



# **Plataformas de Speed Breeding y Mutagénesis química aplicadas al pre-mejoramiento de trigo.**

Dr. Lucio A. Lombardo

**Grupo Biotecnología y Recursos Genéticos  
Laboratorio de Biotecnología, EEA INTA Marcos Juárez**

# Grupo Biotecnología y Recursos Genéticos EEA INTA Marcos Juárez

## *Tareas vinculadas a proyectos nacionales e internacionales*



## *Tareas vinculadas a los programas de mejoramiento*

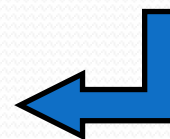
Mapeo y clonado de genes  
Secuenciación del genoma de trigo  
Evaluación de efectos de variantes alélicas de genes de interés agronómico  
Desarrollo de marcadores moleculares  
Desarrollo de herramientas bioinformáticas  
Intercambio de semillas

Selección asistida con MM  
Genotipados - Caracterizaciones moleculares  
Fenotipados - Baja y mediana escala  
Adelanto generacional (Speed Breeding)  
Identificación de variedades  
Generación de nueva variabilidad genética - Mutagénesis

Conservación de semillas

Pre-mejoramiento

**El desarrollo de materiales con un nivel intermedio de mejoramiento que los fitomejoradores pueden utilizar como material base en los programas de mejoramiento para desarrollar nuevas variedades**



# Estabilización de una población de RILs

A campo solo se puede hacer un ciclo de cultivo por año. Por tanto, se tarda 5 años en llegar semillas F7 desde plantas F1



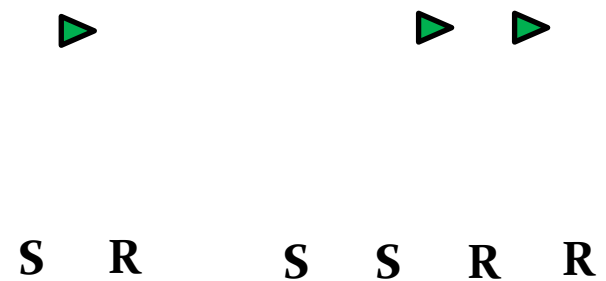
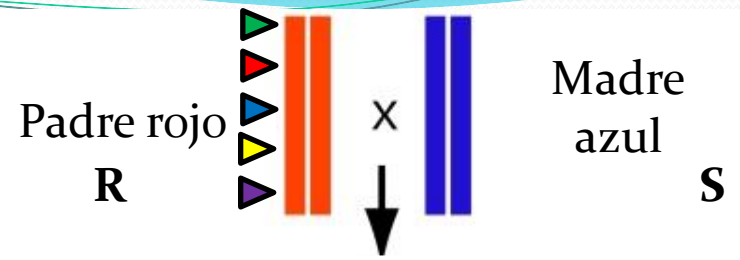
La descendencia de los INDIVIDUOS ESTABILIZADOS es genéticamente idéntica a ellos

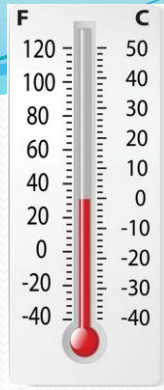


Muy útiles para mapeo genético (identificación de una región en el genoma que explica una variación fenotípica)



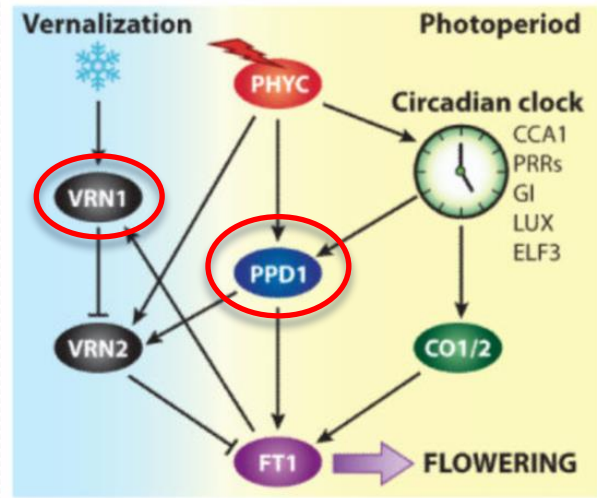
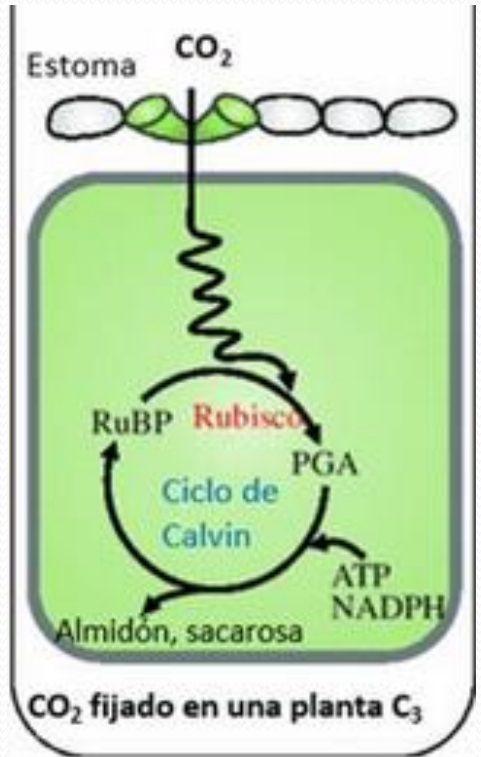
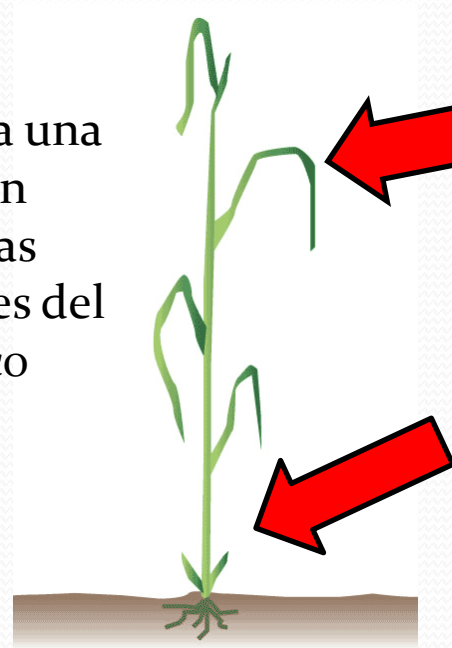
RILs (recombinant inbred lines) Líneas endocriadas recombinantes





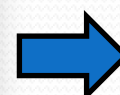
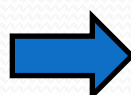
## Floración del trigo

El trigo es  $C_3$ , por lo tanto, necesita una integración de señales que aseguren espigar luego del período de heladas (donde abortarían las flores) y antes del verano donde el desgaste energético para fijar  $CO_2$  mata la planta



- Trigos invernales
- Trigos primaverales
  
- Trigos sensibles
- Trigos insensibles

# Plataforma de mejoramiento acelerado



Temperatura y riego controlados

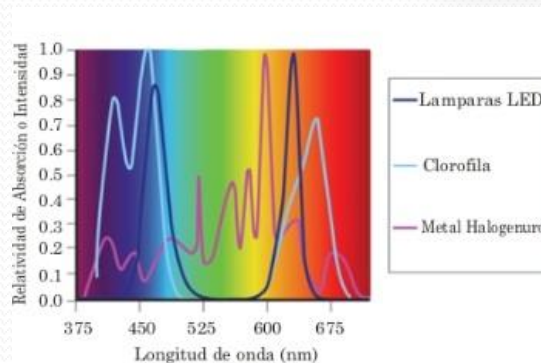


Vernalización de 6 semanas a 4°C (F2 a F6)



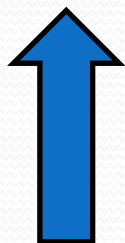
Selección asistida y raleo de plantas en F2/F3

Fotoperíodo extendido 20h luz/día  
Lámpara LED para cultivo con suplementación IR



El ciclo se completa en 3 meses, por lo tanto, se pueden hacer 4 generaciones por año

Siembra (200 plantas por bandeja, 4 bandejas por generación)



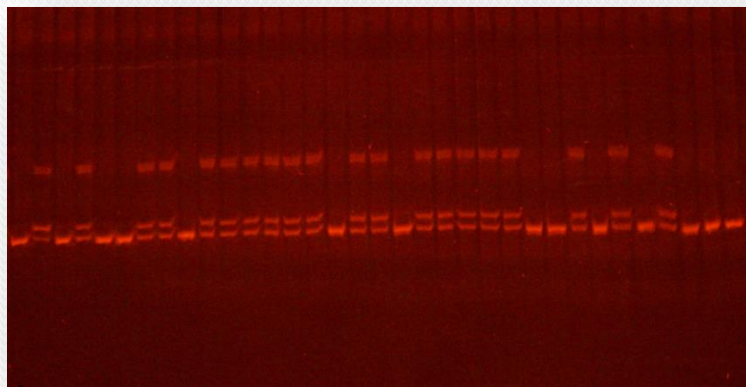
## Etapa de vernalización generación F2/F3



Individuos con zonas en homocigosis y zonas en heterocigosis (NO ESTABILIZADOS)



**Extracción de ADN,  
selección con MM y raleo**



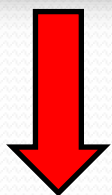
### *Ejemplos de MM usados en trigo usados en nuestro grupo*

<b>Calidad</b>	Fuerza de gluten Volumen de pan Contenido de proteína Almidón Dureza del grano	Glu-B17xoe WMB Gpc-B1 Wx-A1, Wx-B1, Wx-D1 PinA-D1, PinB-D1
<b>Adaptación</b>	Floración	Vrn-A1, Vrn-B1, Vrn-D1, Vrn-2, Ft-D1, Ppd-B1, Ppd-D1, Ppd-A1
<b>Arquitectura</b>	Altura de planta	Rht-D1, Rht-B1, Rht-8
<b>Estrés abiótico</b>	Pre-brotado Tolerancia a frío	Vp-1 Fr-A2
<b>Estrés biótico</b>	Royas Fusarium Virus	Lr19, Lr34, Lr37, Lr47, Lr51, Sr38, Yr18, Yr36, Yr17, Yr15, Yr5 Fhb-1 Wsm-1

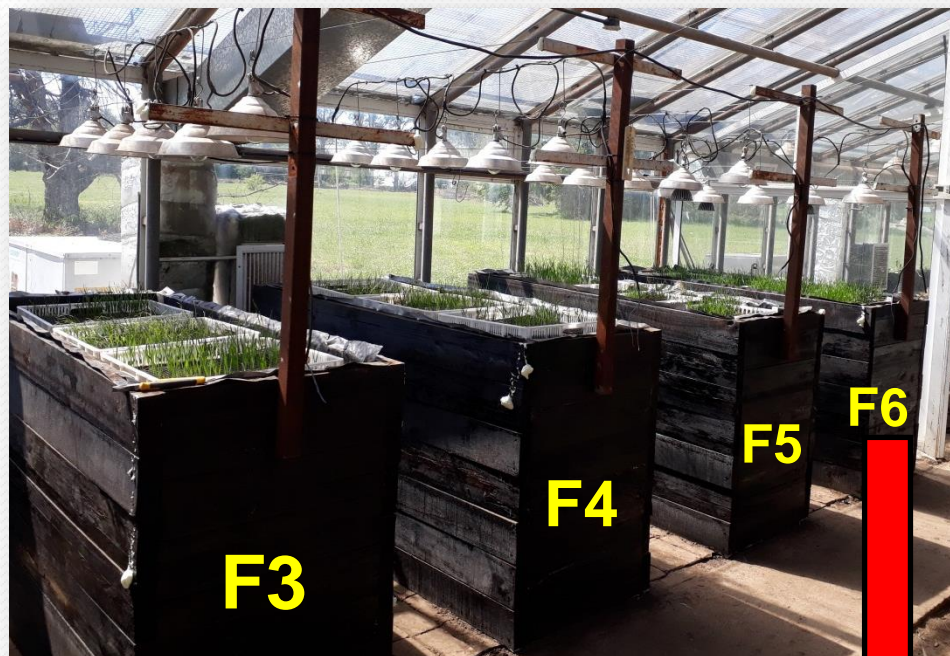
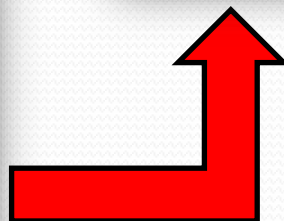
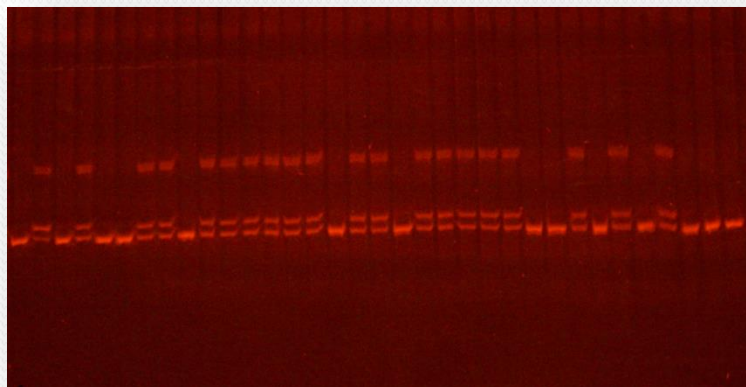
## Etapa de vernalización generación F3/F4



Individuos con zonas en homocigosis y zonas en heterocigosis (NO ESTABILIZADOS)



Extracción de ADN, selección con MM y raleo



Multiplicación y selección a campo

## *En proceso*

1. LASSIK (Yr17, Yr 18, Yr 36-GPC, Lr 34, Lr 37) / BAG 450 (7+8/7oe+8 GC 1).
2. PATWIN 515 (2NS: Lr37/Yr17/Sr38, Yr 5, Yr 15) / LINEA 11 (LUCIO).
3. SY 120 / T289
4. BAG 802 / S NOGAL
5. BASILO / BIO1002
6. J13011 / S NOGAL // BAG 750
7. BLANCA FUERTE/UC1041 (Yr 5, Yr 15, Lr 37, GPC)//MS INTA 119
8. CLEAR WHITE (Yr 5, Yr 15, GPC, 2NS: Lr 37, Yr 17, Sr 38)/NOGAL
9. BAGUETTE 750/UC 1041 (Yr 5, Yr 15, Lr 37, GPC)
10. BAGUETTE 802/UC 1041 (Yr 5, Yr 15, Lr 37, GPC)
11. MS INTA 415/NOGAL//CEIBO/CAMBIUM/P9/BIOINTA 3000
12. MS INTA 416/T 292
13. BAGUETTE 450/LÍNEA 11
14. JN17014 (BAG P 11/B. TAITA)/MS INTA 119

## *Terminadas*

1. LAPACHO/FUSTE
2. BIO2004/BAG801//K.SERPIENTE
3. MS116/ALGARROBO
4. MS316/LAPACHO
5. P05140/BAG802
6. SY300/BIO1004//NOGAL
7. BIO1006/K.PROTEO
8. CEIBO/ALGARROBO





**Grupo Biotecnología y Recursos Genéticos EEA INTA Marcos Juárez**

***Tareas vinculadas a proyectos nacionales e internacionales***

Mapeo y clonado de genes  
Secuenciación del genoma de trigo  
Evaluación de efectos de variantes alélicas de genes de interés agronómico  
Desarrollo de marcadores moleculares  
Desarrollo de herramientas bioinformáticas  
Intercambio de semillas

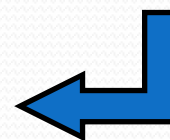


***Tareas vinculadas a los programas de mejoramiento***

Selección asistida con MM  
Genotipados - Caracterizaciones moleculares  
Fenotipados - Baja y mediana escala  
**Adelanto generacional (Speed Breeding)**  
Identificación de variedades  
**Generación de nueva variabilidad genética - Mutagénesis**

Conservación de semillas

Pre- mejoramiento



**El desarrollo de materiales con un nivel intermedio de mejoramiento que los fitomejoradores pueden utilizar como material base en los programas de mejoramiento para desarrollar nuevas variedades**

# ¿Qué es una mutación?

Es un cambio **permanente** en la secuencia de ADN. Las mutaciones son **heredables**.

Mediante mutagénesis inducida podemos generar variabilidad genética **INÉDITA**

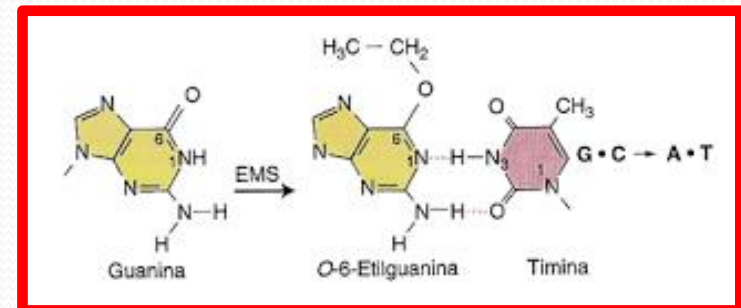
# ¿Como incrementar la tasa de mutaciones?

**Agentes mutagénicos** Formas de energía o sustancias químicas que incrementan significativamente la frecuencia de mutación en los genomas de los organismos expuestos

**Agentes físicos** **Radiaciones ionizantes:** rayos X, rayos  $\gamma$  y rayos cósmicos (ruptura de enlaces y formación de iones) **Radiaciones no ionizantes:** luz UV (formación de enlaces covalentes T-T)

## **Agentes químicos**

- ✓ Análogos de bases
- ✓ Agentes intercalantes
- ✓ Agentes modificadores de bases



# Desarrollo de una población de mutantes

Prueba de dosis



Generación de la M<sub>1</sub>



M<sub>1</sub>



M<sub>2</sub> ⇨ ⇨ ⇨ ⇨ M<sub>n</sub>



Para que una mutación sea transmitida a la descendencia debe estar en una célula germinal (gameta)

**La planta M<sub>1</sub> es quimérica**

## Morfología útil para PM



**Obtuvimos 10 líneas bajas. Y una que tiene las espigas dentro de la mata (¿resistencia a heladas?).**

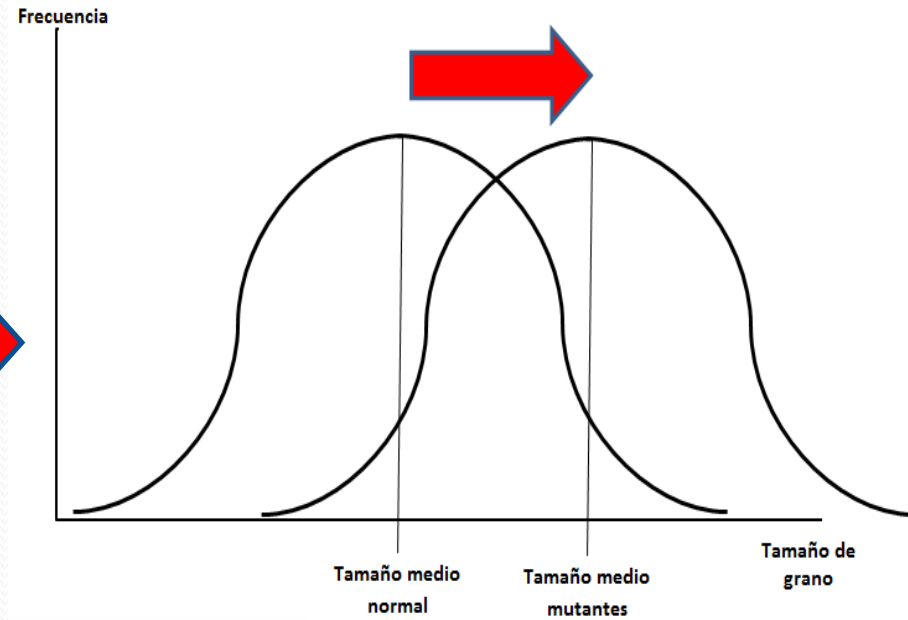
# Adaptación / fenología



**Obtuvimos 17 líneas con fenología diferencial . La M517 ya se está usando para cruzamientos.**

# Componentes de rendimiento / tamaño de grano

Masal Nogal

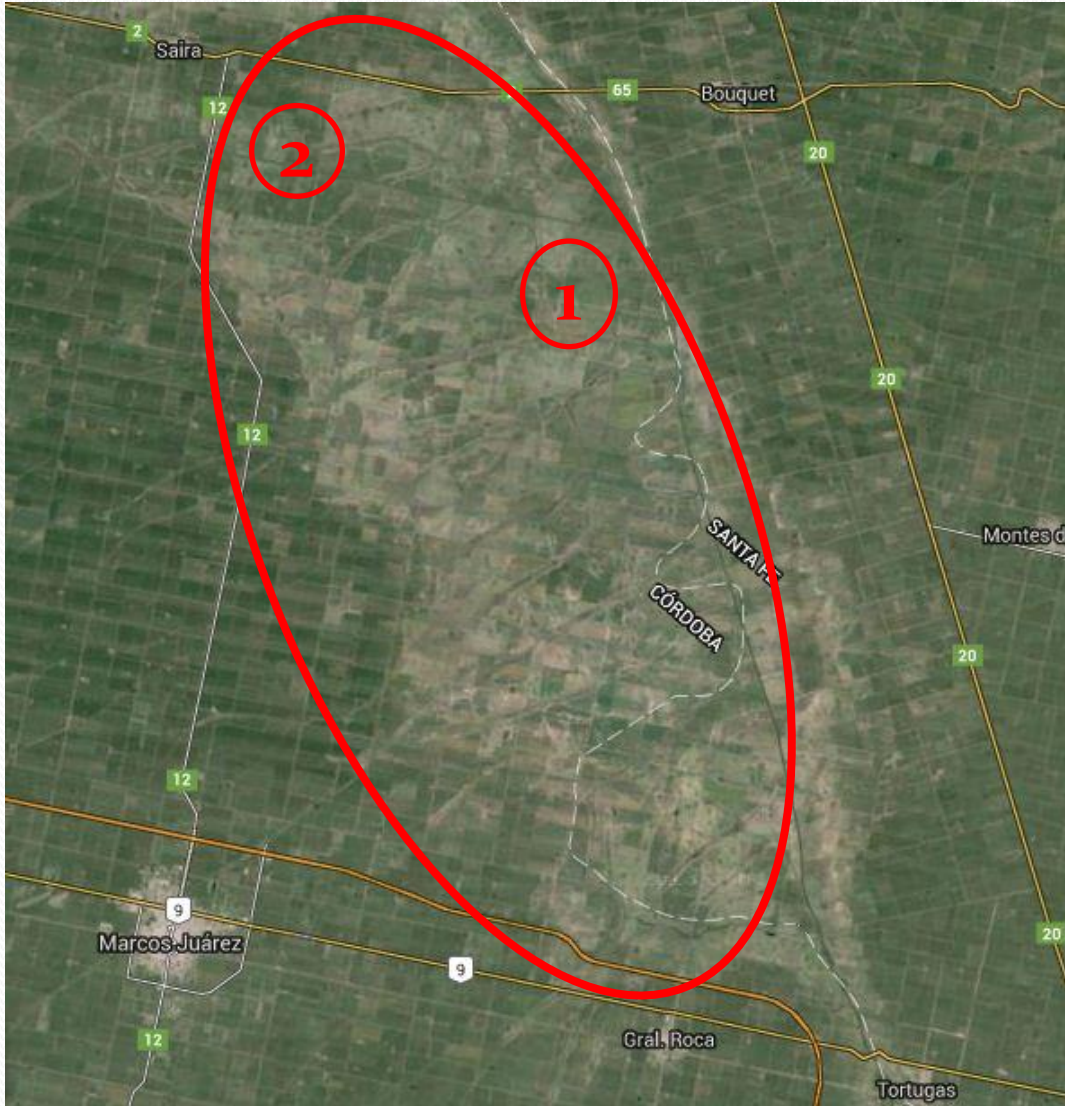


800 líneas individuales



Obtuvimos una línea de mayor tamaño de grano (dato chequeado en 4 ambientes). La M280 se está usando para cruzamientos

# Resistencia a salinidad



**Selección de plantas en la cuenca Garíone**

# Resistencia a salinidad



Identificación de origen	N°	Profundidad (cm)	%CO	%MO	%Nt	C/N	Pe	pH	CE	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
	Laboratorio						ppm	dS m <sup>-1</sup>	ppm	
BO5 R1	17E029		-	-	-	-	-	7,5	8,9	-
BO5 R2	17E030		-	-	-	-	-	7,1	11,3	-
P3 R1	17E031		-	-	-	-	-	8,1	13,3	-
P5 R1	17E032		-	-	-	-	-	7,7	12,2	-
M8 R2	17E033		-	-	-	-	-	8,5	12,7	-

Identificación de origen	N°	Profundidad (cm)	Ca (cmol kg <sup>-1</sup> )	Mg (cmol kg <sup>-1</sup> )	Na (cmol kg <sup>-1</sup> )	K (cmol kg <sup>-1</sup> )	Sumatoria de Bases (cmol kg <sup>-1</sup> )	CIC (cmol kg <sup>-1</sup> )	PSI (%)	V (%)
	Laboratorio									
BO5 R1	17E029		9,3	2,2	3,44	2	16,7	15,7	21,9	100,0
BO5 R2	17E030		12,9	2,4	3,60	2	20,7	18,6	19,4	100,0
P3 R1	17E031		8,0	2,1	11,75	2	24,0	18,8	62,7	100,0
P5 R1	17E032		10,3	2,9	9,25	2	24,6	19,7	46,8	100,0
M8 R2	17E033		9,4	1,7	11,13	2	24,6	18,0	61,8	100,0



# Resistencia a salinidad



Aislamiento M8r2

Multiplicación en Marcos Juárez y cruzamiento con otras líneas aisladas en el mismo ambiente



Selección *in situ* de las líneas F<sub>2</sub>

# Resistencia a sequía

400 líneas  
individuales



39 líneas  
mutantes



Evaluación en Pocitos, San Juan



Evaluación en  
invernáculo de sequía

# Sanidad



**Obtuvimos una línea (M624) que presenta hipersensibilidad**

## *Resistencia a fusarium*

Se desarrollaron mutantes de BioINTA 1005 (variedad altamente susceptible a fusarium) combinando EMS y radiación gama.



# Resistencia a fusarium

Al final del ensayo se selecciona todo el material que presentó una infección menor al 50 %.



0%    7%    14%    21%    33%    50%

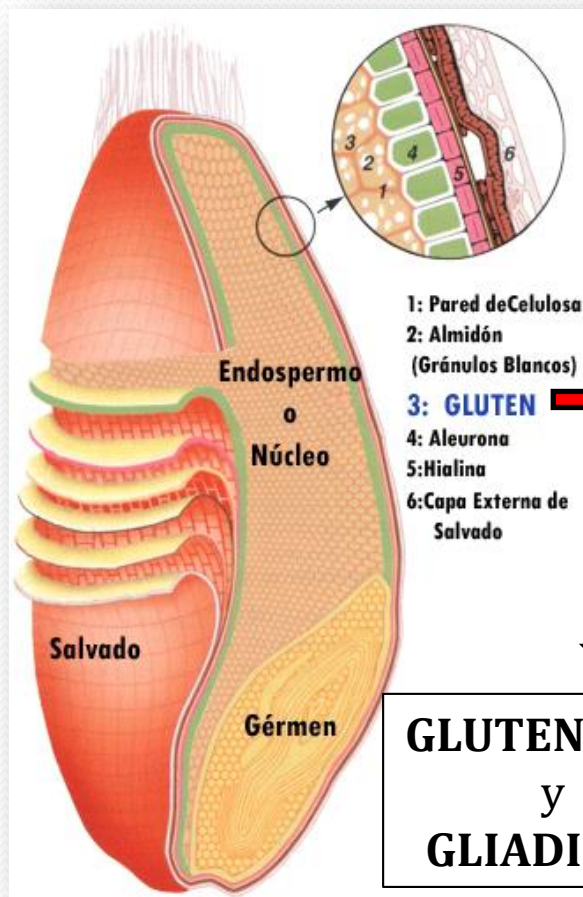


50%    66%    79%    ≈90%    100%

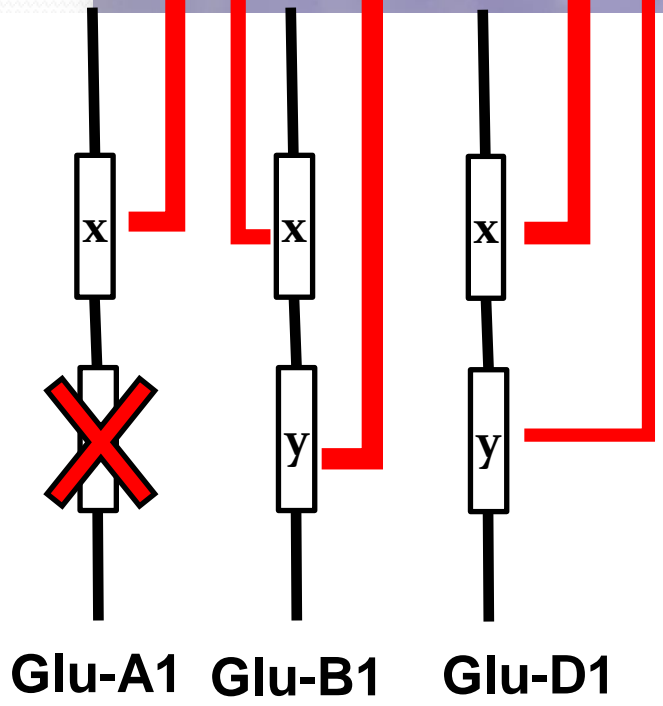
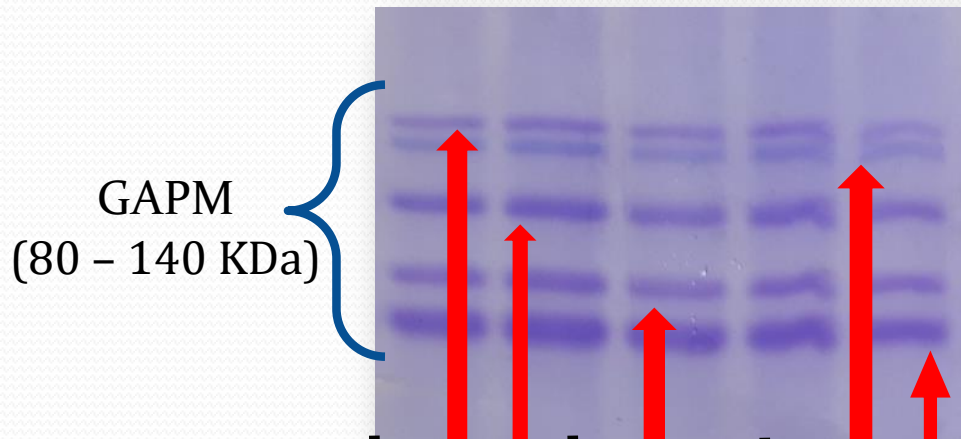


**Obtuvimos una línea que está en etapa de multiplicación y re-evaluación**

# Calidad panadera

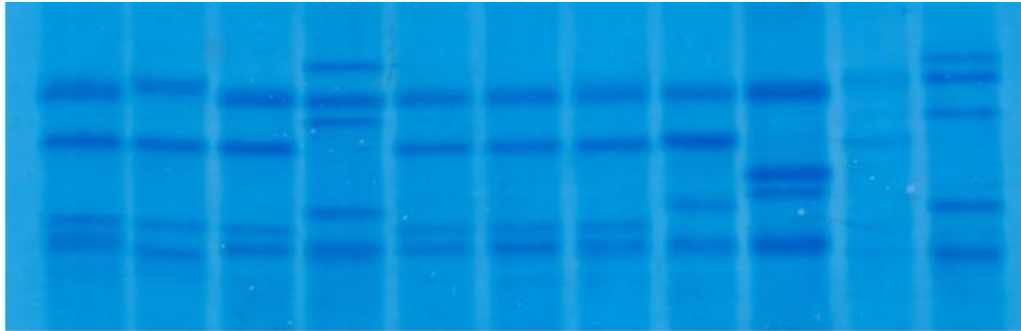


**GLUTENINAS  
y  
GLIADINAS**



# Calidad panadera

Existen muchos alelos de GAPM



2*	2*	2*	1	2*	2*	2*	2*	2*	N/2*	1
7+9	7+9	7+9	6+8	7+9	7+9	7+9	7+8	17+18	7+9	6+8
5+10	2+12	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	5+10	2+12	2+12
2+12						2+12				

Payne y col. (1987) desarrollaron un índice denominado **GLU-1** que nos permite predecir la fuerza del gluten según la combinación alélica de GAPM.

Score	Locus		
	<i>Glu-A1</i>	<i>Glu-B1</i>	<i>Glu-D1</i>
4	-	-	5+10
3	1	-	-
3	2*	-	-
3	-	17+18	-
3	-	7+8	-
3	-	13+16	-
2	-	7+9	-
2	-	-	2+12
1	nulo	-	-
1	-	7	-
1	-	6+8	-
1	-	20	-

Fuerza del gluten

¿Cual es el aporte de cada subunidad "X" o "Y" en la fuerza del gluten y/o calidad panadera?

¿Se puede afectar la calidad panadera mutando las GAPM?

## Identification of Novel High Molecular Weight Glutenin Subunit Mutants in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.)<sup>1</sup>

Lucio Andres Lombardo<sup>a,\*,2</sup>, María Mercedes Nisi<sup>a,2</sup>, Nicolás Salines<sup>b</sup>,  
Celina Elena Ghione<sup>a</sup>, and Marcelo Helguera<sup>a</sup>

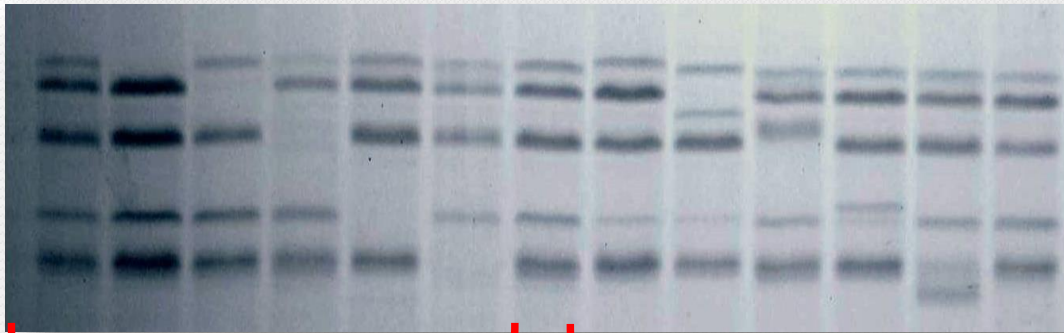
<sup>a</sup>Grupo Biotecnología y Recursos Genéticos, EEA INTA Marcos Juárez, Marcos Juárez, Córdoba, Argentina

<sup>b</sup>Área Mejoramiento Genético Vegetal, EEA INTA Marcos Juárez, Marcos Juárez, Córdoba, Argentina

\*e-mail: lombardo.lucio@inta.gob.ar

Received January 29, 2016

Se obtuvieron líneas  
mutantes para cada  
una de las  
subunidades X e Y de  
las GAPM



Mutantes nulas

Mutantes con alelos  
inéditos funcionales


27 Líneas mutantes

✓ 19 ausencia de  
banda (mutantes  
nulos)

✓ 8 corrimiento  
diferencial

Actualmente se están investigando todas las mutantes y se están desarrollando NILs para cada una de estas variantes alélicas para poder evaluar el impacto de las mismas sobre la calidad panadera





**Muchas gracias por  
su atención**