



## ACTUACIÓNS DA SUBMEDIDA M10.2.2 DE CONSERVACIÓN DE RECURSOS XENÉTICOS NA AGRICULTURA/CULTIVOS-CASTES AUTÓCTONAS 2018

Emprego de marcadores xenéticos moleculares para a selección de parenterais con xenes de ananismo, e a súa utilización en retrocruces con trigos galegos. 12/15/11/230318/04.

### Informe sobre actuacións en 2018

#### 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 auxe 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 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 Callobre 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 a 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. No ano 2017, elixíronse 28 liñas procedentes de espigas retrocruzadas (BC1 a BC4) en febreiro de 2017 ou anteriores.

#### **Selección asistida por marcadores en 2018 de plantas de trigo retrocruzadas (Xenotipado dos alelos Rht-B1a, Rht-B1b, Rht-D1a e Rht-D1b)**

En 2018, elixíronse 31 liñas procedentes de espigas retrocruzadas (BC3 a BC5) en febreiro de 2018 ou anteriores. A maioría destas espigas proceden de plantas máis baixas que os parenterais galegos e testadas positivamente a finais de 2017 para os alelos Rht-B1b ou Rht-D1b, e producirán a metade das plantas con Rht ananizante e a outra metade con Rht “wild type”. As liñas que están amosando unha altura menor e tallo mas erecto son as descendentes do retrocruce, coa variedade Caaveiro, da liña MB012-13c (PALxCV). As liñas que xa se retrocruzasen 5 anos (BC5), en 2018 se autofecundarán para conseguir a homocigosis respecto do alelo ananizante (Rht)

As liñas escollidas son as seguintes:

LIÑA	TIPO DE CRUCE	XERACION
MB012-12a3b	PALxCV	BC3
MB012-14b3a	PALxCV	BC3
MB012-13c12a	PALxCV	BC4
MB012-13c13b	PALxCV	BC4
MB012-13c15a	PALxCV	BC4
MB012-13c61a	PALxCV	BC4
MB012-13c65a	PALxCV	BC4
MB012-13c71a	PALxCV	BC4
MB012-13c74a	PALxCV	BC4



MB012-13c75a	PALxCV	BC4
MB012-13c72	PALxCV	BC4
MB007-31b41a3	NGxCV	BC5
MB007-31b41a2c	NGxCV	BC5
MB010-121b61	INxCV	BC5
MB010-121b41a	INxCV	BC5
MB002-143d32a	ANxCV	BC5
MB002-143a23	ANxCV	BC5
MB002-143d32b	ANxCV	BC5
MB002-143c3	ANxCV	BC4
MB030-11a2	NGxCLL	BC3
MB030-11a3	NGxCLL	BC3
MB024-1c21	ANxCLL	BC3
MB024-1c22a	ANxCLL	BC3
MB014-21b1a1a	GZxCLL	BC4
MB014-21b1b1	GZxCLL	BC4
MB014-21b1a2	GZxCLL	BC4
MB014-21a21	GZxCLL	BC4
MB014-21b1b2	GZxCLL	BC4
MB 017-25b1	PALxCLL	BC3
MB017-111b31	PALxCLL	BC4
MB017-111b32	PALxCLL	BC4

As plantas a mostrear sembráronse en bandexas de alveolos, e despois trasplantáronse ó invernadoiro. Nese momento fíxose o mostreo de 524 plantas que consistiu na recollida de follas xoves de cada planta retrocruzada, no estado de 3-4 follas. Se gardaron en conxelador a -20º, a espera da extracción de DNA.

Posteriormente fíxose a extracción de ADN co kit de extracción “EZNA Plant DNA kit” (Omega BioTek), e despois a cuantificación do ADN con 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 e Zhang *et al.*, 2006). 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 “Wild type” (Rht-B1a e Rht-D1a). El cambio realizado este ano foi utilizar los marcadores de Zhang (2006) para el alelo Rht-B1b, ya que con el utilizado anteriormente fallaba en muchas ocasiones la PCR, y también producía falsos positivos.

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

As análises de 2018 das plantas retrocruzadas (BC3 a BC5) 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 2019 coas variedades Callobre e Caaveiro.

Das análises dos anos anteriores 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 a variedade Ingenio, o que si puidemos comprobar e que non é nin Rht-B1b nin Rht-D1b.

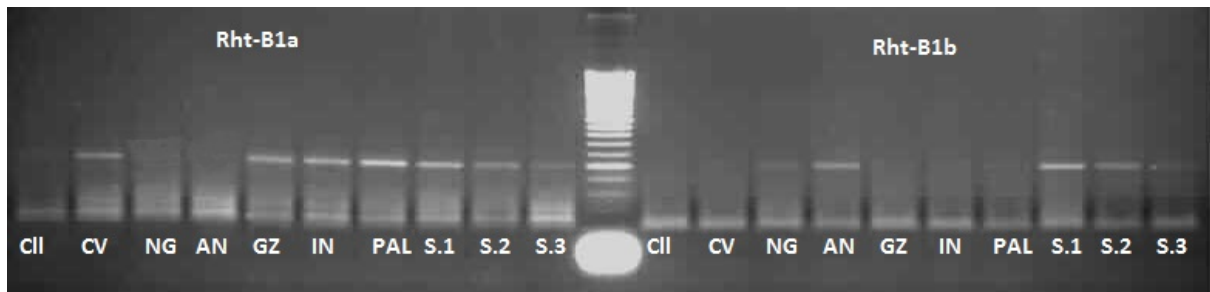


Figura 1. Marcadores para Rht-B1. Os signos (+/-) indican se existe amplificación ou non. As mostras S.1, S.2 e S.3 corresponden a heterocigotos BC2.

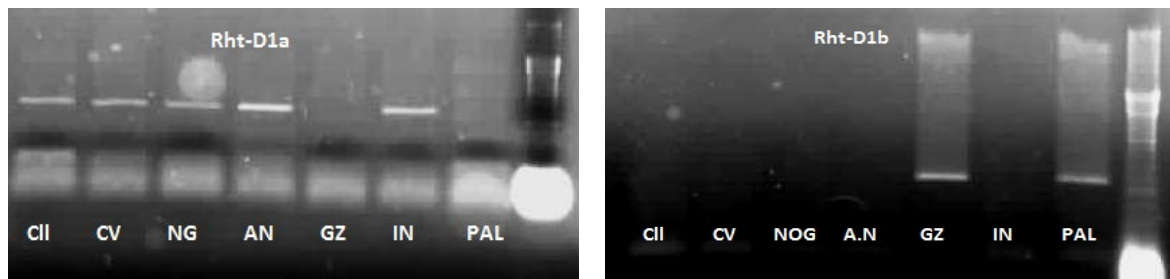


Figura 2. Marcadores para Rht-D1.

O Investigador

O Director do CIAM

Luis Urquijo Zamora

Manuel López Luaces

Abegondo, 18 de outubro de 2018