



FACULTAD DE CIENCIAS
AGRONÓMICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



Estudios genómicos de las bacterias del cerezo: Desde el diagnóstico a la interacción planta- patógeno

Alan Zamorano C.
agezac@uchile.cl



La fiebre de las cerezas: más de 10 años de crecimiento sostenido



Smartcherry

Comercial

Chile exportó 413.979 toneladas de cerezas durante la Tp. 2023-2024



Cultivos . Frutales . Cereza

Comparte



Redagrícola

Estudio de ProChile

Cerezas chilenas logran récord de envíos durante enero de 2024 con aumento de 27,5% respecto a campaña anterior.

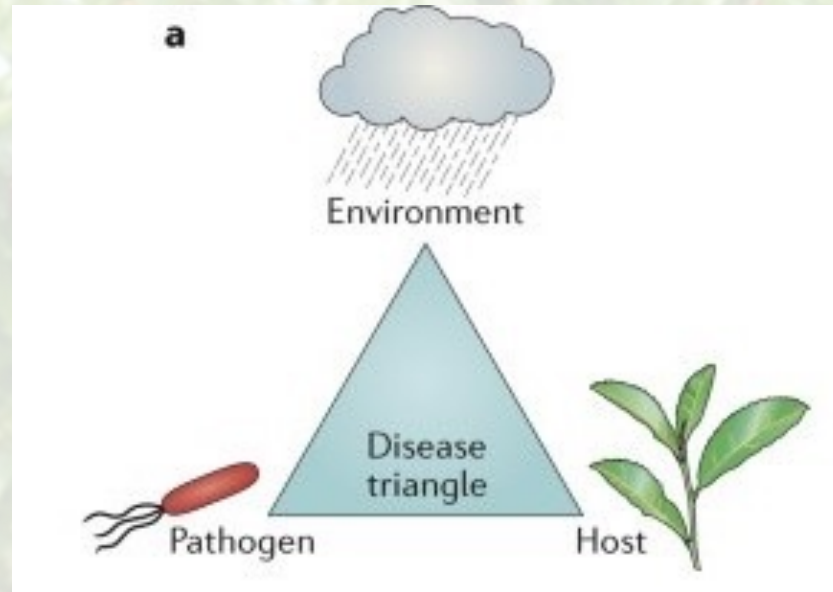
Industria de la cereza chilena celebra una buena temporada y se prepara para enfrentar el desafío de crecer

Por Portal Agro Chile / Grupo Prensa Digital - abril 26, 2024

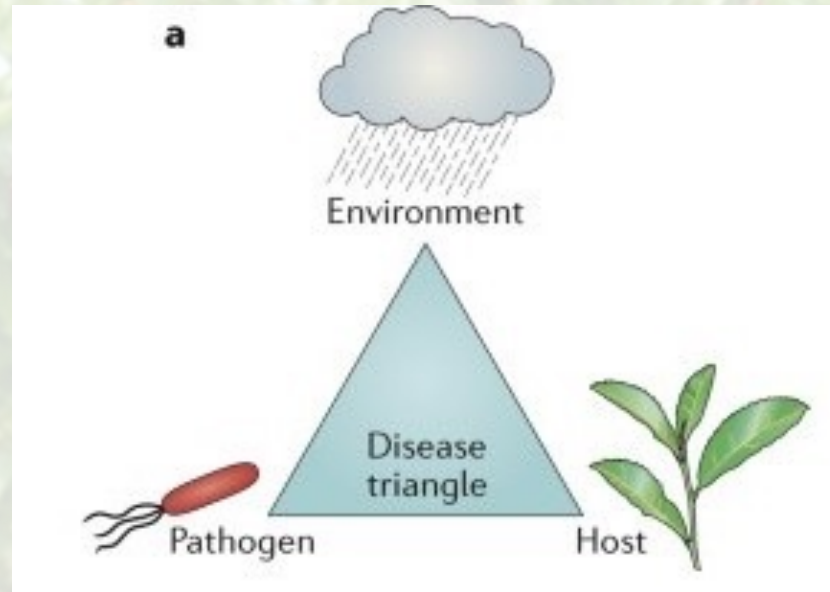
456

0

La fiebre de las cerezas: Chile cuadruplica en 10 años las hectáreas



La fiebre de las cerezas: Chile cuadruplica en 10 años las hectáreas



Situación en zona de alta productividad



Pseudomonas syringae pv. *syringae*

Situación en zona de alta productividad



Pseudomonas amygdali pv. *morsprunorum*

Situación en zona de alta productividad

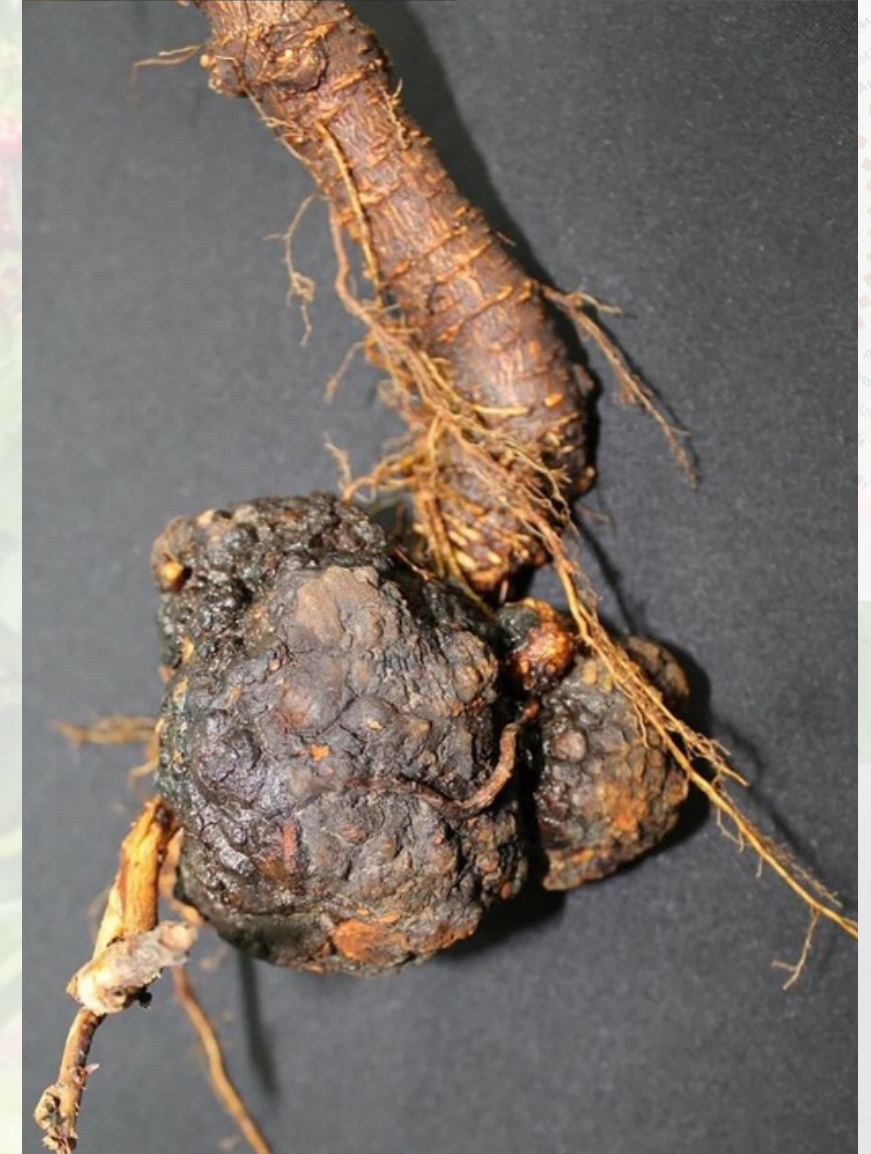
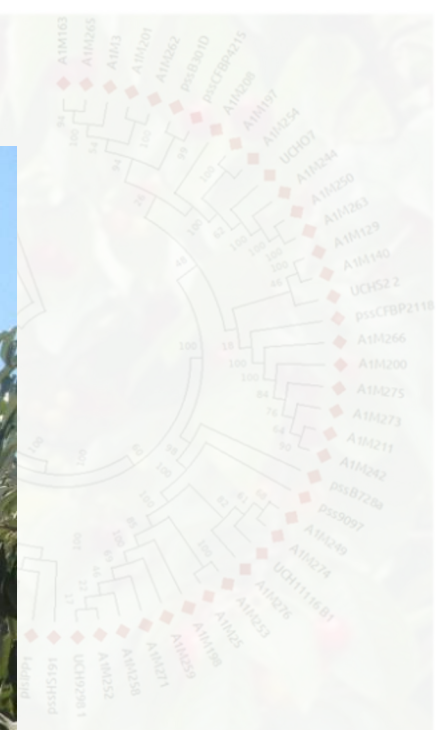


Foto: Paz Millas et al., 2024

***Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)**

Pero también hay patógenos intracelulares



P. exitiosus



B. valdiviana

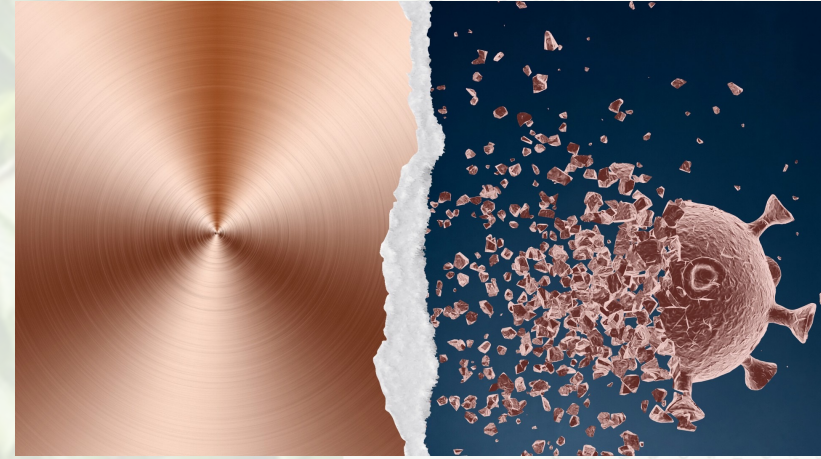


Fitoplasmas

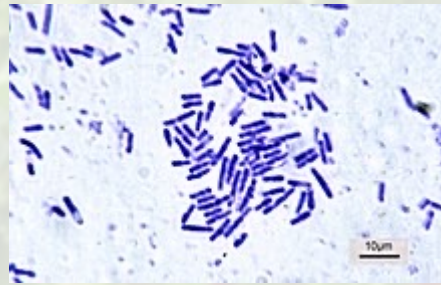
Sweet cherry decline – 16SrIII-J

¿Qué podemos hacer, entonces?

Control químico: Cobre



Control biológico



Factor común: PREVENCIÓN

Mejorar la detección

Proyecto Fondecyt Postdoc - ANID

“Genomic studies for the optimization of detection techniques and characterization of *Agrobacterium* species associated with crown gall in fruit crops of economic importance in Chile.”

Proyecto Anillo O'Higgins ACTO190001 PIA - ANID

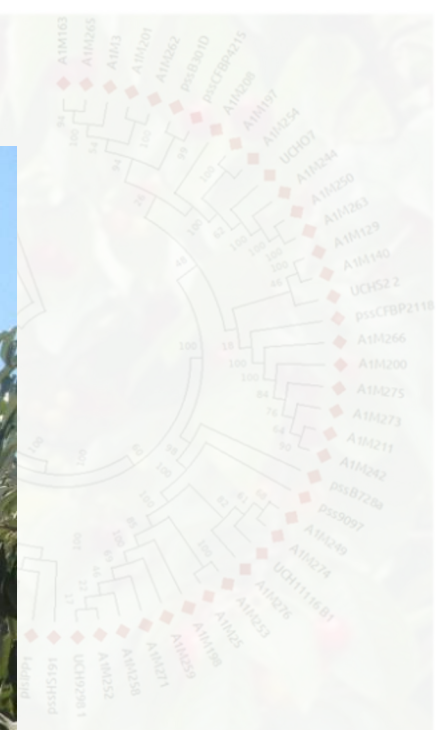
“Deep insight into cherry plant defense responses to bacterial canker disease, in a scenario of water restriction”

Proyecto Fondecyt regular ANID

“Use of deep sequencing for optimization of phytoplasma detection in fruit crops”



Partamos con lo más antiguo...



P. exitiosus



B. valdiviana



Fitoplasmas

Sweet cherry decline – 16SrIII-J

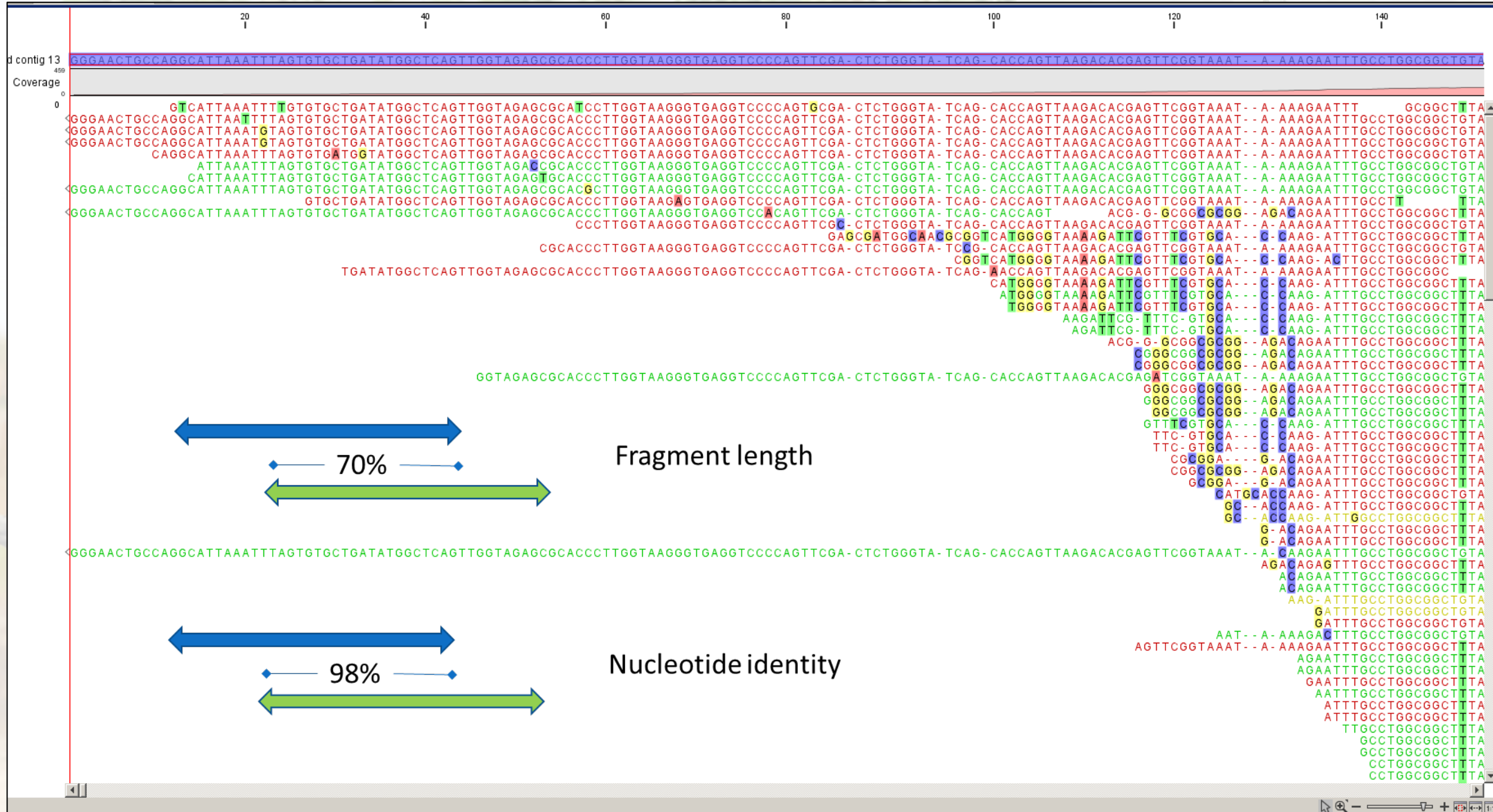
Partamos con lo más antiguo...

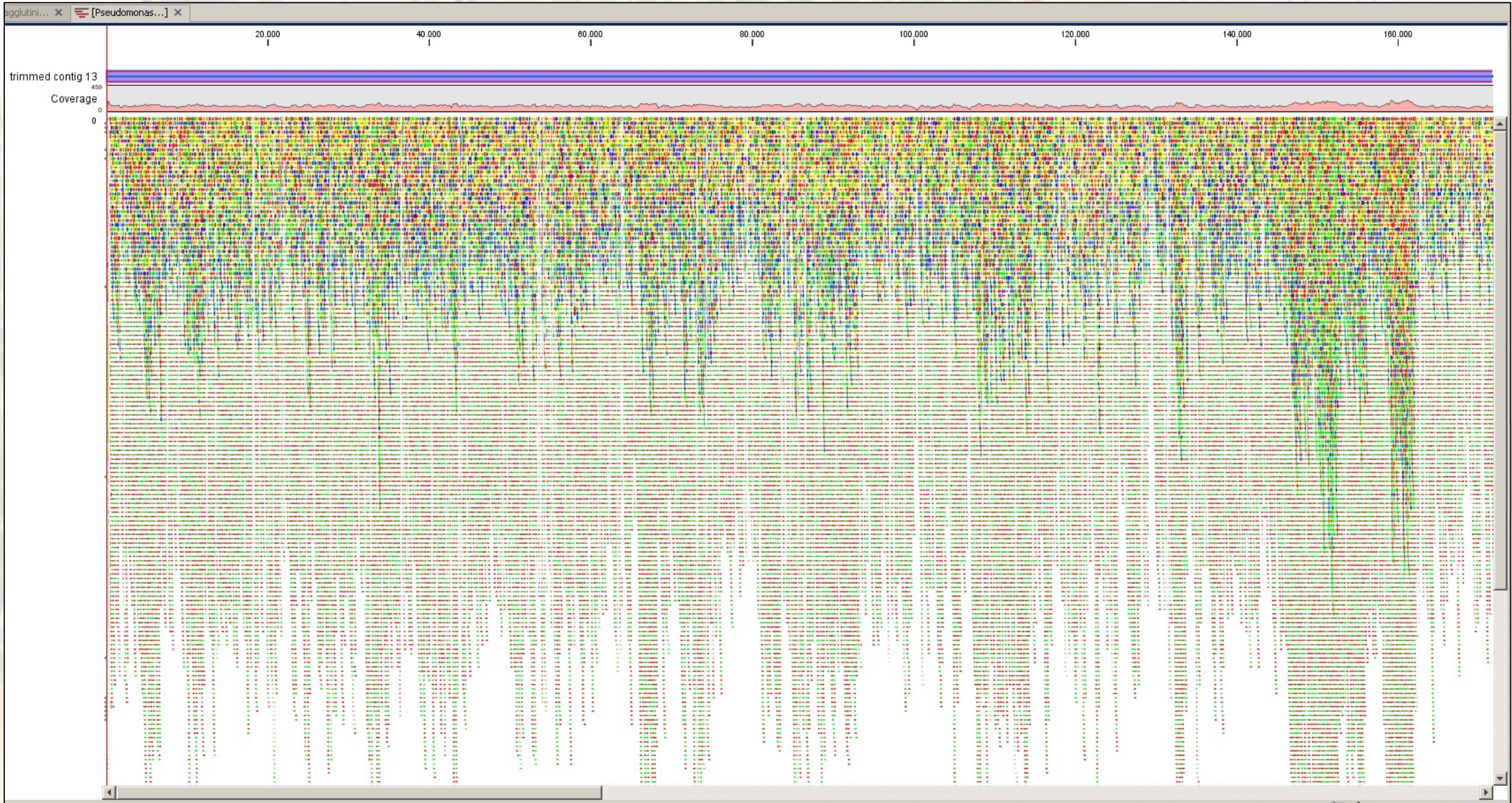


Vinca
infectada

Vinca Sana

- Illumina seq
- Millones de secuencias pequeñas para ordenar







genomeA^{announcements}



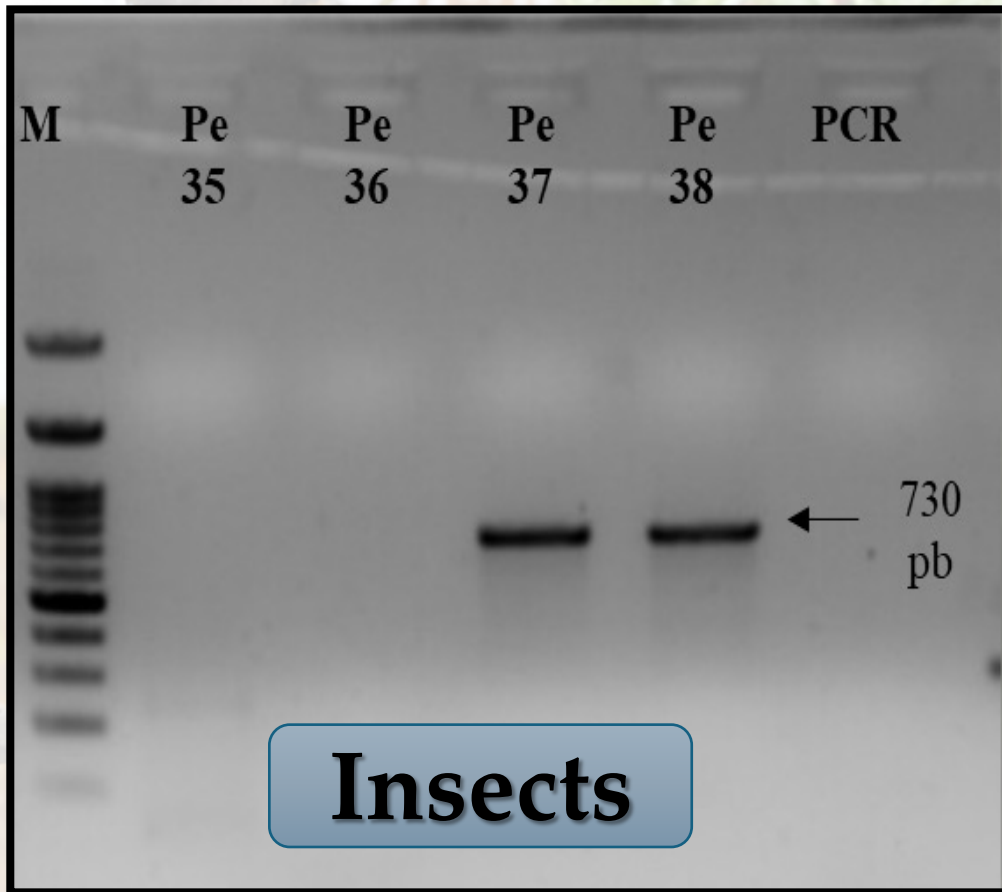
Draft Genome Sequence of 16SrIII-J Phytoplasma, a Plant Pathogenic Bacterium with a Broad Spectrum of Hosts

Alan Zamorano, Nicola Fiore

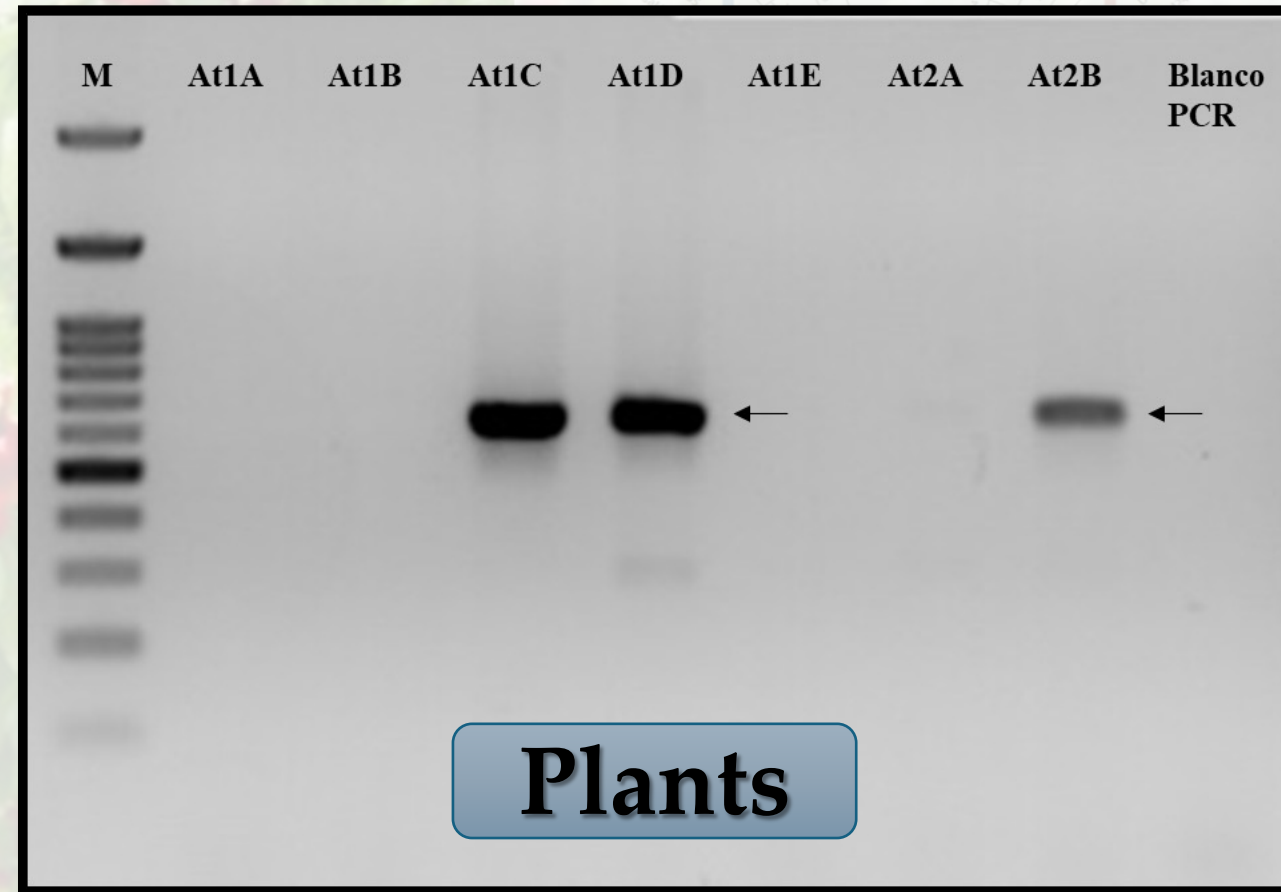
Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Departamento de Sanidad Vegetal, Santiago, Chile

Secuencia del genoma del fitoplasma 16SrIII-J
(29 contigs – 687 Kb)

Nuevo método de detección



Insects



Plants

IdpAJ-F

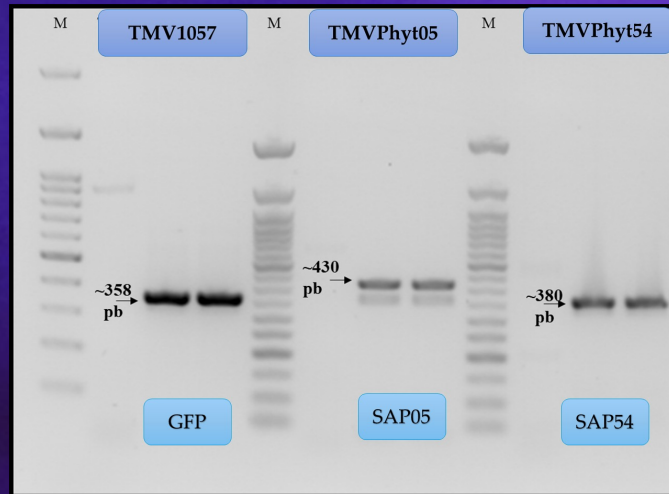
IdpAJ-R

730 pb

Immunodominant
membrane protein
A

**Sequencing confirmation:
OK!!**

Identificación de genes de virulencia



TMVPhyt54

10 plants

TMVPhyt05

6 plants

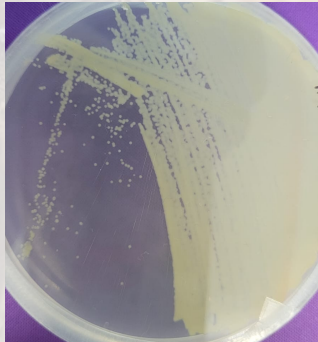
TMV1057

4 plants

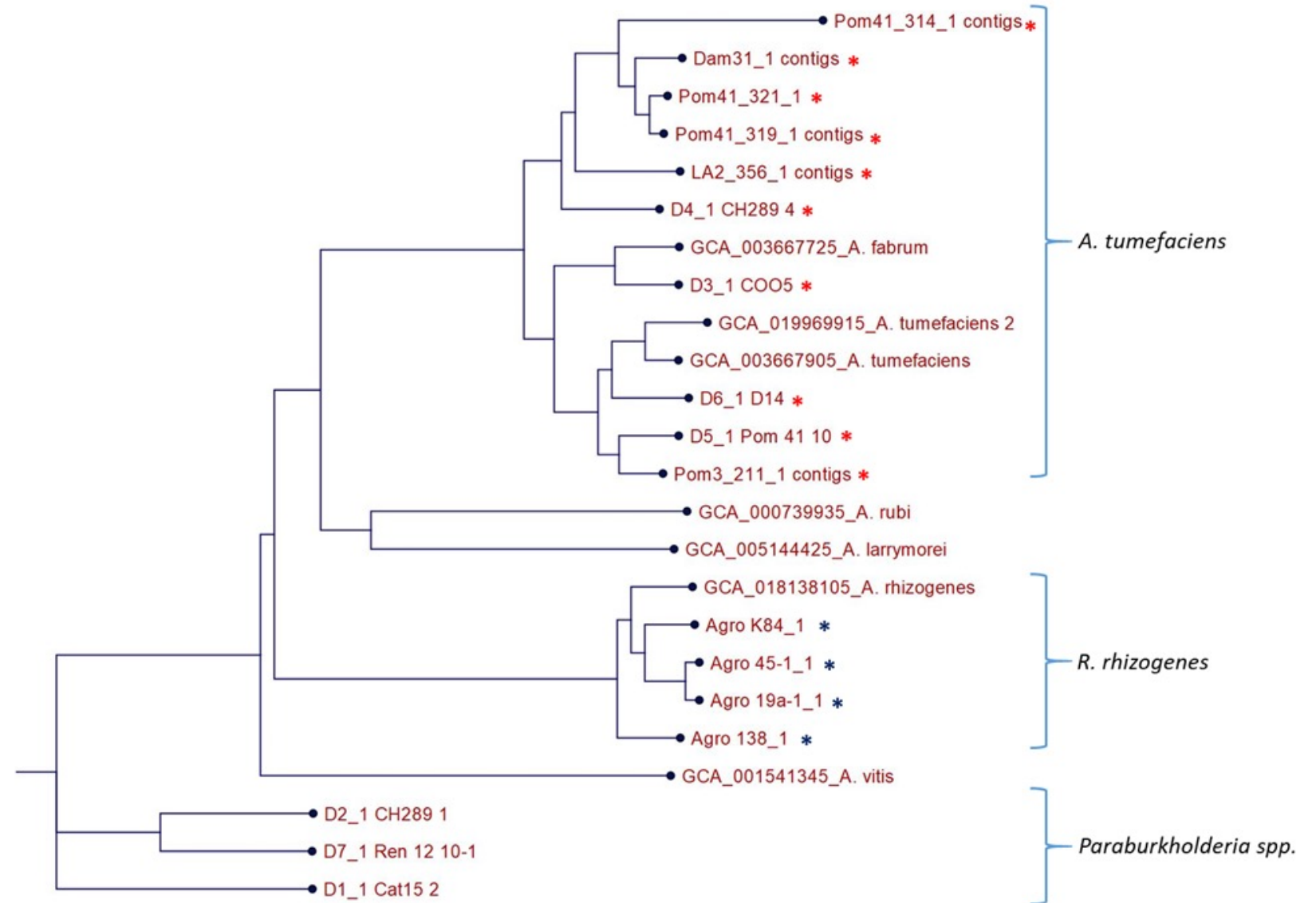


Sigamos con *Agrobacterium*... (trabajo en progreso)

- Colecta de aislados en la zona central
- Diferentes hospederos incluido cerezo
- Identificación en medio de cultivo semi-selectivo



Caracterización molecular



[organism selection](#)

Use to compute data for the following organisms:

Agrobacterium tumefaciens 12D1 (358.631)

Comparison Organism 1 Agrobacterium fabrum (1176649.52) [BlastDotPlot](#)

Comparison Organism 2 Agrobacterium tumefaciens D14 (358.629) [BlastDotPlot](#)

Comparison Organism 3 Agrobacterium tumefaciens LA2_356 (358.630) [BlastDotPlot](#)

Comparison Organism 4 Rhizobium rhizogenes (359.387) [BlastDotPlot](#)

Percent protein sequence identity

Additional best hit 100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10

Additional best hit 100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10

[table](#) [clear all filters](#)

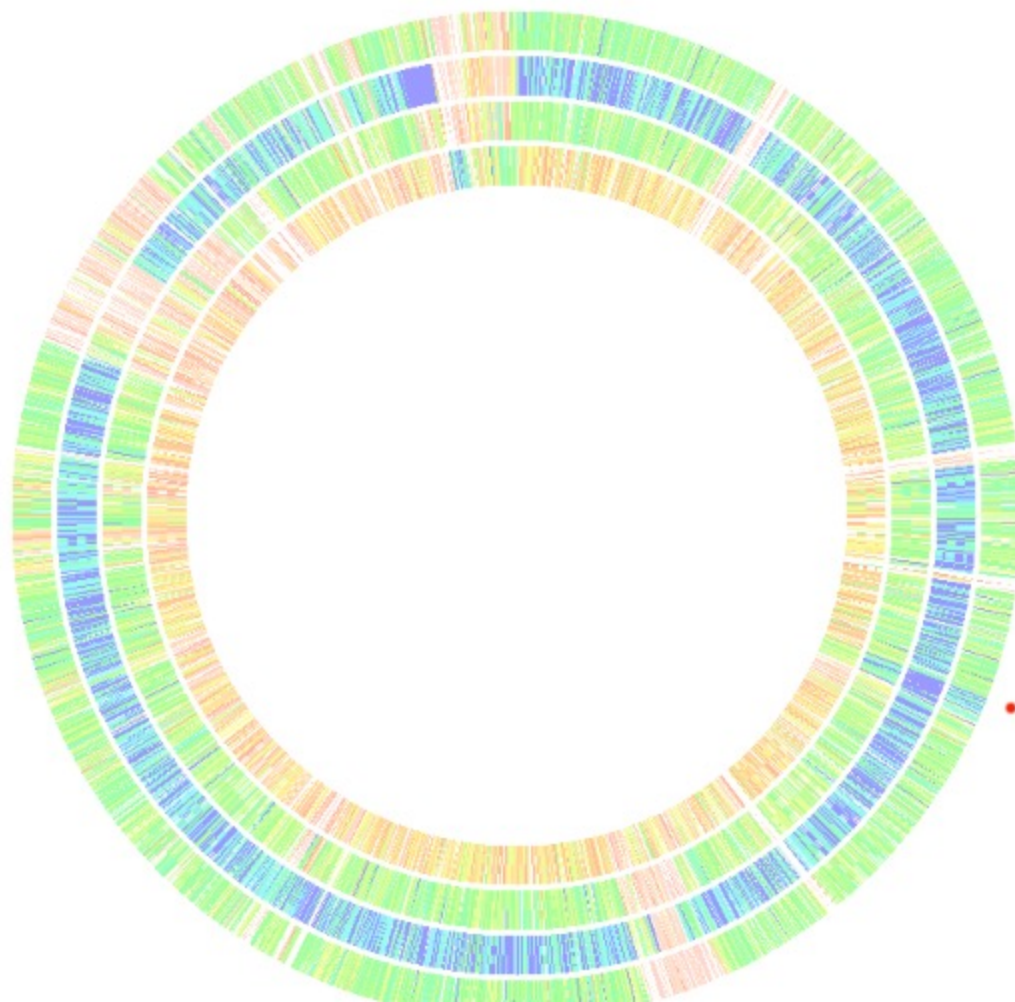
display 30 items per page

[prev](#) displaying 1631 - 1660 of 5239

[next](#) [last](#)

Percent identity 1176649.52 < ▾
Percent identity 358.629 < ▾
Percent identity 358.630 < ▾
Percent identity 359.387 < ▾

358.631				1176649.52				358.629				358.630				359.387			
Gene	Length	Hit	Contig	Gene	Length	Hit	Contig	Gene	Length	Hit	Contig	Gene	Length	Hit	Contig	Gene	Length	Hit	Contig
1631	133	bi	1	1724	62	bi	1	4830	194	bi	1	5255	217	bi	1	5153	217	bi	1
1632	102	bi	1	1725	62	bi	1	4831	194	bi	1	5254	217	bi	1	5154	217	bi	1
1633	185	bi	1	1726	62	bi	1	4832	194	bi	1	5253	217	bi	1	5155	217	bi	1
1634	103	bi	1	1727	62	bi	1	4833	194	bi	1	5252	217	bi	1	5156	217	bi	1
1635	123	bi	1	1728	62	bi	1	4834	194	bi	1	5251	217	bi	1	5157	217	bi	1
1636	79	bi	1	1729	62	bi	1	4835	194	bi	1	5250	217	bi	1	5158	217	bi	1
1637	67	bi	1	1730	62	bi	1	4836	194	bi	1	5249	217	bi	1	5159	217	bi	1
1638	138	bi	1	1731	62	bi	1	4837	194	bi	1	5248	217	bi	1	5160	217	bi	1
1639	244	bi	1	1732	62	bi	1	4838	194	bi	1	5247	217	bi	1	5161	217	bi	1
1640	130	bi	1	1733	62	bi	1	4839	194	bi	1	5246	217	bi	1	5162	217	bi	1
1641	93	bi	1	1734	62	bi	1	4840	194	bi	1	5245	217	bi	1	5163	217	bi	1
1642	279	bi	1	1735	62	bi	1	4841	194	bi	1	5244	217	bi	1	5164	217	bi	1
1643	98	bi	1	1736	62	bi	1	4842	194	bi	1	5243	217	bi	1	5165	217	bi	1
1644	207	bi	1	1737	62	bi	1	4843	194	bi	1	5242	217	bi	1	5166	217	bi	1
1645	214	bi	1	1738	62	bi	1	4844	194	bi	1	5241	217	bi	1	5167	217	bi	1
1646	103	bi	1	1739	62	bi	1	4845	194	bi	1	5240	217	bi	1	5168	217	bi	1
1647	392	bi	1	1740	36	bi	1	3782	161	bi	1	4219	561	bi	1	7535	561	bi	1
1648	700	bi	1	1741	23	bi	1	2680	138	bi	1	3330	217	bi	1	5170	217	bi	1
1649	157	bi	1	1742	23	bi	1	2679	138	bi	1	3331	217	bi	1	5171	217	bi	1
1650	124	bi	1	1743	23	bi	1	2678	138	bi	1	3332	217	bi	1	5172	217	bi	1
1651	98	bi	1	1744	23	bi	1	2677	138	bi	1	3333	217	bi	1	5173	217	bi	1
1652	117	bi	1	1745	23	bi	1	2676	-	bi	1	-	217	bi	1	4269	217	bi	1
1653	362	bi	1	1746	23	bi	1	2675	138	bi	1	3334	153	bi	1	3672	153	bi	1
1654	1403	bi	1	1747	23	bi	1	2674	138	bi	1	3335	217	bi	1	5174	217	bi	1
1655	1379	bi	1	1748	23	bi	1	2673	138	bi	1	3336	217	bi	1	5175	217	bi	1
1656	126	bi	1	1750	23	bi	1	2671	138	bi	1	3338	217	bi	1	5176	217	bi	1
1657	173	bi	1	1751	23	bi	1	2670	138	bi	1	3339	217	bi	1	5177	217	bi	1
1658	232	bi	1	1752	23	bi	1	2669	138	bi	1	3340	217	bi	1	5179	217	bi	1
1659	144	bi	1	1753	23	bi	1	2668	138	bi	1	3341	217	bi	1	5180	217	bi	1
1660	177	bi	1	1754	23	bi	1	2667	138	bi	1	3342	217	bi	1	5181	217	bi	1



organism selection

use to compute data for the following organisms:

Agrobacterium tumefaciens 12D1 (358.631)

Agrobacterium fabrum (1176649.52) [BlastDotPlot](#)

Agrobacterium tumefaciens D14 (358.629) [BlastDotPlot](#)

Agrobacterium tumefaciens LA2_356 (358.630) [BlastDotPlot](#)

Rhizobium rhizogenes (359.387) [BlastDotPlot](#)

Percent protein sequence identity

100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10

100 99.9 99.8 99.5 99 98 95 90 80 70 60 50 40 30 20 10

table [clear all filters](#)

display 30 items per page

displaying 1 - 23 of 23

percent identity 1176649.52 < 80

percent identity 358.629 > 95

percent identity 358.630 > 95

percent identity 359.387 < 80

358.631		1176649.52			358.629			358.630			359.387		
Gene	Length	Hit all ▼	Contig all ▼	Gene	Hit bi ▼	Contig all ▼	Gene	Hit bi ▼	Contig all ▼	Gene	Hit all ▼	Contig all ▼	Gene
507	91	bi	1	531	bi	33	3326	bi	99	2283	bi	110	3184
586	209	uni	2	3419	bi	33	3247	bi	99	2202	uni	323	5893
1409	54	-			bi	62	4597	bi	194	5456	-		
1699	104	-			bi	22	2630	bi	28	221	-		
2000	423	bi	1	2098	bi	11	1945	bi	28	520	bi	217	4060
2730	150	-			bi	42	3806	bi	222	5426			
3138	290	uni	2	4082	bi	80	551	fig 358.629.peg.1945					
3297	376	uni	2	3387	bi	79	512	location: D8_1_D14_(paired_trimmed_pairs)_contig_1Ave					
3299	122	uni	3	4898	bi	79	512	length: 422					
3633	304	uni	2	3131	bi	6	121	identity: 1					
3840	548	bi	3	4916	bi	12	2358	function: BACTEROID DEVELOPMENT PROTEIN BAC					
3847	376	bi	3	4922	bi	12	2351	bi	187	4801	uni	34	1854
4060	88	-			bi	5	1149	bi	187	4794	bi	525	6925
4454	303	uni	1	1553	bi	4	801	bi	178	4545	-		
4455	268	uni	2	3470	bi	4	800	bi	59	1013	uni	217	4452
4456	222	uni	2	3903	bi	4	799	bi	59	1012	uni	560	7202
4457	347	uni	2	4303	bi	4	798	bi	59	1011	bi	1	206
4459	293	uni	5	5373	bi	4	796	bi	59	1010	bi	1	210
4460	265	bi	2	4160	bi	4	795	bi	59	1008	bi	1	208
4618	329	uni	2	4389	bi	4	639	bi	59	1007	bi	1	207
4707	308	uni	2	3949	bi	4	639	bi	170	4360	bi	132	3586
4708	416	uni	2	3949	bi	17	2491	bi	170	4418	bi	13	1124
4708	416	uni	1	1924	bi	17	2492	bi	170	4419	bi	13	1215
4868	151	-			bi	2	142	bi	10	143	uni	185	3926

displaying 1 - 23 of 23

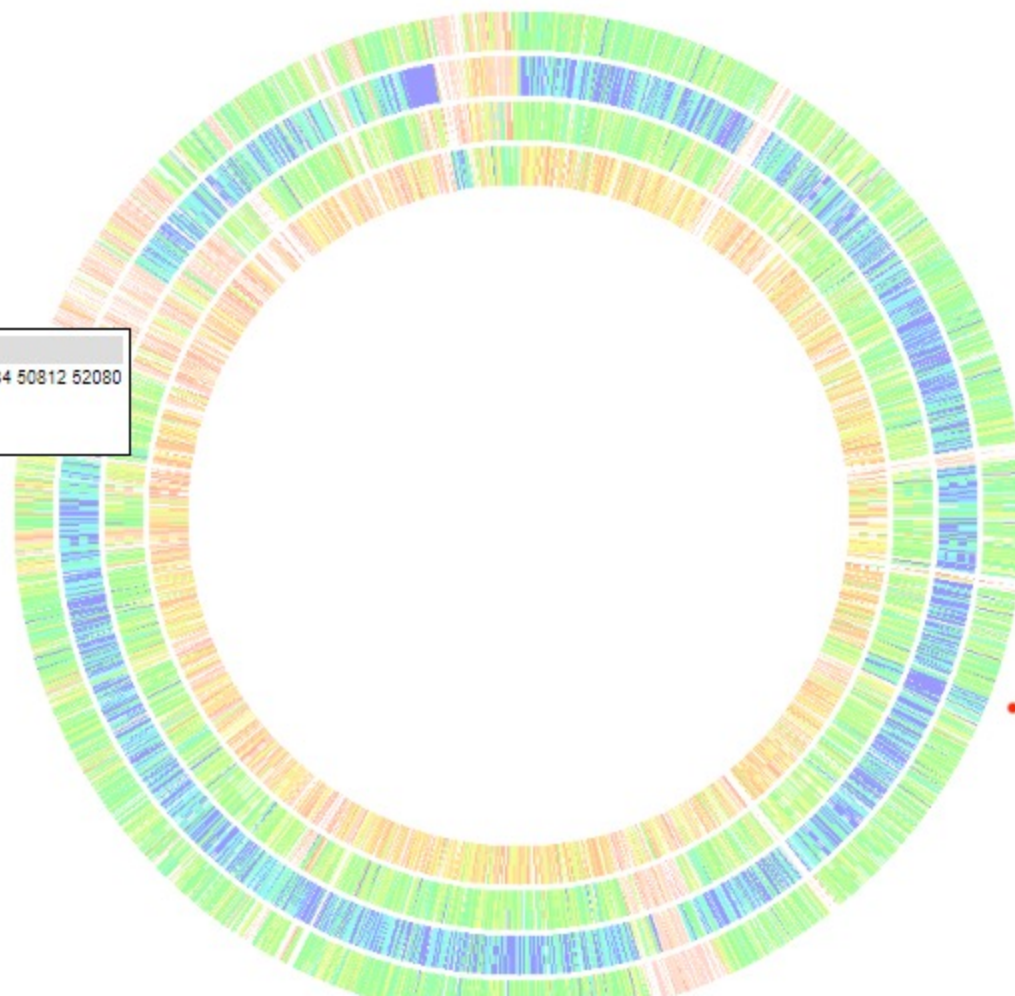
fig|358.629.peg.1945

location: D8_1_D14_(paired_trimmed_pairs)_contig_1Averagecoverage_35834 50812 52080

length: 422

identity: 1

function: BACTEROID DEVELOPMENT PROTEIN BACA



Sequences producing significant alignments

Download

Select columns

Show 100



☒ select all 100 sequences selected

GenPept

Graphics

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Id.	Acc.
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Agrobacterium tumefaciens]	Agrobacterium tumefaciens	406	406	99%	1e-142	100.0	
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Agrobacterium tumefaciens]	Agrobacterium tumefaciens	404	404	99%	6e-142	99.48	
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Agrobacterium]	Agrobacterium	404	404	99%	8e-142	99.48	
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Agrobacterium tumefaciens]	Agrobacterium tumefaciens	403	403	99%	1e-141	99.48	
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Agrobacterium sp. LAD9]	Agrobacterium sp. LAD9	395	395	99%	2e-138	97.44	
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Agrobacterium tumefaciens]	Agrobacterium tumefaciens	394	394	99%	6e-138	97.95	
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Agrobacterium tumefaciens complex]	Agrobacterium tumefaciens complex	394	394	99%	7e-138	97.44	
☒	hypothetical protein ATCR1_04209 [Agrobacterium tumefaciens CCNWGS0286]	Agrobacterium tumefaciens CCNWGS...	388	388	95%	9e-136	99.47	
☒	alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase AlkB [Rhizobium rhizogenes]	Rhizobium rhizogenes	350	350	98%	2e-120	86.06	

UPLOAD FILE: Primer Alk.fas

```
1  ATGAATCATG  TCGGTGCATC  CCTTTTGCAG  CCAGGCGTCA  TGTATTTTCA  CGCCTTCGTC  TCCCCCGAAG  AGGAAGCCAC  80
81  CCTCGCAGCC  ATATTGGATA  ACGGTGCTTG  GAGCACTGAG  TTGAAGCGCC  GTGTGCAGCA  TTTCGGTTAT  CGCTACGACT  160
161  ATAAAGCGGC  CACTGTTACC  CCAGATGCCT  ATCTCGGGCC  ATTGCCACAG  TGGTTGGGTA  TCTTCGCTGA  GCGATTGTTT  240
241  ACGGAAGGAT  ATTGCCGAAA  TTTCGCCGAC  CAGGTGATTG  CGAACGAGTA  TCCTCCGGGC  CAGGGCATCA  GCGCACACAT  320
321  CGACTGTGTT  CCTGTTTTTC  ACGATACAA  CGTTCGATA  AGCCTTCTAT  CCGCATGTGA  GATGGTTTTC  CACGATGTGC  400
401  GCGGACCAGC  CGCGTGGGT  GTTTTGTTC  AACCTCGCTC  CGCGTCTTC  CTGAGAGATT  CCGGCCGCTA  CGGCTGGACT  480
481  CATGAAATTC  CGGCTGCGAA  ATCGGATATC  GTGAATGGAG  TTAGGACAGA  CCGAAGCAGA  AGAATTTCCC  TCACTTTTCG  560
561  CAAGGTCATC  GCTCCGAAAT  GGTCTTGA  598
```

Set Mutation

Mut/Cons

Clear

Fixed Primer

F3

F2

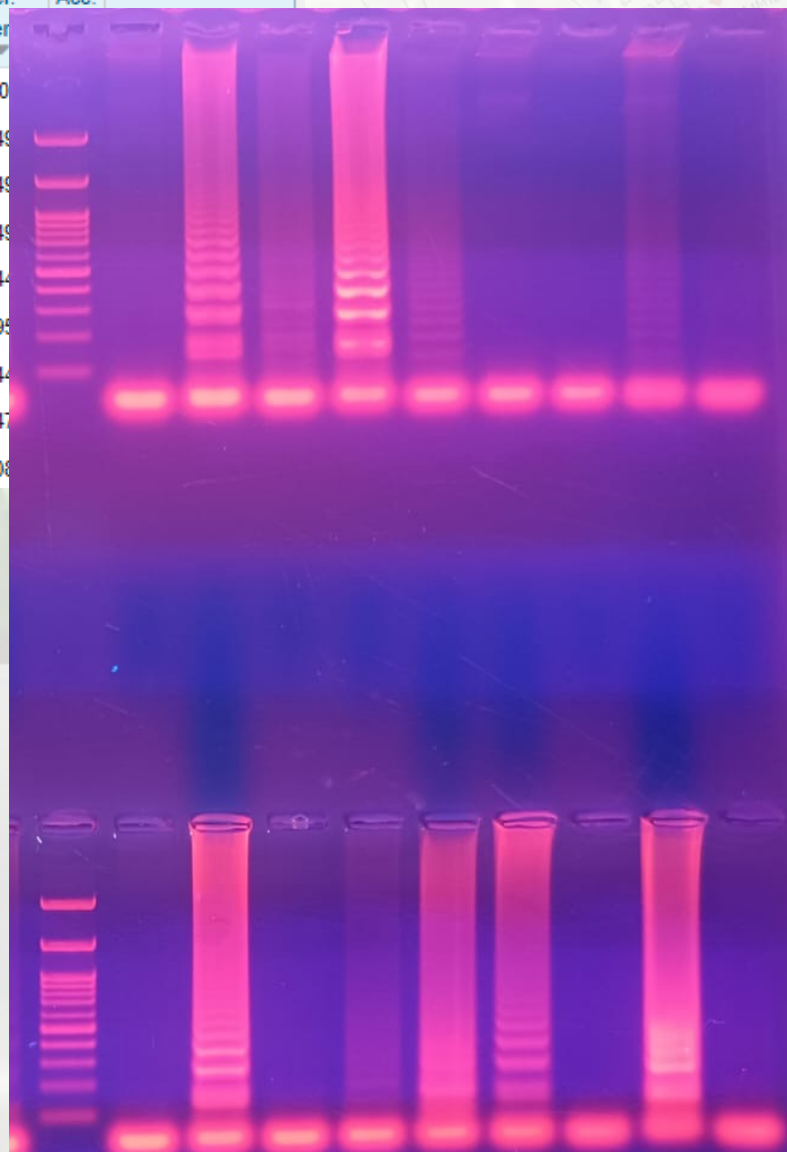
F1

B1

B2

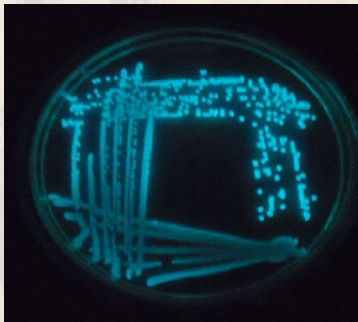
B3

Clear



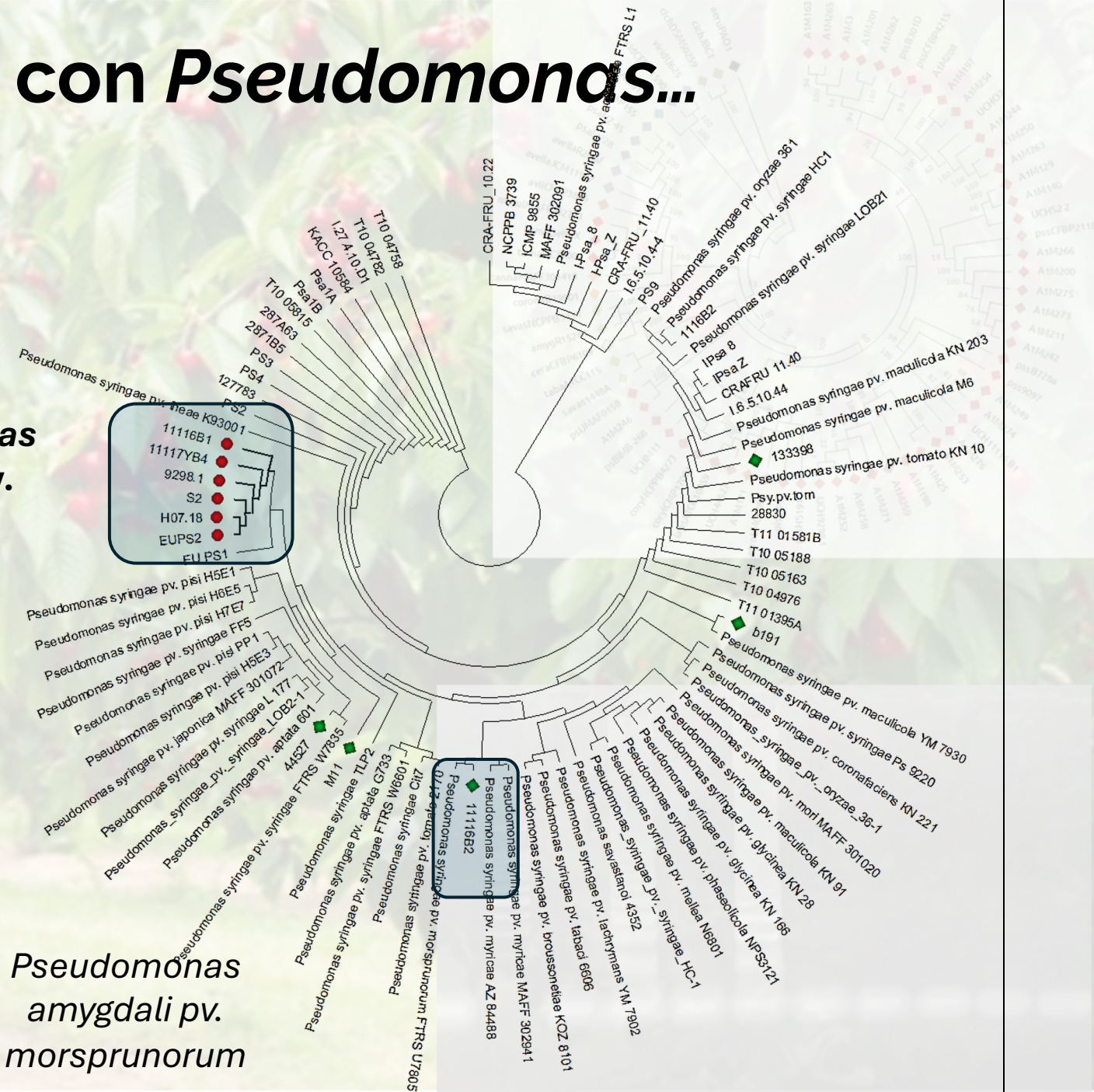
con *Pseudomonas*...

- Colecta de aislados en la zona central
- Diferentes hospederos incluido cerezo
- Identificación en medio de cultivo diferencial



Caracterización molecular

Pseudomonas syringae* pv. *syringae



*Pseudomonas
amygdali* pv.
morsprunorum



**Y ahora que la detectamos,
Interacción con la planta**

Interacción con la planta

Antecedentes



Susceptible

-



Susceptible

+

Fotografía: Javier Rodrigo García

Santina

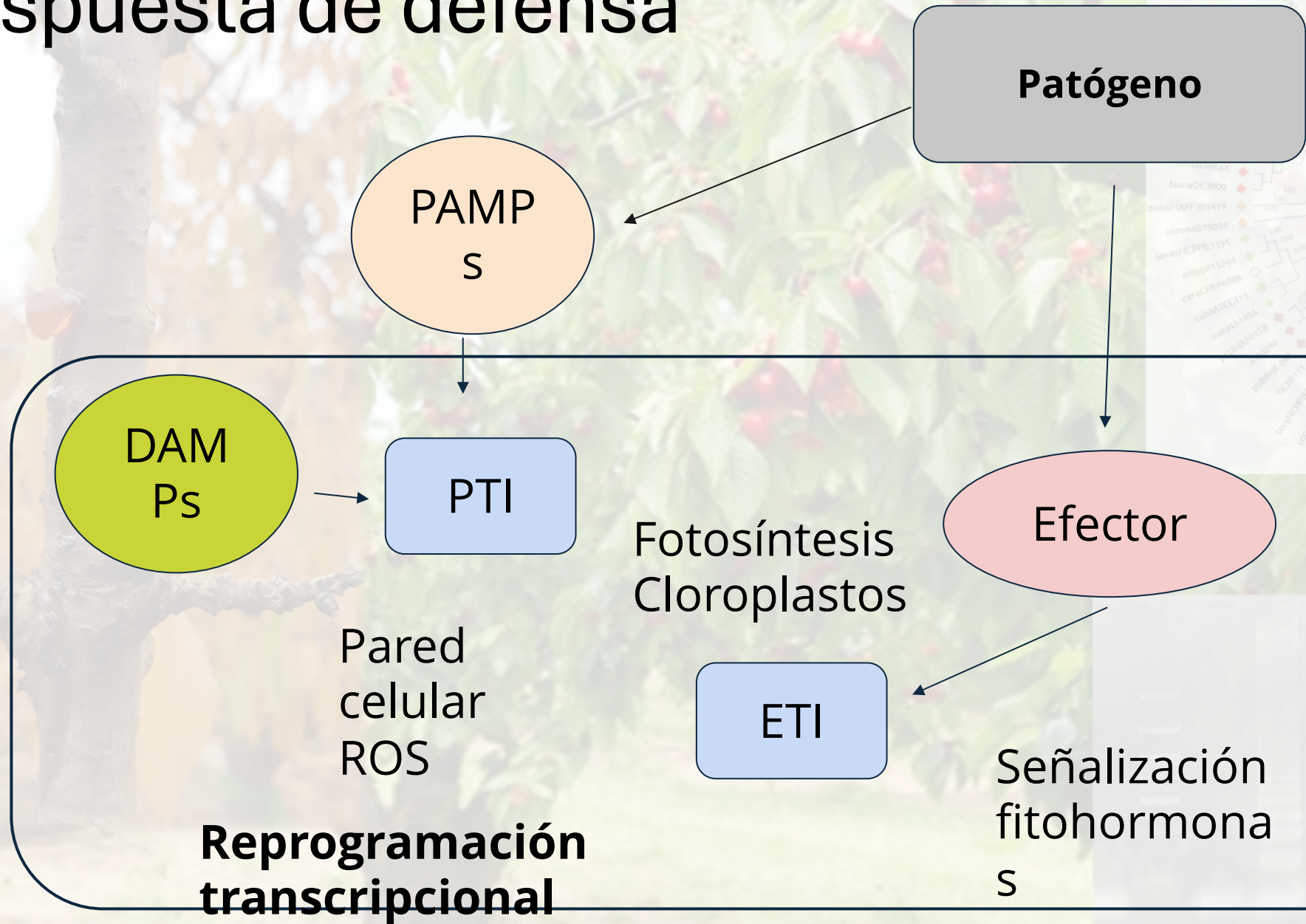
Lapins

Regina

Bing



Respuesta de defensa



Estrés individual v/s combinado



Estrés individual

Estrés combinado

Estrés
hídrico

Pss

$\neq$

Pss
+
Déficit
hídrico

Menor número de genes regulados

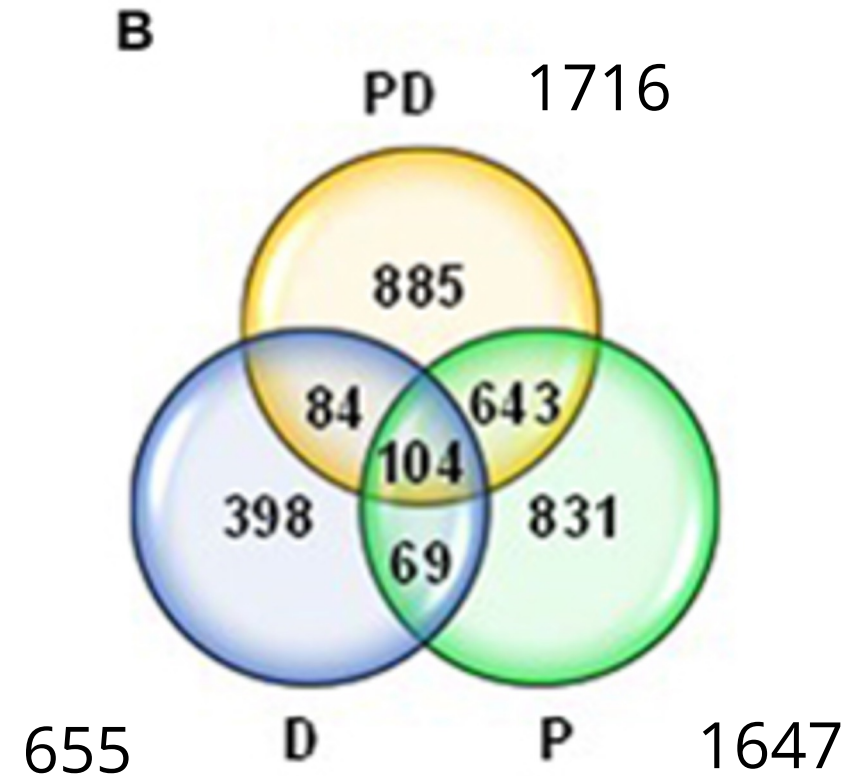
Respuestas únicas
Cronología del estrés

Estrés individual v/s combinado



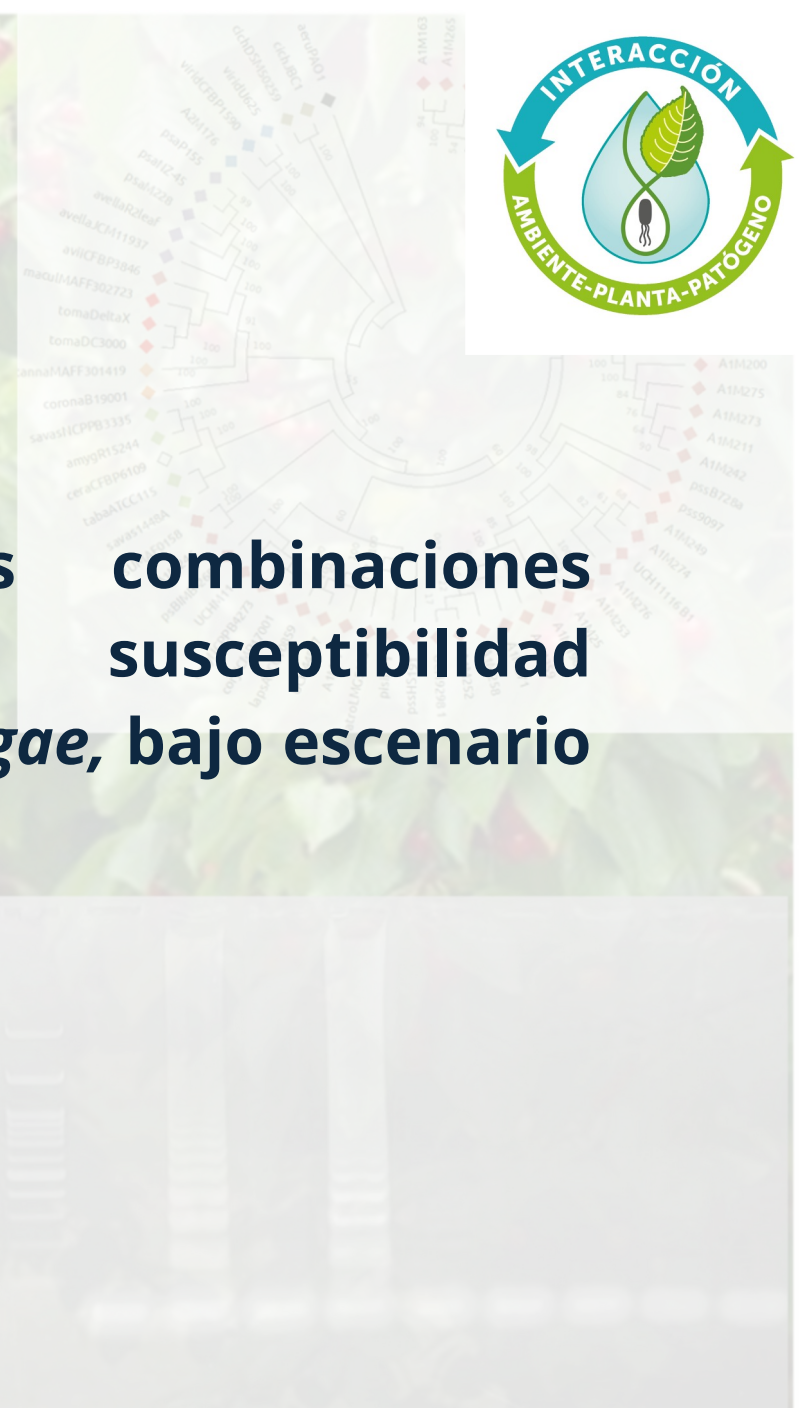
- Las plantas en estrés combinado con cronología P-DH fueron más susceptibles a Pst que las bien regadas (Gupta *et al.*, 2016).

Diagrama de Venn de la distribución de genes expresados diferencialmente (DEG) en el estrés por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst DC3000; P) y déficit hídrico (D), individual y combinado, en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Gupta *et al.*, 2016).



Objetivo

- **Evaluar el transcriptoma de distintas portainjerto-variedad de cerezo con susceptibilidad contrastante a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, bajo escenario de déficit hídrico.**



Selección del material vegetal

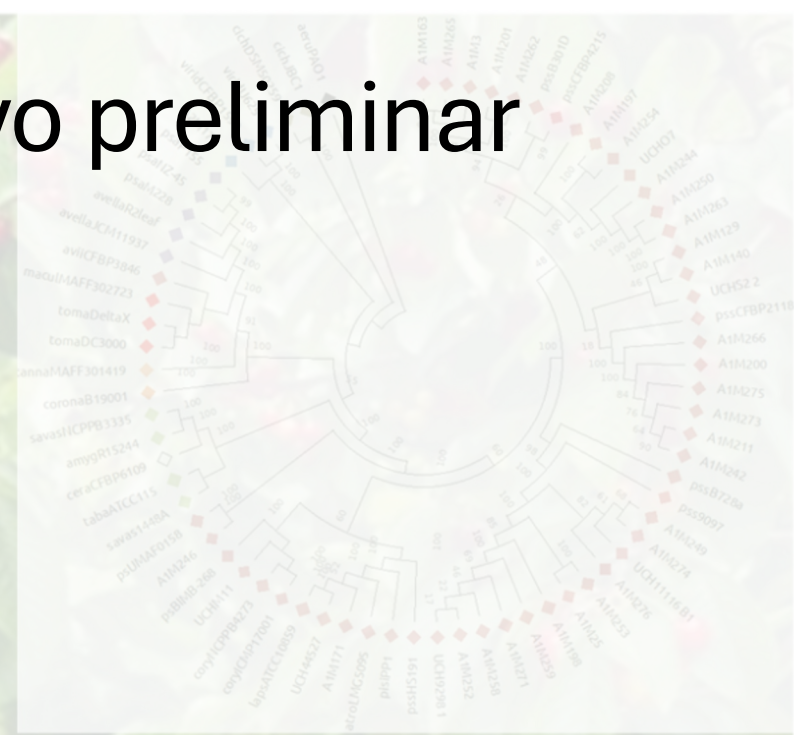


- Plantas de vivero de la misma edad, asintomáticas, de buen vigor.
- Centro de Estudios Avanzados en Fruticultura (CEAF), Rengo

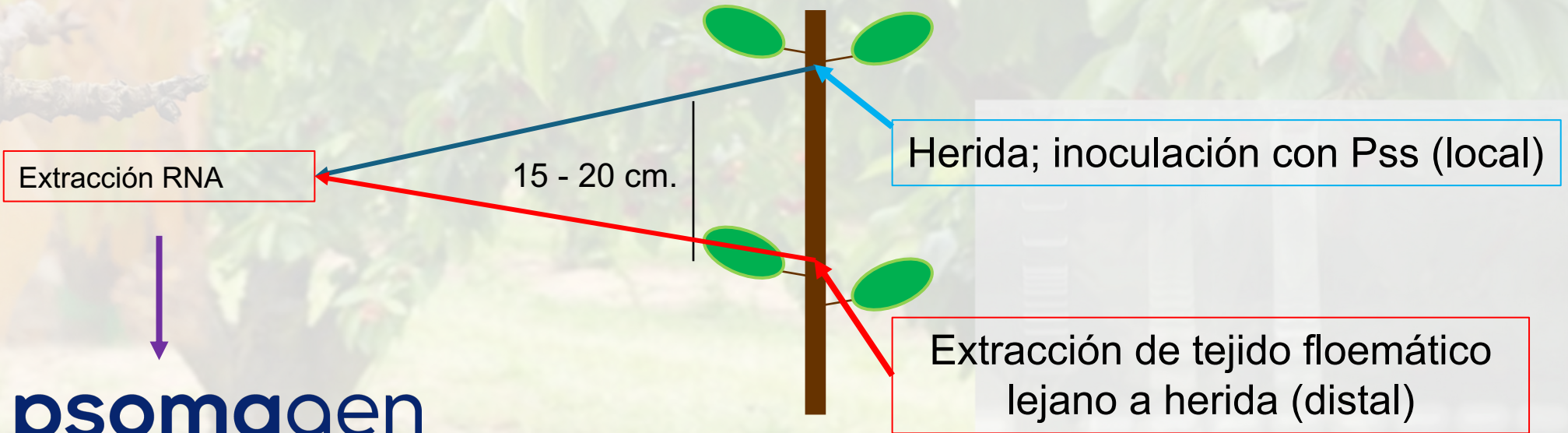
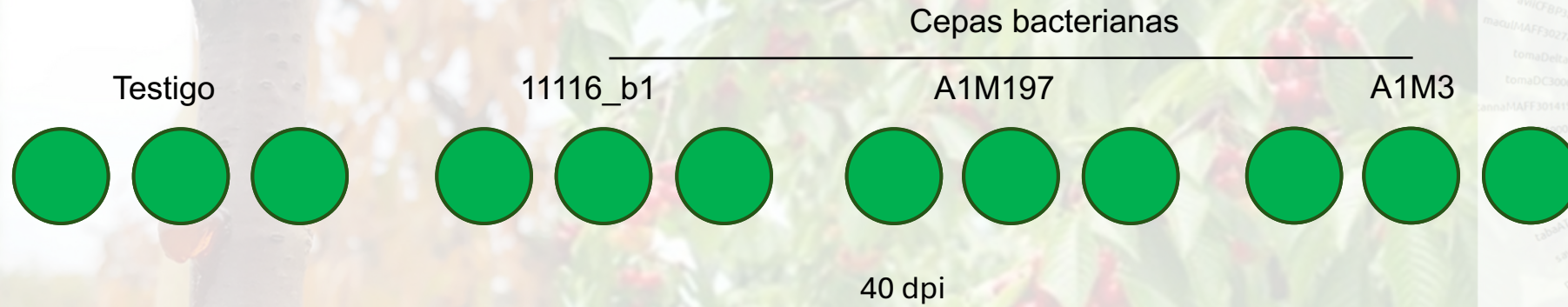


Selección de la cepa bacteriana: Ensayo preliminar

Primera aproximación transcriptómica



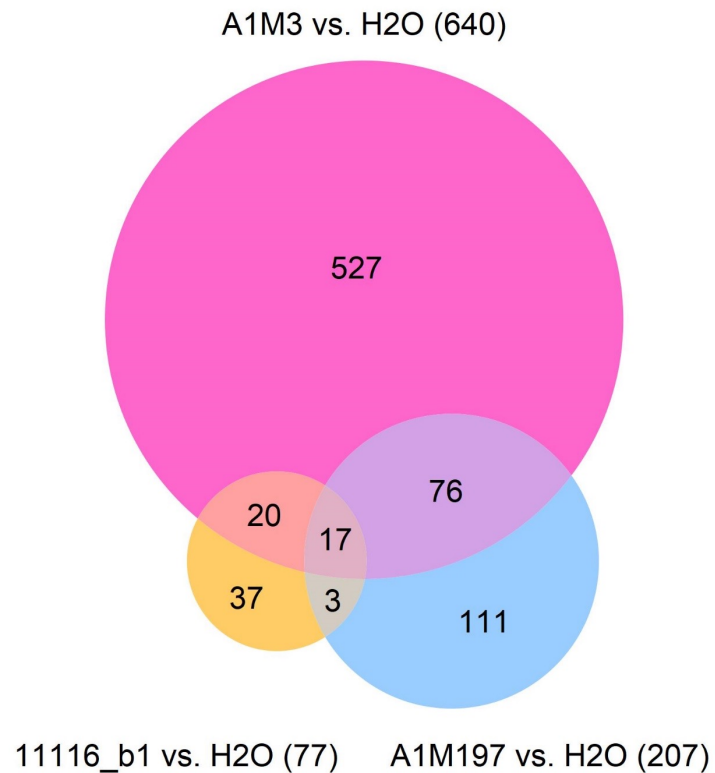
Selección de la cepa bacteriana: Ensayo preliminar



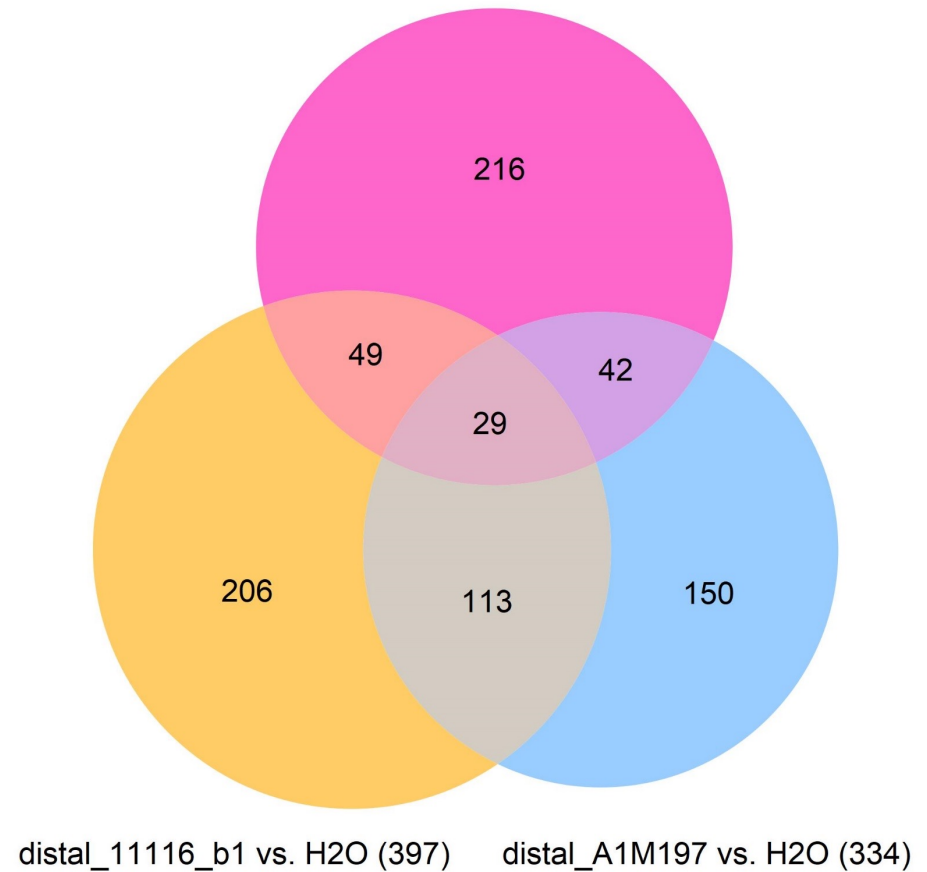
Tres bacterias candidatas, dos escenarios de expresión génica

- Software: CLC, “Differential Expression for RNA-Seq”
- Grupo control : Tratamiento con H₂O

Local



distal_A1M3 vs. H2O (336)



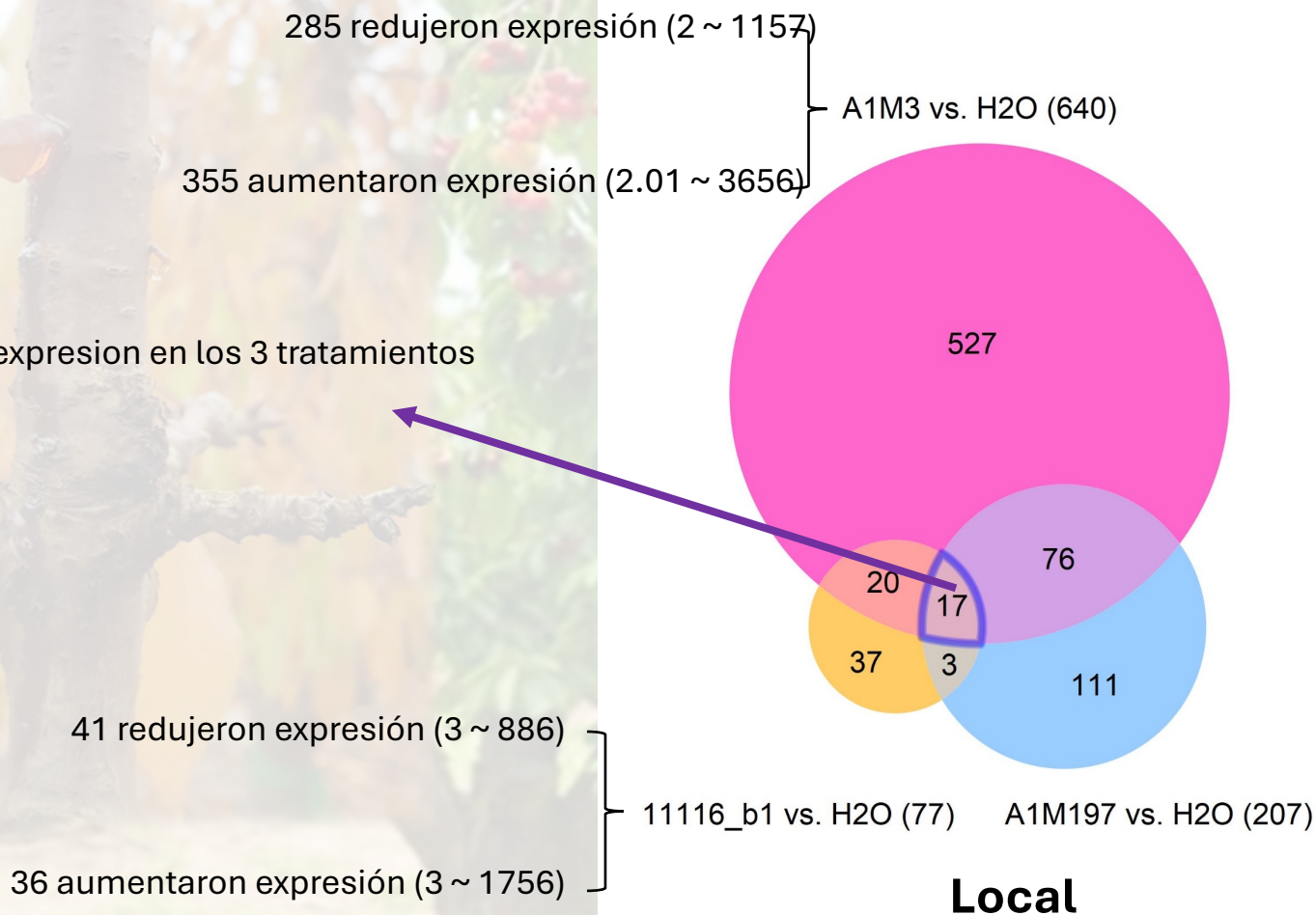
Distal

Patrones de expresión génica comparados

➤ Respuesta Local :

- Genes reprimidos $\approx$ genes inducidos
- A1M3 induce una respuesta mucho más intensa que 11116_b1 y que A1M197

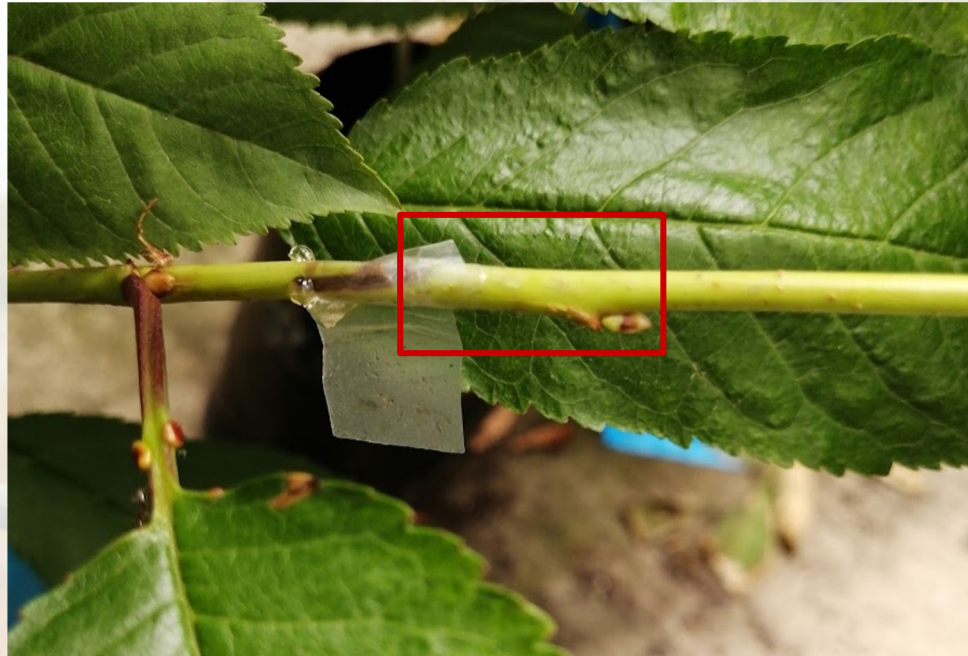
Se decide utilizar 11116b1



115 redujeron expresión (2.5 ~ 1450)

92 aumentaron expresión (2.15 ~ 4162)

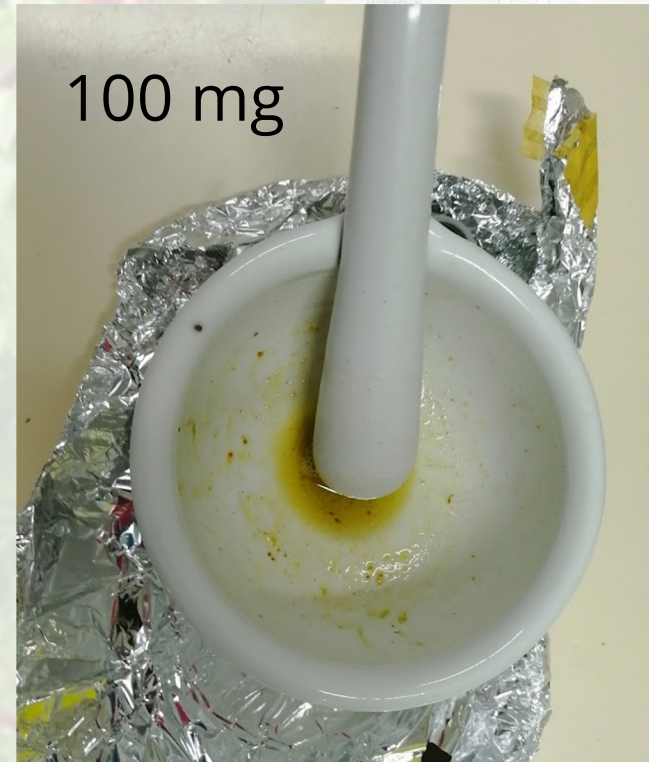
Transcriptoma



R1

R2

R3



RNA Spectrum Plant Total

Plantas de 1 año
Santina y Bing

Inoculación

Muestreo 1

**Síntomas
Muestreo 2**

Sombreadero y trasplante Traslado a campo

Seguimiento
infección

Inicio riego deficitario

Muestreo 3

13-oct-22

23-nov-22

24-nov-22

30-nov-22

06-dic-22
27-dic-22

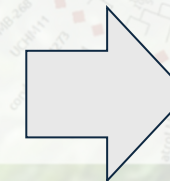
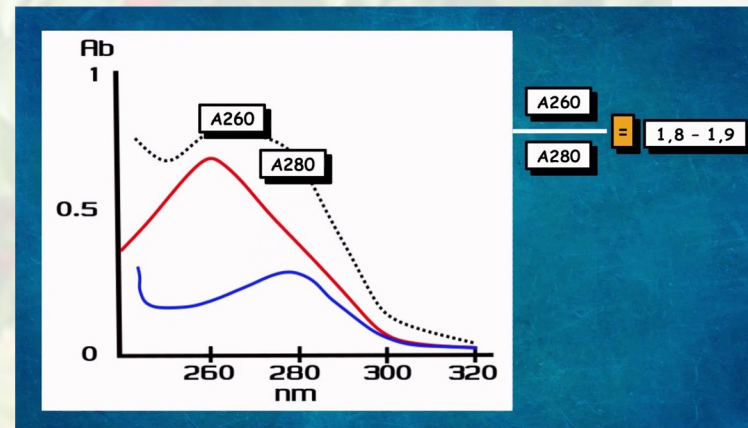
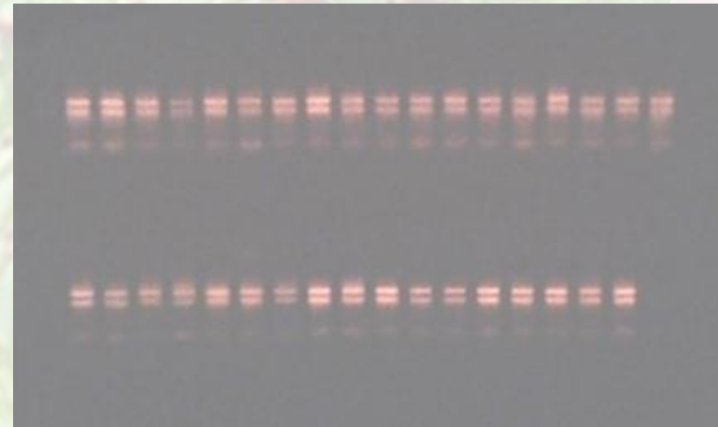
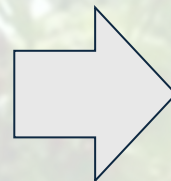
04-ene-23

11-ene-23

15-feb-23

15-mar-23

Transcriptoma



RNA Spectrum Plant Total Kit

Plantas de 1 año
Santina y Bing

Inoculación

Muestreo 1

**Síntomas
Muestreo 2**

Sombreadero y trasplante Traslado a campo

Seguimiento
infección

Inicio riego deficitario

Muestreo 4

13-oct-22

23-nov-22

24-nov-22

30-nov-22

06-dic-22
27-dic-22

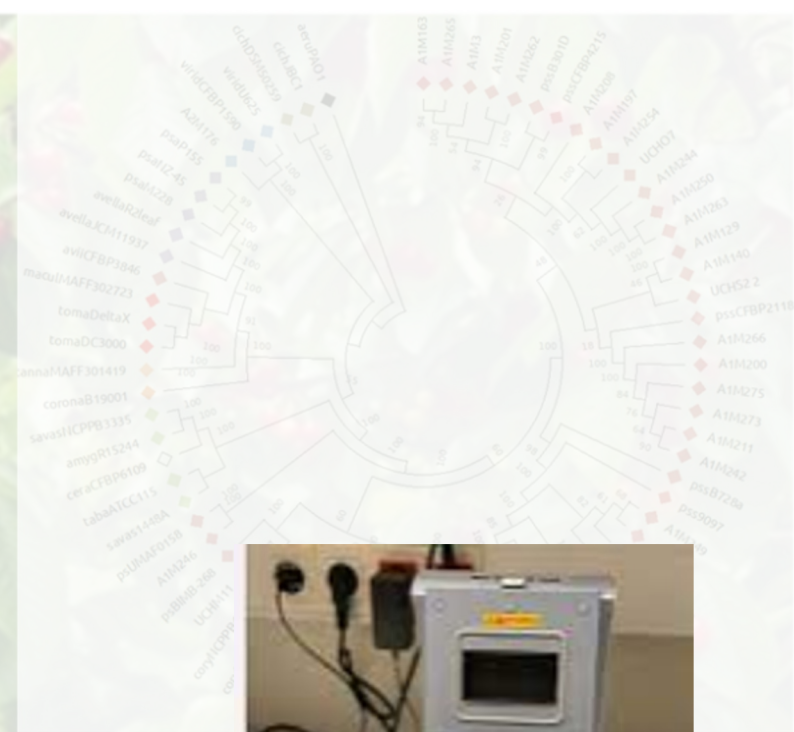
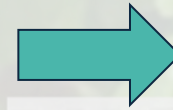
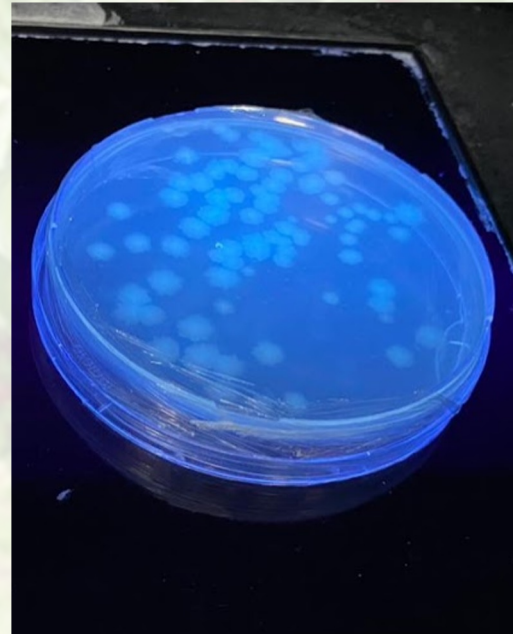
04-ene-23

11-ene-23

15-feb-23

15-mar-23

Seguimiento de la infección



Análisis bioinformáticos

illumina®

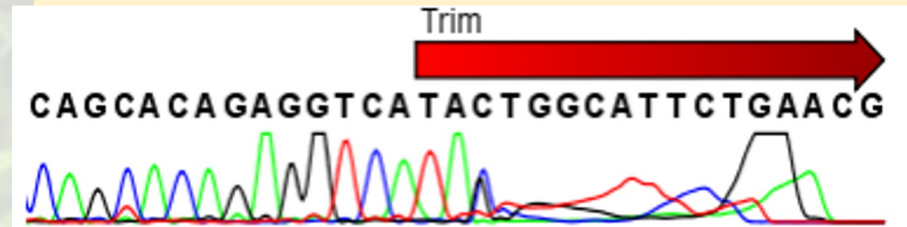


QIAGEN CLC Genomics
Workbench versión 23.1



Filtrado (Trimming)

Eliminar secuencias de baja
calidad



Librería TruSeq Stranded

Total RNA + Ribo-Zero

Análisis bioinformáticos

Ensamble por referencia Transcriptoma *Prunus avium*

PAV_r1.0

GCE_002207925.1

Size (Mb)	GC%	Protein	tRNA	Gene
272.36	38.8	35,009	419	30,405

var. Satonishiki

Parámetros:

80% de cobertura total de la lectura.

95% de identidad entre cada lectura.

Ensamble
de novo

Mapeo referencia

Genoma Pss11116B1

GCA_029383325.1 y de 10 virus
presentes en Chile

Detección Pss y virus

Análisis bioinformáticos

R1

R2

R3

Variedad vs Testigo

DEG

Entre Variedades



GEN	Arabidopsis locus description
ACT	Actin 2/7
CYP2	Cyclophilin (CYP2)
TEF2	Translation elongation factor 2
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
PLA2	Phospholipase A2 beta
RP II	RNA polymerase subunit
RPL13	60S ribosomal protein L13 (RPL13D)
TUA	Tubulin alpha-5
TUB	Tubulin beta-1
UBQ10	Ubiquitin 10



Se analizó la expresión relativa frente a genes housekeeping (Tong *et al.*, 2009).

En resumen: ensayo de interacción planta bacteria



Plantas de 1 año
Santina y
Bing/Gisela12



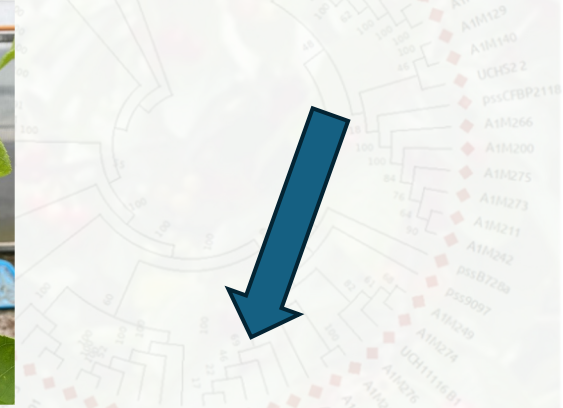
Muestreo 1
Transcriptoma



Sombreadero y
trasplante



Seguimiento
infección



Muestreo 3
Transcriptoma



13-oct-22

23-nov-22

24-nov-22

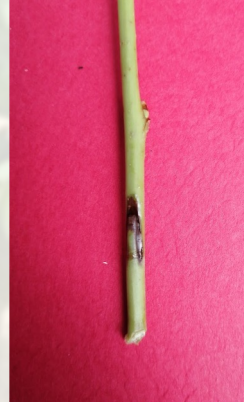
30-nov-22

06-dic-22
27-dic-22

04-ene-23

11-ene-23

marzo-2023



Ensayo de interacción planta-bacteria-estrés hídrico



Inicio riego deficitario

15-feb-23

Medición filocrono

(17-21-22-
24-27-feb-



Análisis fisiológicos
(Intercambio de gases)

(10-marzo-23

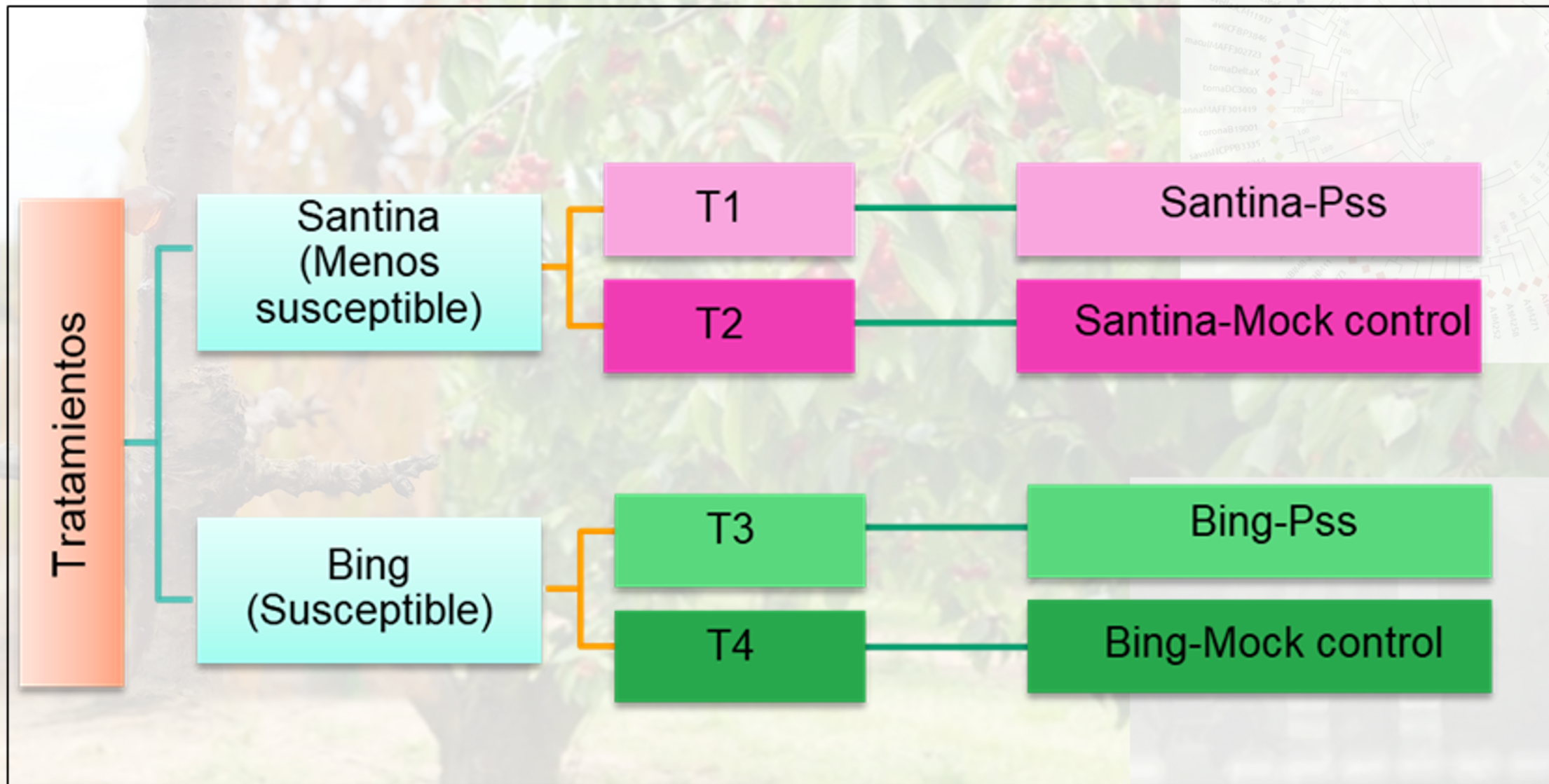


Muestreo
Transcriptoma
Hormonas
Biomasa

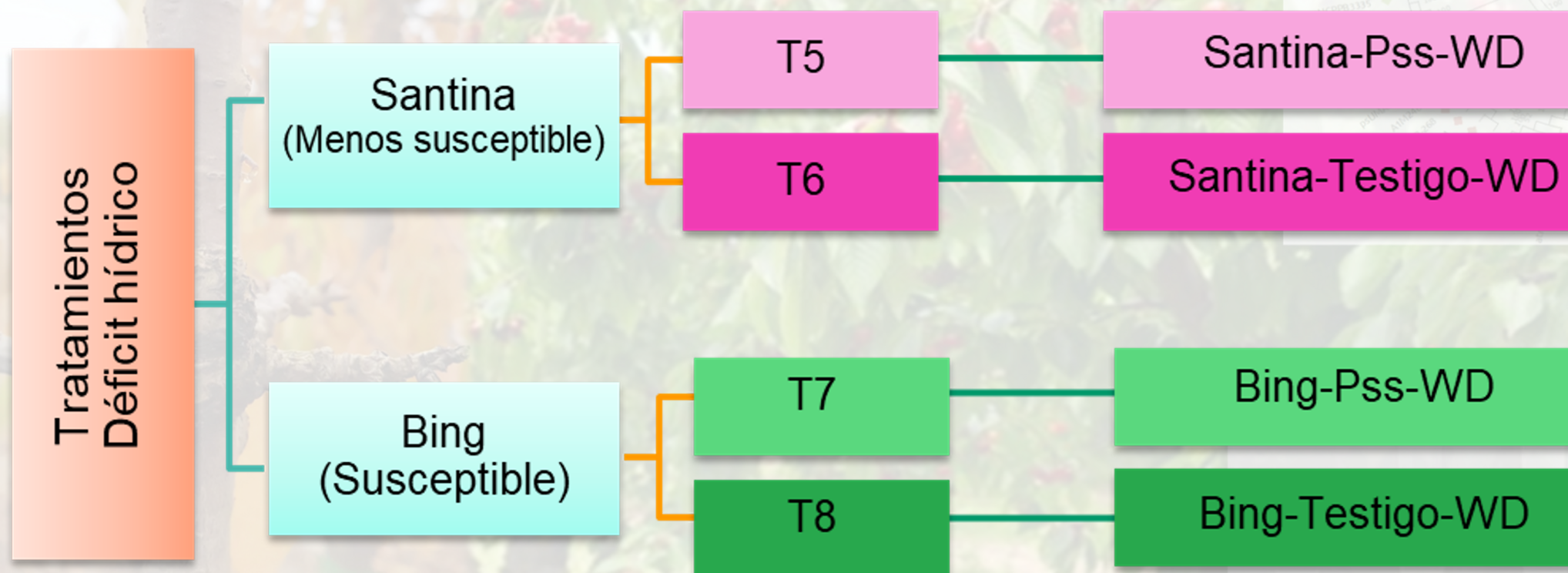


15-marz-23





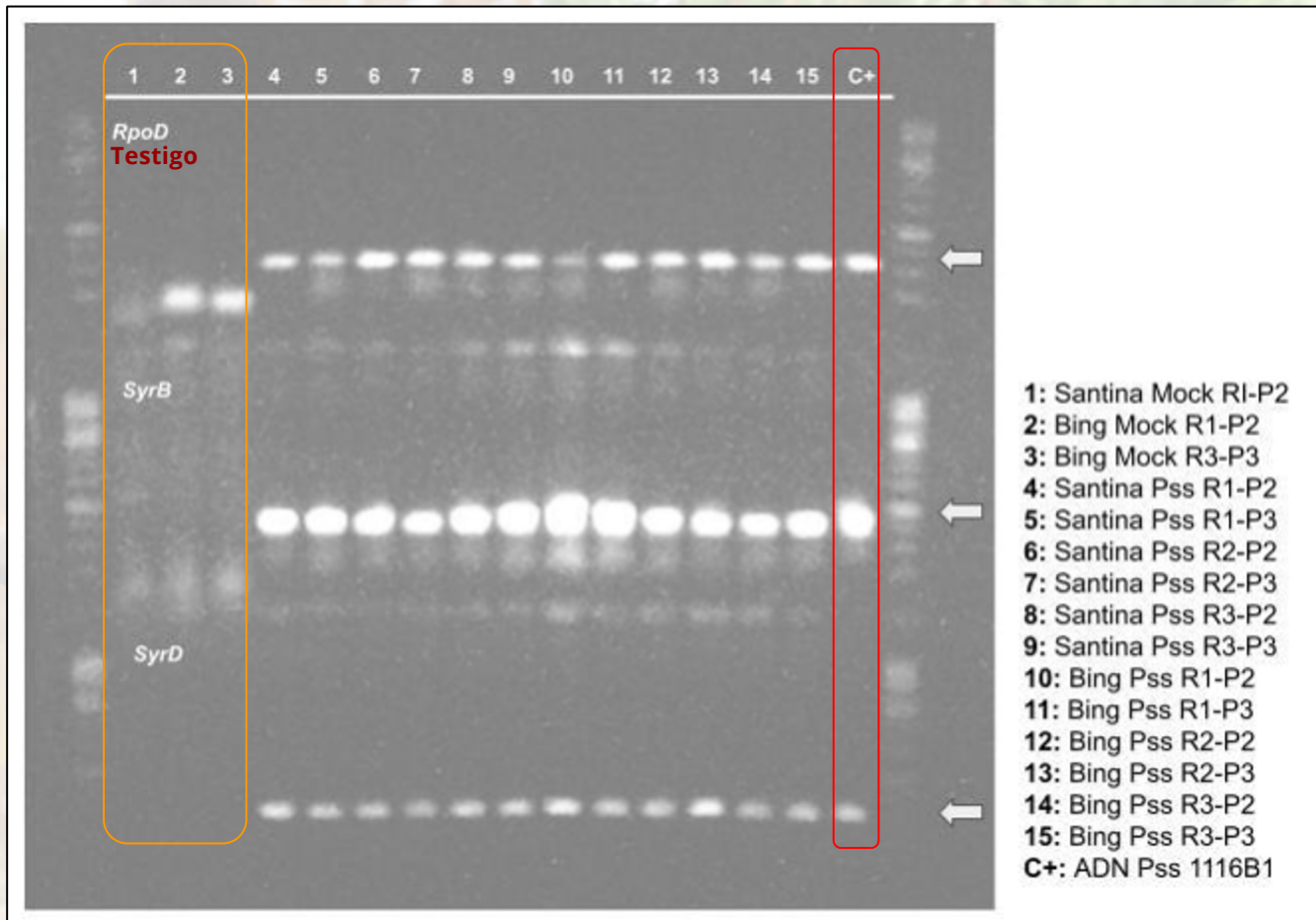
Tratamientos



Santina-Gisela 12



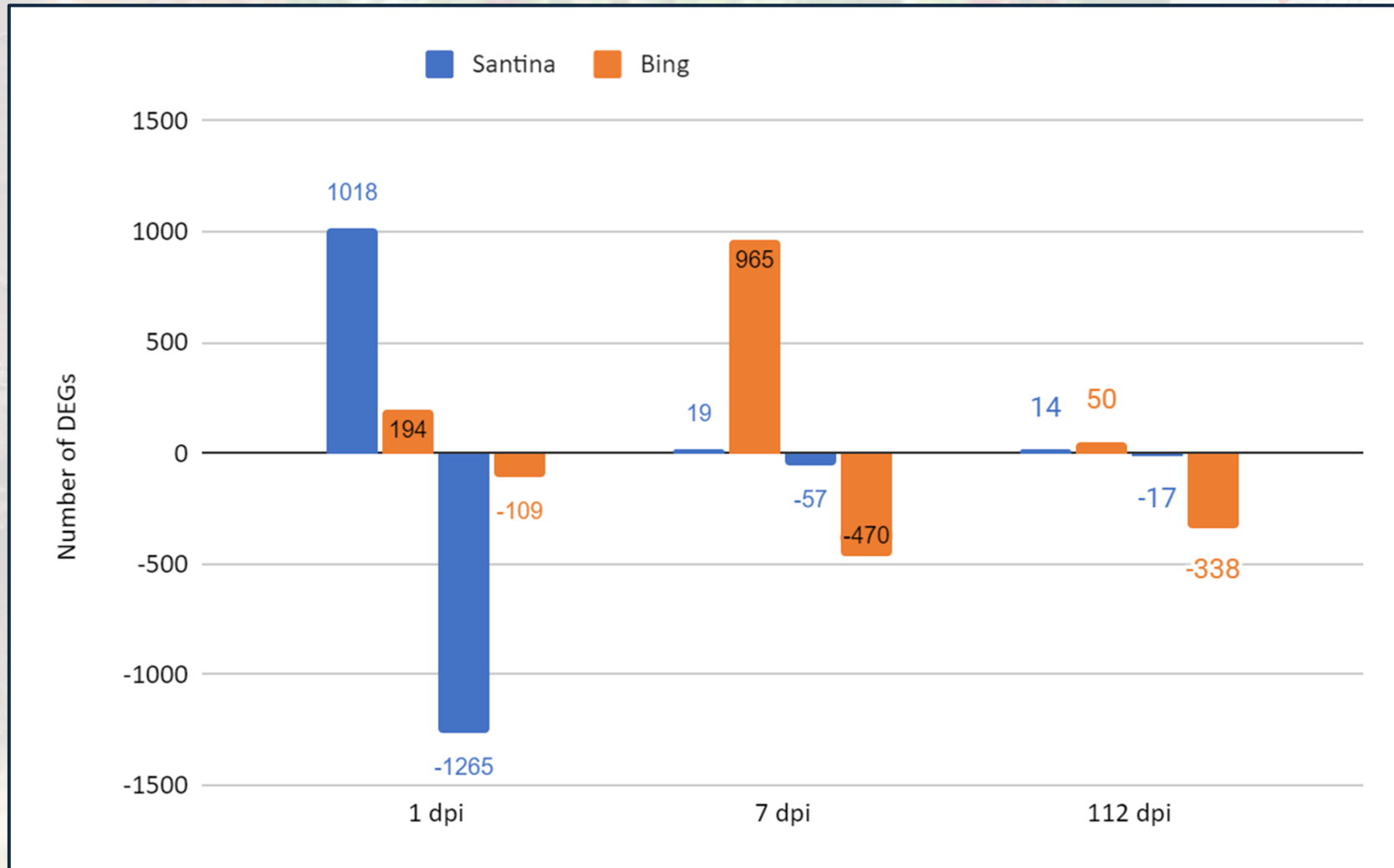
Seguimiento de la infección



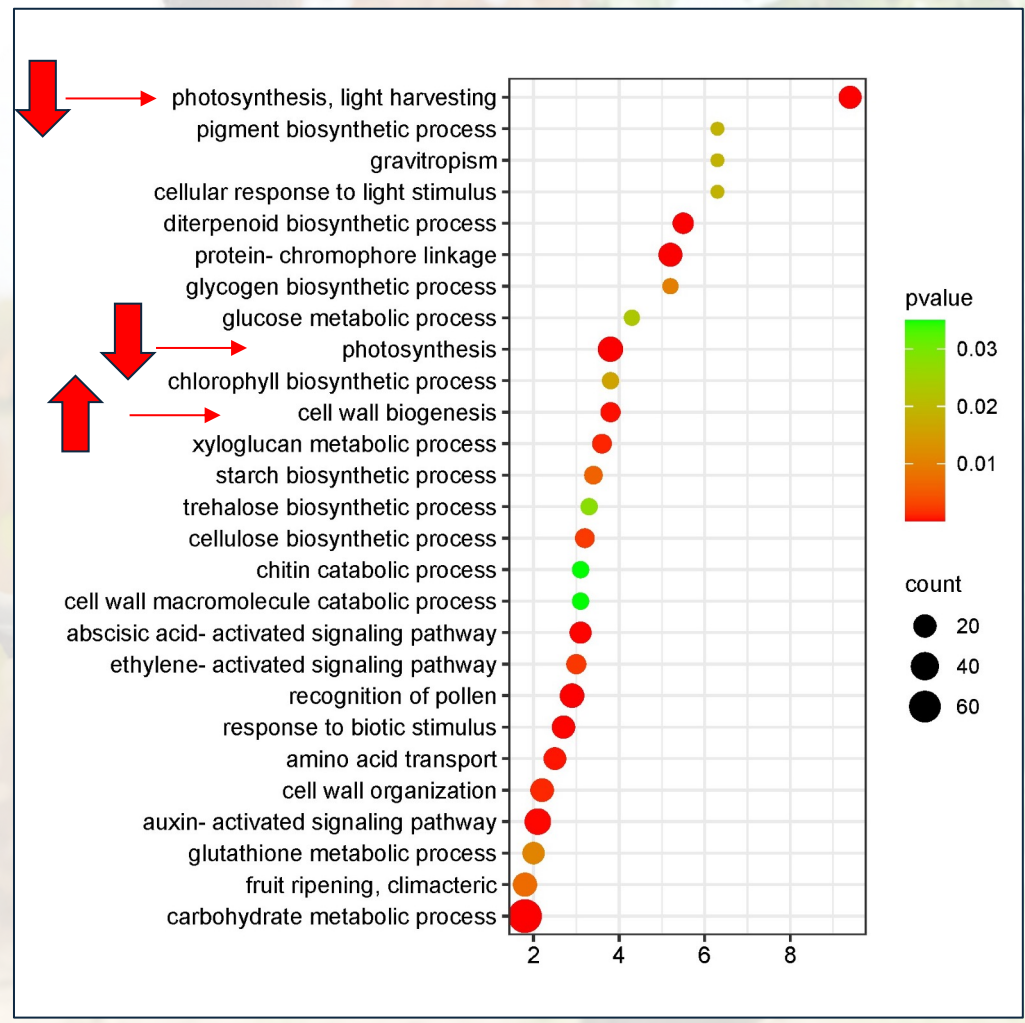
**Detección Pss a 49 dpi
con partidores
específicos de los genes
syrB y *syrD*.**

R: Repetición; P2: zona sobre el punto de
inoculación y P3 zona bajo el punto de
inoculación.

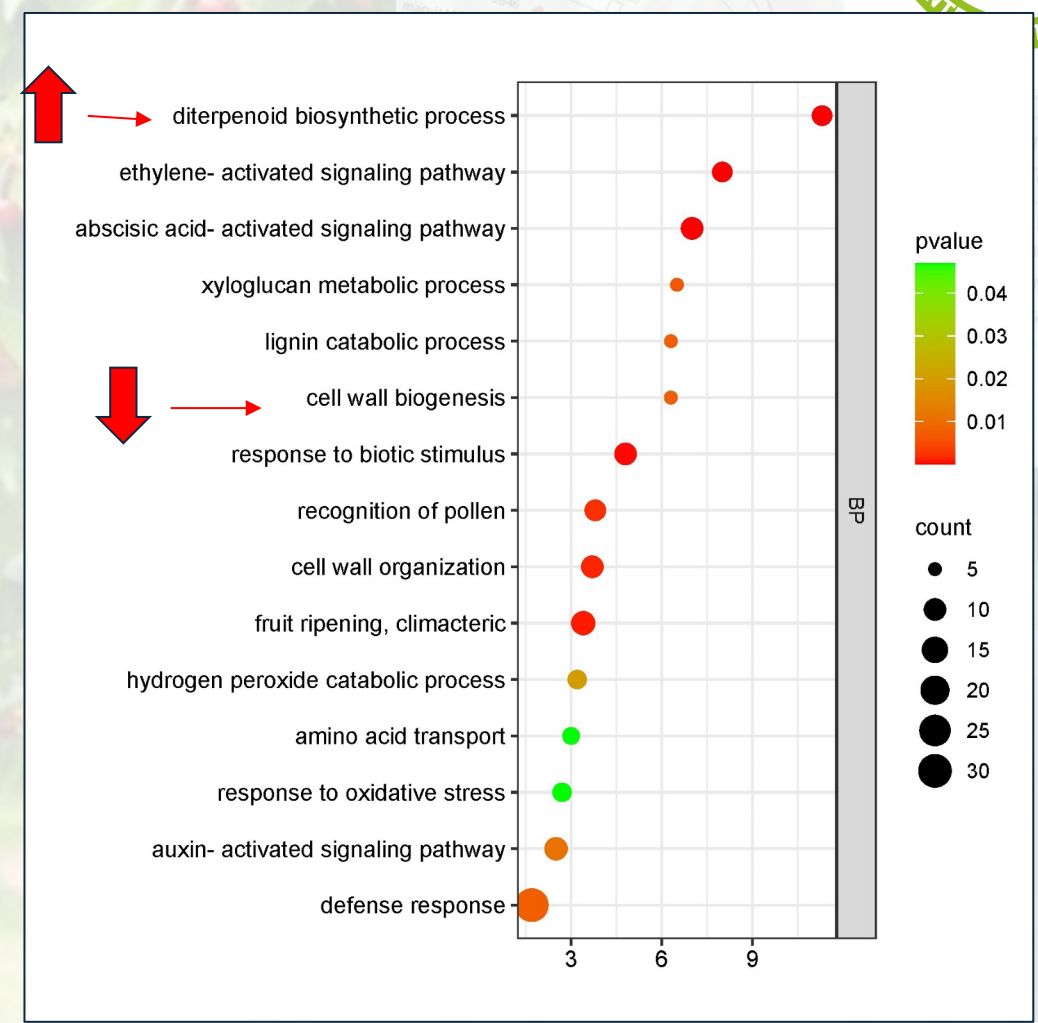
DEG: Pss vs Testigo



DEG Pss vs Testigo 1dpi

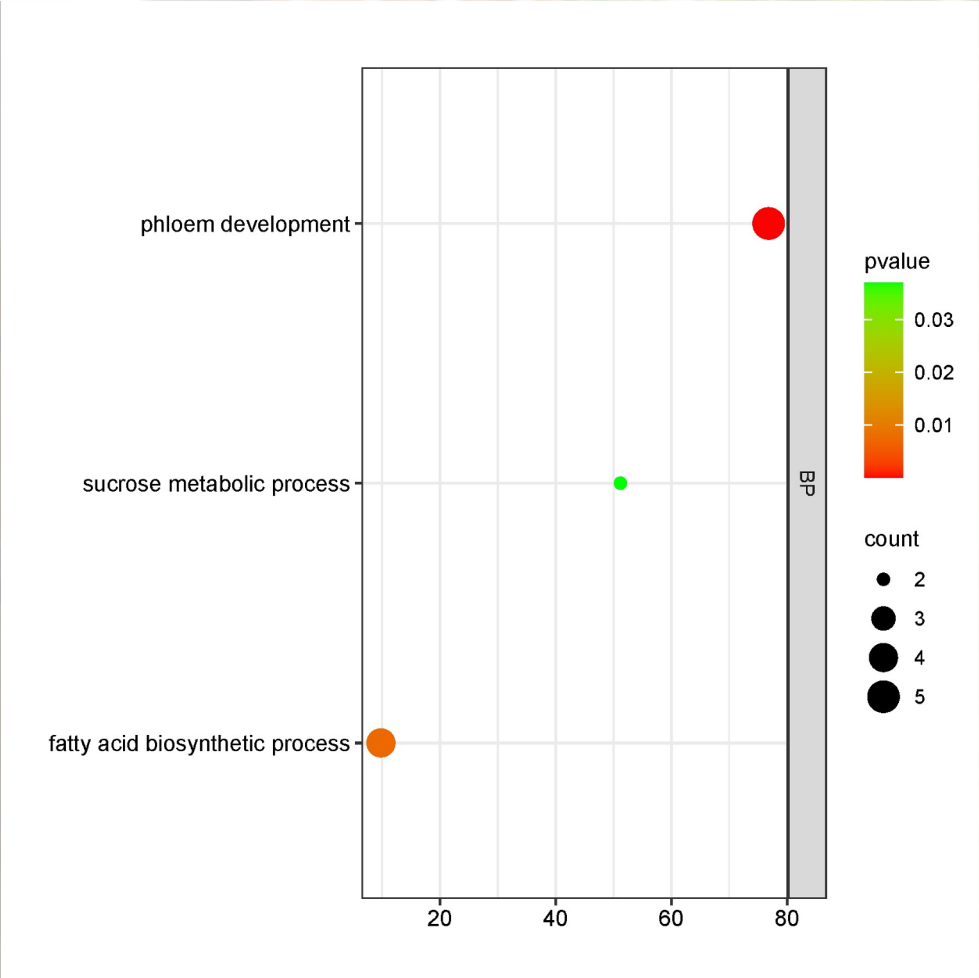


Santina

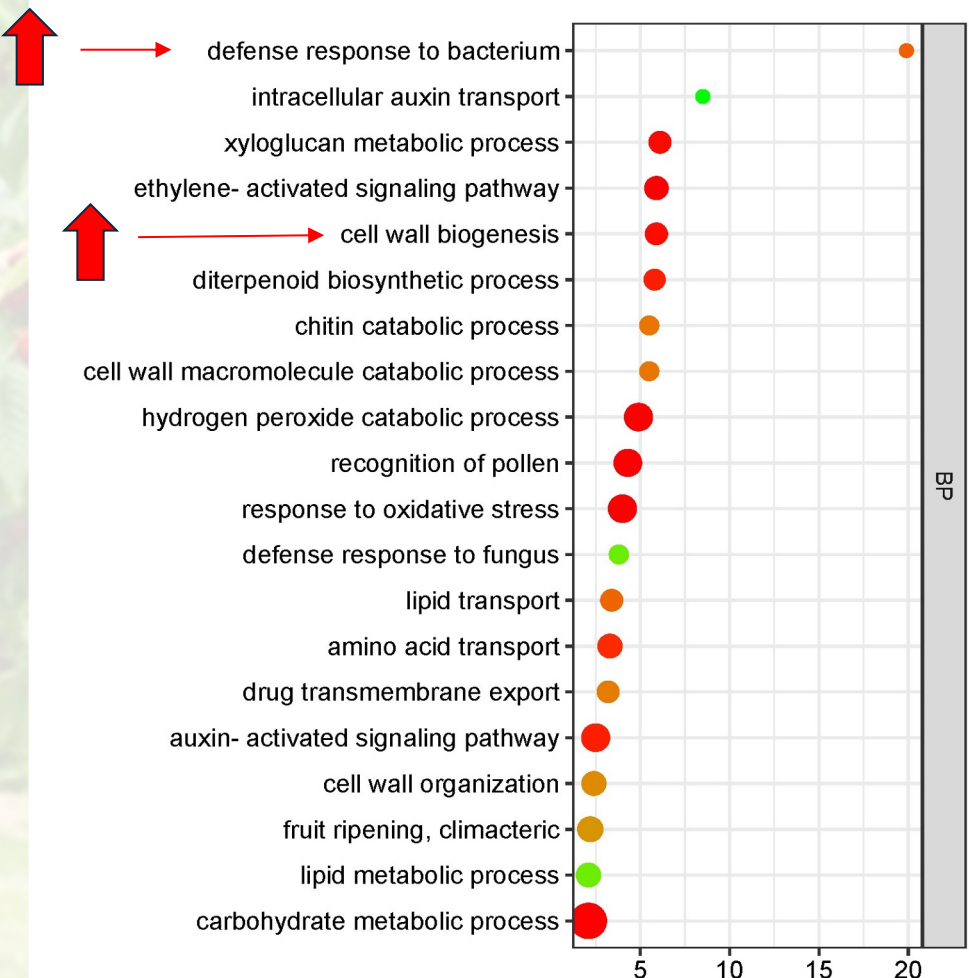


Bing

DEG Pss vs Testigo 7 dpi

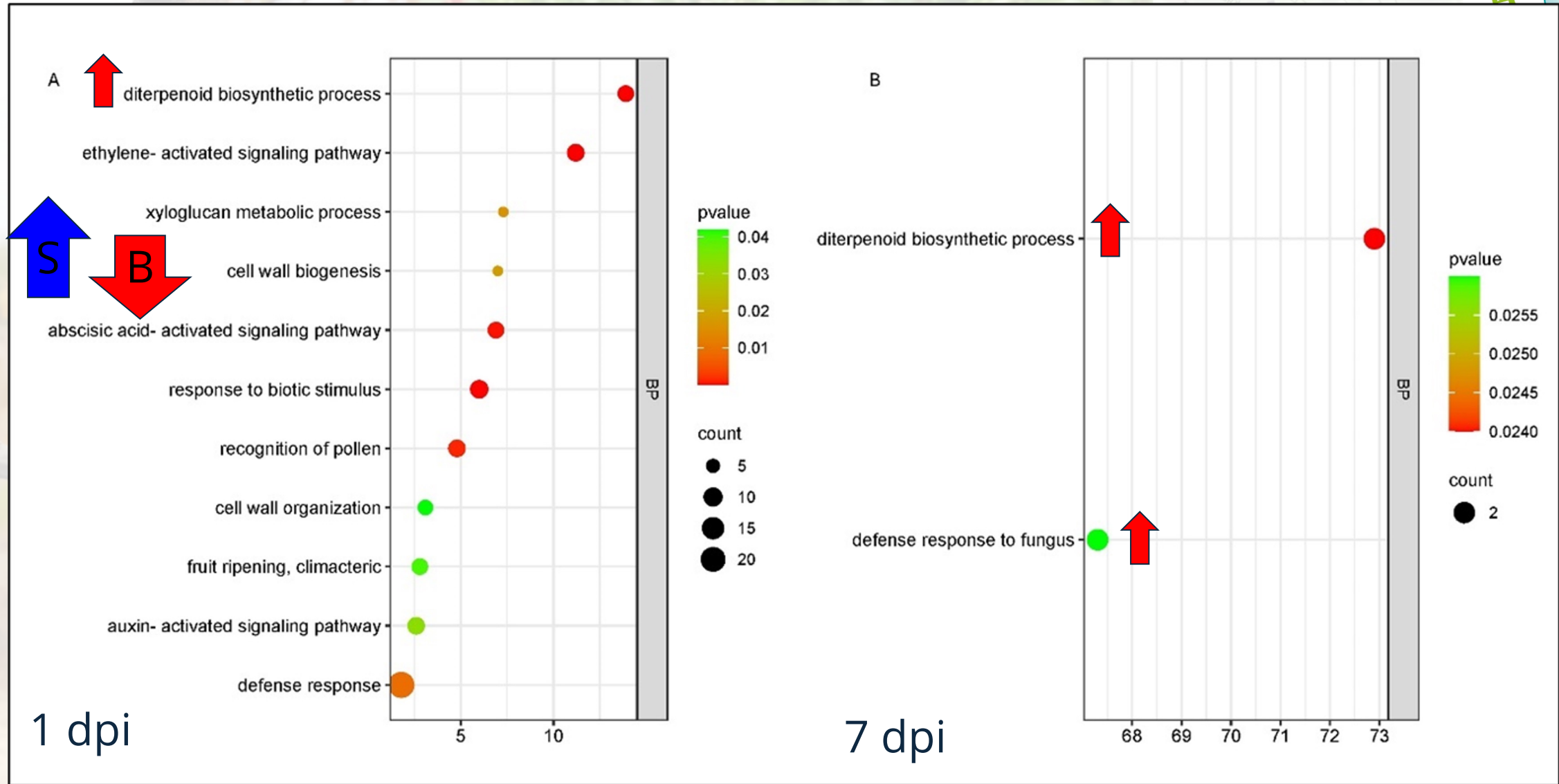


Santina

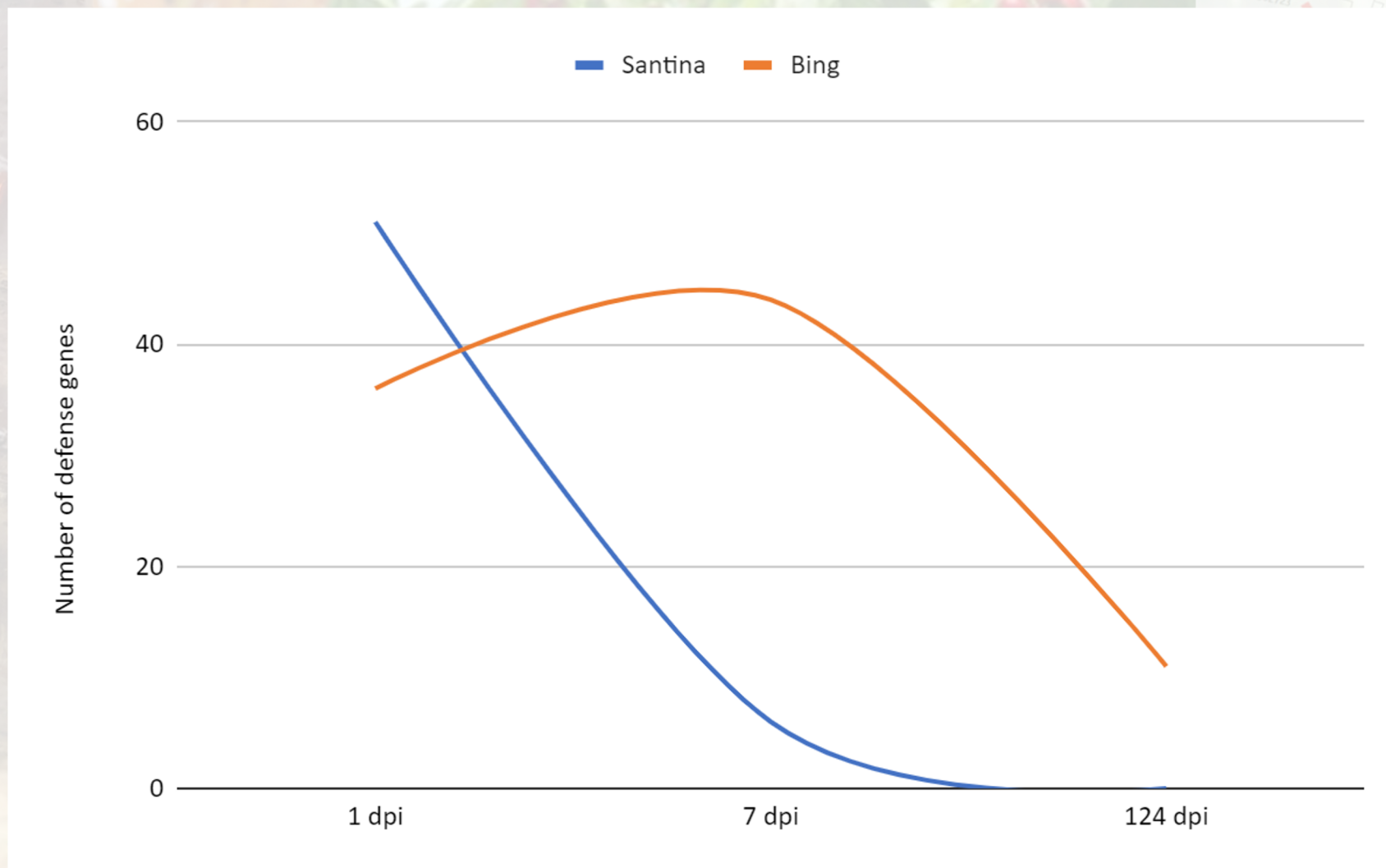


Bing

DEGs compartidos



Genes de respuesta



Conclusiones de este trabajo



La respuesta de defensa de Santina frente a la infección de Pss es más rápida e involucra un mayor número de genes en comparación con Bing

La variedad Santina activa la ruta del ácido salicílico más tempranamente que Bing

La respuesta de defensa a largo plazo se encuentra apagada (¿porqué?)

Resumiendo



- El estudio genómico permite mejorar la detección
 - La detección oportuna disminuye el daño
- Dato extra: La caracterización molecular permite mejorar el control (¿?)
- El conocimiento de los mecanismos de patogenicidad nos ayudará a proponer nuevas soluciones
- El conjunto de estas estrategias nos ayuda a estar mejor preparados para enfrentar nuevos escenarios fitosanitarios



FACULTAD DE CIENCIAS
AGRONÓMICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



Estudios genómicos de las bacterias del cerezo: Desde el diagnóstico a la interacción planta- patógeno

Alan Zamorano C.
agezac@uchile.cl

