

## ACTUACIÓN DA SUBMEDIDA M10.22 DE CONSERVACIÓN DE RECURSOS XENÉTICOS NA AGRICULTURA/CULTIVOS-CASTES AUTÓCTONAS 2016

Emprego de marcadores xenéticos moleculares para a selección de parenterais con xenes de ananismo, e a súa utilización en retrocruces con trigos galegos. CIAM/06/2016.

### Informe sobre actuacións en 2016

#### 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 desenroladas 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 Callobre e a Caaveiro, as cales son moi estimadas no seu uso na panadería tradicional e responsables de darlle o seu sabor típico ao 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 enanismo dentro das mesmas. Estes xenes de enanismo 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 Callobre e Caaveiro, co fin de comparar as secuencias de todas elas.

Por outra banda, e grazas a que os alelos Rht1-B1 e Rht1-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.

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

Para a secuenciación dos xenes Rht1-B1 e Rht-D1 foi necesario buscar a secuencia dos mesmos na base de datos Genbank (FR719732.1 y HE585643.1 respectivamente) . Para que a secuenciación sexa efectiva é preciso facela por fragmentos de non mais de 1000pb. É por isto polo que foi necesario o deseño de oligonucleotidos cebadores que flanquean as rexións a secuenciar. Para poder logo alinear a secuencia e xuntar tódolos fragmentos o deseño de cebadores foi feito de xeito que estivesen solapados. Os cebadores empregados na secuenciación son os seguintes:

Taboa 1.- Cebadores empregados para a secuenciación dos xenes Rht-B1 e Rht-D1

Nome	Seq (5'-->3')	bp
Rht-D1-F1	GCAAGCAAAAGCTTCGC	17
Rht-D1-R1	GAGAGACGACGAGGAG	16
Rht-D1-F2	GACCTGTCCGCCGACTC	17
Rht-D1-R2	GAAGTGGGCGAGCTTCCA	18
Rht-D1-F3	CAGGTGGGCTGGAAGCTC	18
Rht-D1-R3	CTTCTCAAGTGCCTGCGT	20
Rht1-B1-F1	CTCCAAAAGGAGGATCGGC	19
Rht1-B1-R1	TGTCAAAGCCACAGGTCG	19
Rht1-B1-F2	CCATCCCTGCTCCGTTTTC	19
Rht1-B1-R2	GCTAATGCGACACACGGTTC	20
Rht1-B1-F3	CCCTATGGCTTGCCCTGTAT	20
Rht1-B1-R3	CCTGGTACTCGCGCTTCAT	19
Rht1-B1-F4	AGCCGGAATCGAGGCAAG	18
Rht1-B1-R4	AGTGGGCGAACTTGAGGTAG	20
Rht1-B1-F5	AAGCAGATACCCTTGCTGGC	20
Rht1-B1-R5	TTGTGTCGTCCTCCATGCTC	20
Rht1-B1-F6	GTGACCGCGAGTTTTGAACG	20
Rht1-B1-R6	AGTCCGGTGACAAAAGCTGA	20
Rht1-B1-F7	AACAGCTTGCCGTCTAAGGGC	21
Rht1-B1-R7	GGTGTGTGCTCTGACTGGG	20

Para a secuenciación de fragmentos é preciso obter unha boa amplificación do mestro, para isto houbo que facer un deseño e proba das condicións de PCR así como una posterior purificación dos mesmos, mediante ExoSAP (Affimetrix) (Figura 1) se na amplificación solo se viu unha banda, ou mediante purificación desde xeles de agarosa (Invitrogen), no caso que na amplificación aparecesen bandas inespecíficas (Figura1). Unha vez purificado enviáronse os fragmentos a secuenciar a USC (resultados que están a ser analizados).

## Xenotipado dos alelos Rht-B1a, Rht-B1b, Rht-D1a e Rht-D1b

Debido o carácter de semidomancia dos xenes Rht e a que altura no trigo está moi influenciada por factores tanto ambientais como de fertilización. Todo isto xunto co feito que os xenes mais

abundantes empregados nas variedades comerciais só reducen a talla nun 30/40%, as veces faise complicado ver se a planta seleccionada leva o alelo mutante de ananismo.

O realizarse unha revisión bibliográfica atopáronse unha serie de 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 o se polo contrario a planta só leva o alelo normal (Rht-B1a e Rht-D1a). Para ver se estes marcadores nos eran útiles no caso do noso xenotipado, foron probados nos parentais: Callobre, Caaveiro, Nogal, Arthur Nick, Gazul, Ingenio e Paledor.

Grazas a estos análisis puidemos ver que os parentais Nogal e Arthur Nick levan a mutación Rht-B1b (Figura 2) e os parentais Gazul e Paledor levan a mutación Rht-D1b (Figura 3). Mentres que non puidemos determinar a mutación que leva Ingenio, o que sí puidemos comprobar é que non é nin Rht-B1b nin Rht-D1b.

Con estes datos e esta información, ata a data de este informe, estanse a realizar os análisis das plantas retrocruzadas (BC1 a BC3) que serán empregados na xeración de inverno para o seguinte retrocruzamento coas variedades Callobre e Caaveiro, de forma que se podan seleccionar mediante selección asistida por marcadores (MAS) as plantas que leven en heterozigose os alelos que confiren o ananismo.

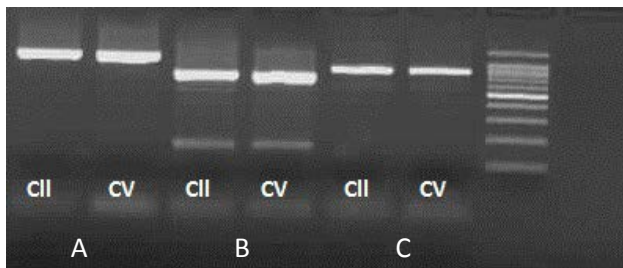


Figura1. Amplificación de fragmentos para secuenciación, A e C con unha única banda, e B con bandas inespecíficas.

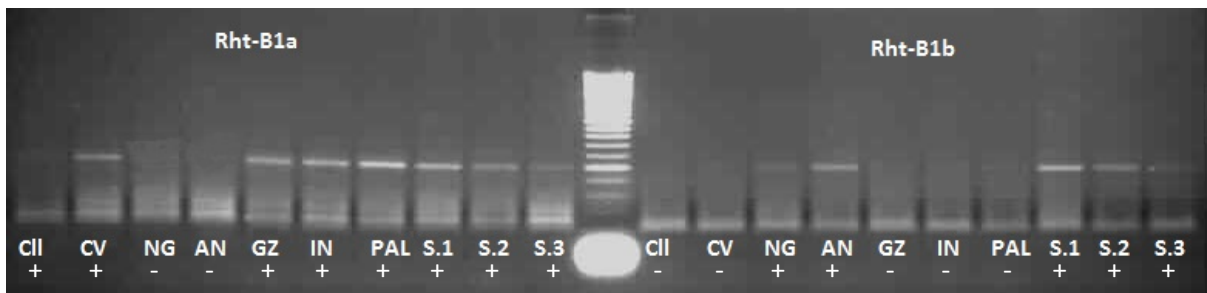


Figura 2. Marcadores para Rht-B1. Os signos (+/-) indican se existe amplificación ou non. As mostras S.1, S.2 e S.3 corresponden a heterozigotos BC2.

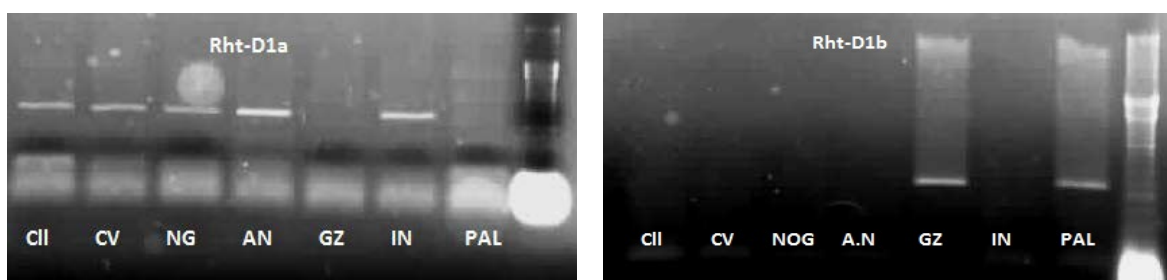


Figura 3. Marcadores para Rht-D1.

**Bibliografía:**

**The genes of the Green Revolution.** Hedden, P. In: Trends in Genetics, 2003, 19:5-9.

**'Perfect' markers for the *Rht-B1b* and *Rht-D1b* dwarfing genes in wheat.** Ellis MH, Spielmeier W, Gale KR, Rebetzke GJ, Richards RA. In: Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105:1038-104

O Investigador

O Director do CIAM

Luis Urquijo Zamora

Manuel López Luaces

Abegondo, 07 de novembro de 2016