



Técnicas moleculares aplicadas a la sanidad forestal

Jonàs Oliva

Dept. Forest Mycology and Plant Pathology
Swedish University of Agricultural Sciences
Uppsala - Suecia



Uppsala BIOCENTER

5 profesores
25 investigadores
18 estudiantes de doctorado

Control biológico
Genómica
Ecología microbiana
Patología forestal
Patología vegetal

Heterobasidion annosum s.l.

Modelización

Epidemiología

Control

Detección

Respuestas del huésped: crecimiento vs. defensa

Nuevos retos de mayor complejidad



Phytophthora ramorum en Tanoak (*Lithocarpus densiflorus*) y en California en *Larix kaempferi* in UK (Brasier & Webber, 2010)

Triángulo - interacción



Ambiente

Enfermedad

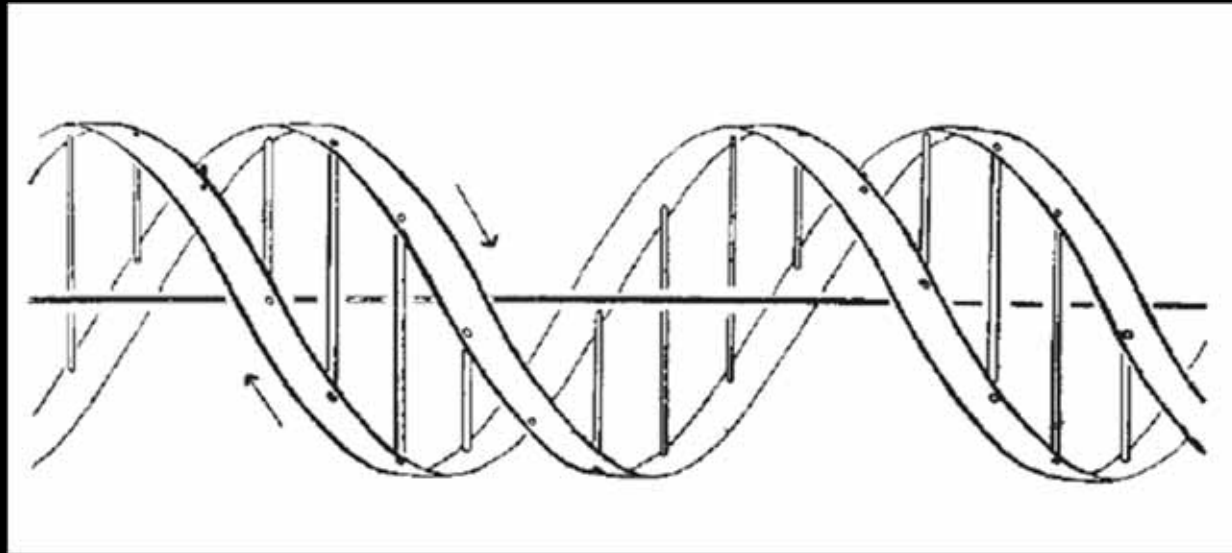


Huésped

Patógeno



Por qué estudiar el ADN?

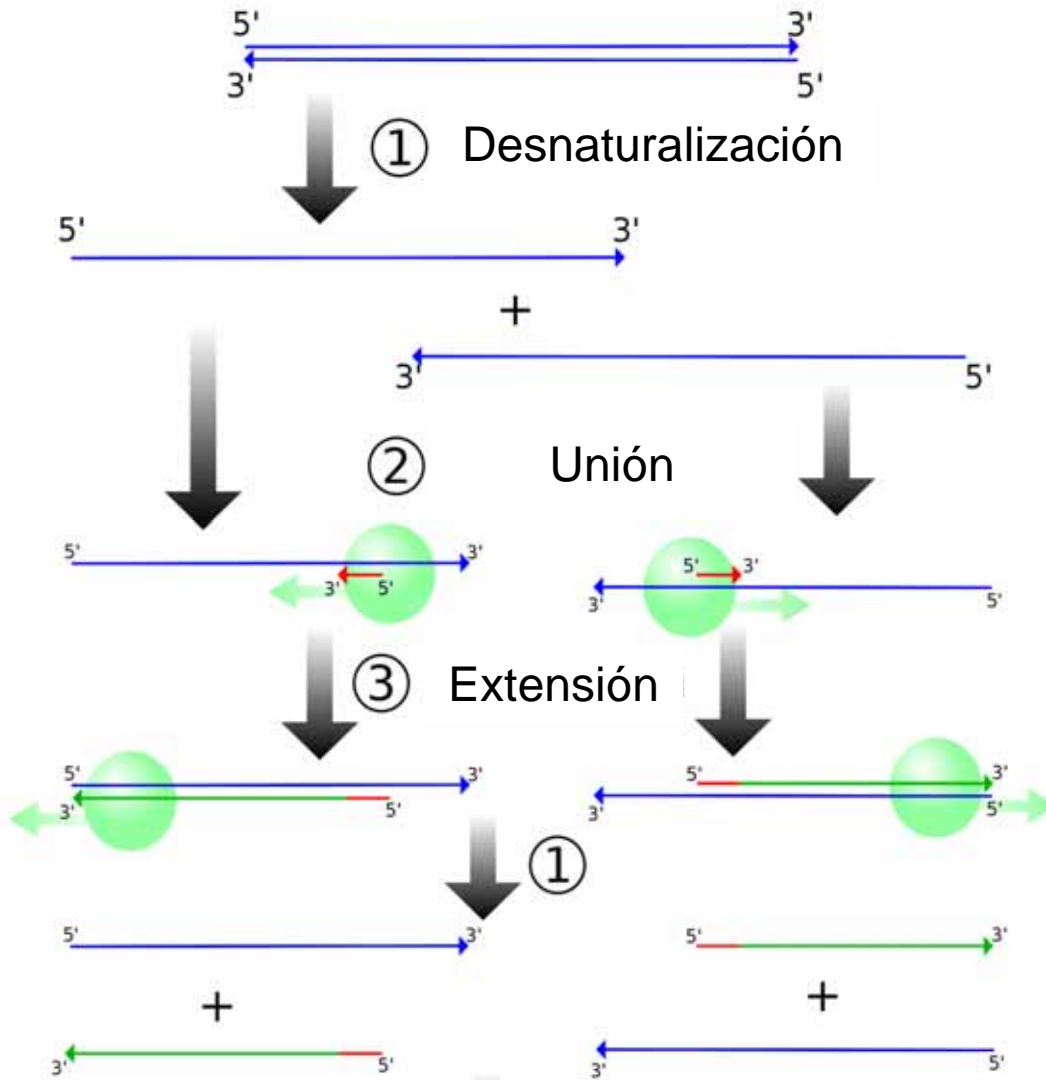


Por que es donde está la información!

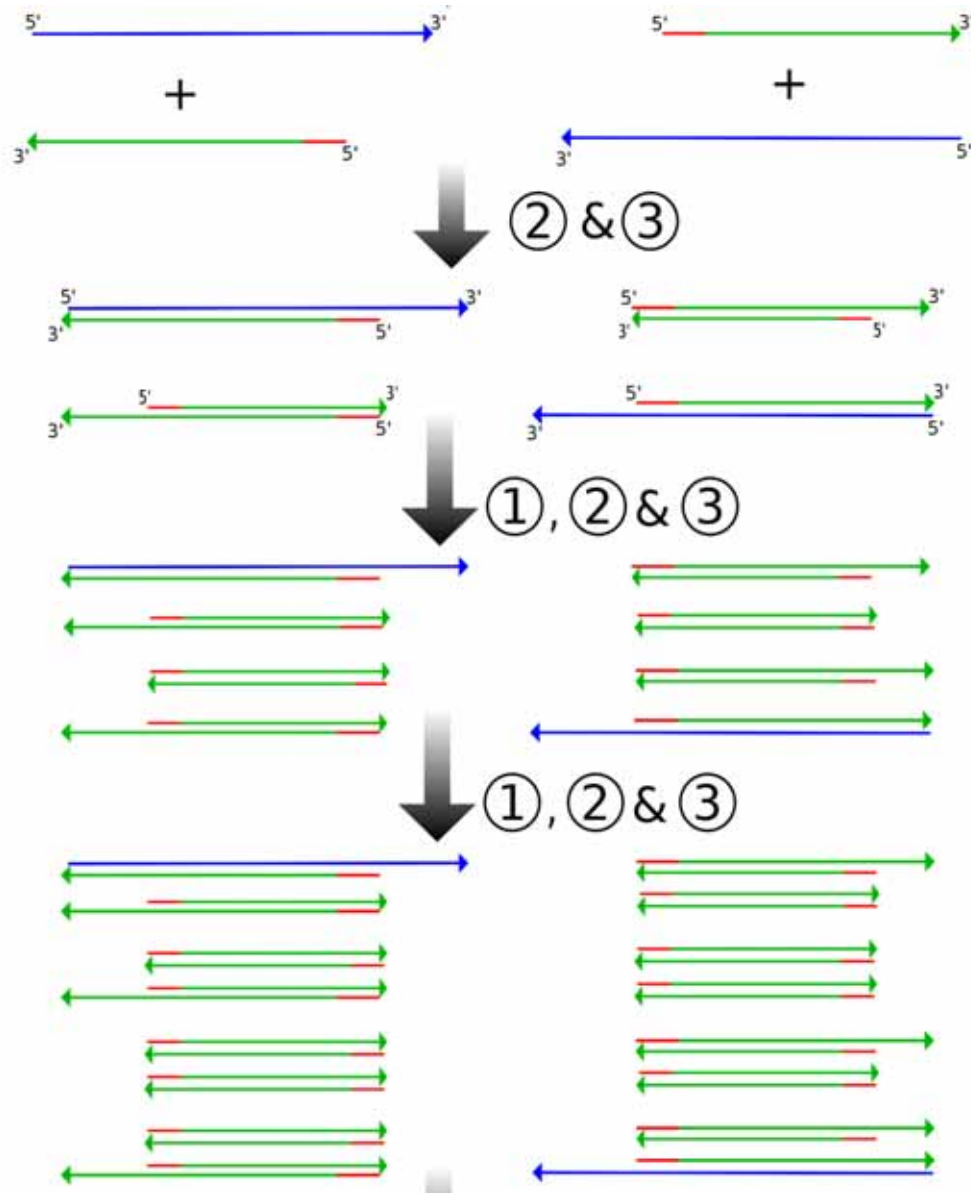
TCCGTGCTCGAAACGATGATGTTGGTGTGCGCACATTAGACTTGTGTTTAAATAGAGCTTTGCTCGTGAACCAAATATGGTGGGCTGGGTTG
TCTTTGTGGAAACGCTTAGGCGACTTGTCTACGAATTGTAATCATAATATGGGCGGCGGTGAATCCTTTGCAGACGACTTGAATGGGAAC
GGGGTACTGTAAGTGGTAGAGTAGCCTTGTTGCTACGATCCACTGAGGTTAAGCCCTTGTTCTAAAGATTTGTTCAACTTTGTTGGACTTT
CTCTTTCTTTTACATGCTGAAACCTTGAGGGCCGGGATAGTATCCTTTGTGCACTCGCGACAGCATGTTACTTGCGTTCGAACGGGTAA
GCTAACAACGCCTTGGTGTGTTTTGTTACCTTTCTCGTTTGAATCATGAAGTTATTACGAGCCTTGAAGGCATAGAGGGAACTCGGTTAGCA
AGCTCTAAACGCGCGCTGACTTGGAACGGTCTTTACCTTGACTTGATATCGACCTTATGGCCGATATCCTGCATATGGTATAGCCAAG

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

Ciclo 1



**Extraemos
ADN de tejido
y lo copiamos
con una
enzima**



**Nuestro trozo
de ADN
aumenta de
manera
exponencial**

707 gaataaagaattccaaatgggtgcccaagcctacaactgctacaggcaatgctgcagctcc 766
.....
.....
.....

767 atccacttgtacagcaagagagaatcctgcttacggccgacatatgcaggatgctgagat 826
.....
.....
.....

827 gtttaciaaatgctgcttacatggcattgaatatttgggatcgttttgatgtattctgtac 886
.....
.....g.....g.....
.....

887 attaggagccaccagtggatatcttaaaggaaattcagcatctttcaacttagttggctt 946
.....
.....g..
.....g..

947 attcggagataatgagaaccatgctacagtttcagatagtaagcttgtaccaaatatgag 1006
.....
.....g..
.....g..

1007 cttagatcaatctgttgttgagttgtatacagataactacttttgcttggagtgctggagc 1066
.....
.....
.....

Quién es el patógeno?

Cómo definimos el patógeno?

Especie?

Qué definición?

Definimos una especie evolutiva

Usamos diferentes maneras de **reconocer** especies:

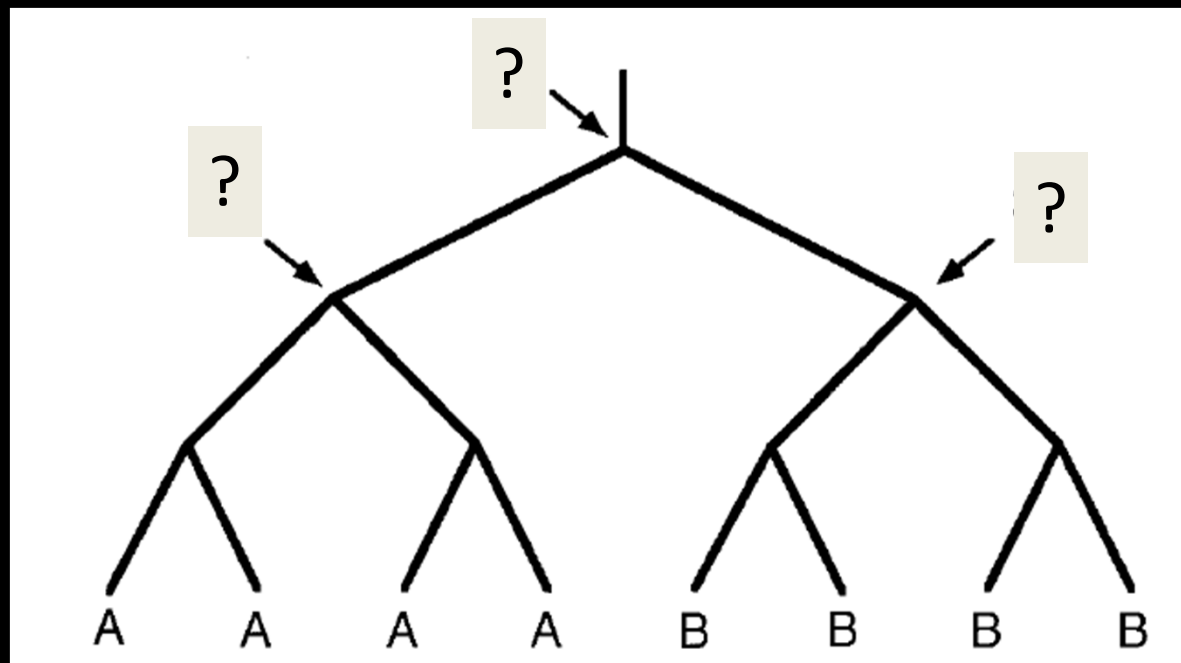
- Morfológica
- Biológica
- Filogenética

```
707 gaataaagaattccaaagggtgccaagcctacaactgctacaggcaatgctgcagctcc 766
.....
.....
.....
767 atccacttgtagcaagagagaatcctgcttacggccgacatatgcaggatgctgagat 826
.....
.....
.....
827 gtttacaatgctgcttacatggcattgaatatttgggatcgttttgatgtattctgtac 886
.....
.....g.....g.....
.....
887 attaggagccaccagtggatatcttaaggaaattcagcatctttcaacttagttggctt 946
.....
.....g..
.....g..
```

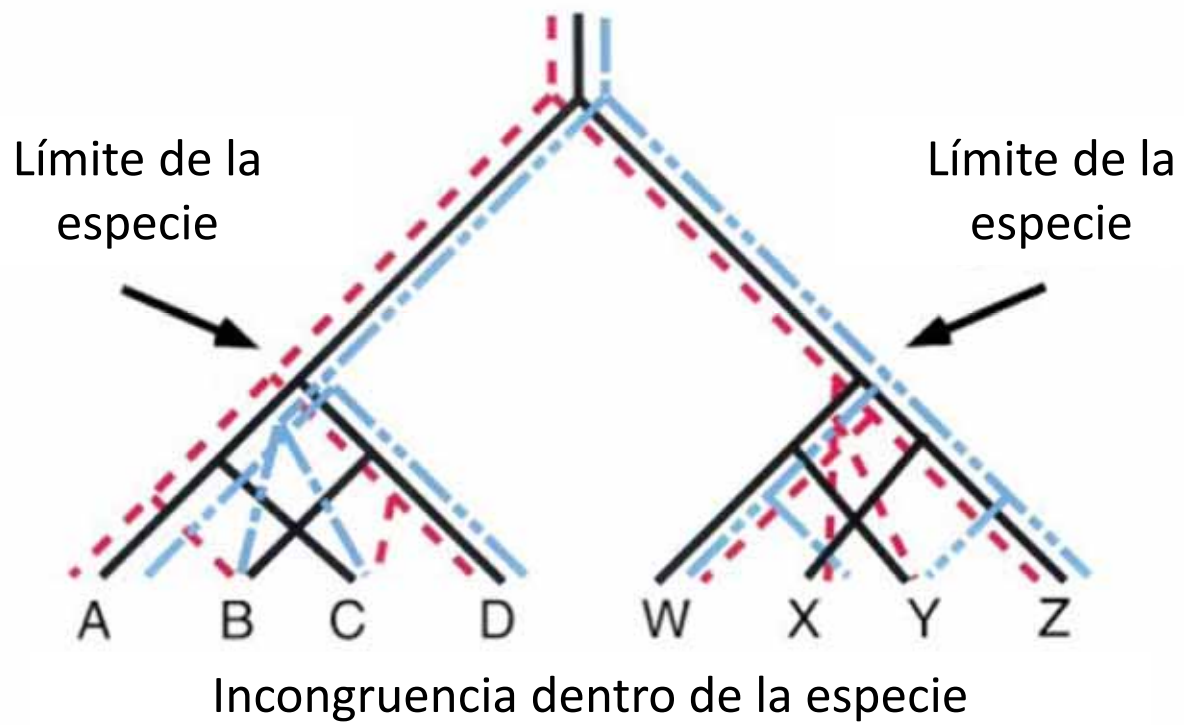
Definimos una especie evolutiva

Usamos diferentes maneras de **reconocer** especies:

- Morfológica
- Biológica
- Filogenética



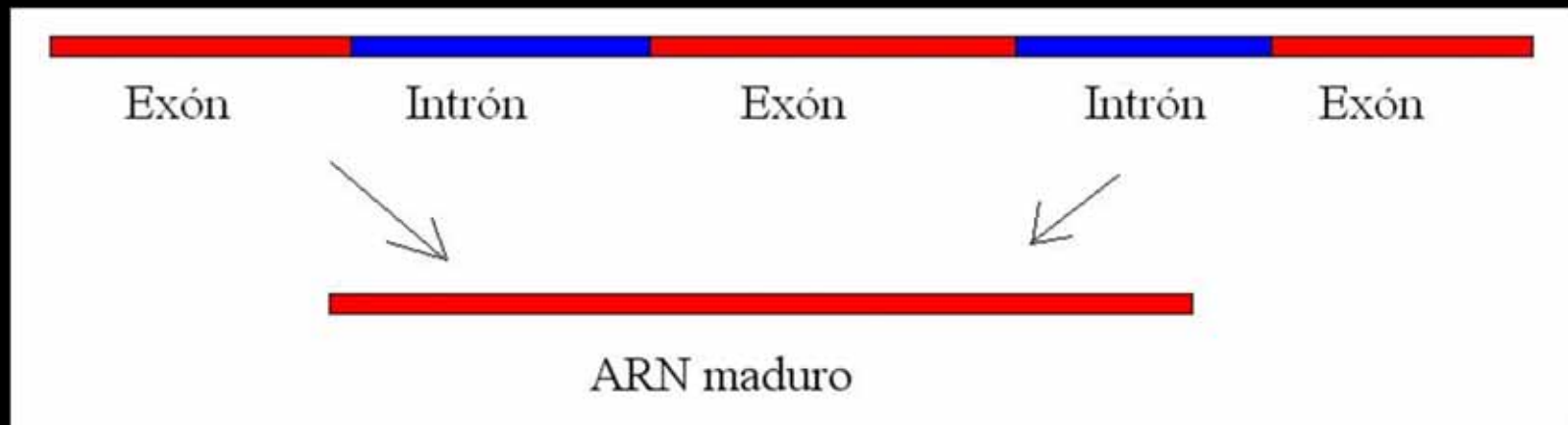
Concordancia entre especies



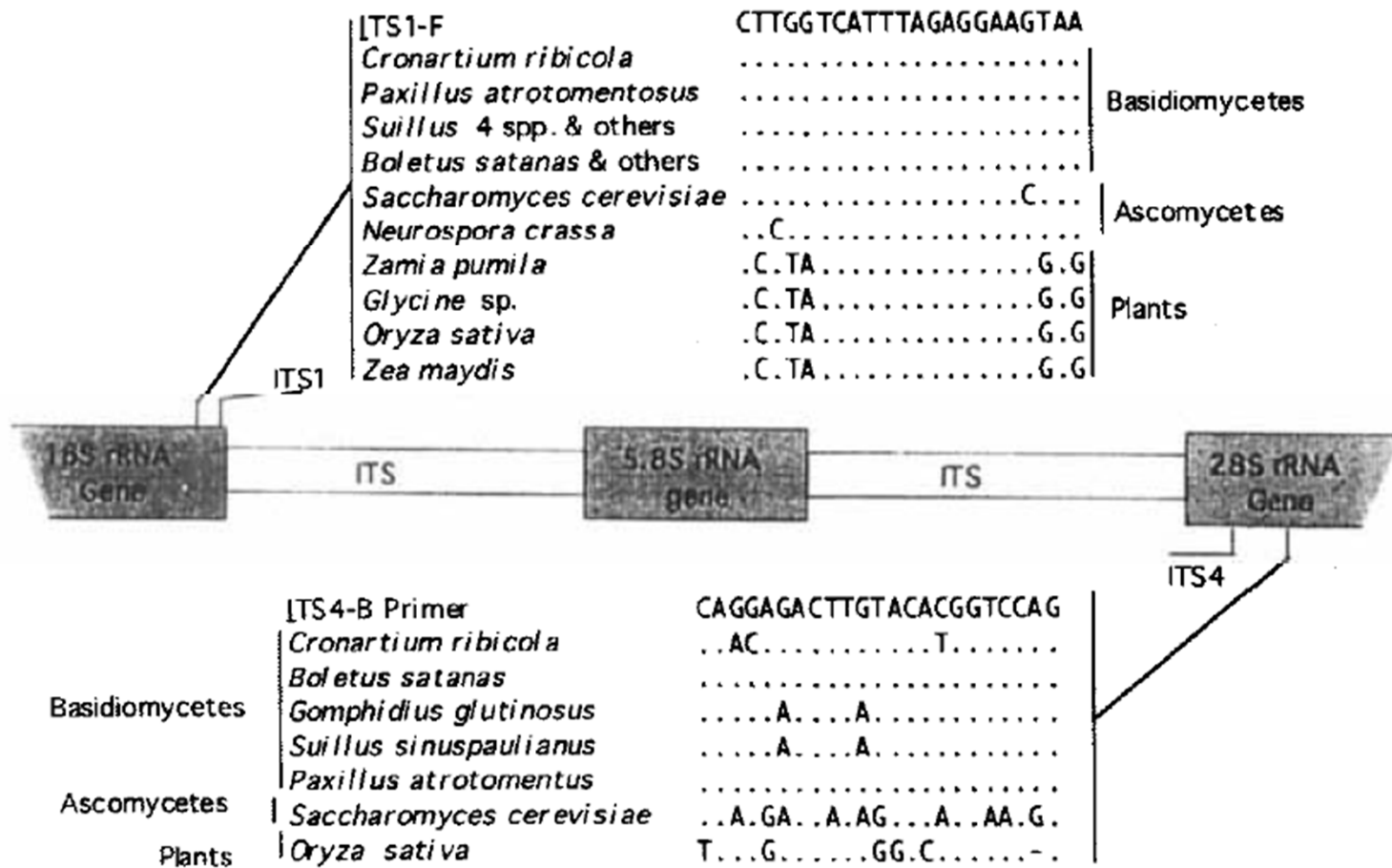
Taylor et al. (2000) Fung. Genet. Biol.

Que genes vamos a usar?

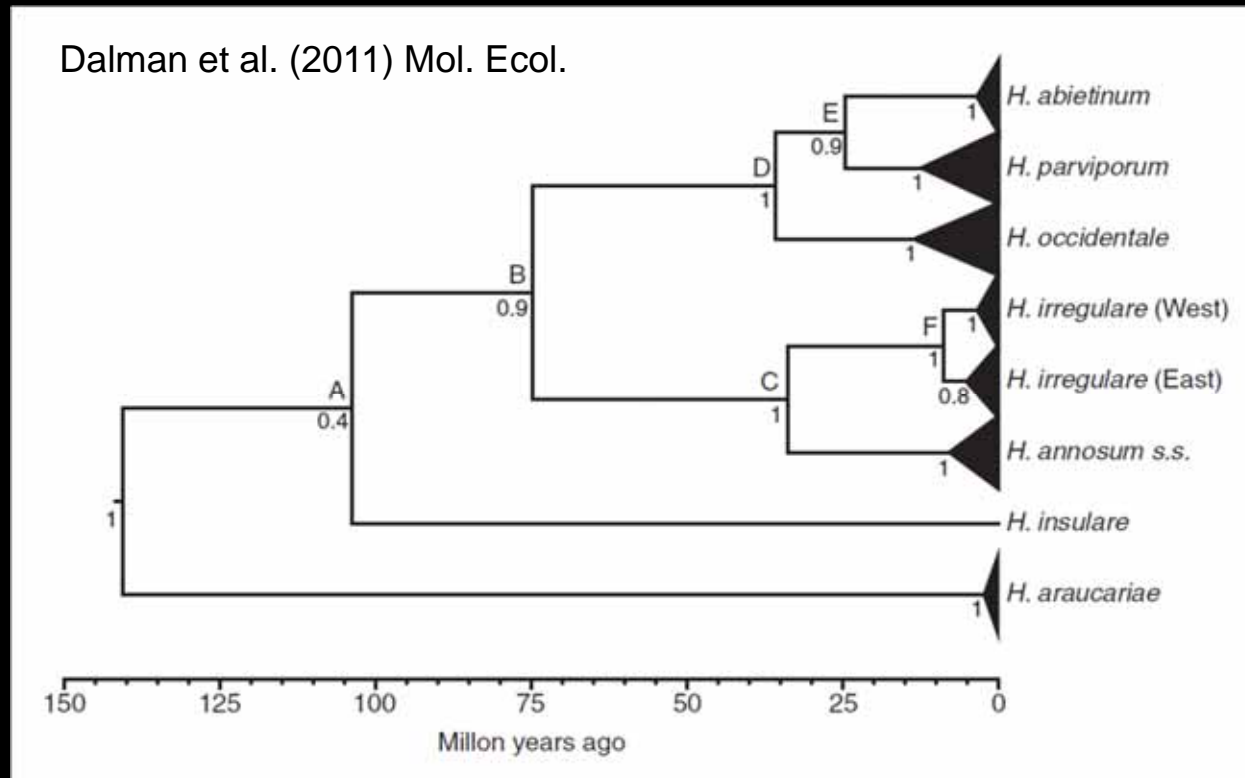
- Genes constitutivos (house-keeping genes)
- Exones e intrones



Internal Transcribed Spacer



Organismos de cuarentena

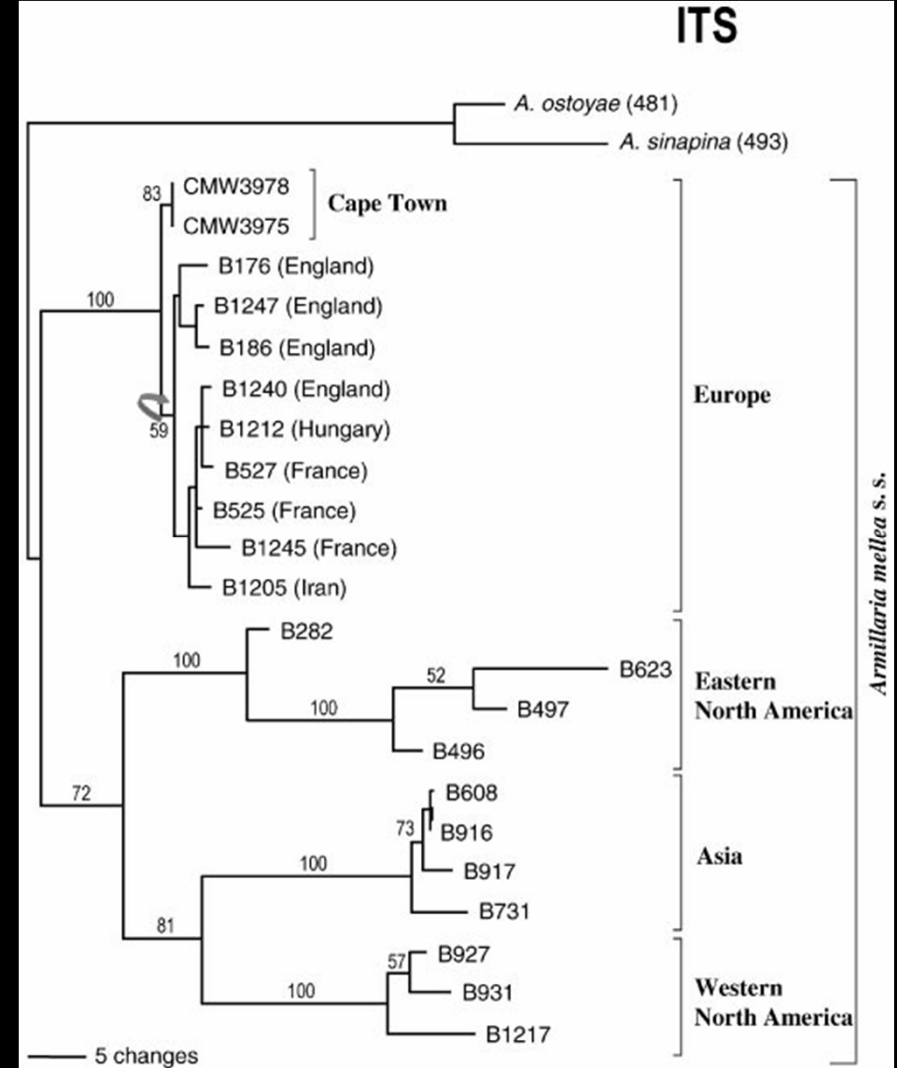
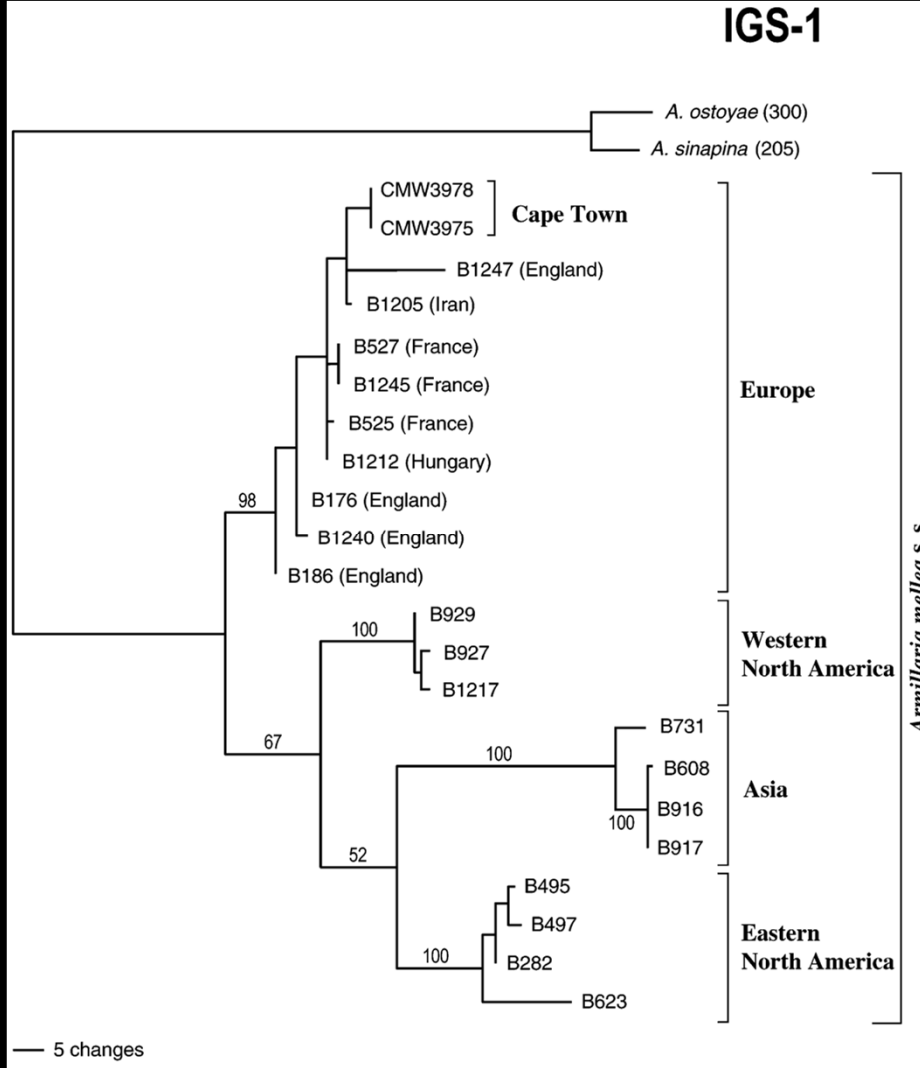


En 1988, *H. araucariae* fue descrito como una nueva especie, en Australia y Nueva Zelanda (Buchanan 1988 Mycotaxon)

Quién es y de dónde viene el patógeno?

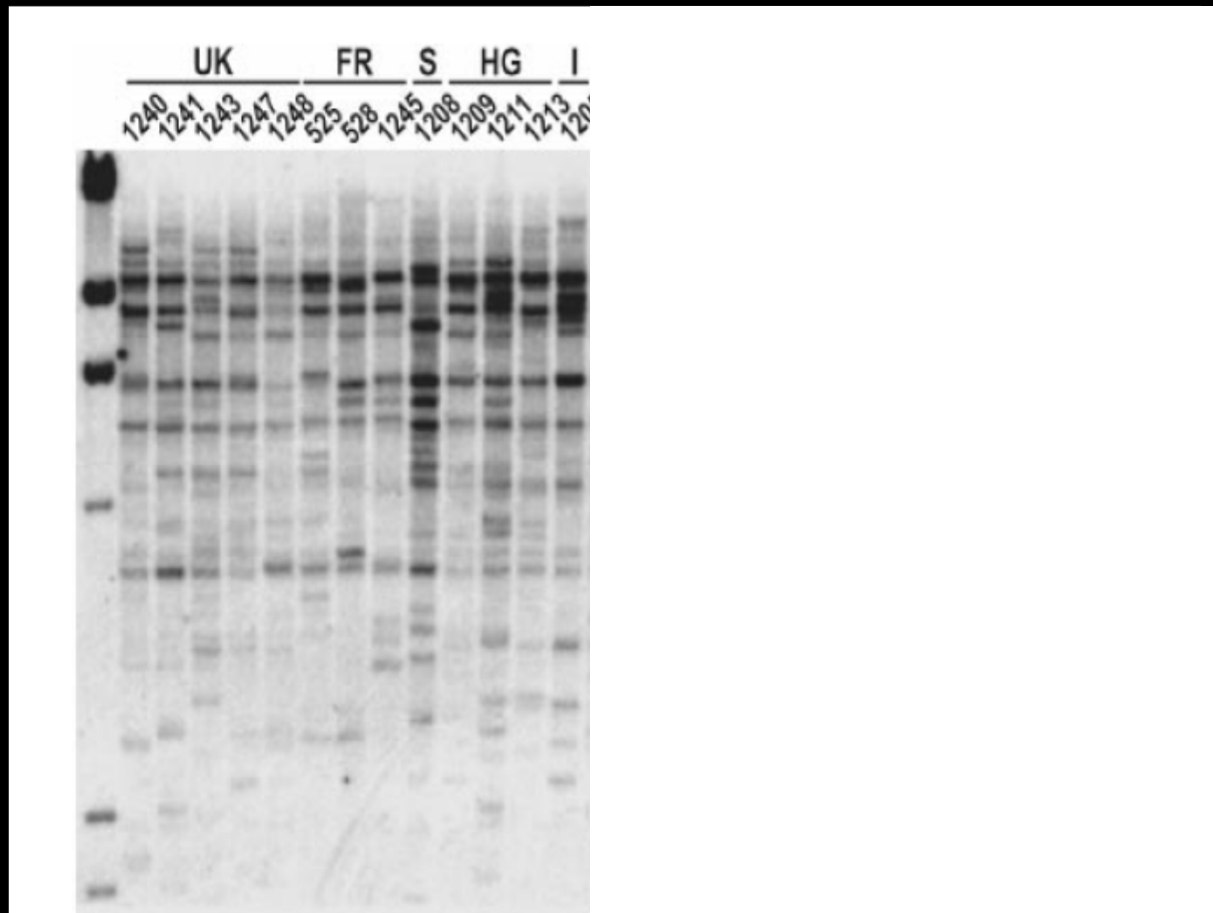
Dependiendo del marcador que usemos vamos obtener información a diferentes niveles (especie, población, individuo)

Coetzee et al. (2001) Mol. Ecol.

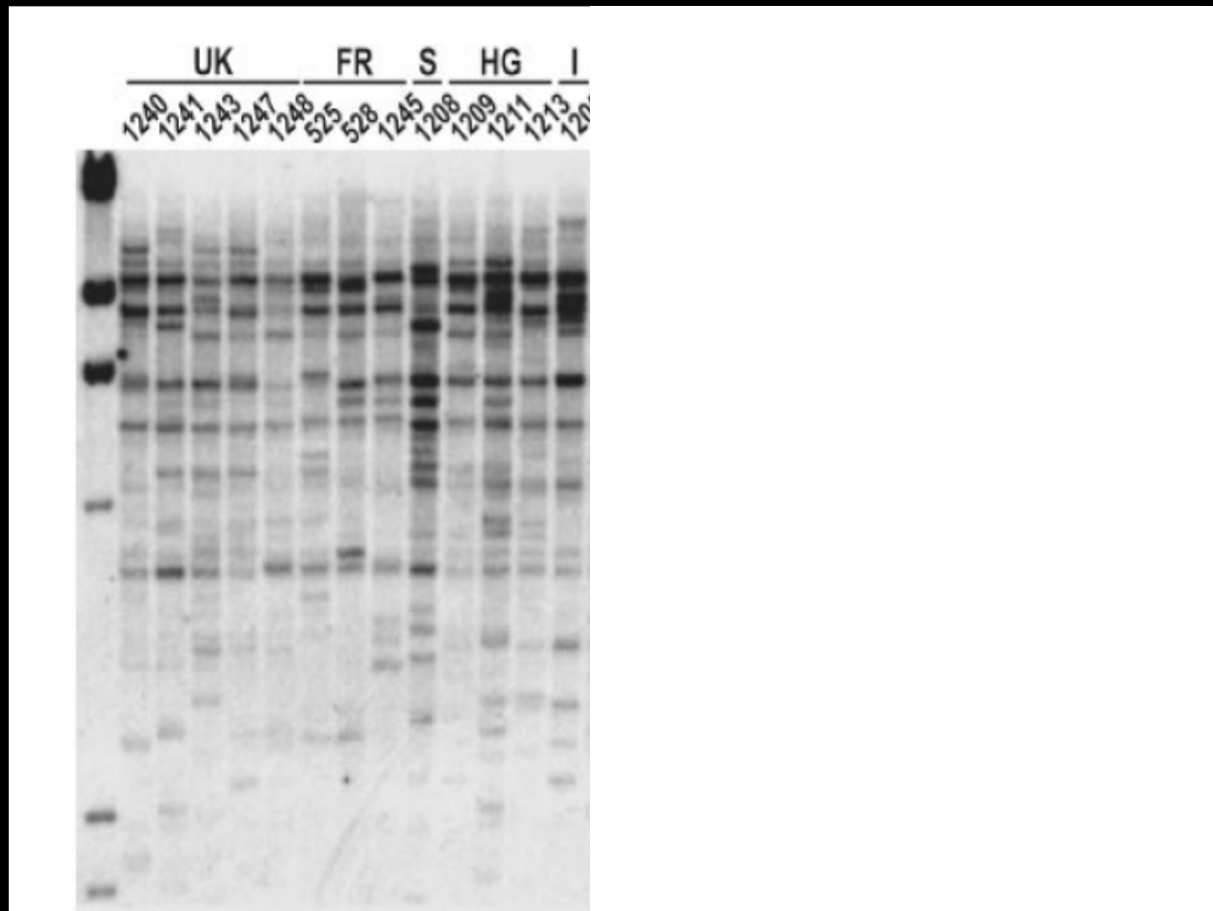


Ambos árboles muestran el mismo patrón

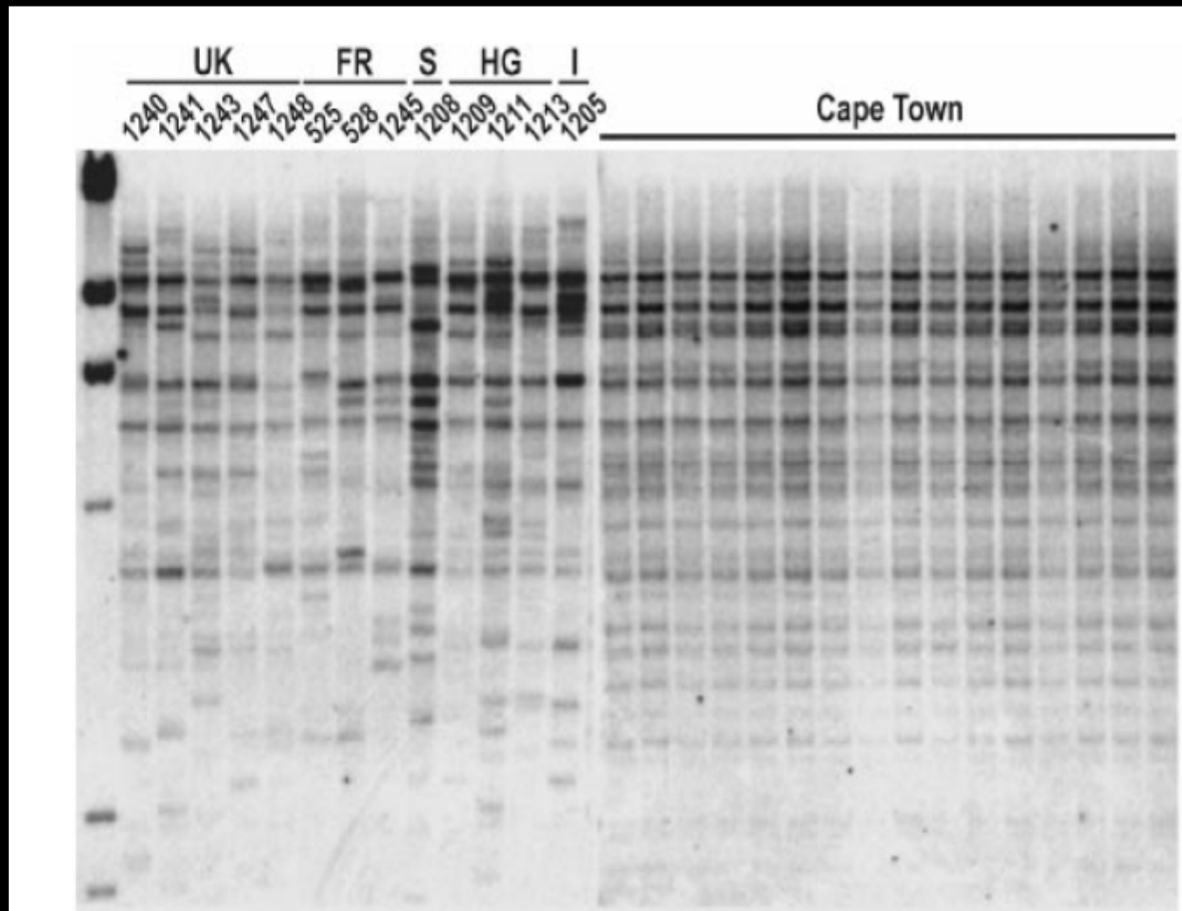
Diferenciamos genótipos



Estructura de la población y tipo de reproducción



Típico patrón de efecto fundador

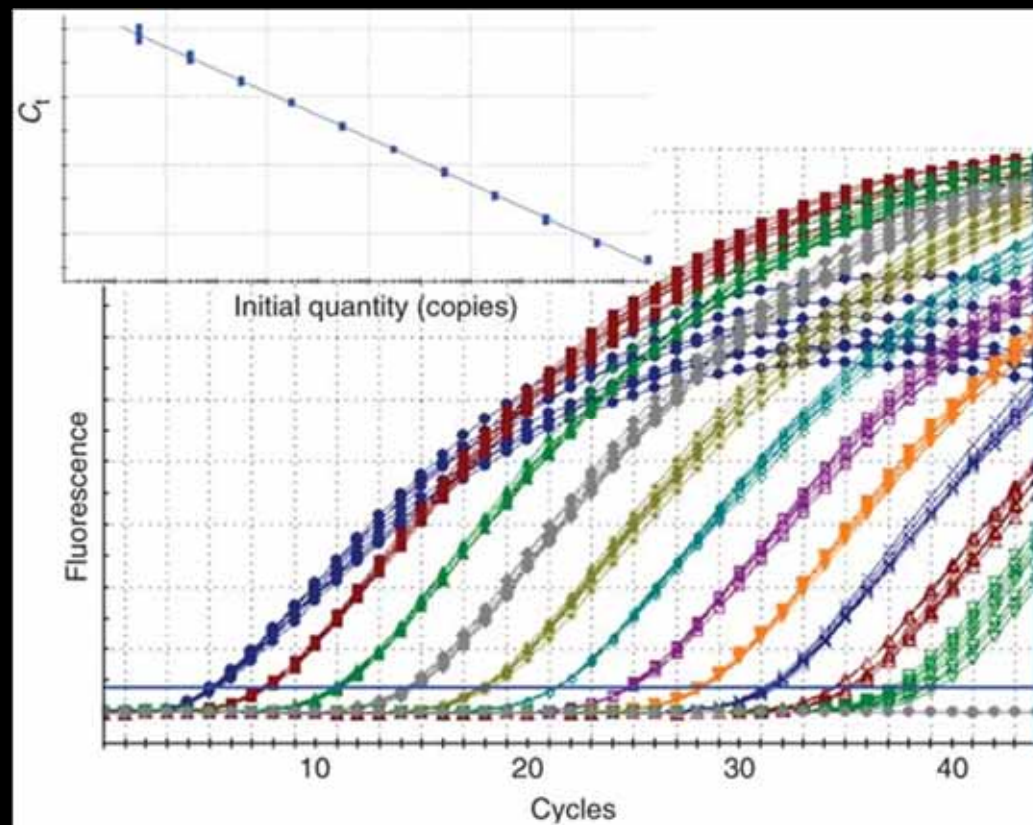


Dónde está nuestro patógeno?

PCR en tiempo real, qPCR, real time-PCR

Técnica muy precisa: utilidad para detectar patógenos de tejidos asintomáticos

ciclos = copias de ADN = nucleos = células = biomassa



Quien está haciendo que?

ARN: indica que genes (proteínas) se están usando en un determinado momento

Ej. Interacción patógeno-planta

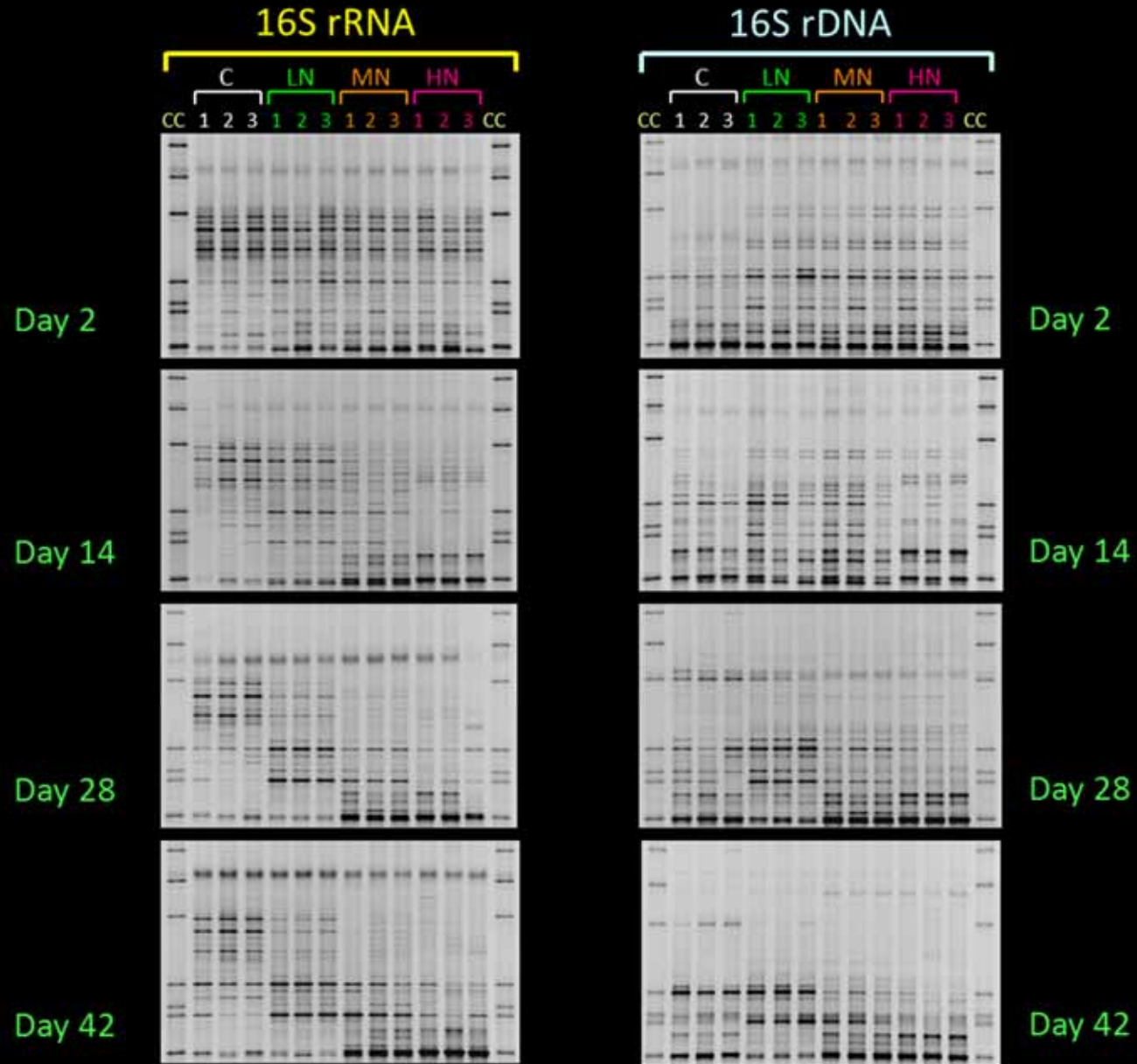
RT-PCR: convertimos ARN en cADN

Genes ribosómicos

ADN nos indica cantidad de micelio de una especie

ARN nos indica cantidad de ribosomas producidos por una especie

Comunidad microbiana ACTIVA vs. PRESENTE



Qué genes debemos estudiar?

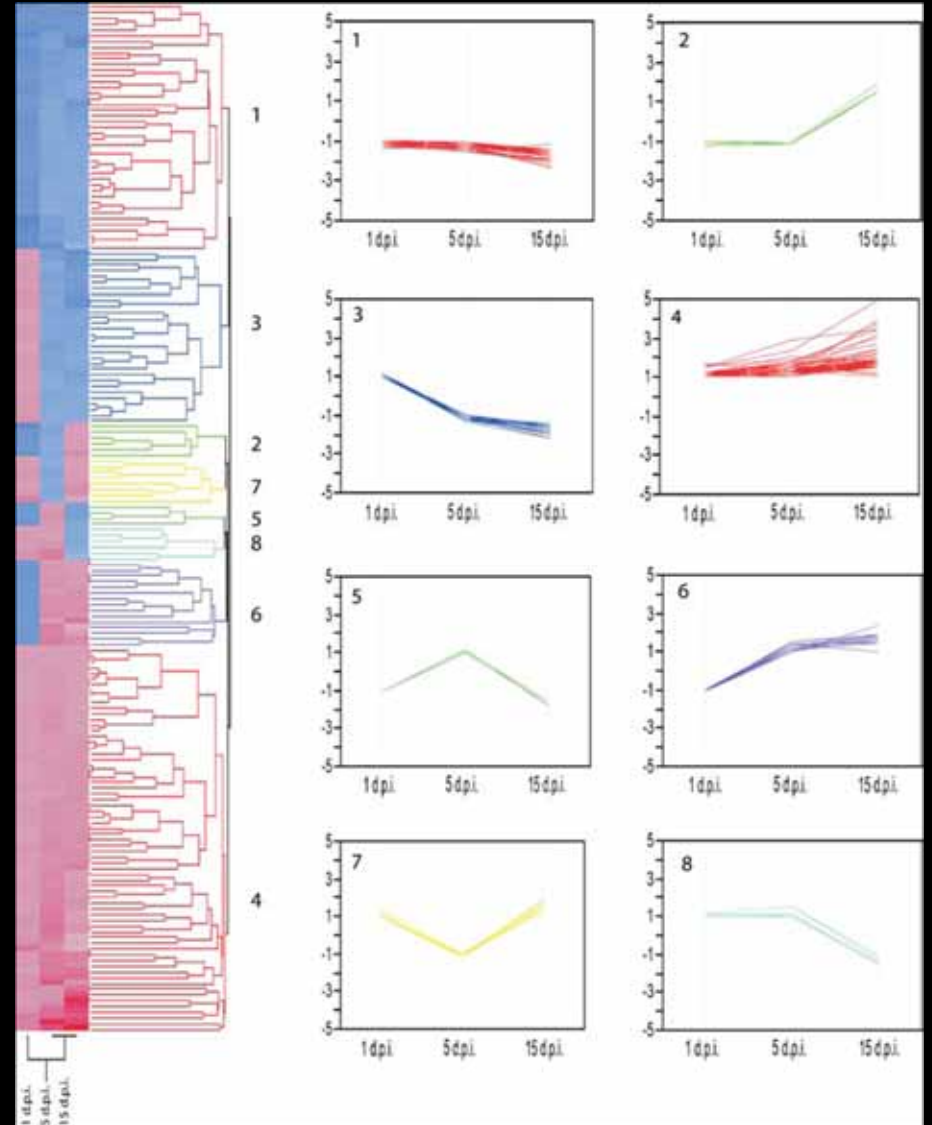
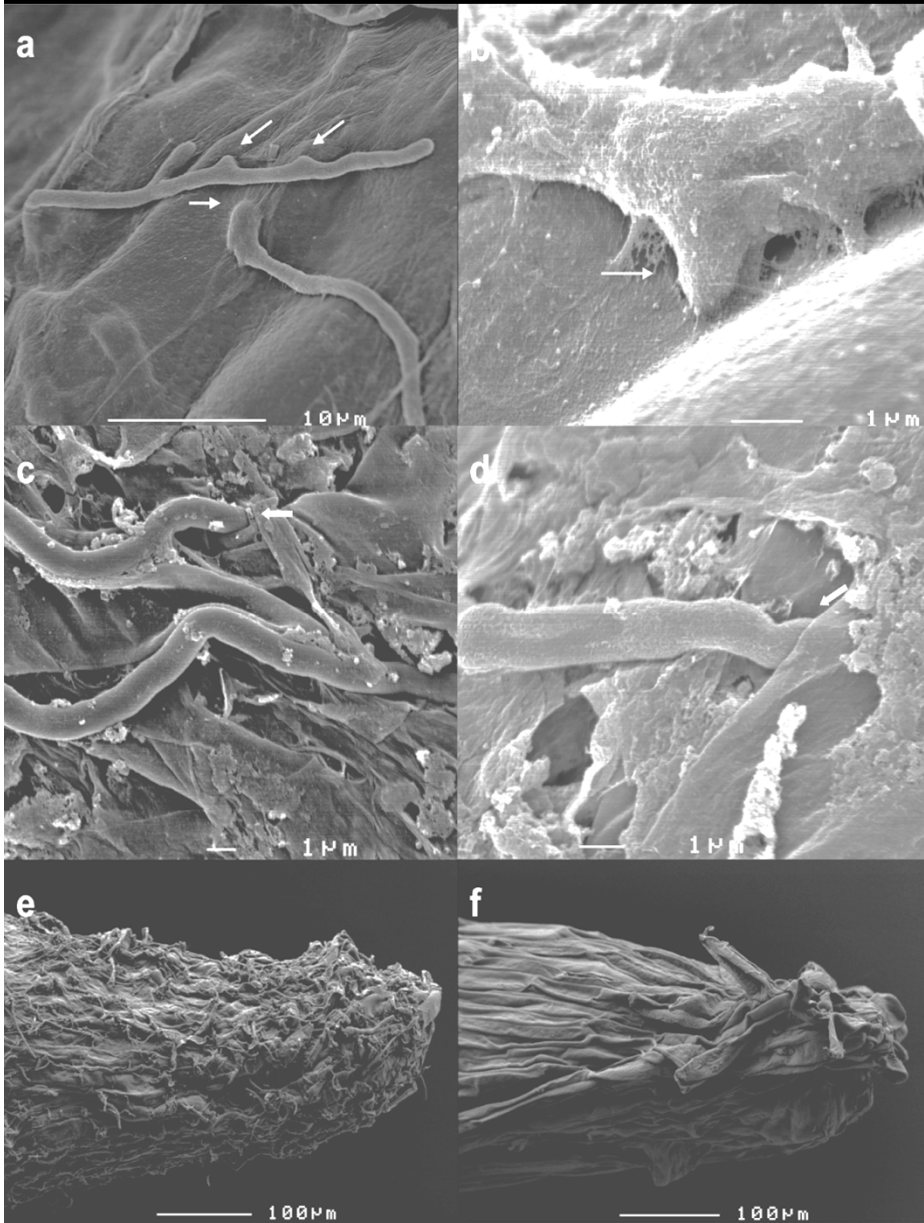
- Estudiar la interacción y ver qué está pasando
- Ver diferencias entre patógenos más o menos virulentos

— Expresión patógeno-huésped
Expresión patógeno sin el huésped

Librería de substracción (SSH)

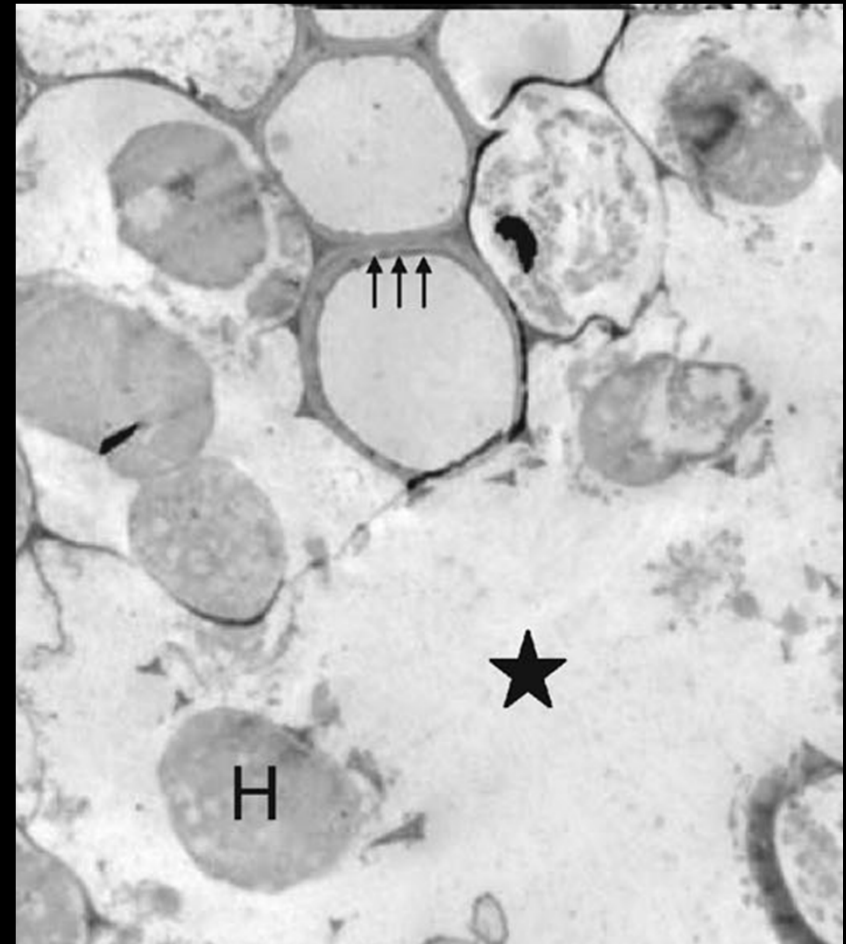
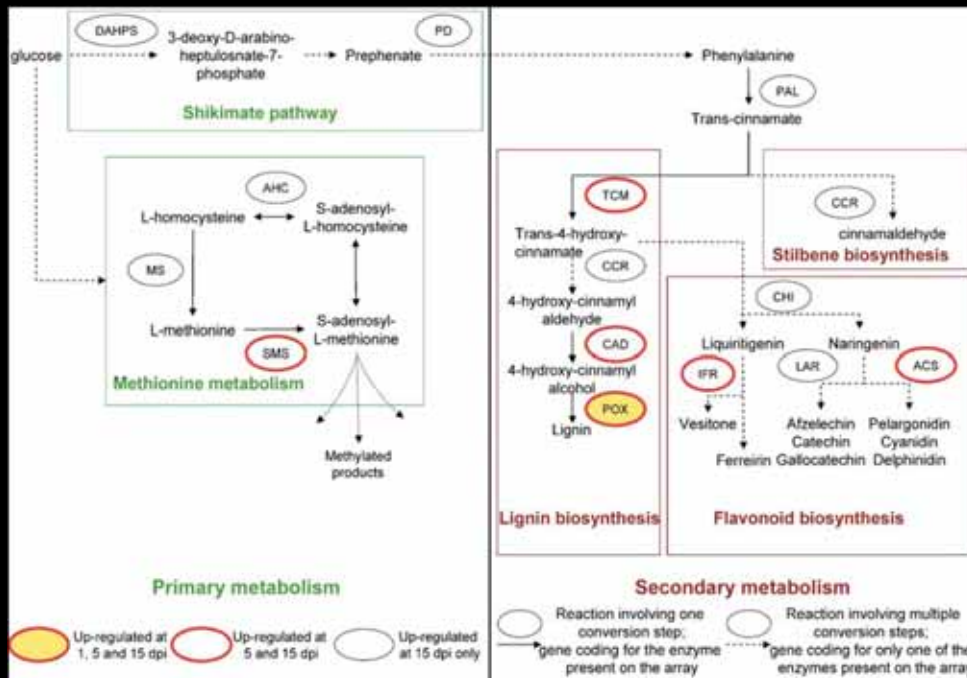
Permite identificar los genes que se expresan únicamente en la interacción

Comparar observación con expresión



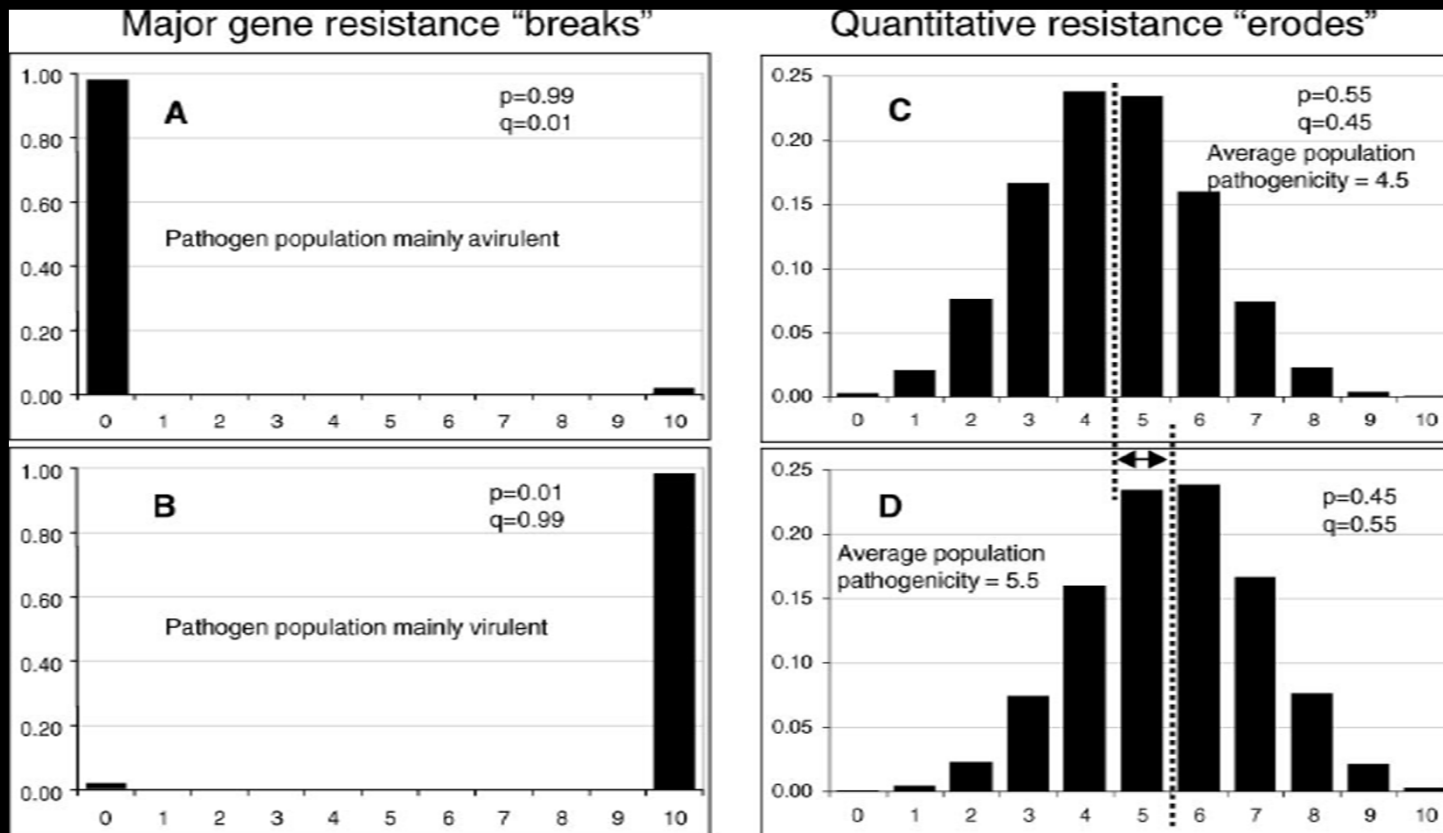
Adomas et al. (2007, Tree Physiol.)

Genes actuando conjuntamente pueden indicar una misma ruta metabólica



Cambio de metabolismo primario hacia producción de lignina y metabolitos secundarios

Qué genes contribuyen más a la resistencia?

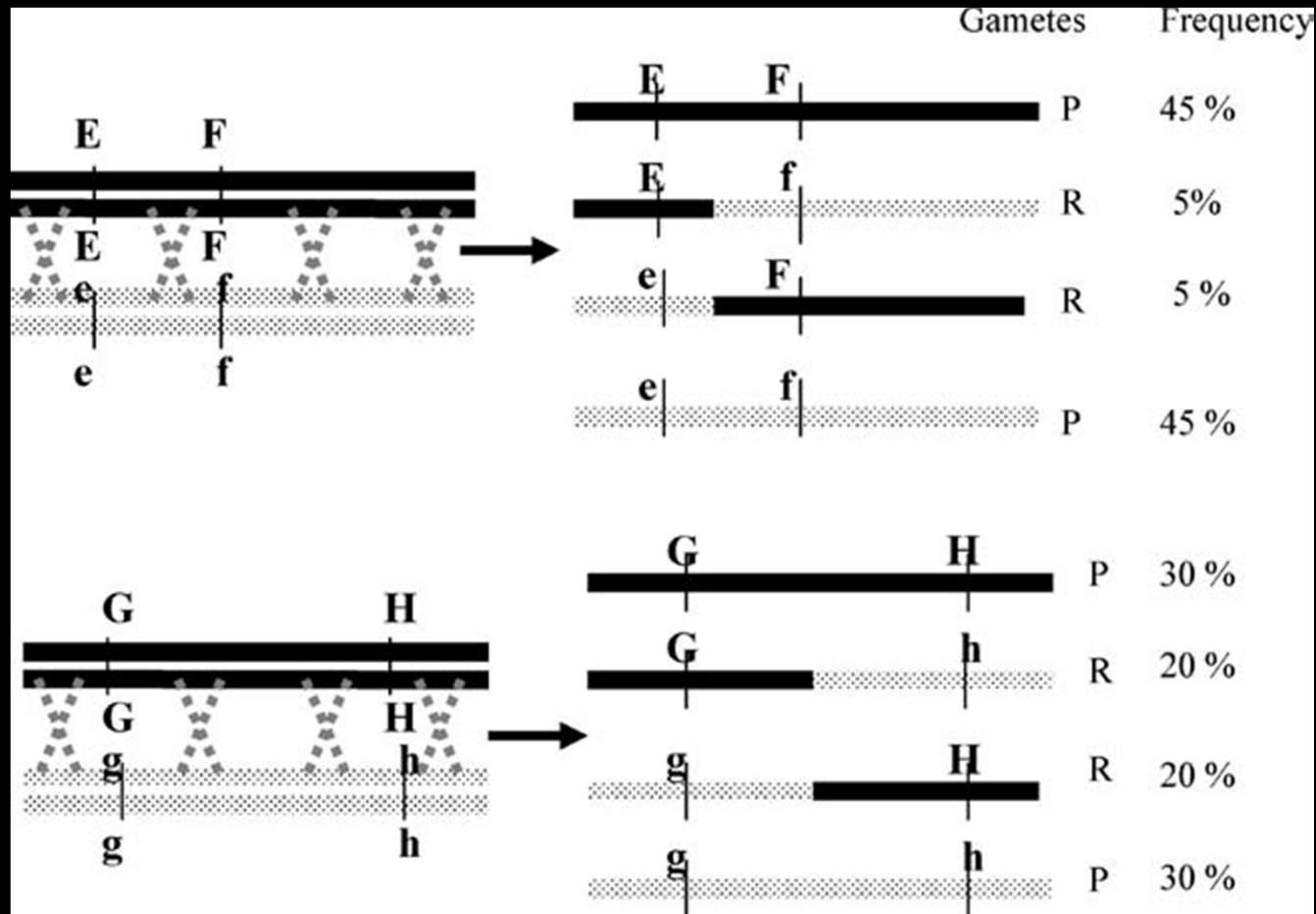


Mejora asistida con marcadores genéticos

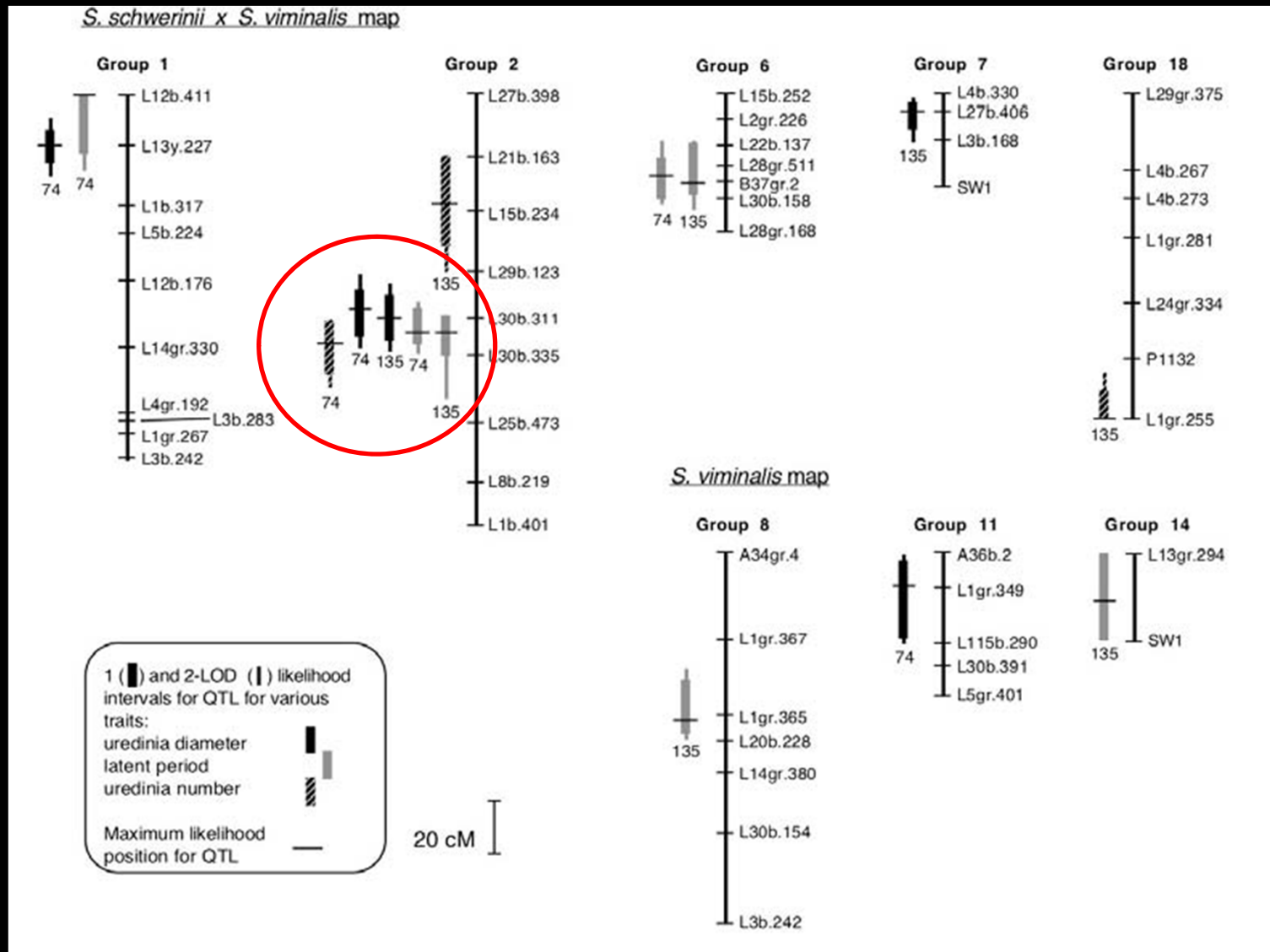
- Buscamos marcadores **asociados** a genes de interés
- Usaremos marcadores para seleccionar individuos de futuro

Desequilibrio de ligamiento “Linkage disequilibrium”

Partes del genoma más cercanas se heredan juntas más frecuentemente



Resistencia de *Salix* sp. para bio-energía a la roya *Melampsora*



Futuro?

Técnicas de secuenciación masiva

454 pyrosequencing

Illumina

SOLiD

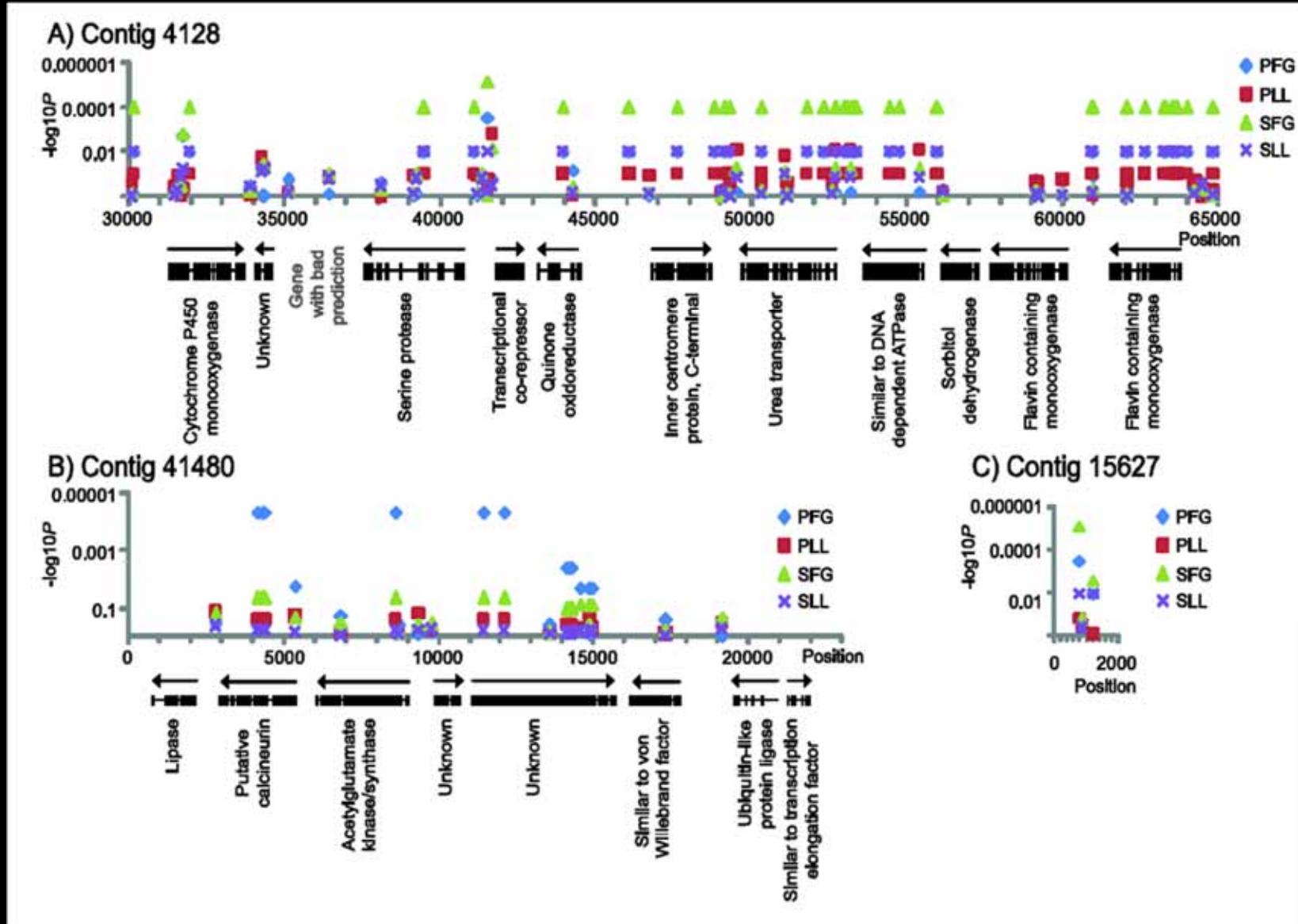
400 000 seq. de 700(1000)* bp en 10 horas por 10.000 €

28 000 bp / euro

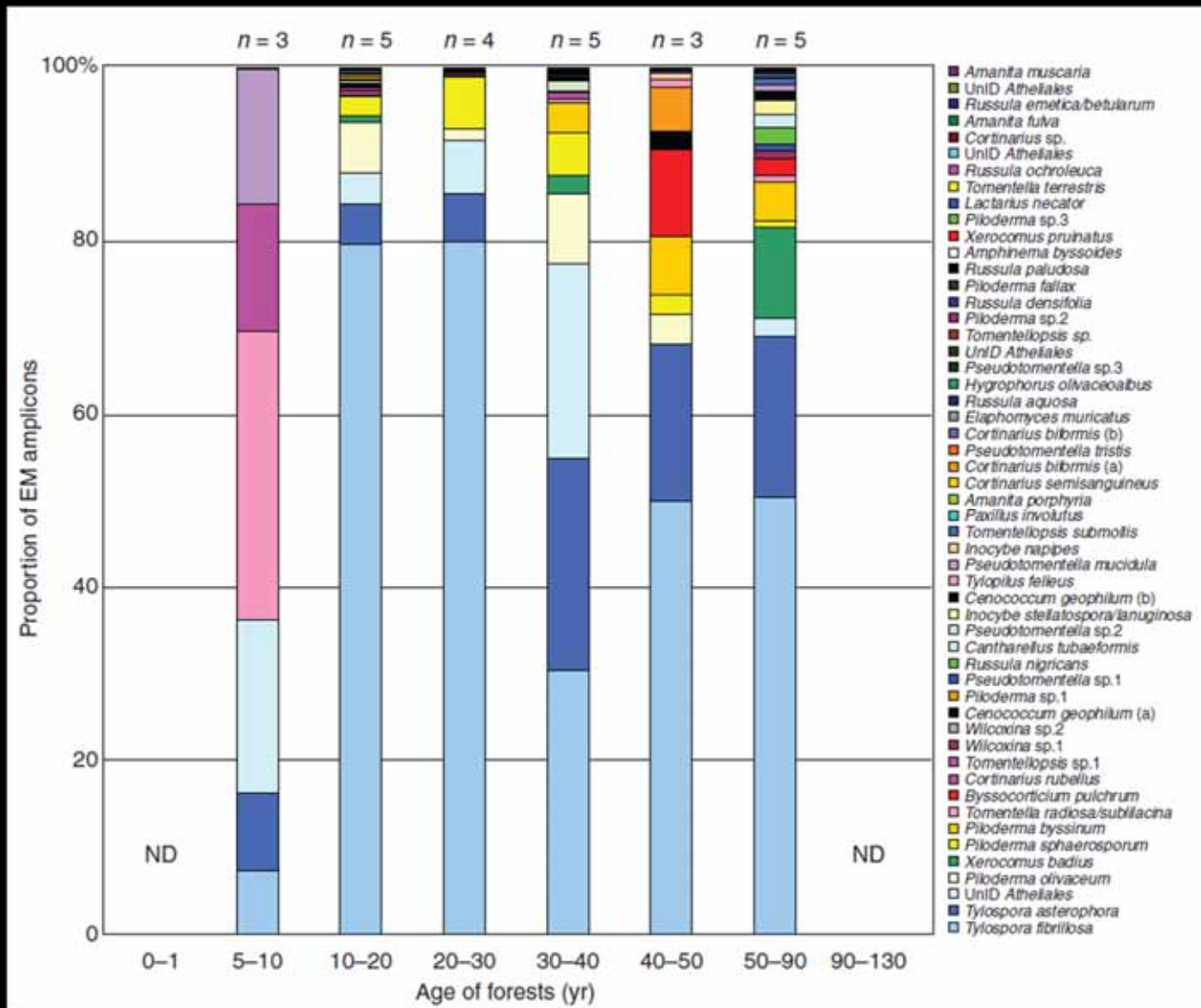
Sequenciación “Sanger” : 100 bp / euro

*700 bp es la longitud de la región ITS

Comparamos genomas completos



Ectomicorrizas en suelo y edad del bosque



Técnicas moleculares

Quien es el patógeno?

De dónde viene el patógeno?

Cómo se reproduce/dispersa el patógeno?

Quien está activo en la interacción?

Qué genes/rutas metabólicas están activas en la interacción?

Qué genes explican resistencia/virulencia?

Muchas gracias