

## ACTUACIÓN DA SUBMEDIDA M10.2.2 DE CONSERVACIÓN DE RECURSOS XENÉTICOS NA AGRICULTURA/CULTIVOS-CASTES AUTÓCTONAS 2017

Emprego de marcadores xenéticos moleculares para a selección de parenterais con xenes de ananismo, e a súa utilización en retrocruces con trigos galegos. 12/15/011/070417/001.

### Informe sobre actuacións en 2017

#### Antecedentes

A recuperación e o uso de variedades locais e/ou tradicionais cada vez é máis importante, ben porque son variedades que están totalmente adaptadas ao ambiente no que foron desenvolvidas e porque constitúen unha fonte de alelos favorables que poden ser empregados nun futuro na mellora do cultivo. O problema co que contan estas variedades locais é o seu baixo rendemento se se compara coas variedades modernas comerciais, co cal os agricultores non as seleccionan para o seu cultivo a pesares de estar tamén moi en auge o seu uso.

As variedades galegas de trigo empregadas neste estudo son a Calobre e a Caaveiro, as cales son moi estimadas no seu uso na panadería tradicional e responsables de darlle o seu sabor típico ó pan galego. O problema destas dúas variedades é que son variedades moi altas, cunha altura media de 145 cm. Existen no mercado variedades comerciais que posúen unha talla moito máis baixa o cal obtense a partir da introdución de xenes de ananismo dentro das mesmas. Estes xenes de ananismo son mutacións puntuais do xen xa existente dentro do xenoma pero que dan lugar a proteínas non funcionais ou cuxo funcionamento é deficiente. No caso do trigo estanse a empregar os xenes chamados Rht (Reduced height) do cal existen diferentes alelos (diferentes modificacións dentro dos xenes normais que dan lugar a fenotipos diferentes). Estes xenes divídense en dous grupos, as GA-independentes e as GA-dependentes, esta clasificación faise en relación a se a mutación afecta a sinalización e/ou resposta a Xiberelina que é unha das principais hormonas relacionadas co crecemento da planta, entre outras funcións. Durante os anos 90 os xenes *Rht* atopábanse presentes no 80% das variedades de trigo, sendo o 90% dos mesmos os alelos *Rht-B1b* e *Rht-D1b* (as letras B e D fan referencia ao xenoma no que se encontran os xenes). Os alelos Rht-X1x conteñen mutacións nas proteínas DELLA as cales reprimen o crecemento mediado polo GA.

As variedades comerciais que están a ser empregadas neste estudo son: Arthur Nick, Nogal, Gazul, Ingenio e Paledor, procedentes de diversas casas comerciais e debido a isto non se coñece de forma pública o alelo ou mutación que levan para obter a redución de talla, é por isto que foi necesario a secuenciación previa de tódolos parenterais, incluídos as variedades autóctonas Calobre e Caaveiro, co fin de comparar as secuencias de todas elas.

Por outra banda, e grazas a que os alelos Rht-B1 e Rht-D1 son os máis empregados, realizouse unha revisión bibliográfica e atopouse que existen de maneira pública secuencias que poden, a priori, ser empregadas como marcadores e así poder facer un xenotipado das liñas e dos cruces.

En 2016 logrouse facer a secuenciación dos xenes homeólogos Rht-B1 e Rht-D1 dos parenterais donantes, mediante o deseño de oligonucleotidos cebadores que flanqueaban rexións a secuenciar, a amplificación dos fragmentos en PCR, a purificación dos mesmos e a secuenciación na USC.

Ademais realizouse una selección asistida por marcadores de 35 liñas de retrocruces (BC1 a BC3), que resultou na eliminación de 10 liñas nas que non se encontraron os alelos mutantes ananizantes en ningunha das plantas testadas, e na selección e posterior cruzamento de plantas de 17 liñas onde se verificou a presenza de Rht1-B1b ou Rht1-D1b (mutantes). No caso das 6 liñas procedentes de cruce INxCV e INxCLL, se verificou que non ten ningún do alelos mutantes estudados (Rht-B1b e Rht-D1b), aínda así retrocruzáronse varias plantas. Isto amosa a gran dificultade de facer o programa de retrocruzamentos tan só tomando datos de altura das plantas retrocruzadas, xa que como puidemos demostrar leva a erros. Debido o carácter de semidominancia dos xenes Rht, a heterocigosis dos retrocruces co respecto ó alelo mutante e a que altura no trigo está moi influenciada por factores tanto ambientais como de fertilización, e co feito que os xenes Rht mais empregados nas variedades comerciais só reducen a talla nun 30-40%, faise complicado ver se a planta seleccionada leva o alelo mutante de ananismo.

#### **Selección asistida por marcadores en 2017 de plantas de trigo retrocruzadas (Xenotipado dos alelos Rht-B1a, Rht-B1b, Rht-D1a e Rht-D1b)**

Neste ano 2017, elixíronse 28 liñas procedentes de espigas retrocruzadas (BC1 a BC4) en febreiro de 2017 ou anteriores. A maioría destas espigas proceden de plantas máis baixas que os parenterais galegos e testadas positivamente a finais de 2016 para os alelos Rht-B1b ou Rht1-D1b, e producirán a metade das plantas con Rht ananizante e a outra metade con Rht “wild type”. Pero algunhas espigas procedían de liñas aínda non testadas para a presenza do alelo Rht ananizante, polo que pode que teñamos que eliminar mais liñas de retrocruces no futuro.

As liñas escollidas son as seguintes:

LIÑA	TIPO DE CRUCE	XERACION
MB012-13c1	PALxCV	BC3
MB012-13c6	PALxCV	BC3
MB012-13c7	PALxCV	BC3
MB012-11b	PALxCV	BC3
MB012-12a	PALxCV	BC3
MB012-13b	PALxCV	BC3
MB012-13d	PALxCV	BC3
MB007-31b41a	NGxCV	BC3
MB007-31b41b	NGxCV	BC3
MB010-121b4	INxCV	BC3
MB010-121b6	INxCV	BC3
MB005-25b4	GZxCV	BC3
MB002-46b1	ANxCV	BC3
MB002-143a2	ANxCV	BC4
MB002-143d3	ANxCV	BC4
MB002-143c	ANxCV	BC3

MB030-11a	NGxCLL	BC2
MB031-1	NGxCLL	BC1
MB024-1c2	ANxCLL	BC2
MB024-1c1	ANxCLL	BC2
MB014-21b1a	GZxCLL	BC3
MB014-21b1b	GZxCLL	BC3
MB014-21a2	GZxCLL	BC3
MB 014-21c	GZxCLL	BC2
MB 017-25b	PALxCLL	BC2
MB 017-23a3	PALxCLL	BC3
MB017-111b3	PALxCLL	BC4
MB017-23b2	PALxCLL	BC3

O primeiro traballo desenvolto foi mostreo de 386 plantas que consistiu na recollida de follas xoves de cada planta retrocruzada, no estado de 3-4 follas. Neste caso aínda estaban as plantas en alveolo (sen trasplantar). Se gardaron en conxelador a -20º, a espera da extracción de DNA.

Posteriormente fíxose a extracción de ADN polo protocolo CTAB de Doyle e Doyle, e despois a cuantificación do ADN se fixo en NaNoDrop, seguindo as indicacións do mesmo para cuantificación de ácidos nucleicos de dobre cadea. Tras a dilución do ADN, amplificouse en PCR usando os marcadores para os alelos Rht-B1b e Rht-D1b (Ellis *et al.*, 2002). Con estes marcadores é posible diferenciar se a planta leva o alelo que causa o ananismo ou se polo contrario a planta só leva o alelo normal (Rht-B1a e Rht-D1a).

O último paso foi a utilización de xeles de agarosa para diferenciar as distintas secuencias por medio da distinta migración das bandas no xel.

Das análises de 2016 puidemos ver que os parenterais Nogal e Arthur Nick levan a mutación Rht-B1b (Figura 1) e os parenterais Gazul e Paledor levan a mutación Rht-D1b (Figura 2). Mentres que non puidemos determinar a mutación que leva Ingenio, o que si puidemos comprobar é que non é nin Rht-B1b nin Rht-D1b.

As análises de 2017 das plantas retrocruzadas (BC1 a BC4) están rematadas, e só queda o seu estudo final detallado, para seleccionar aquelas plantas que levan en heterozigose os alelos Rht-B1b ou Rht-D1b, e que serán empregadas para o seguinte retrocruzamento en febreiro de 2018 coas variedades Callobre e Caaveiro.

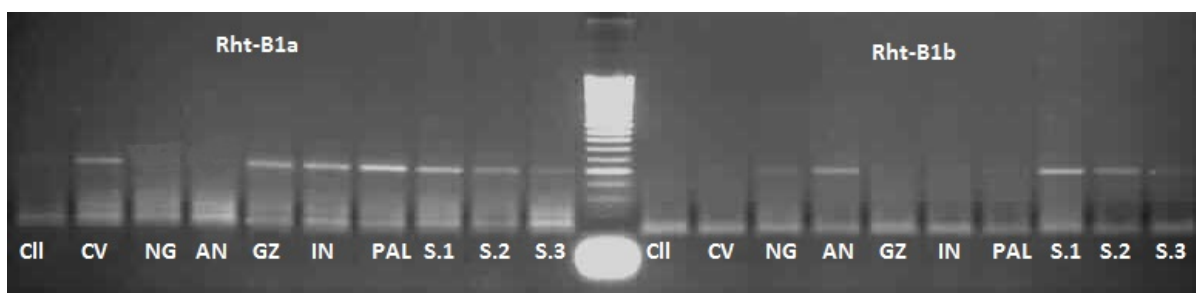


Figura 1. Marcadores para Rht-B1. Os signos (+/-) indican se existe amplificación ou non. As mostras S.1, S.2 e S.3 corresponden a heterozigotos BC2.

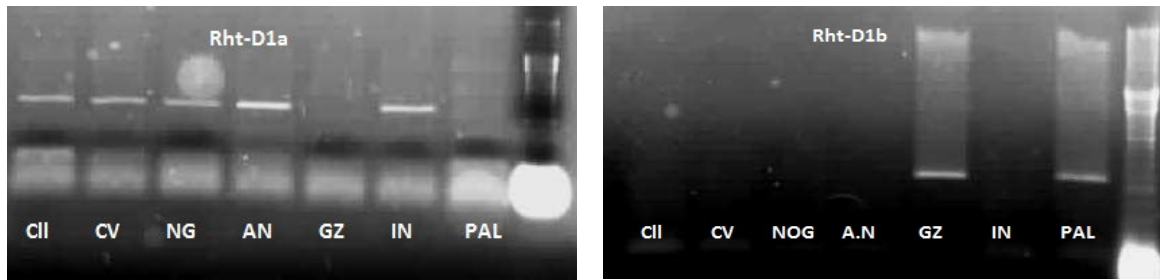


Figura 2. Marcadores para Rht-D1.

### Secuenciación en 2017 dos xenes homeólogos Rht-B1 e Rht-D1

Por unha banda, debido á complexidade do deseño de primers, e a mellora e adaptación a cada secuencia das condicións de PCR e secuenciación, foi necesario a repetición de diversas reaccións de secuenciación. Despois da primeira tanda de secuenciación amosouse a presenza de dobres secuencias que indican que os primers e fragmentos derivan de dous copias, isto se debe a que posiblemente os primers están amplificando á vez dos xenes (por ser as secuencias moi similares), o cal fixo que se modificasen as condicións de PCR, purificación e secuenciación para tratar de evitar estes problemas.

Por outra banda, para confirmar que os xenes responsables da redución de talla nas liñas galegas teñen a mesma secuencia que os de referencia se mandaron a secuenciar. Para iso foi necesaria a amplificación do xen por fragmentos, posterior secuenciación de estes fragmentos e o seu ensamblaxe.

Neste caso a complexidade radica en que os ditos xenes manteñen unha homoloxía moi alta nos tres xenomas que posúe o trigo (A,B y D) co que no proceso de deseño de primers se tivo que ter en conta facelo nas rexións nas que difiren. As secuencias de referencia para os xenes Rht son de dominio público e se usaron para o deseño dos primers.

Una vez recibidos os resultados da secuenciación se esta levando a cabo o ensamblaxe dos fragmentos co fin de reconstruír a secuencia completa dos xenes nas liñas galegas.

Nas figuras 3 e 4 (páxina seguinte) mostrase unhas fotos de bandas de fragmentos de amplificación de xenes Rht-B y Rht-D.

O Investigador

O Director do CIAM

Luis Urquijo Zamora

Manuel López Luaces

Abegondo, 05 de novembro de 2017

Figuras 3 e 4. Fragmentos para secuenciación de genes RhtB, RhtD

