

Genómica de la Resistencia a las Enfermedades del Cacao

Mark Gultinan, Drew Fister y Siela Maximova



PennState
College of Agricultural Sciences

Program in the Molecular Biology of Cacao

Hacia una comprensión del Sistema Inmune de la Planta

La rapidez con la cual reacciona la planta al patógeno determina el resultado.



Inmunidad

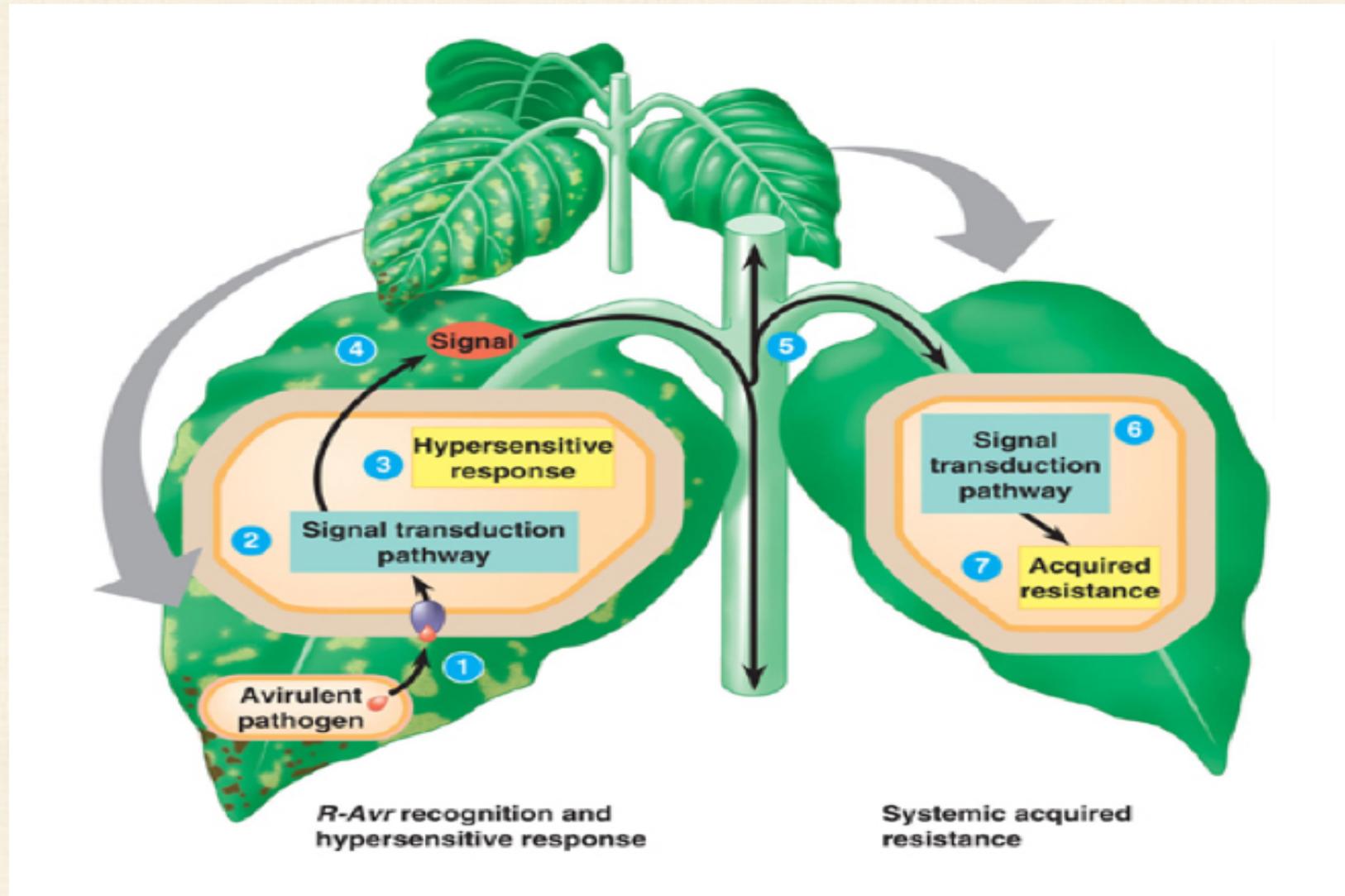


Enfermedad

Pasos clave en las Interacciones Planta-Patógeno

- 1) Reconocimiento de la presencia del patógeno
- 2) Transducción y amplificación de la señal
- 3) Mecanismos complejos de respuesta

Un vistazo al sistema inmune de las plantas





Hacia una comprensión del Sistema Inmune de la Planta

Tres categorías principales de genes

1. Proteínas receptoras
2. Proteínas de transducción de señal
3. Proteínas de respuesta relacionadas con la patogénesis



Preguntas principales

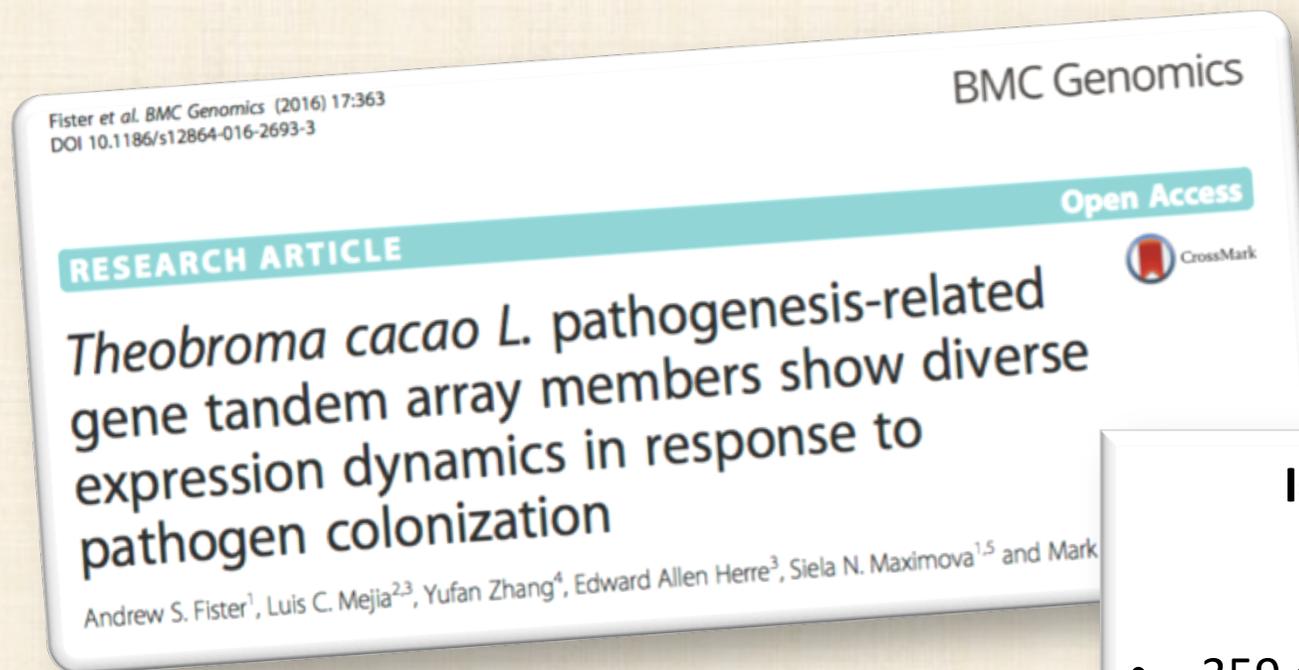
¿Cuáles son los mecanismos de resistencia más importantes para el cacao?

¿Cuáles son los genes que controlan estos mecanismos?

¿Podemos descubrir variantes útiles de estos genes?



Andrew Fister

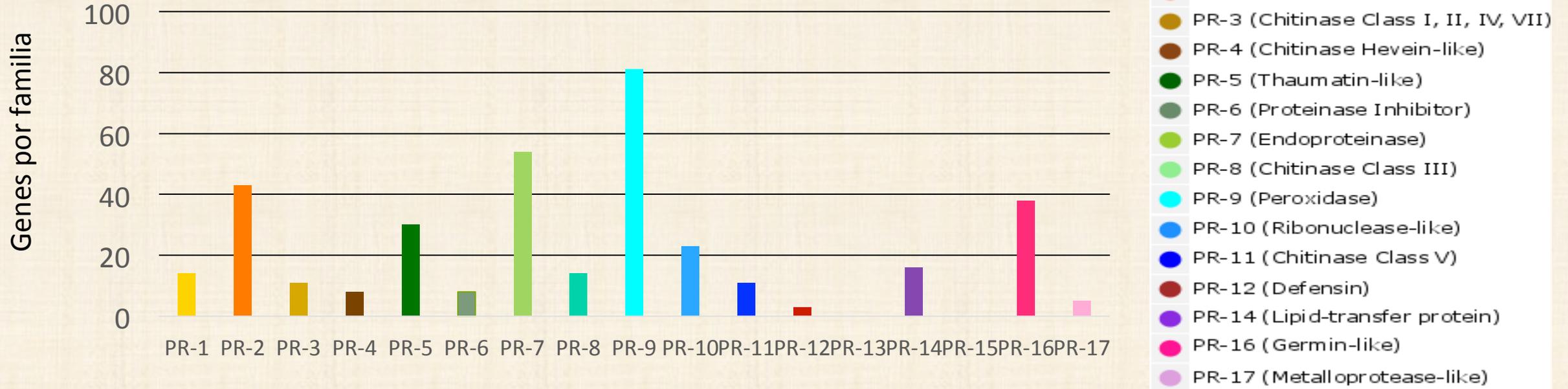


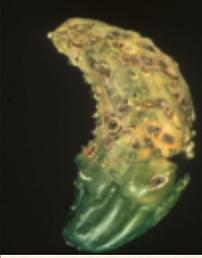
Identificó y anotó todos los Genes PR del cacao

- 359 genes
- 45 Genes de quitinasa en 4 familias multigénicas
- Perfiles de expresión de genes complejos
- Respuesta transcripcional compleja a la infección por *Phytophthora*

Existen 15 familias PR en el cacao, y los tamaños de las familias oscilan entre 3 y 81.

359 genes PR del cacao en total





Funciones de las proteínas relacionadas con la patogénesis

Degradación de la pared celular

43 11 8 54 14 11
PR-2, PR-3, PR-4, PR-7, PR-8, PR-11

Degradación de la membrana

30 3 16
PR-5, PR-12, PR-14

Degradación/Inhibición de las proteínas

8 54 5
PR-6, PR-7, PR-17

Degradación de ADN y ARN

8 23
PR-4, PR-10

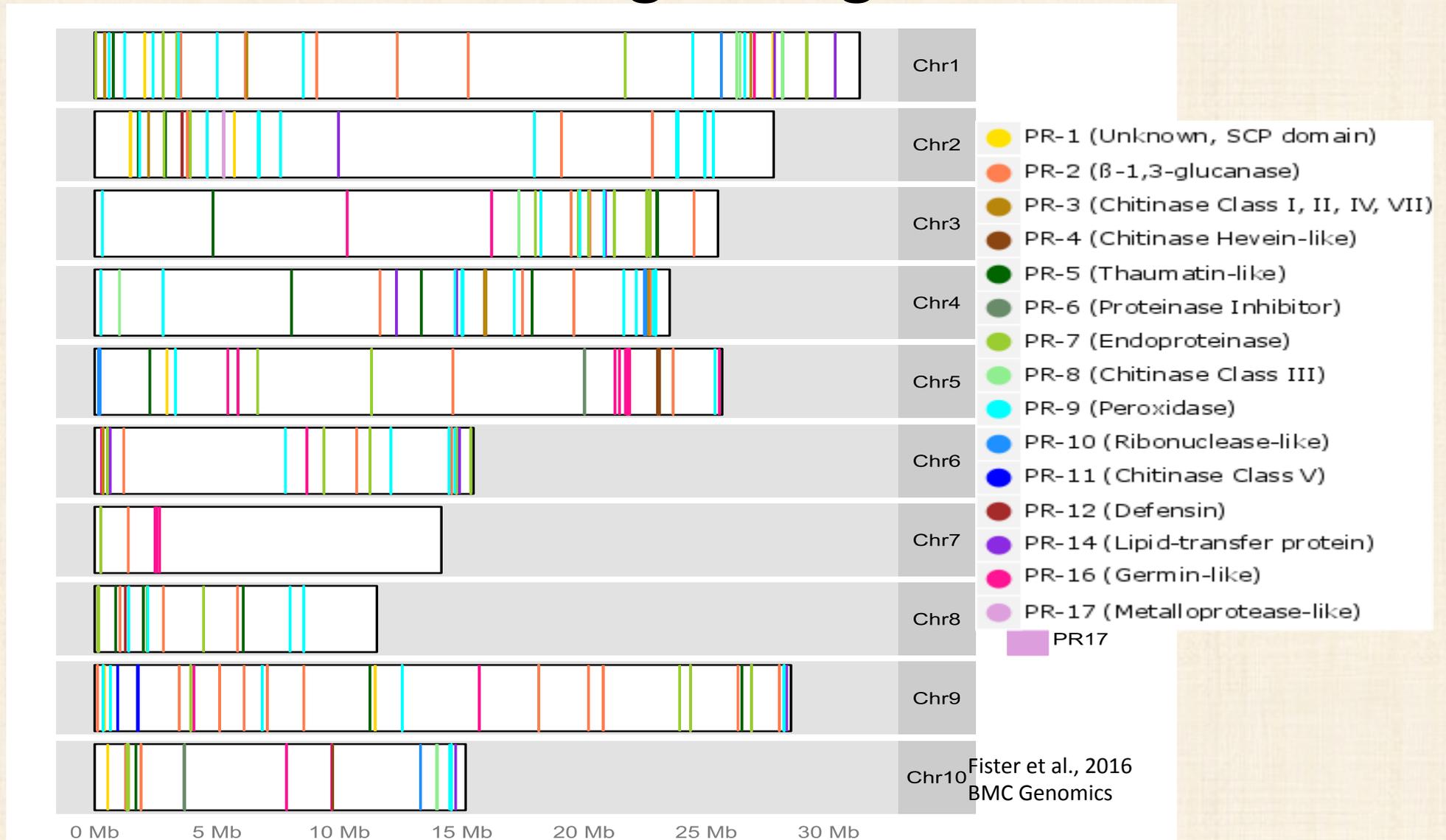
Generación de especies oxígeno-reactivas

81 38
PR-9, PR-16

Modificación de la pared celular

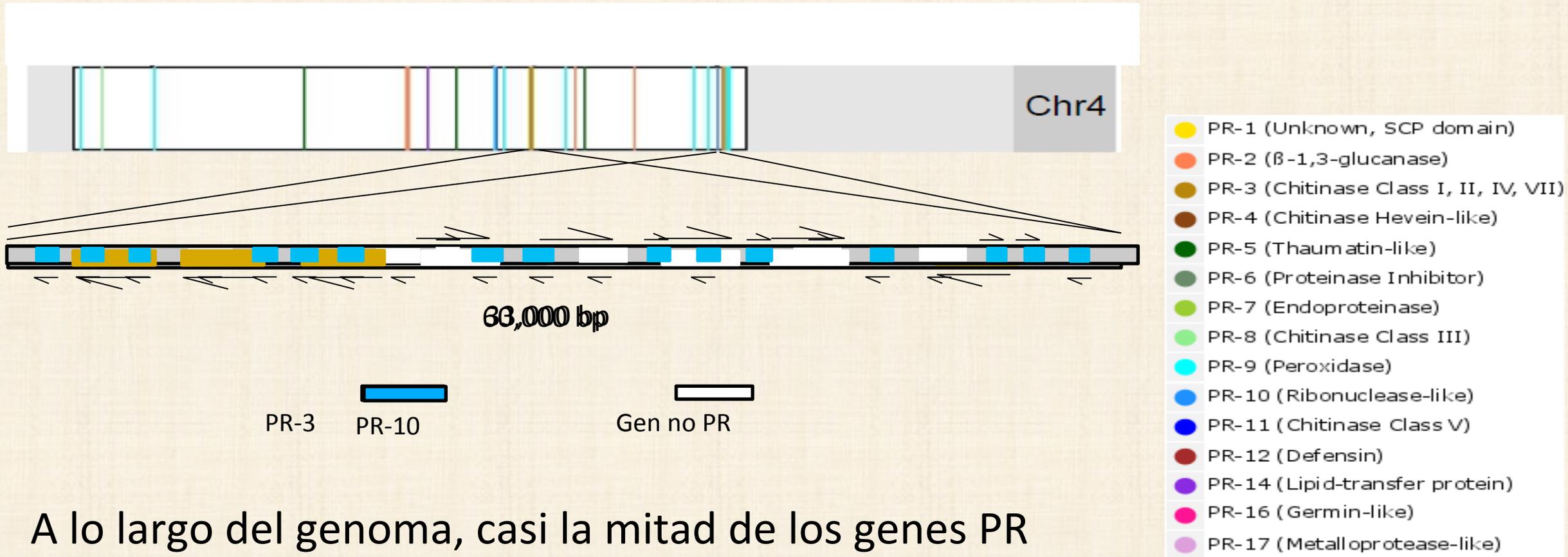
81
PR-9

Los genes y familias se encuentran dispersos a lo largo del genoma



Fister et al., 2016
BMC Genomics

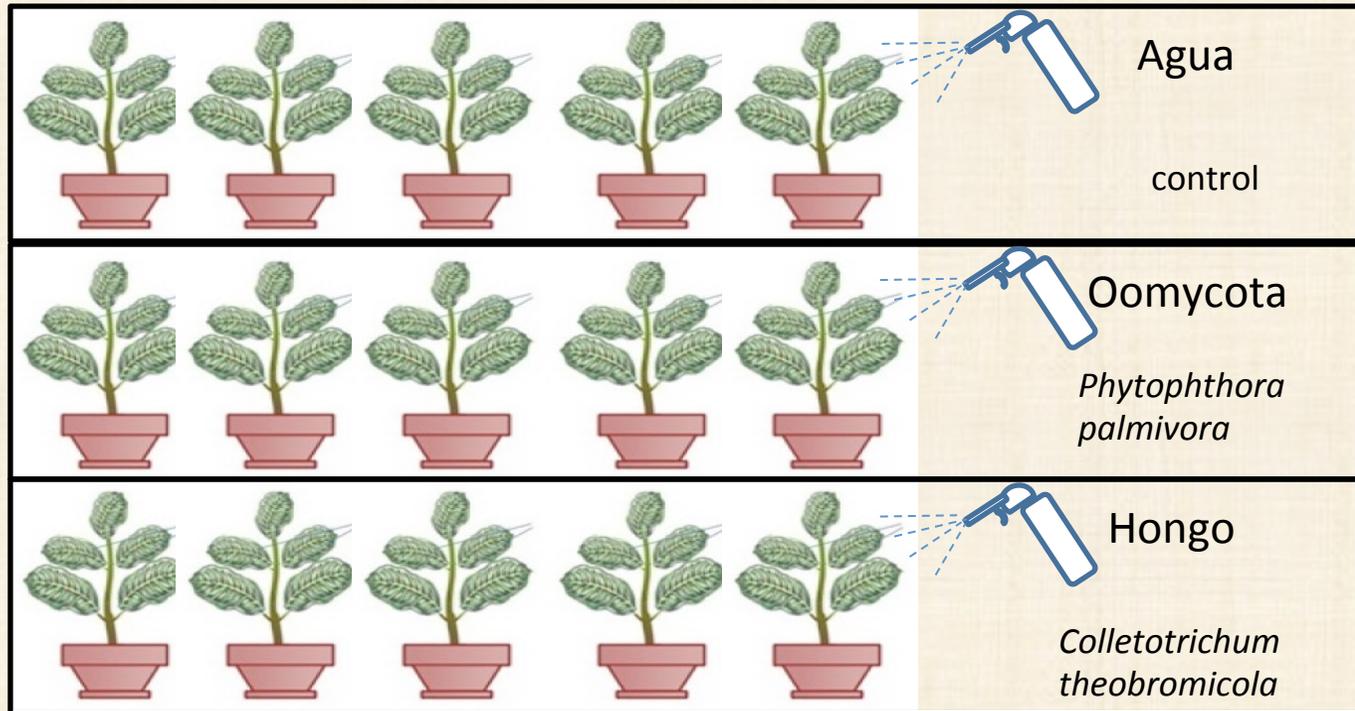
Las distribuciones grupales son una característica común de las familias de genes PR



A lo largo del genoma, casi la mitad de los genes PR se encuentran **densamente aglomerados**.

Dentro de las grandes familias, ¿qué tan diversos son los perfiles de expresion?

Diseño Experimental:



N = 5 plántulas para cada tratamiento
Genotipo: Semillas derivadas de UF17

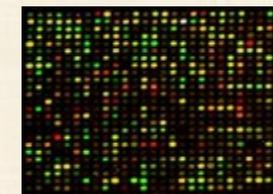
Hybridizadas 46,000, para sondeo de todas las variedades genómicos.
Analizado mediante RMA y LIMMA.



ARN Total

ARN Total

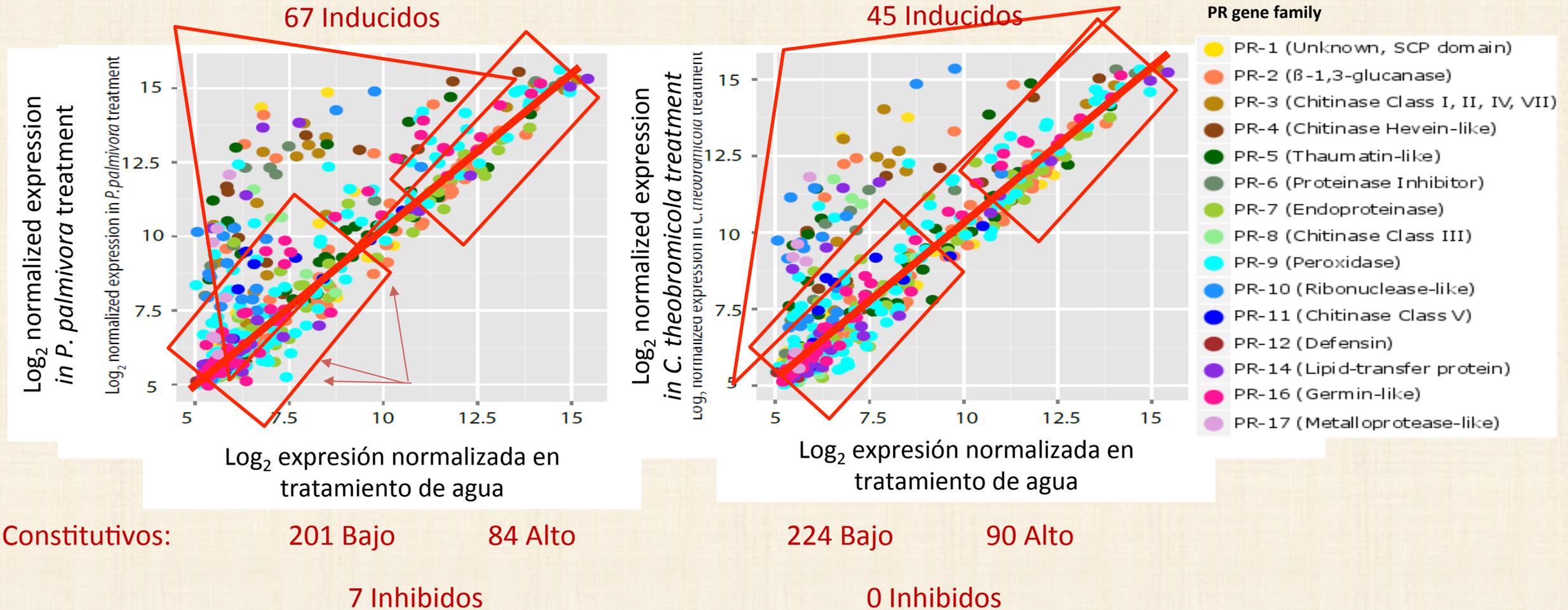
ARN Total



Dr. Luis Mejia Dr. Allen Herre
Smithsonian Tropical
Research Institute



Entre familias, los genes PR tuvieron **diversos** perfiles de expresion.

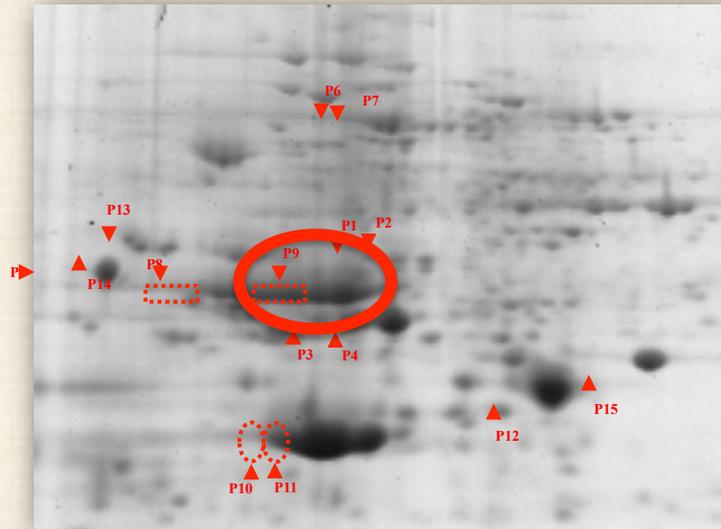


ESTUDIO DE CASO DE GENÓMICA FUNCIONAL

Quitinasa

Program in the Molecular Biology of Cacao

Pod Proteins 2-D Gel



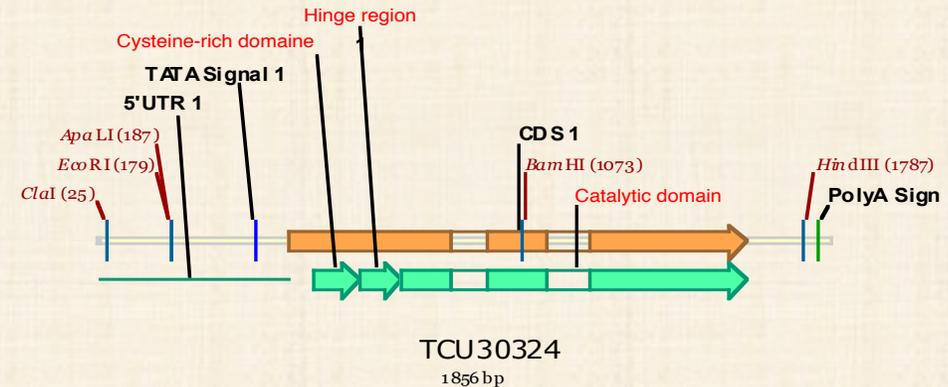
Endoquinasa ácida

Separación por electroforesis de gel 2-D

Identificación de Proteínas - LC-Mass Spec

Niemenak, N., Kaiser, E., Maximova, S. N., Laremore, T. & Guiltinan, M. J. (2015) Proteome analysis during pod, zygotic and somatic embryo maturation of *Theobroma cacao*. *Journal of Plant Physiology* 180, 49-60

1995 - Gene Cloned



Snyder-Leiby, T.E., and Furtek, D.B. (1995). A genomic clone (Accession No. U30324) from *Theobroma cacao* L. with high similarity to plant class I endochitinase sequences. *Plant Physiol.* 109, 338.



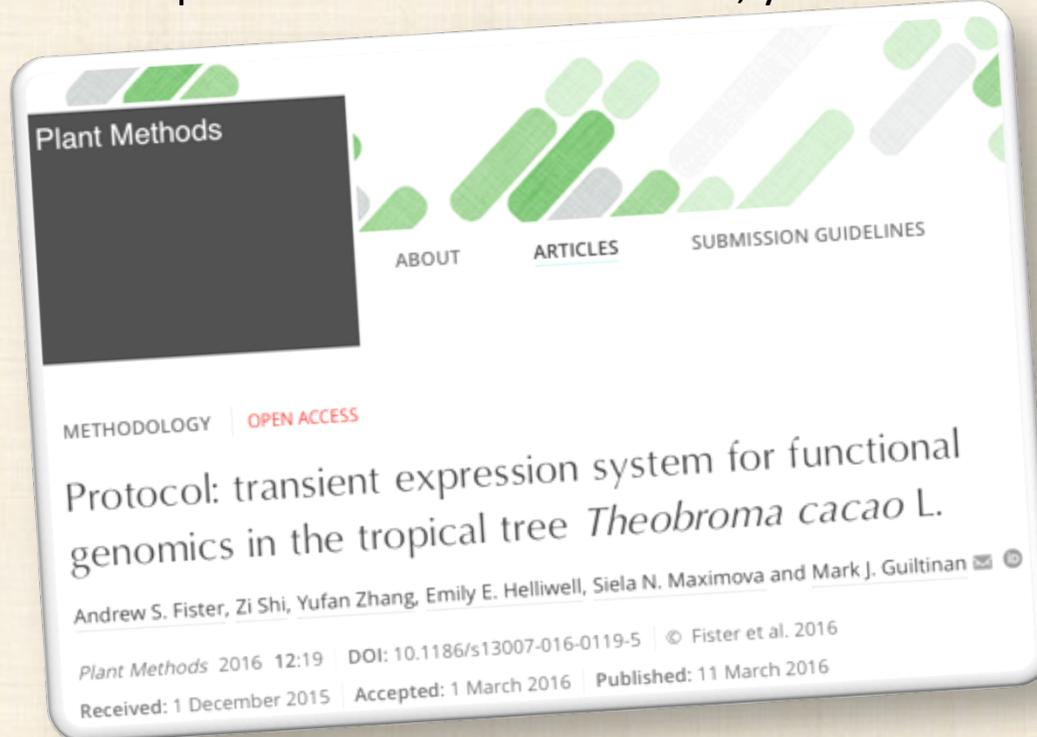
Genómica funcional del gen de la quitinasa

Abordaje:

Aumentar el nivel de expresión de un gen
Adelantar un bio-ensayo de enfermedades de la planta para medir el efecto

Técnicas:

Expresión temporal: 2-7 days, no en todas las células
Expresión estable: Permanente, y en todas las células

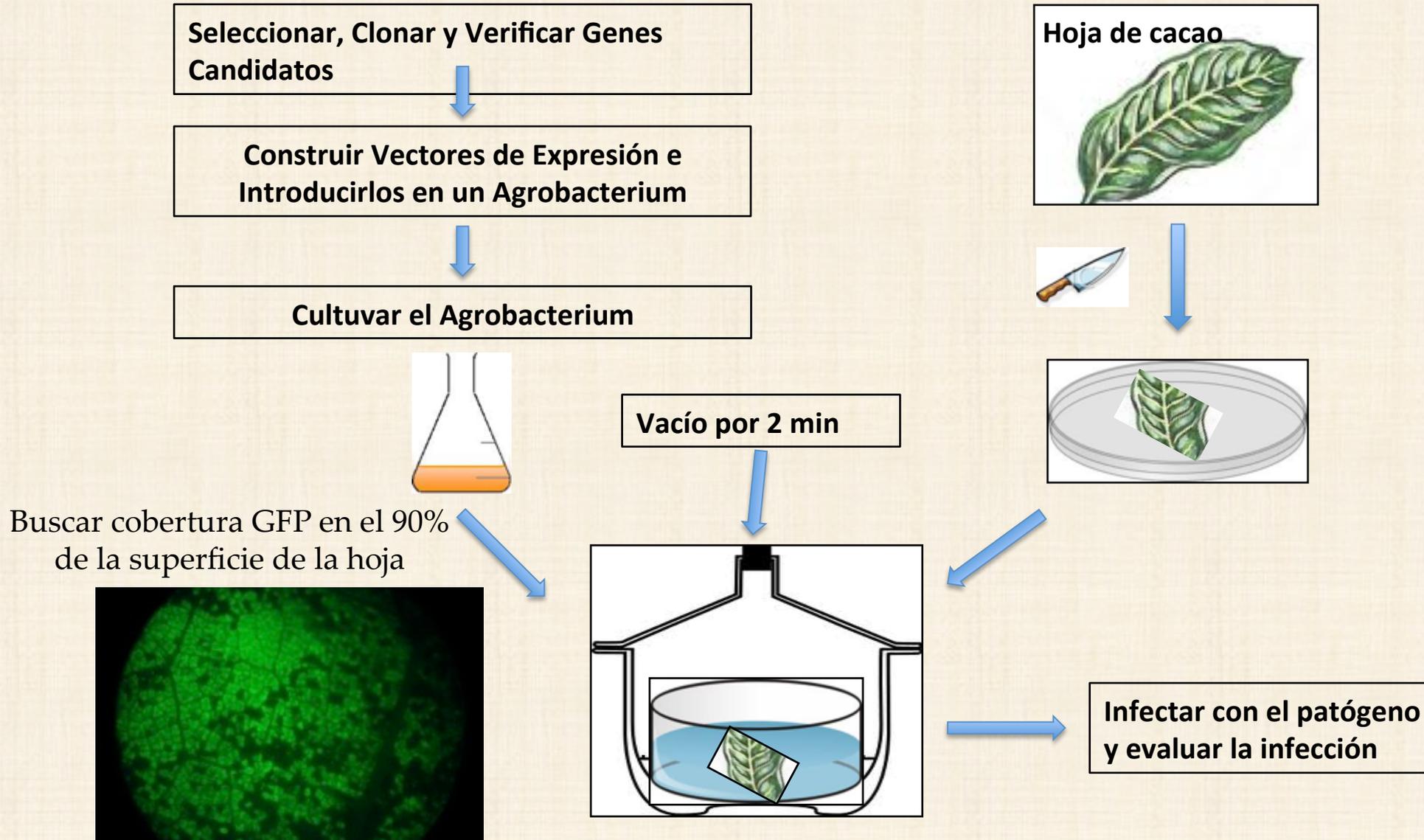


Equipo del Estudio

Andrew Fister
Zi Shi
Emily Helliwell

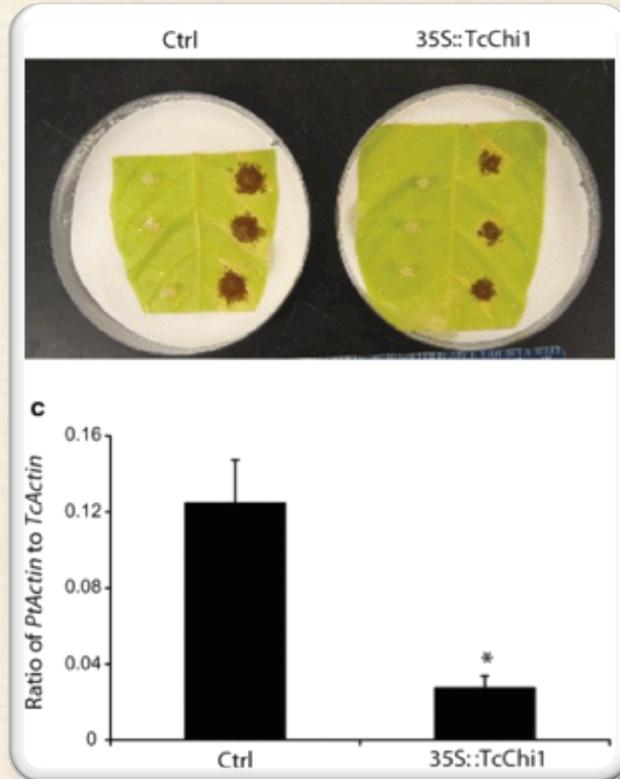


Ensayo de Expresión de Genes – Candidato Transitorio



El Aumento en la Expresión del gen de Quitinasa Aumenta fuertemente la resistencia a la Enfermedad

Expresión Transitoria en Hojas



- Aumento en expresión de 6 veces
- 4 veces menos replicación del patógeno

Expresión Estable de Alto Nivel

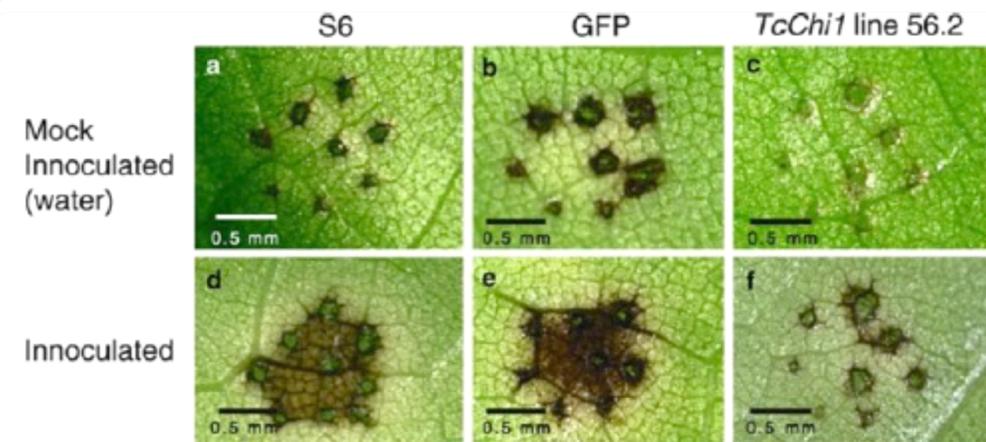
Planta (2005)
DOI 10.1007/s00425-005-0188-6

ORIGINAL ARTICLE

Siela N. Maximova · Jean-Philippe Marelli · Ann Young
Sharon Pishak · Joseph A. Verica · Mark J. Gultinan

Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*

Received: 1 September 2005 / Accepted: 16 November 2005
© Springer-Verlag 2005



El tamaño de la lesión es 3 veces menor

NUEVO PROYECTO

Descubrimiento y Caracterización Funcional de los Genes que Regulan la Inmunidad de las Plantas en los Cultivos Perennes

Mark Gultinan - Genómica del Cacao

Siela Maximova - Genómica Funcional

Claude dePamphillis - Genómica Evolutiva

James Marden - Genómica Evolutiva

Peter Tiffin, Univ. of Minnesota - Genómica de Población

Dapeng Zhang, USDA ARS Beltsville - Diversidad genética

Désiré Pokou, CNRA, Ivory Coast, West Africa – Reproducción

Wilberth Phillips and Mariela Leandro, CATIE, Costa Rica -

Colección de Germoplasma y Fitopatología



Objetivos principales

Selección de genes candidatos para la resistencia a las enfermedades empleando un nuevo enfoque genómico desarrollado en PSU para árboles tropicales

1. Evaluar la diversidad genómica dentro del cacao resecuenciando los genomas con fenotipos de resistencia extrema y antecedentes genéticos
2. Secuencia de transcriptomes para corroborar modelos de genes, identificar las variantes de empalme y caracterizar las respuestas a la infección por patógenos
3. Identificar genes con mayor probabilidad de ser importantes en su impacto contra la resistencia cuantitativa a patógenos
4. Verificar las funciones de estos genes





Embriogénesis Somática

- Método para la multiplicación rápida y en gran escala de plantas.
- Las plantas se generan sin una fertilización y son genéticamente idénticas a los padres.
- Se hace en cultivo estéril.
- Puede utilizarse para la producción de plantas libres de enfermedades.
- Almacenamiento de germoplasma mediante crioconservación.





Artículos sobre Embriogénesis Somática del cacao

HORTSCIENCE 41(3):753-758. 2006.

**Effects of ...
Type of ...
Four C**

Abdoulaye T.
School of For
Park, PA 1680

Mark J. Guil
Department of
Sciences Buil

In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant not known
© 2003 Society for In Vitro Biology
1054-5476/03 \$10.00+0.00

MICROPROPAGATION

ABD

Department of Horticulture, C

In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant (2008) 44:487-493
DOI 10.1007/s11627-008-9130-5

EMBRYOGENESIS/SOMATIC EMBRYOGENESIS

Field performance of *Theobroma cacao* L. plants propagated by somatic embryogenesis

S.N. Maximova, A. Young, S. Pishak, C. ...
propagation of *Theobroma cacao* L., In: *Forestry Sciences*, Vol. 77, Jain, S. Moha
Netherlands, ISBN: 1-4020-2984-5

In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant
© 2002 Society for In Vitro Biology
1054-5476/02

INTEGRATED SYSTEM FOR PE

SIELA N. MAXIMOVA
Department of Horticulture, C
CIRAD, TA 80

(Received 7 Febr

Department of Horticulture
Penn State University
16802-4200

January 1998; accepted 2 July 1998; editor P. Ozi

Bioversity International



SUPPLYING NEW COCOA PLANTING MATERIAL TO FARMERS: **A review of propagation methodologies**

Authors and reviewers: Augusto Roberto Sena Gomes, George Andrade Sodré, Mark Gultinan, Rob Lockwood and Siela Maximova
Editors: Bricette Laliberté and Michelle End



Pruebas de Campo de las Tecnologías de Clonación *In Vitro* 1999 - 2016



Ecuador

Santa Lucía

Puerto Rico

Indonesia

Brasil

Ghana

Costa de Marfil

Malasia



Ecuador



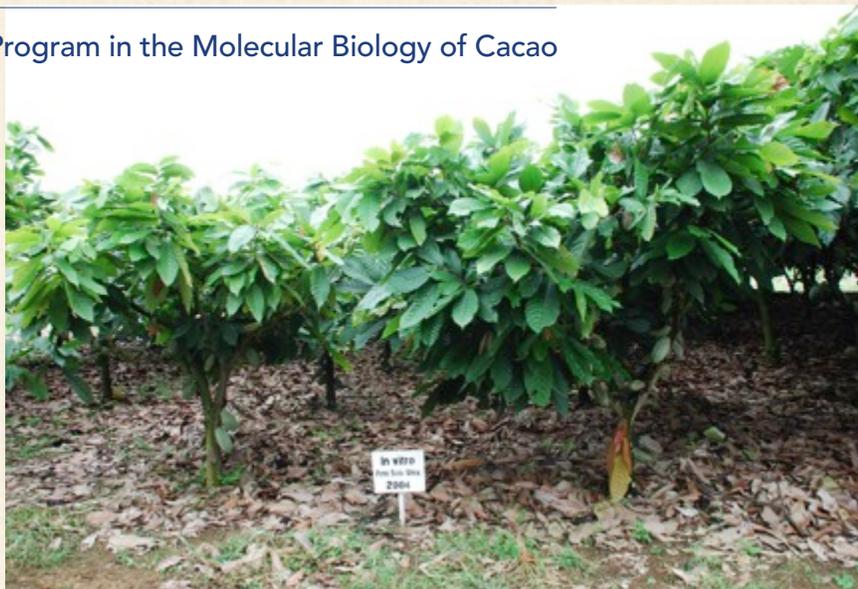
Ghana - África Occidental



Brasil



Program in the Molecular Biology of Cacao



Prueba en campo en La Finca de Nestle en Ecuador (Pruebas en cacao nacional desde 1999)



**Rendimiento promedio de 2.6 t/ha con
plantas de embriogénesis somática**



PennState
College of Agricultural Sciences



Program in the Molecular Biology of Cacao

Colaboración con el USDA ARS Puerto Rico

Ricardo Goenaga



HortScience

[HOME](#) | [HELP](#) | [FEEDBACK](#) | [SUBSCRIPTIONS](#) | [ARCHIVE](#) | [SEARCH](#)

Yield Performance and Bean Quality Traits of Cacao Propagated by Somatic Embryos and Somatic Embryo-derived

Ricardo Goenaga²

Mark Guiltinan and Siela Maximova

Ed Seguire

Heber Irizarry¹





Adopción a gran escala de la embriogénesis somática en Indonesia

100 Millones de Embriones Somáticos de Cacao

Instituto de Investigación del Café y el Cacao de Indonesia (ICCRI)



Nuevo Proyecto

Transportadores de Cadmio en Cacao

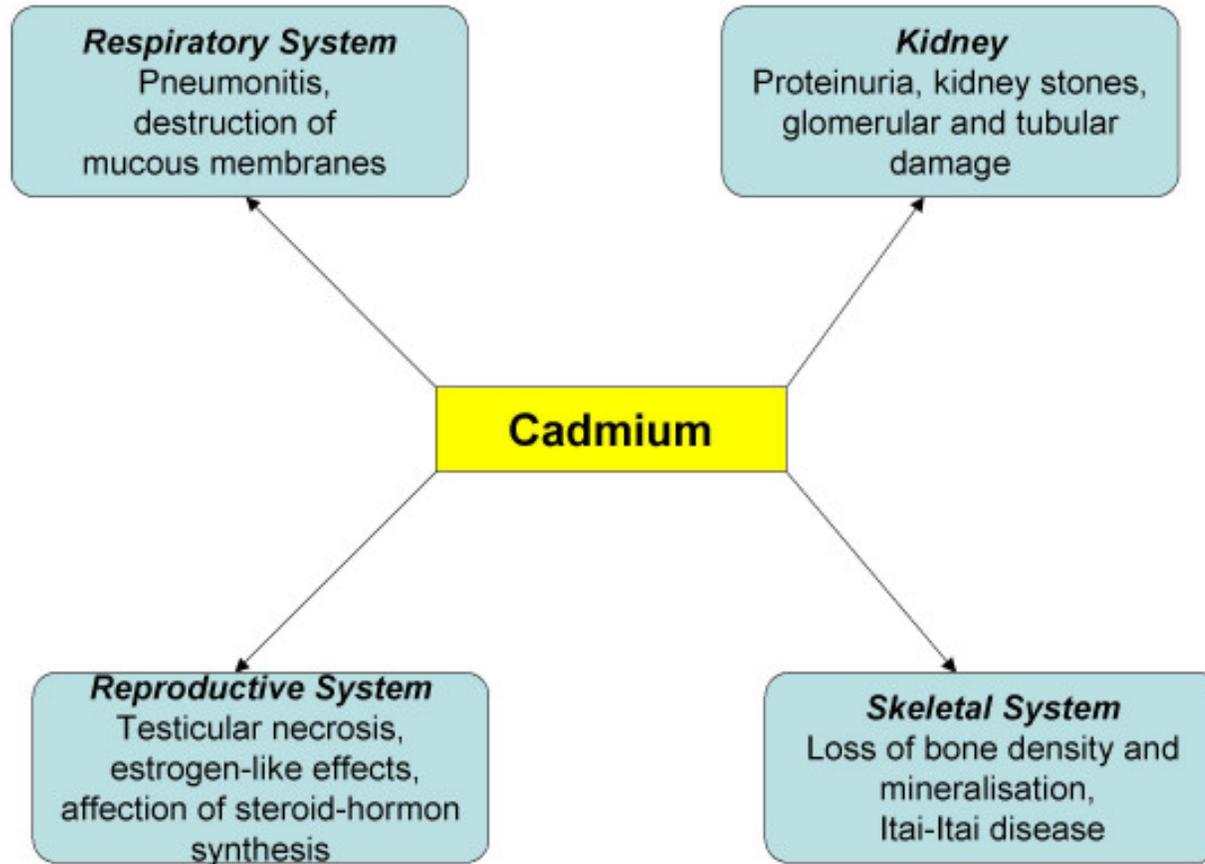
**Investigación Conducida Por JAIME ANDRÉS OSORIO GUARÍN
de CORPOICA
BECARIO BORLAUG**

AGOSTO DE 2016

UNIVERSIDAD ESTATAL DE PENNSYLVANIA

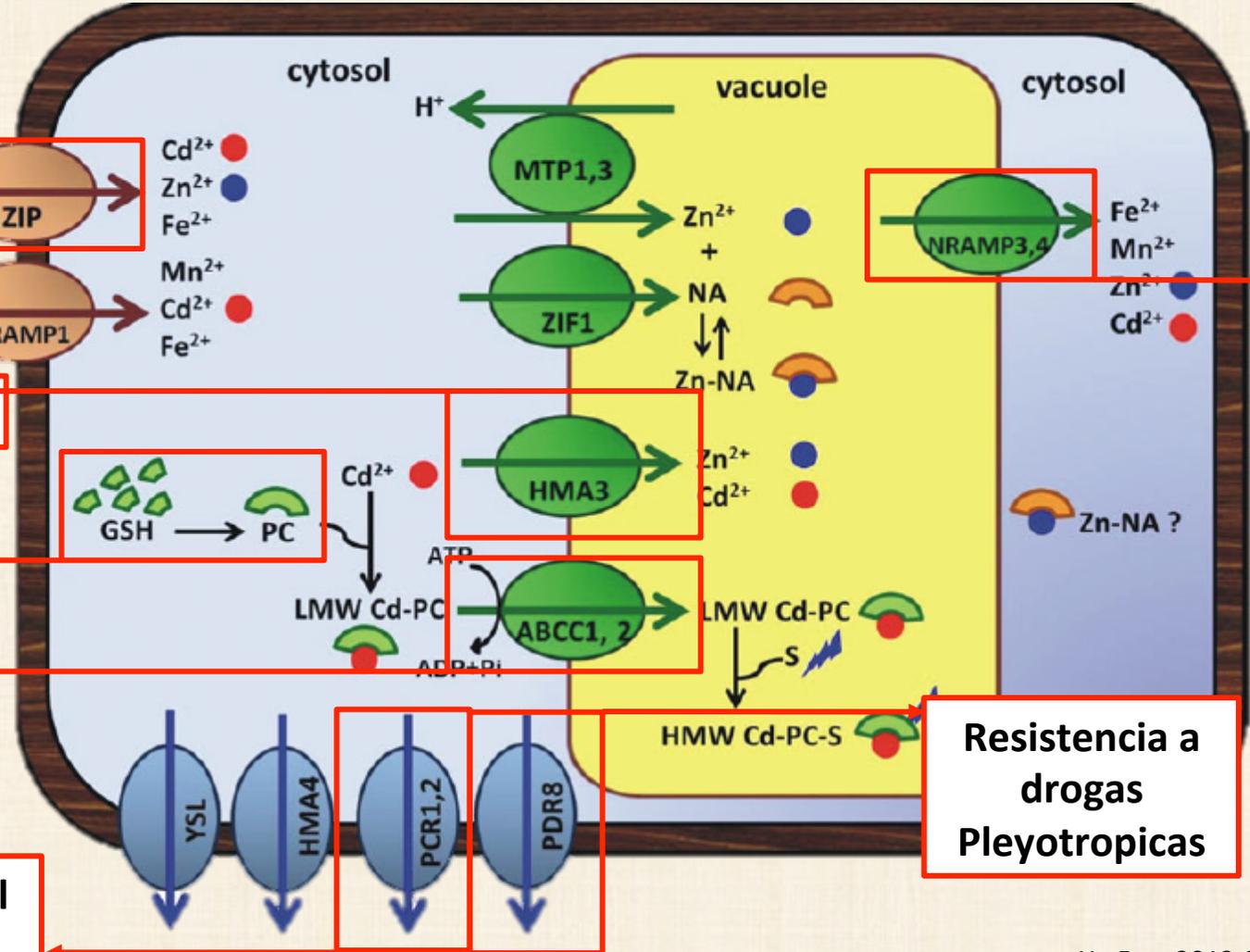


Los altos niveles de cadmio pueden afectar diferentes órganos en humanos



Godt et al., 2006
J Occup Med Toxicol. 2006; 1: 22.

Familias genéticas relacionadas al transporte de cadmio



Transportes regulados x Zinc

ATPasas de metales pesados

Fitoquelatinas de Glutación

Casete Aglutinante de ATP Miembro de Subfamilia C

Resistencia al cadmio en plantas

Resistencia natural asociada a proteínas macrofagas

Resistencia a drogas Pleyotropicas

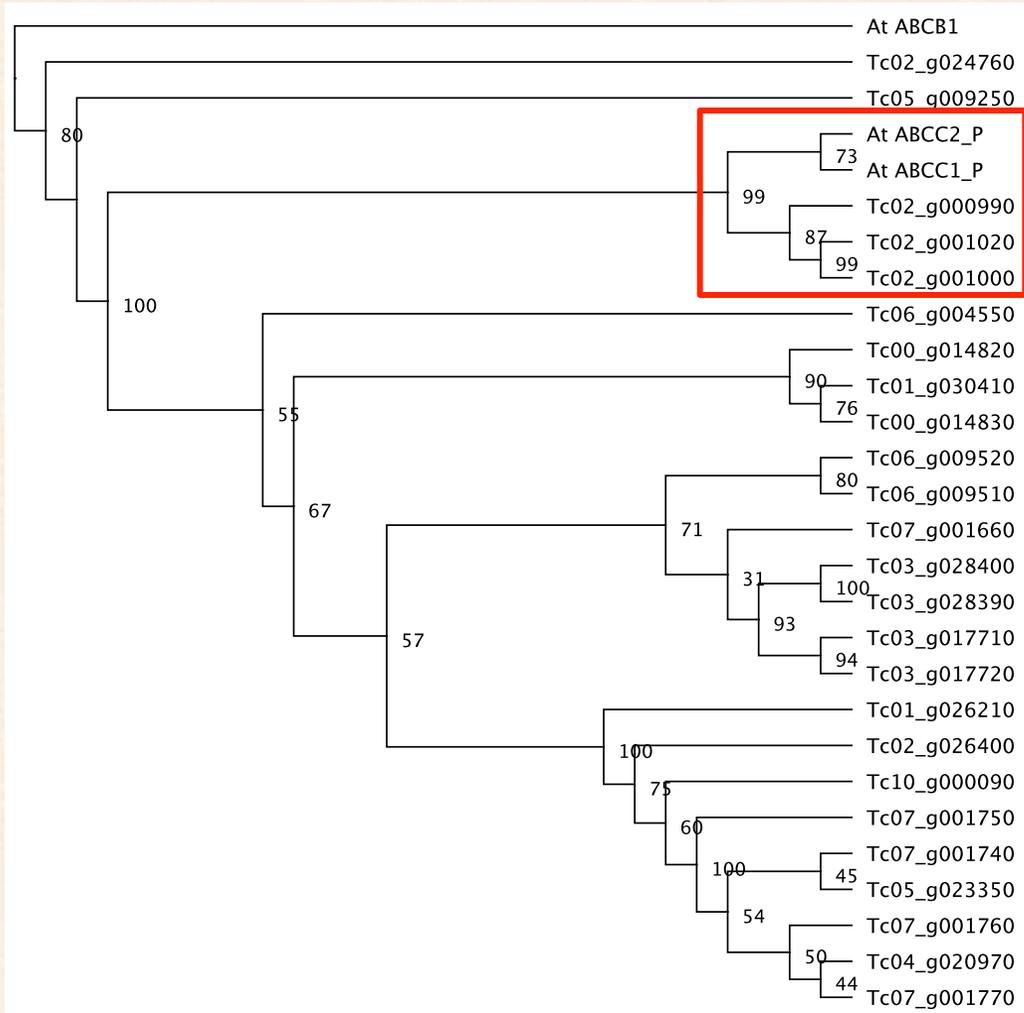
Zn-NA
Fe-NA
Ni-NA
Cd²⁺
Zn²⁺

OBJETIVOS

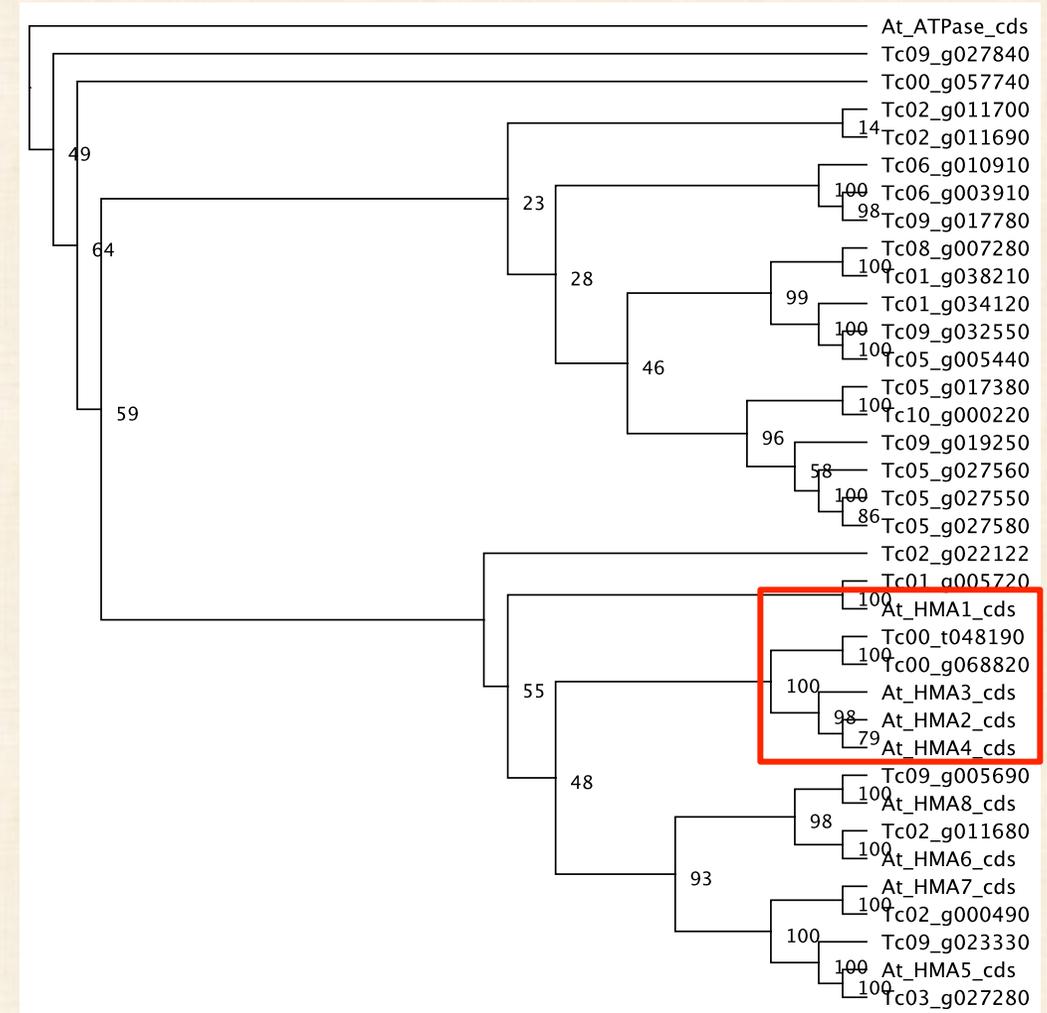
- Identificar y seleccionar genes candidatos involucrados en la desintoxicación por cadmio en *Theobroma cacao*.
- Desarrollar una valoración funcional para evaluar la función de genes relacionados al cadmio en *Theobroma cacao*.



Árboles filogenéticos que muestran ortología con los genes arabidopsis

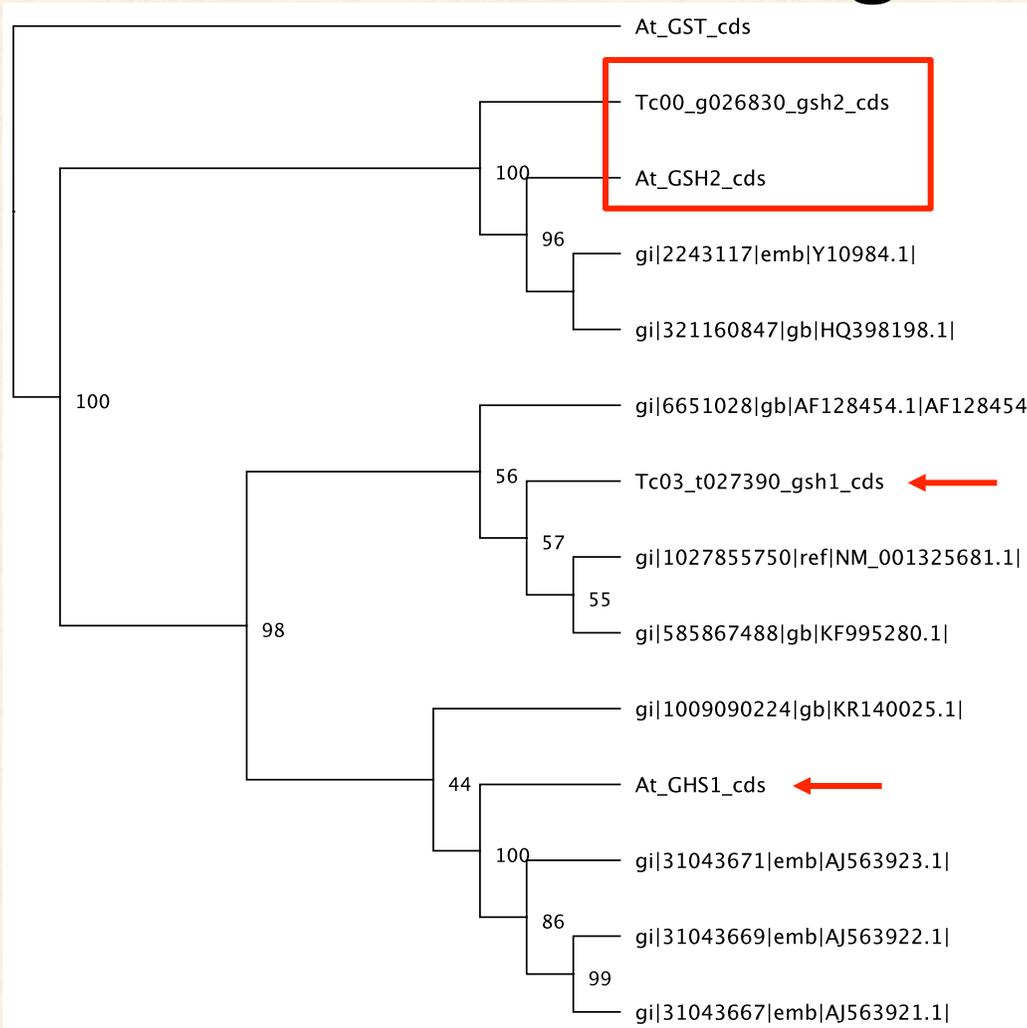


FAMILIA ABCC

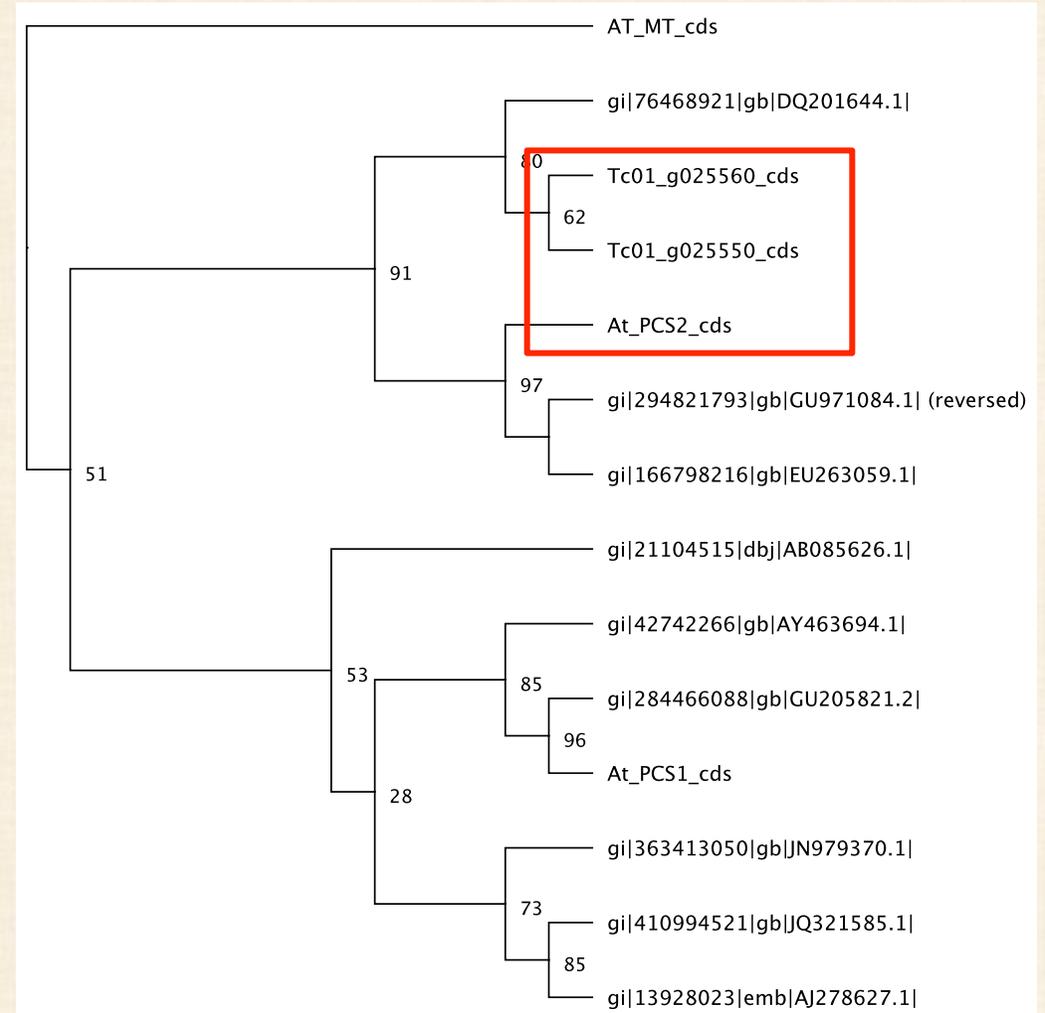


FAMILIA HMA

Árboles filogenéticos que muestran ortología con los genes arabidopsis



FAMILIA GSH

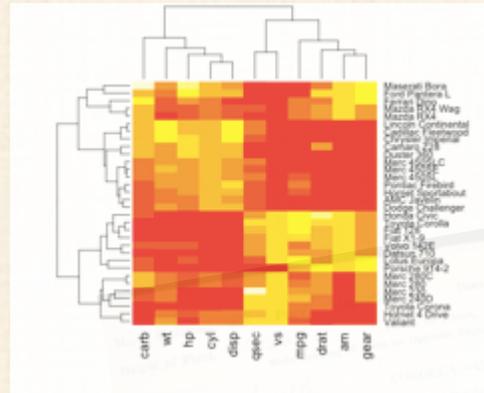
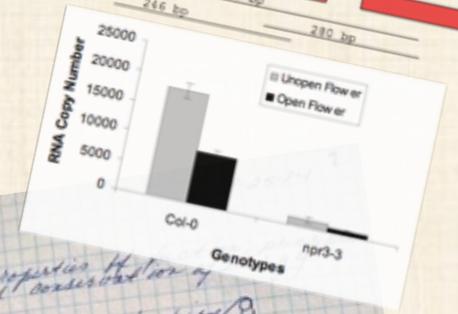
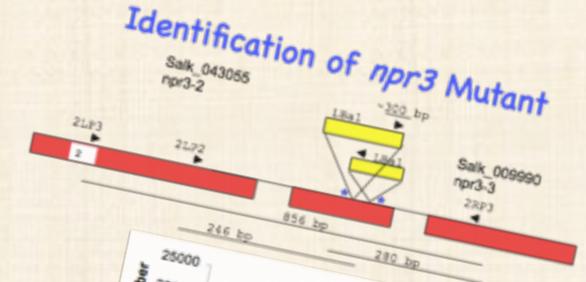


FAMILIA PCS

Plan Futuro Para Elementos Genómicos Del Cadmio En Cacao

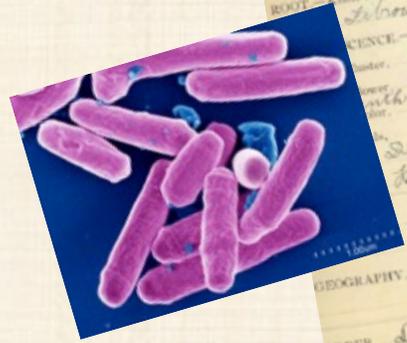
- Caracterización Genómica
- Pruebas Funcionales de Funciones Genómicas
- Filtrar el Germoplasma en Cuanto a Variación Genética Natural en Genes Relacionados con CD (expresión y variación alélica)
- Desarrollo de Estrategias para Enfoques Genéticos del Problema Cd en Cacao

Muchas Gracias!



...at #3
...to study properties of
...of work and conservation of
...the coefficient of friction
 $\mu = \frac{F}{W}$
 $\mu = \frac{F}{W} = \frac{W \sin \theta}{W \cos \theta}$
 $\mu = \tan \theta$

② to prove conservation of energy.
% difference = $\frac{A - A_2}{A} \times 100 =$
2 F.O.L = 51 = 6.1



...May 20
...date.

LEAF.—Type. <i>Linear</i>	No. of Flowers. <i>Union.</i>
General Outline. <i>Acute</i>	Insertion. <i>Union.</i>
Apex. <i>Perforate</i>	STAMENS.—No. <i>6.</i>
Base. <i>Entire</i>	Union. <i>Distinct</i>
Margin. <i>Parabolic</i>	Insertion. <i>Opposite</i>
Venation. <i>Radial</i>	Attachment to Anthers. <i>Insert</i>
Position. <i>Alternate</i>	Aspect. <i>Introva</i>
Arrangement. <i>Endogen</i>	PISTILS.—No. <i>1</i>
STEM.—Structure. <i>Cotyled bulb</i>	Type. <i>Compound</i>
Kind. <i>Cotyled bulb</i>	Placentation. <i>Wallof</i>
ROOT.—Kind. <i>Stolon</i>	Placentation. <i>3006</i>
SCIENCE.—Determinat. <i>Racem</i>	No. of Cells. <i>3006</i>
Order. <i>Rev. Reg.</i>	Insertion of Ovary. <i>Superior</i>
with <i>no. hild</i>	FRUIT.—Kind. <i>Simple</i>
<i>live</i>	Seed Vessel. <i>Reby</i>
<i>Distinct</i>	Dehiscence. <i>Many</i>
<i>Opposite</i>	USE. <i>Ornament.</i>
<i>Latin</i>	PROPAGATION. <i>Steds.</i>
GEOGRAPHY. <i>Ironcliff.</i>	
ORDER. <i>Liliaceae</i>	COMMON NAME. <i>Star of Bethlehem Plant.</i>
GENUS. <i>Ornithogalum</i>	LOCALITY. <i>Gardens.</i>
SPECIES. <i>Noctua</i>	NATURE OF SOIL. <i>Samp.</i>

Star of Bethlehem Plant.
Family—Lily.
Single Flower

