/02 Llay-Llay	2000/01	18-24 mm, seedless, loose bunch, GA3 resp. Post-harvest OK
H16P51 (6)	Flame-Blush	16	5/02 Llay-Llay	1998/99	Seedless, GA3 resp., 17-22 mm, soft Muscat flavor



4





Why genetic transformation on grapes?

- **Not possible to improve by conventional breeding a cultivar vegetatively propagated**
 - Interest to preserve the original phenotype, such as Thompson seedless or Cabernet Sauvignon
- **Faster option to introduce a gene or trait not present in close relatives of cultivated grape**
 - Close to a century to develop 'Regent', in Germany
- **Testing of new, candidate genes possibly related or responsible of profitable phenotypes**





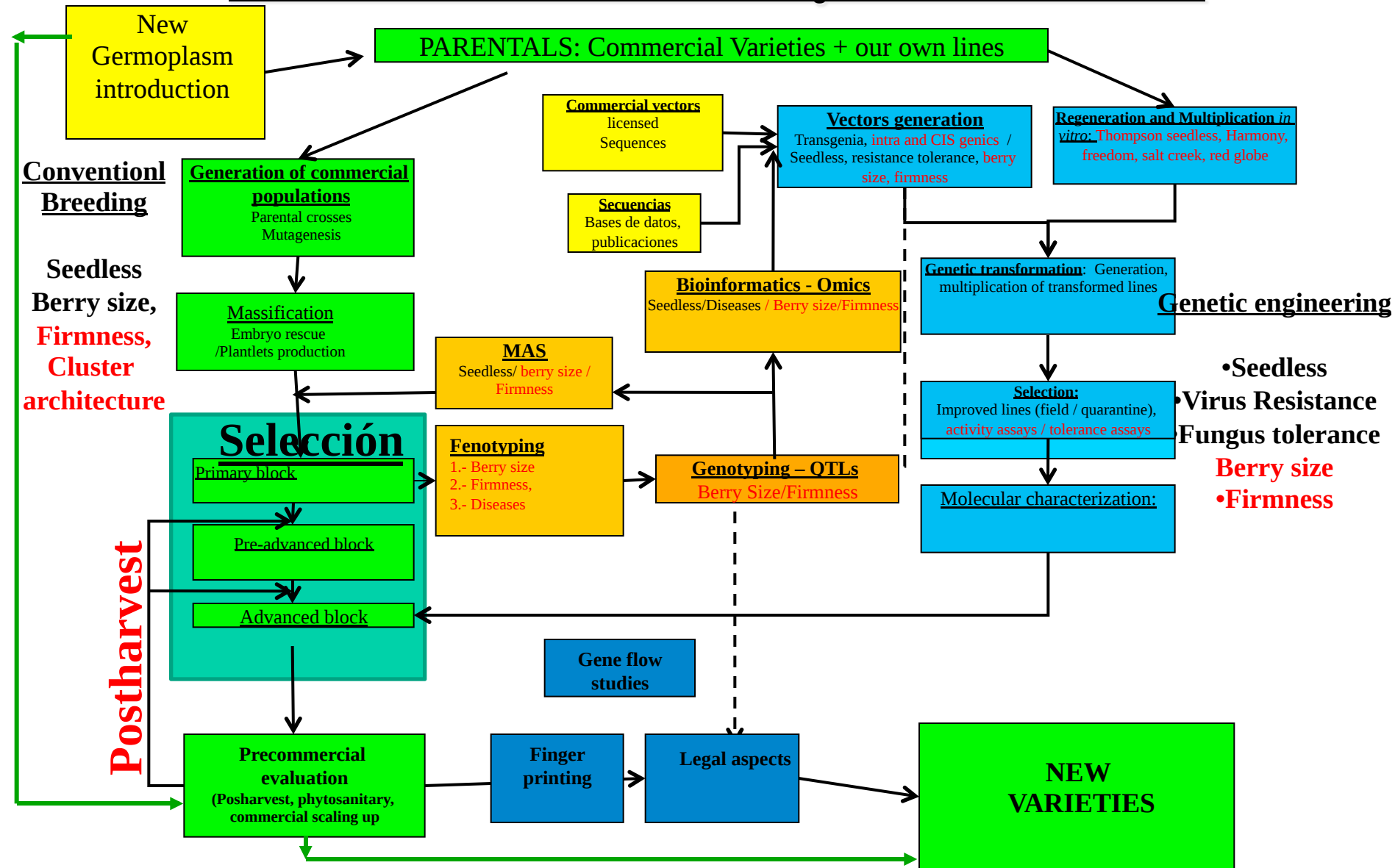
Grape GMO's are one additional element in a more extense Program including:

- **Conventional Breeding**, the key factor for the development of new table (wine) grape cultivars, assisted by selected markers (linkage mapping, QTL-detection)
- **Permanent optimization** of agronomical, irrigation and phytopathological management of the fruit crop
- **Cultivar and clonal *Fingerprinting*** for vineyard/nursery management and IP issues
- **Antique and / or exotic germplasm characterization**
- **Functional Genomics Program**, as a powerful tool to identify key genes determining main traits of interest
- **Molecular characterization** of pest and disease agents

DESARROLLO de NUEVAS y MEJORES VARIEDADES de UVA de MESA.

Objetivos de Mejora: 1.- Apirenia, 2.- Firmeza 3.- Tamaño baya.

4.- Resistencia a virus / Tolerancia a hongos 5.- Estructura de racimo



ADOPTED TECHNOLOGY

Field material



Floral buds cultivation



In vitro material



Embryogenic calli

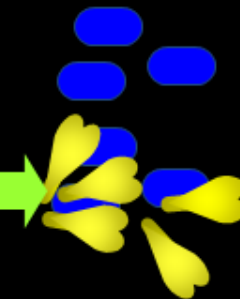
- Bought from U. Florida
- US\$ 100 k

DEVELOPED TECHNOLOGY

A. tumefaciens



New experimentation

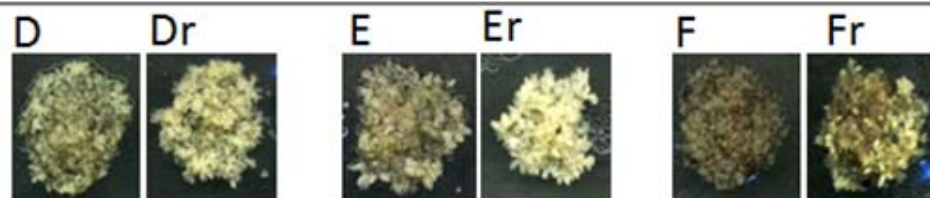
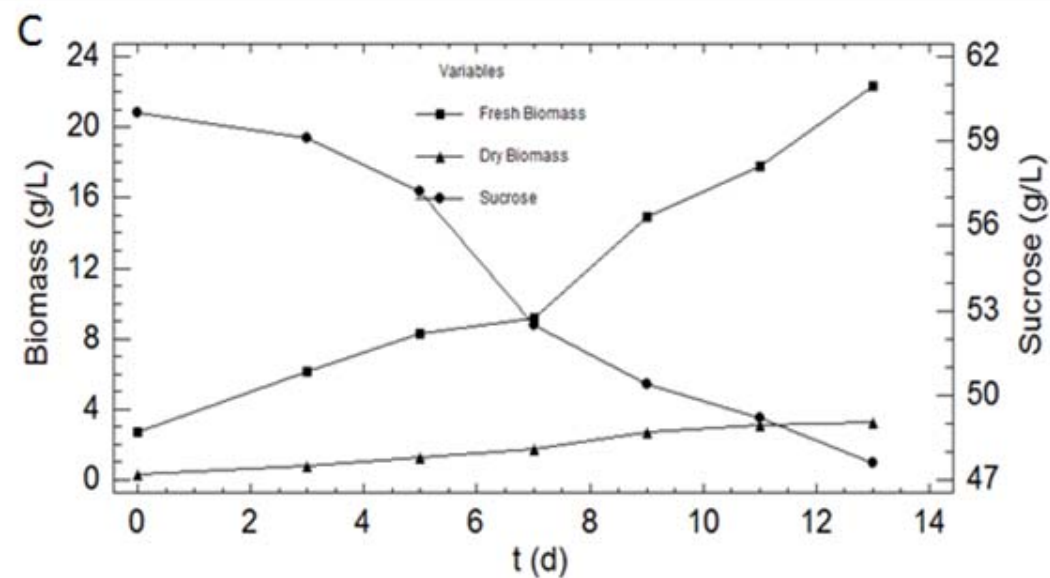
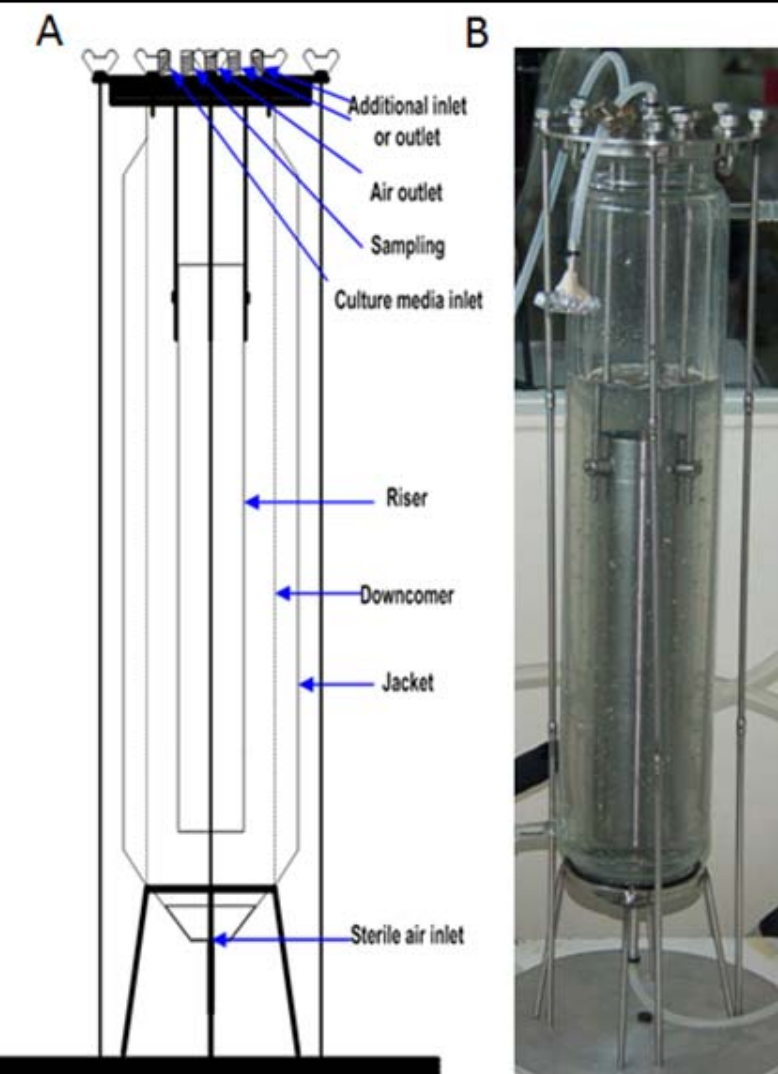


Selection

Product (general objective)



New experimentation



Application Nro. CL3521-2008.

(Tapia *et al.* (2009), J. Biotech. DOI 10.1016/j.jbiotec.2008.09.009



Patógenos más relevantes para la vid en Chile y el mundo

- Pudrición gris (*Botrytis cinerea*)
- Oidio, powdery m. (*Uncinula necator*)

➡ *Pre-cosecha*

➡ *Post-cosecha*





Christian Montes
Bioquímico

**103 GM lines
(568 plants)
In 2004**

**81 TS
(461 plants)**

**22 GI
(107 plants)**

**60 control
plants**



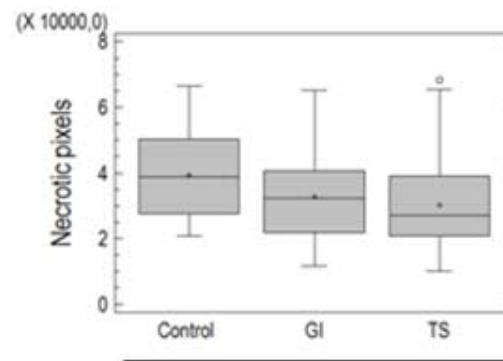
Multiple comparison analysis of genetically modified (TS and GI) and control plants groups during three seasons of *Botrytis cinerea* foliar infections.

	2006-2007	2007-2008	2008-2009	
Control	*	*	*	TS
TS	ns	ns	ns	GI
GI	ns	*	*	Control

A

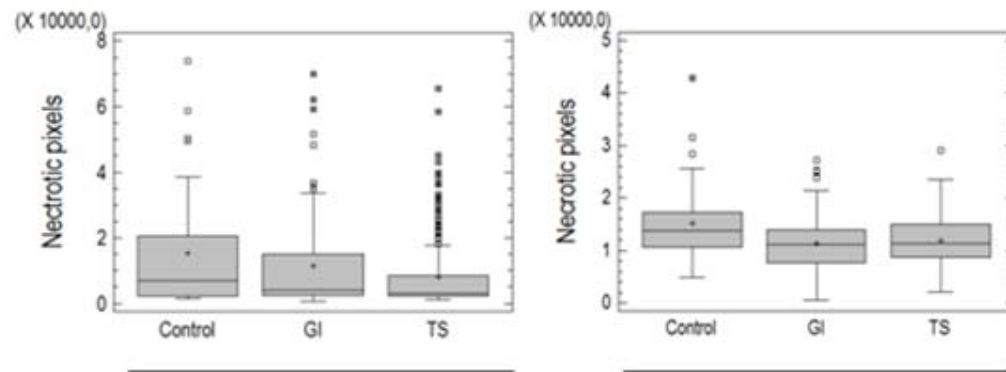


B



2006-7

C



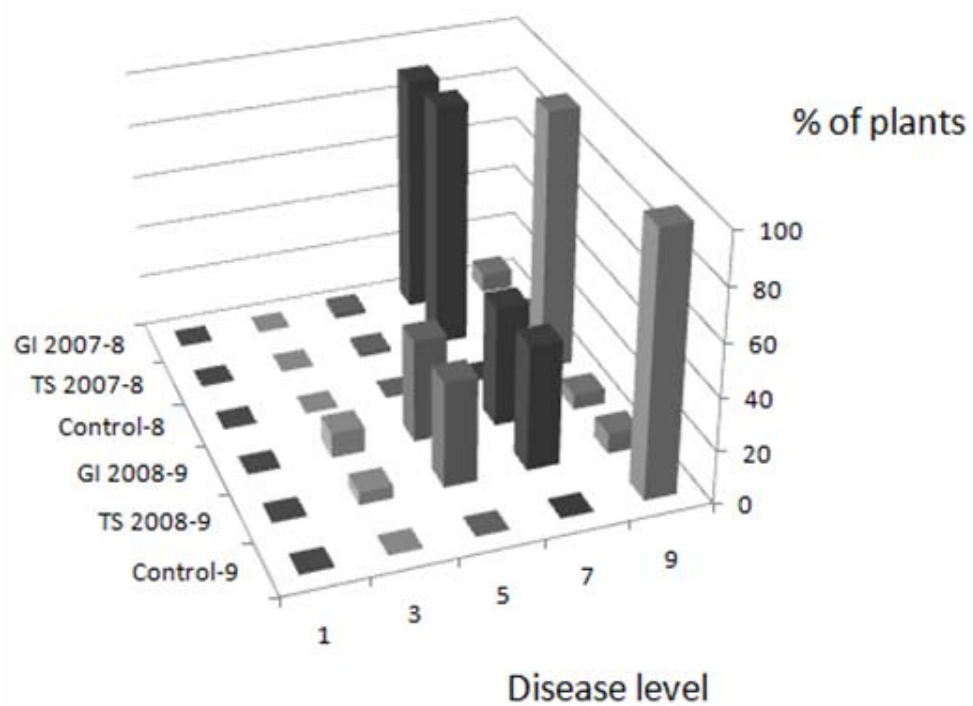
2007-8

2008-9

A



B



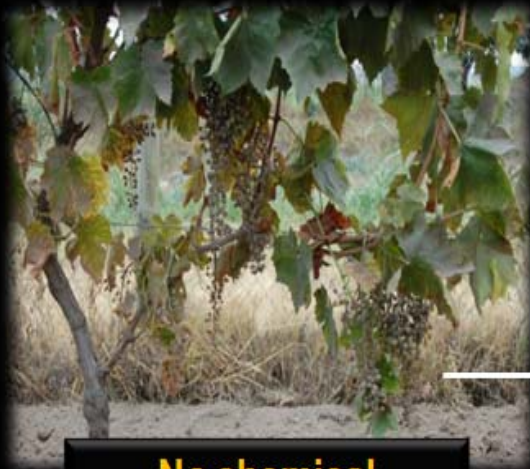
C



Genetic Transformation: Botrytis tolerance

Biosafety field:

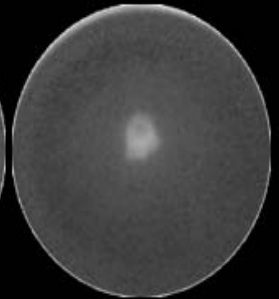
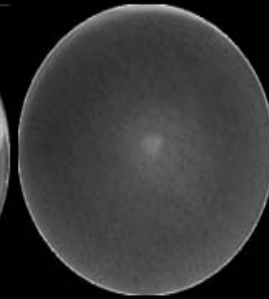
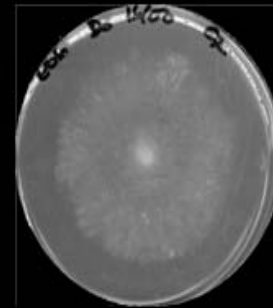
Sultana Plants



No chemical
treatments since
2006-7 season



Botrytis dishes in
Culture medium + berry juice

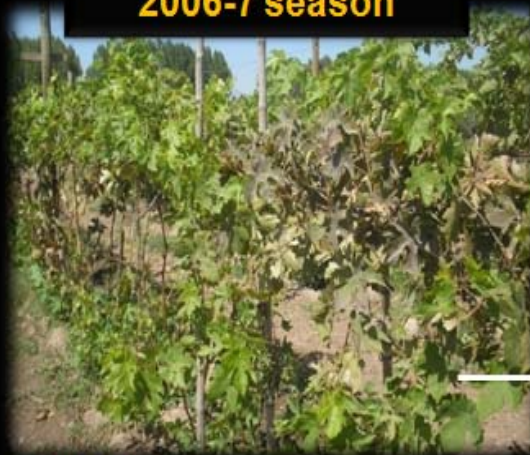


Days of growth

3

7

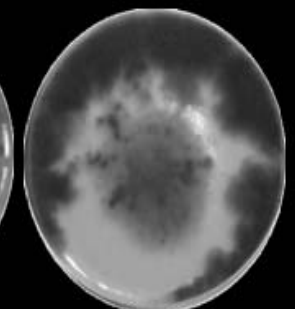
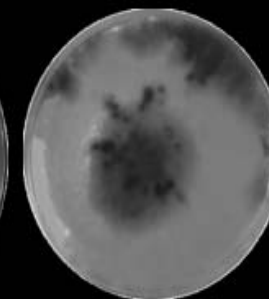
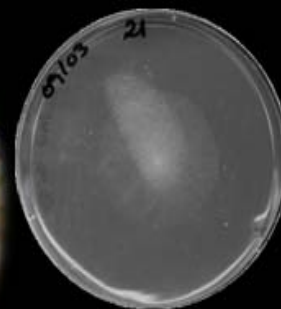
10



GM lines



Clone 21



Caracterización final



Luis Ortega
Doctoral Thesis
USACH



Evelyn Sánchez
Bioquímico

Plant	Gene
GI0201.09	Chi42-cNAG
GI0301.01	Chi42
GI0301.14	Chi42
GI0302.04	Chi42
GI0302.07	Chi42
GI0328.07	Chi42
GI0328.12	Chi42
GI0338.02	Chi42
GI0342.02	Chi42
GI0342.08	Chi42
TS0124.01	Chi33
TS0235.04	Chi42-cNAG
TS0252.05	Chi42-cNAG
TS0253.02	Chi42-cNAG
TS0253.04	Chi42-cNAG
TS0256.01	Chi42-cNAG
TS0309.10	Chi42
TS0520.21	cNAG
TS0524.10	cNAG
TS0528.06	cNAG

Exogene copy number determination using qPCR determination

DNA ID	Genes de interes en el vector		<i>qui33</i>	<i>cNAG</i>	<i>nptII</i>
5	Chi42	< 0.01			< 0.01
8	Chi42-cNAG	< 0.01		< 0.01	< 0.01
14	Chi42	0			NE
18	Chi42	< 0.01			< 0.01
19	Chi42	0			NE
20	Chi42	0			NE
21	Chi42	0			NE
23	cNAG			0	NE
25	cNAG			0	NE
33	Chi42	0			NE
35	Chi42-cNAG	1.26		1.07	0.80
49	Chi42	< 0.01			< 0.01
71	Chi33		< 0.01		< 0.01
74	Chi42-cNAG	0		0	NE
81	Chi42-cNAG	< 0.01		0	< 0.01
84	Chi42	0			NE
101	cNAG			0	NE
114	Chi42-cNAG	< 0.01		0	< 0.01
115	Chi42-cNAG	0		< 0.01	< 0.01
160	Chi42	0			NE

Lucia Martinelli y Lorenza
Dallacosta - IASMA Italy

**Nuevas estrategias:
De transgenia a cisgenia**



Vid



Transgenia



Vector basado
en
Agrobacterium



Otro género o familia o reino:
Thichoderma atroviride



Vid



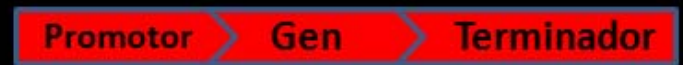
Intragenia



Vector
Agrobacterium



Biología molecular



Vitis spp.
(tres genes distintos)





Vid

↑ **Cisgenia**



Promotor > Gen > Terminador

Vector
basado en
genes de vid



Biología molecular

Promotor > Gen > Terminador



Vitis spp.
Sexualmente compatible con la
“uva”

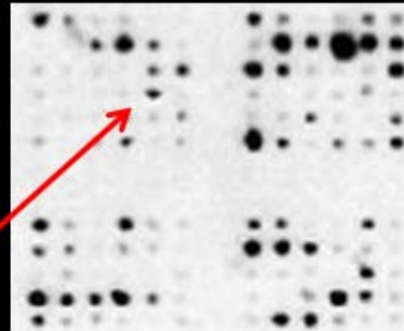


Primeros pasos a la intragenia:
caracterización de un promotor
inducido por *Botrytis*

+Botrytis



DEGECHIVID macroarray



RNA

Vid-*Botrytis*: (induced/repressed)

1. Genes involved in plant response (tissue specific)
2. Genes involved in plant response (cultivar specific)



**Ankirin-like protein, 30-fold induced in
carménere at 72 h pi**



Gene

Promoter



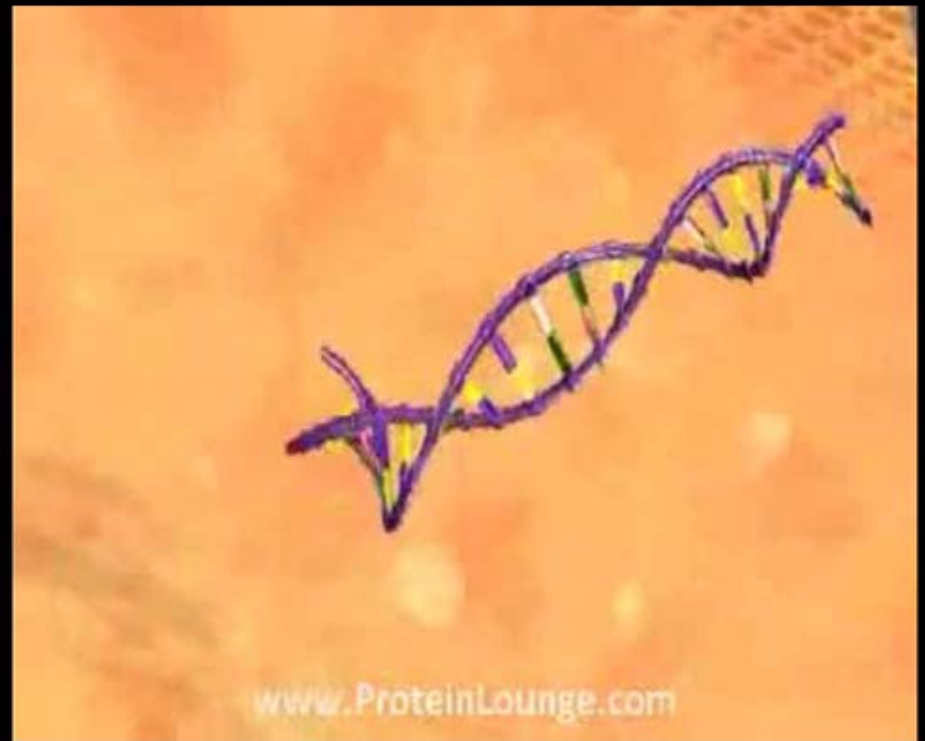
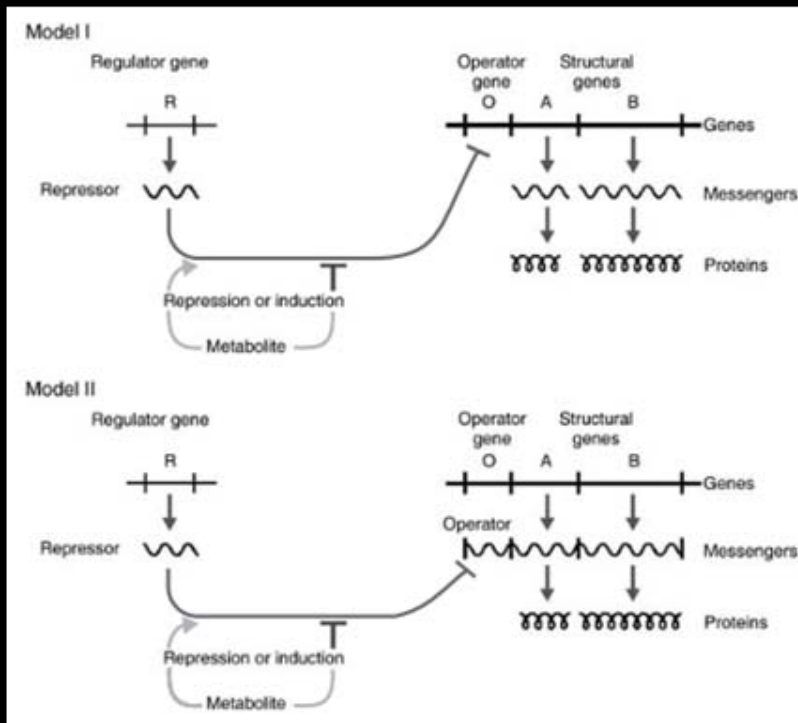
M° de los Angeles Miccono
Bioquímico

Reemplazo funcional de genes mediante el uso de ARNs mensajeros bifuncionales.

Diseño y construcción de miRNAs artificiales



Álvaro Gonzalo
Castro Oyarzún.
Doctorado en
Biotecnología.
USACH

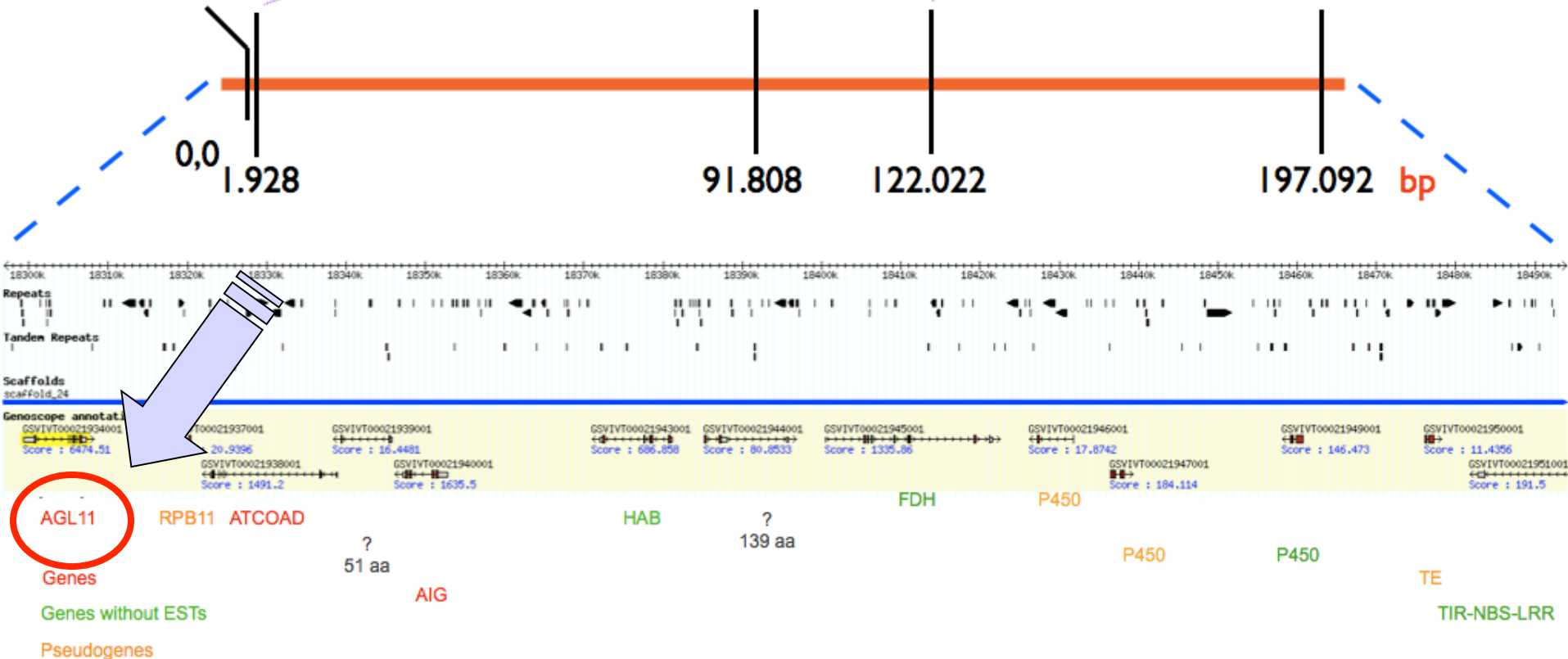


www.ProteinLounge.com

“Caza” de genes candidatos por saturación y mapeo posicional



Integración de mapa genético, mapa físico y secuencia del genoma de la vid



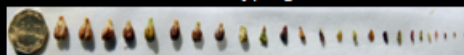
Structural Genomics Program : example Seedless



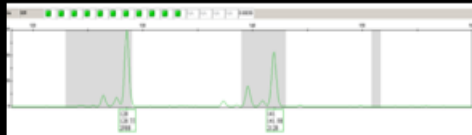
F1 population



n = 140
Phenotyping



Genotyping



QTL

Genetic Map

QTL mapping

VMC1F10
VMC6G8
VMC1B11
VMC7f2
VMC3C9
VMC1E8
VMC3F8
VMC2H10

VMC1B11

BAC_END

VMC7F2

Physical Map

Public Genomic
Sequence

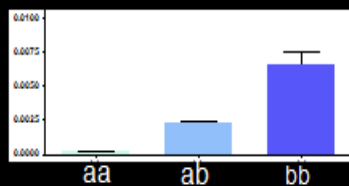
GGTTATCTCCAAAGCCGAGGGGGTCTCTCAGGTTATCGGGGGGTTTC



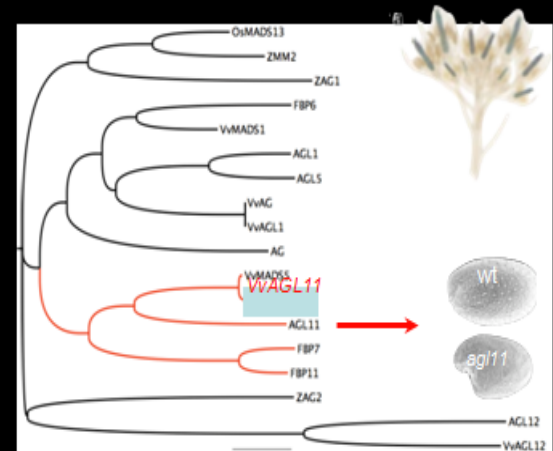
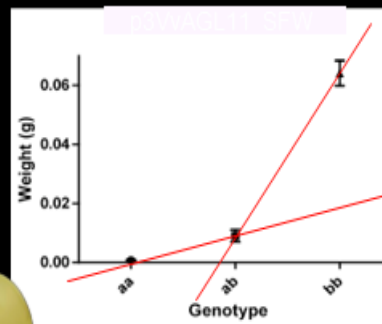
Ab initio
prediction



qPCR VvAGL11



MAS SEEDLESSNESS



“Evaluación de frecuencia de polinización cruzada en vides mediante el uso de marcadores de microsatélites”

Jessica Bravo

Gustavo Cáceres



- En la actualidad se conocen numerosos estudios sobre dispersión de polen y flujo genético vertical en diversas especies, asociado principalmente a la detección de transgenes provenientes de líneas GMO.
- Sin embargo, en vid estos estudios son escasos o inexistentes:
- Mínima concentración de polen detectado en el aire que rodeaba las vides en floración (*Vitis coignetiae*): polinización cruzada no sería importante, en comparación a la autopolinización (Kimura et al., 1998).
- Distancia máxima de dispersión de polen de vid fue de hasta 500 m, aunque a esa distancia se detectaron menos de 5 granos por cm² (Turner et al., 2004).
- Polen de vides transgénicas, cv. Dornfelder, se detectaron a 150 m de plantas de origen (Bornhoff et al., 2005) y cruzamientos fueron efectivos hasta 10 m (2,5%) (Harst et al., 2009)

La estructura floral de la caliptra en las flores de la vid, en la cual los sépalos se encuentran fusionados y forman una especie de “casquete” cubriendo el resto de los órganos reproductivos, hace suponer que en esta especie habría una alta frecuencia de auto-polinización (Boss et al. 2004)



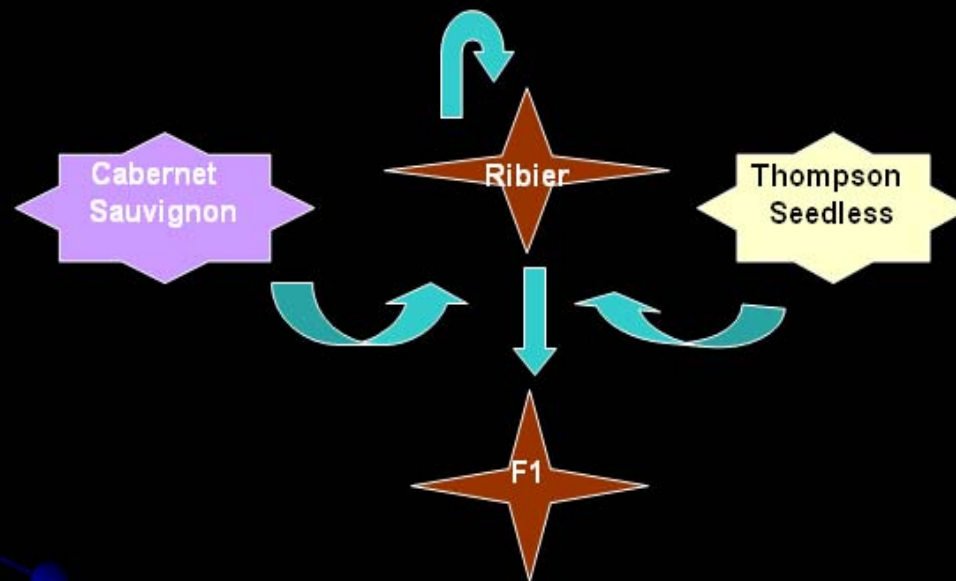


En resumen:

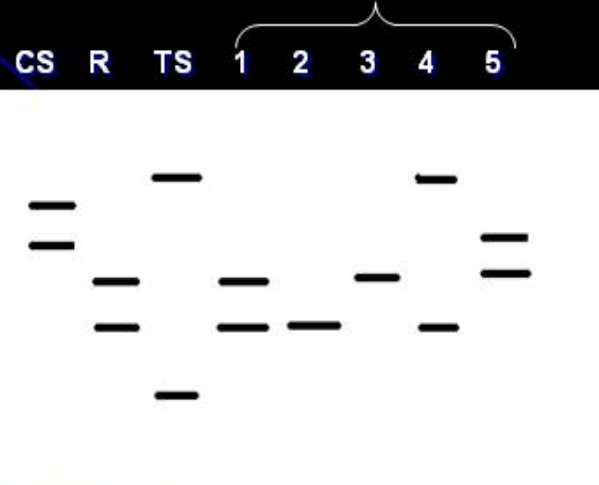
- El polen de la vid se puede desplazar a distancias variables, aunque en bajas concentraciones;**
- Susceptibilidad de las vides a la polinización cruzada está dificultada por la presencia de la caliptra.**
- Propagación vegetativa reduce a un mínimo probabilidad de flujo génico**



Modelo experimental empleado: Auto-polinización vs. polinización cruzada?



Hileras del Jardín de variedades
INIA La Platina



Evaluación de “variedades madre”
y “plántulas hijas” (F1) mediante
marcadores de tipo co-dominante
(microsatélites o SSR)

**>> Coincidencia alélica entre
progenitores y F1**



Plan de Trabajo



Muestreo

Colecta y estratificación de semillas; germinación de plántulas hijas

Extracción DNA genómico

Evaluar combinatorias de posición de plantas en hileras del Jardín Varietal vs. sus genotipos

Selección de los mejores marcadores de SSR

-Identificación de patrones alélicos de SSR de progenies

Análisis de los datos obtenidos

Estimaciones de frecuencia de polinización cruzada

Resultados

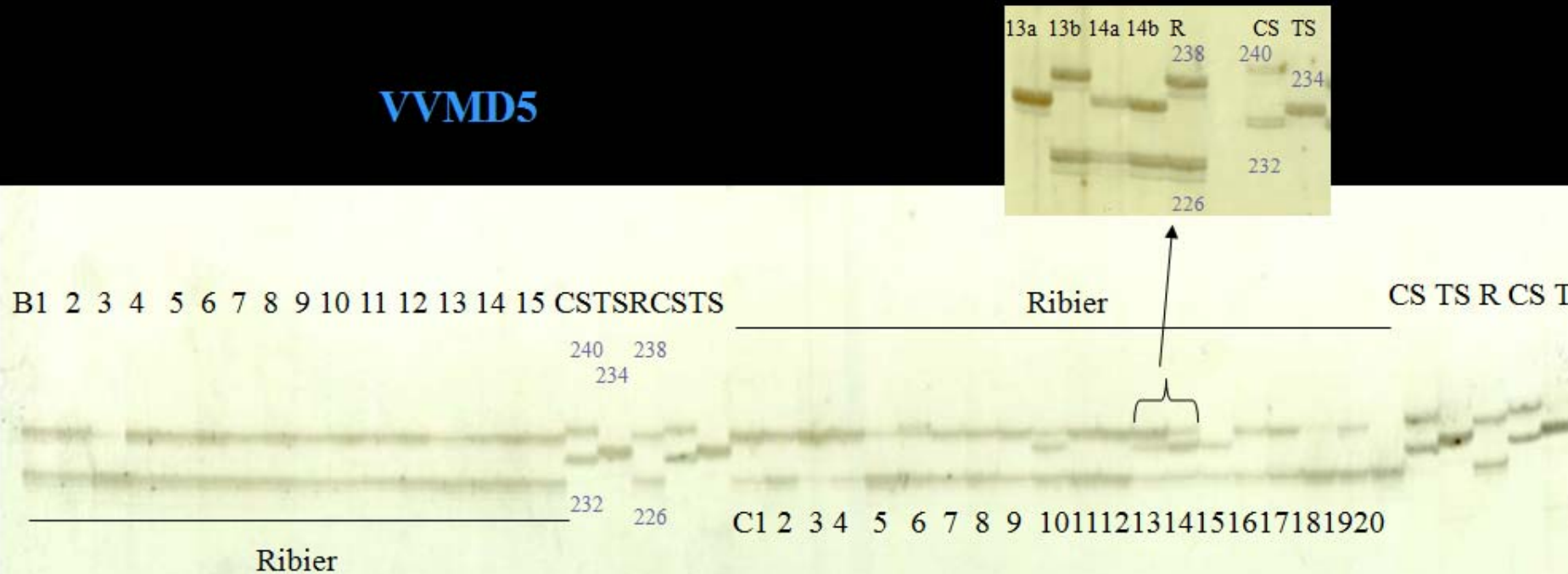
Se obtuvieron 510
“plántulas hijas” de vid
(*Vitis vinifera* L.)
regeneradas en
macetas,
correspondientes a 9
“variedades madre”
diferentes.

Variedades	Nº de plántulas
San Francisco	36
Ribier	132
Sauvignon gris	62
Sauvignonasse	80
White Riesling	88
Red Globe	22
Emperor	42
Cabernet Sauvignon	36
Italia Pirovano	12
TOTAL	510



Plántulas de semillas de Ribier (autopolinización)

VVMD5



Patrones genéticos de plántulas obtenidas de semillas de la *variedad madre* Ribier. Segregantes de Ribier [B (1-15) y C (1-20)] y patrón alélico de la “variedad madre” [Ribier, (R)] y sus variedades vecinas [Cabernet Sauvignon (CS) y Thompson Seedless (TS)]. Inserto: Análisis individual de las muestras compuestas C-14 y C-15 y referencias de variedades

Polinización cruzada

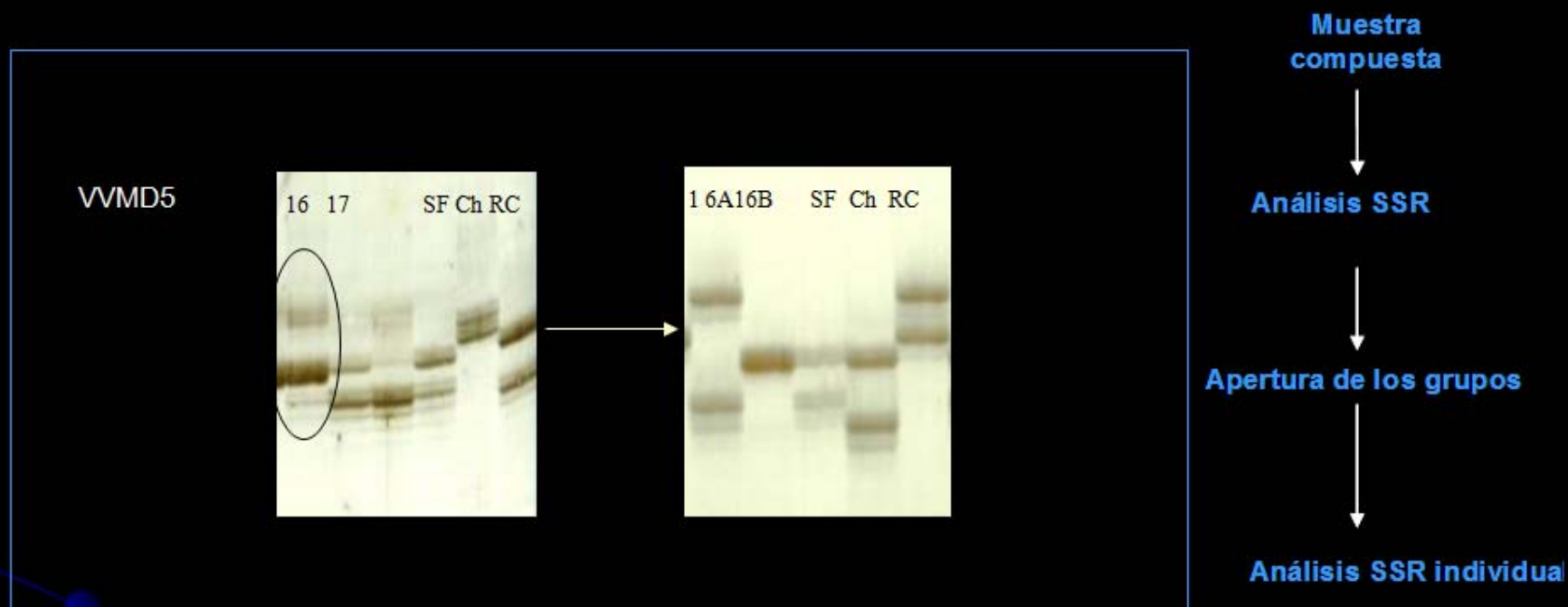


Figura 4. Evento de polinización cruzada. La figura muestra una separación electroforética de reacciones de PCR con marcador VVMD5 para segregantes de San Francisco (muestras N° 16 y 17) de análisis compuesto y los patrones San Francisco (SF), Chardonnay (Ch) y Ruby Cabernet (RC) (figura a). Como en la figura anterior, en la parte (b) de la figura se muestra el análisis individual para la muestra N° 16 (muestras 16A y 16B), comparada con los patrones de San Francisco (SF), Chardonnay (Ch) y Ruby Cabernet (RC).

Mezclas o contaminación

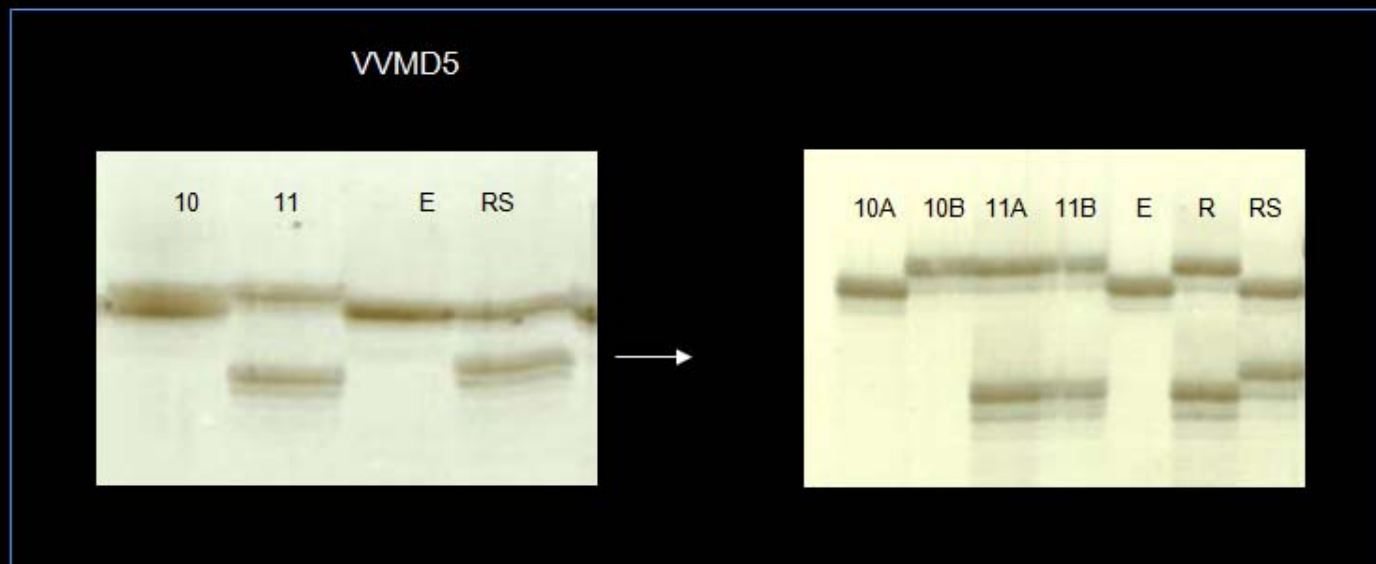


Figura 7. Ejemplo de casos de mutaciones o contaminación por semillas de otras variedades. La figura muestra el análisis de los patrones alélicos de las plántulas hijas del cv. Emperor (10 y 11) en análisis compuesto, comparadas con variedades patrones (E) Emperor y (RS) Ruby Seedless (parte a). la parte (b) de la figura muestra el análisis individual de 10A, 10B, 11A, 11B en comparación con los patrones de los cvs. Emperor (E), Ribier (R) y Ruby Seedless (RS).

Estimación de frecuencia de polinización cruzada en cultivares de vid evaluados

Variedades analizadas	Eventos de polinización cruzada*	Nº de plántulas hijas	Polinización cruzada por variedad (%)	Posible mutación (Nº de eventos)	Mezcla o contaminación (Nº de eventos)
Ribier H23-P8	2 TS- 1CS	132	2,3	1	6
Sauvignon gris H-30 P3	1 CH	40	2,5	1	1
Sauvignonasse H-39-P5	2 TK	62	3,2		10
Red Globe H-57 P34		22			
Enperor H-43 P3		42			3
San Francisco H-32 P3	1 RC	36	2,7		
White Riesling H-49-P4		88			
Sauvignon gris H-30 P1		22			
Cabernet Sauvignon H-35 P32		36			7
Italia Pirovano H-46		12			2
Sauvignonasse H-47-P1		18			
TOTAL	1,37 %	510		0,39%	5,68 %

Conclusiones

- ❖ Los resultados basados en el análisis de marcadores genéticos co-dominantes muestran que existen eventos de polinización cruzada entre distintas variedades de vid, aunque en baja frecuencia (1,4% de las plántulas regeneradas; $n = 500$ plántulas).
- ❖ Todos los eventos de polinización cruzada detectados se verificaron con plantas del entorno más próximo (2 m), es decir, de hileras contiguas del jardín varietal.
- ❖ Esto sugiere que para el manejo de líneas GM de vid la posibilidad de dispersión genética podría ser controlada usando técnicas agronómicas y distancias de aislamiento adecuadas.
- ❖ Análisis más exhaustivo en curso ($n = 1.000$ nuevas plántulas) para ratificar porcentajes de flujo

EN RESUMEN

- Sistema de transformación genética de vides OK, en uso para desarrollo de productos y función de genes;
- Se han obtenido líneas con tolerancia a enfermedades fungosas promisorias
- Desarrollo de nuevos enfoques experimentales basados en cis- o intra-genia en progreso
- Aunque de corta distancia, se ha documentado que el flujo génico es efectivo en vides, pero falta evaluar numerosas variables de manejo y comportamiento de diferentes fondos genéticos

Muchas gracias!

Vid con tolerancia a estrés por frío

