

|  |  |                |
|--|--|----------------|
|  | <b>CIRCULAR Nº1/2017</b><br><br><b>CONSERVACIÓN DE RECURSOS XENÉTICOS EN AGRICULTURA</b> | <b>M10.2.2</b> |
|  |  | Páxina 1 de 7  |

## ANEXO I

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

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>Nº DE PROTOCOLO<sup>(*)</sup></b> | <b>RRFF 2017 110 12/15/011/070417/001</b> |
|--------------------------------------|---|

<sup>(\*)</sup> A encher polo SXEA

|  |
|--|
| <b>1.- ACTUACIÓN PROPOSTA</b>  |
| Empleo de marcadores xenéticos moleculares para a selección de parenterais con xenes de enanismo, e a súa utilización en retrocruces con trigos galegos. |

|   |                   |  |
|---|-------------------|--|
| <b>2.- ENTIDADE SOLICITANTE</b>                           |                   |  |
| Centro Institucional/Entidade Colaboradora:<br>CIAM       |                   |  |
| Enderezo: Km 7, Estrada AC-542, Betanzos a Mesón do Vento |                   |  |
| C. Postal:15318   | Concello:Abegondo | Provincia:A Coruña                                   |
| Tfn:881 881 852   | Fax:              | Correo electrónico:<br>luis.urquijo.zamora@xunta.gal |

|   |
|---|
| <b>3.- XUSTIFICACIÓN DA ACTUACIÓN PROPOSTA</b>  |
| <p>A utilización de castes autóctonas de trigo para facer pan galego artesán ven sendo unha práctica común entre os panadeiros galegos desde fai moitas décadas. Este uso está condicionado á cada vez máis reducida produción de trigos autóctonos, a pesar dos esforzos acometidos no CIAM-INGACAL para tratar de frear esta ameaza. O rexistro das variedades autóctonas de trigo galego “Callobre” e “Caaveiro”, tratan de revertir a ameaza de erosión xenética das castes autóctonas, e que os panadeiros poidan utilizar trigo galego con unha trazabilidade total. A pesar de todo, no futuro esta ameaza non desaparecerá, xa que estas variedades autóctonas ten a metade ou a terceira parte do rendemento dunha variedade comercial de talla baixa. Así que fai dous anos comezouse un programa de retrocruzamentos de trigo galego, con cinco variedades comerciais de talla baixa, para conseguir variedades que manteñan máis do 98% da xenética das variedades autóctonas, pero que teñan os xenes de enanismo que lle confiren talla baixa, e polo tanto a posibilidade de obter máis rendemento.</p> <p>Este proceso e moi longo (10 anos) e de moito traballo, e na actualidade estase a utilizar datos fenotípicos (altura da planta) para poder seleccionar as plantas que recibiron os xenes de enanismo que buscamos. Pero desta forma, xa detectamos erros, debido a variabilidade ambiental da altura das plantas, ademais do factor xenético, polo que podemos errar na selección das plantas a cruzar.</p> |

|  |  |                                     |
|--|--|-------------------------------------|
|  | <b>CIRCULAR Nº1/2017</b><br><br><b>CONSERVACIÓN DE RECURSOS XENÉTICOS EN AGRICULTURA</b> | <b>M10.2.2</b><br><br>Páxina 2 de 7 |
|--|--|-------------------------------------|

Polo tanto, e necesario utilizar marcadores moleculares que nos aforren moito traballo, e eliminemos no proceso calquer erro que nos fai perder anos de cruzamentos. Estes marcadores tamén nos permiten traballar con máis plantas, xa que aquelas que no momento do afillado xa nos den negativos para os xenes que buscamos, as podemos eliminar, e traballar e cruzar só as plantas que nos interesan.

Ata agora, fixéronse cruzamentos das variedades autóctonas “Calobre” e “Caaveiro” con cinco variedades comerciais de talla baixa, en maio de 2014 e en xuño de 2015, obtendo 31 espigas F1. Posteriormente, en invernadoiro, fixéronse retrocruces dos parenterais masculinos recorrentes (Calobre e Caaveiro) coas plantas F1 anteriores, en febreiro de 2015, obtendo 51 espigas retrocruzadas BC1. O ano seguinte, fixéronse retrocruces dos parenterais masculinos recorrentes coas plantas BC1, en xullo de 2015, obtendo 19 espigas retrocruzadas BC2. No ano 2016, en marzo, fixéronse retrocruces dos parenterais masculinos recorrentes coas plantas BC1 y BC2 anteriores, obtendo 78 espigas retrocruzadas BC2 e 26 espigas retrocruzadas BC3. En febreiro de 2017, fixéronse retrocruces dos parenterais masculinos recorrentes coas plantas BC1, BC2 y BC3 anteriores, e se estima obter unhas 50 espigas retrocruzadas.

No período desde 2014 ata agosto de 2016, non puidemos testar as plantas BC obtidas con marcadores moleculares, polo que non temos a certeza absoluta de que os cruces foran correctos, e poidamos seguir as liñas seleccionadas. Pero en outubro de 2016 puidemos testar mediante marcadores xenéticos moleculares a existencia de xenes de redución de talla en parte das liñas retrocruzadas (liñas BC) desenvolvidas anteriormente. Ademais queremos facer novos cruzamentos con outras cinco variedades comerciais.

A partires de BC3, temos que empregar máis planta para poder facer selección das máis interesantes, polo que a selección con marcadores axudará a aforrar tempo e traballo, e asegurar que vamos no camiño correcto. Para acabar con todo o proceso, necesítase facer 5 retrocruzamentos cos parenterais recorrentes e dous anos máis de autofecundación das espigas seleccionadas. A partires desta última fase, terase que multiplicar e ensaiar con máis variedades, para poder demostrar a consecución do obxectivo principal.

Estas variedades autóctonas obtidas poderanse utilizar como material para facer pan galego dentro da I.X.P Pan Galego, xa que o Prego de Condicións da I.X.P Pan Galego publicado na páxina web da Consellería de Medio Rural dice: *“Para tratar de minimizar este problema (talla alta do trigo), están a levarse a cabo traballos de mellora xenética co obxectivo de obter variedades de menor talla que manteñan as características organolépticas do “trigo país”. No seu caso, poderán ser autorizadas estas variedades como “Trigo país” aínda que a súa talla sexa inferior á antes referenciada”*.

|  |   |  |
|--|---|--|
|  | <p align="center"><b>CIRCULAR Nº1/2017</b></p> <p align="center"><b>CONSERVACIÓN DE RECURSOS XENÉTICOS EN AGRICULTURA</b></p> | <p align="center"><b>M10.2.2</b></p> <p align="center">Páxina 3 de 7</p> |
|--|---|--|

#### 4.- OBXECTIVOS DA ACTUACIÓN PROPOSTA

##### Ano 2017:

- Emprego dos marcadores xenéticos moleculares para a selección de parenterais BC que posúan os xenes de enanismo e que van a ser usados nos retrocruces (xeración de verano)

##### Ano 2018:


- Emprego dos marcadores xenéticos moleculares para a selección de parenterais BC que posúan os xenes de enanismo e que van a ser usados nos retrocruces (xeración de verano e outono)

#### 5.- METODOLOXÍA

Para levar a cabo a Selección Asistida por Marcadores (MAS) e necesario coñecer a secuencia que levan os parenterais a estudo. Neste estudo poseemos un parental recorrente, que son as liñas galegas de trigo Callobre e Caaveiro, e o parental donante que está representado por diversas liñas comerciais que posúen a característica de que son de talla baixa, e levan no seu xenoma unha mutación que o fai posible. Actualmente, existe un acceso público as secuencias dalgúns destes xenes de enanismo así como das variantes alélicas, pero non temos coñecemento de cales de elas posúen as variedades comerciais empregadas, e por iso que é necesario unha previa secuenciación dos mesmos para identificalos e poder así facer unha selección das plantas que posúen estes xenes de interés nos cruces e retrocruces, de forma que se aforre tempo e recursos, xa que mediante MAS sabese se a planta va a ser de tamaño reducido cando está en estadio de plántula, e non é necesario esperar ata o fin do cultivo. Ademais, este carácter de altura da planta, segundo resultados previos, resultou ser moi variable e depende tanto da dose do xen (homozigosis o heterozigosis), como do alelo ou alelos que posúa.

Unha vez que se sabe a secuencia do xen e do alelo que posúen os parenterais, realizarase un estudo e comparación das secuencias para identificar as partes que difiren de forma que se poidan diseñar oligonucleótidos que flanqueen esas rexións. Dependendo se as diferenzas son máis o menos grandes o seguinte paso a seguir será diferente. Se as diferenzas nas secuencias mutantes (plantas de porte baixo) e as salvaxes (plantas altas) son do tipo insercións ou deleccións, o análise se realizaría mediante amplificacións de PCR e análise de xeles de agarosa, onde a diferenza do tamaño da secuencia faise patente no distinto grado de migración da banda no xel. Se polo contrario as diferenzas nas secuencias son máis pequenas, do tipo pequenas deleccións ou insercións de 2-10pb (pares de bases) o cambios en unha base, sería necesario realizar secuenciacións de eses fragmentos, análise de SNPs ou análise mediante marcadores KASP.

Unha vez se teña o marcador adecuado analizaranse as plantas que serán empregadas para os retrocruces e que deben posuír polo menos unha copia do xen de redución de talla, de maneira que as plantas que non o posúan se descartarán. Debido a que se están facendo retrocruces con parenterais que son de talla alta (Caaveiro e Callobre), estes xenes de redución de talla atópanse en heterozigosis, co que os marcadores desenvolvidos teñen que diferenciar ben ambas variantes.

|  |  |  |
|--|--|--|
|  <p>XUNTA DE GALICIA<br/>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL<br/>E DO MAR</p> <p>FEADER:<br/>Europa inviste no rural</p> <p>GOBIERNO DE ESPAÑA<br/>MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA,<br/>ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE</p> | <p>CIRCULAR Nº1/2017</p> <p><b>CONSERVACIÓN DE RECURSOS<br/>XENÉTICOS EN AGRICULTURA</b></p> | <p><b>M10.2.2</b></p> <p>Páxina 4 de 7</p> |
|--|--|--|

#### **Ano 2017:**

Durante este ano se levará a cabo un cultivo (outono) e se realizará o screening cos marcadores moleculares desenvolvidos o ano anterior para identificar aquelas plantas que posúan unha copia do xen de redución de talla, seguindo o mesmo protocolo: toma de mostra de folia de plántula; extracción de ADN; amplificación mediante PCR (reacción en cadena da polimerasa) empregando os marcadores moleculares; confirmación da amplificación mediante xeles de agarosa; análise dos resultados dos marcadores, ben directamente do xel de agarosa se a diferenza entre mutante e silvestre é grande e es posible vela nos xeles, ou mediante análise das secuencias e electroferogramas se as diferenzas entre secuencias son máis pequenas do tipo SNP.

#### **Ano 2018:**

Durante este ano se levaran a cabo dous cultivos (verano e outono) e en ámbolos dous se realizará o screening cos marcadores moleculares desenvolvidos o ano anterior para identificar aquelas plantas que posúan unha copia do xen de redución de talla, seguindo o mesmo protocolo: toma de mostra de folia de plántula; extracción de ADN; amplificación mediante PCR (reacción en cadena da polimerasa) empregando os marcadores moleculares; confirmación da amplificación mediante xeles de agarosa; análise dos resultados dos marcadores, ben directamente do xel de agarosa se a diferenza entre mutante e silvestre é grande e es posible vela nos xeles, ou mediante análise das secuencias e electroferogramas se as diferenzas entre secuencias son máis pequenas do tipo SNP.

### **6.- PLAN DE DIVULGACIÓN**

#### **Reunións:**

Ano 2017:

Reunión con representantes de FEGAPAN, e agricultores do sector, para facerlles chegar os resultados obtidos

Ano 2018:

Reunión con representantes de FEGAPAN, e agricultores do sector, para facerlles chegar os resultados obtidos

#### **Cursos:**

Ano 2016:

Ano 2017:

#### **Demostracións:**

Ano 2017:

Demostración do procedemento de cruces en invernadoiro a técnicos e agricultores do sector, para facerlles chegar os resultados obtidos.

Ano 2018:

Demostración do procedemento de cruces en invernadoiro a técnicos e agricultores do sector, para facerlles chegar os resultados obtidos.

|  |  |  |
|--|--|--|
|  <p>XUNTA DE GALICIA<br/>CONSELLERÍA DO MEDIO RURAL<br/>E DO MAR</p> <p>FEADER:<br/>Europa inviste no rural</p> <p>GOBIERNO DE ESPAÑA<br/>MINISTERIO DE AGRICULTURA Y PESCA,<br/>ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE</p> | <p>CIRCULAR Nº1/2017</p> <p><b>CONSERVACIÓN DE RECURSOS<br/>XENÉTICOS EN AGRICULTURA</b></p> | <p><b>M10.2.2</b></p> <p>Páxina 5 de 7</p> |
|--|--|--|

Publicacións:

Ano 2017:

Se publicará en [www.ciam.es](http://www.ciam.es), y [www.campogalego.es](http://www.campogalego.es), os resultados da experiencia

Ano 2018:

Se publicará en [www.ciam.es](http://www.ciam.es), y [www.campogalego.es](http://www.campogalego.es), os resultados da experiencia

Outras:

Ano 2016:

Ano 2017: