

PAE-PICT-2007-00053

Desarrollo de nuevas tecnologías basadas en la manipulación de ADN adaptadas al trigo

Conformación de Grupo

Grupo Responsable	Nombre y Apellido Marcelo Helguera Antonio Diaz Paleo Dalia Marcela Lewi
--------------------------	---

Grupo Colaborador	Nombre y Apellido María José Diéguez Paula Faccio Francisco Sacco Mariana del Vas Leonardo S. Vanzetti
--------------------------	---

Objetivo General

Desarrollar en el país nuevas tecnologías y conocimientos basadas/os en la manipulación del ADN, adaptadas/os al cultivo de trigo

- **transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.**
- **silenciamiento génico postranscripcional.**
- **caracterización de lesiones sobre regiones específicas del genoma (TILLING).**

Esto posibilitará la consolidación de una red de capacidades en el desarrollo de conocimientos de frontera, potencialmente útiles para alcanzar nuevas soluciones a problemáticas de la cadena de trigo.

Transformación mediada por *A. tumefaciens*

Racionalidad del proyecto: Se conoce que es posible la transformación de trigo y otras gramíneas vía *A. t.* y que el procedimiento es potencialmente tan eficiente como el biolístico con las **ventajas** adicionales de:

- ❖ Transferir e integrar menor número de copias al genoma de las células blanco
- ❖ Integrar secuencias transgénicas definidas en el genoma de las células blanco

Situación inicial: disponibilidad en el IGEAF de un protocolo de transformación basado en el acelerador de microproyectiles *Particle Inflow Gun* (PIG)

Objetivos Específicos:

- 1. Adquirir y desarrollar plásmidos binarios** portadores del gen marcador (*gusA*) acompañado de secuencias codificantes de tolerancia *in vitro* a agentes selectivos.
- 2. Optimizar protocolos de infección y transferencia génica** con *A. tumefaciens* a embriones inmaduros / meristemas apicales de trigo.
- 3. Evaluar** un protocolo de transformación utilizando *A. tumefaciens* con genes marcadores.
- 4. Comparar** este método de transformación con el método biolístico durante el desarrollo de proyectos con distintos genes de interés. (actividad sujeta a disponibilidad de tiempo dentro del proyecto)

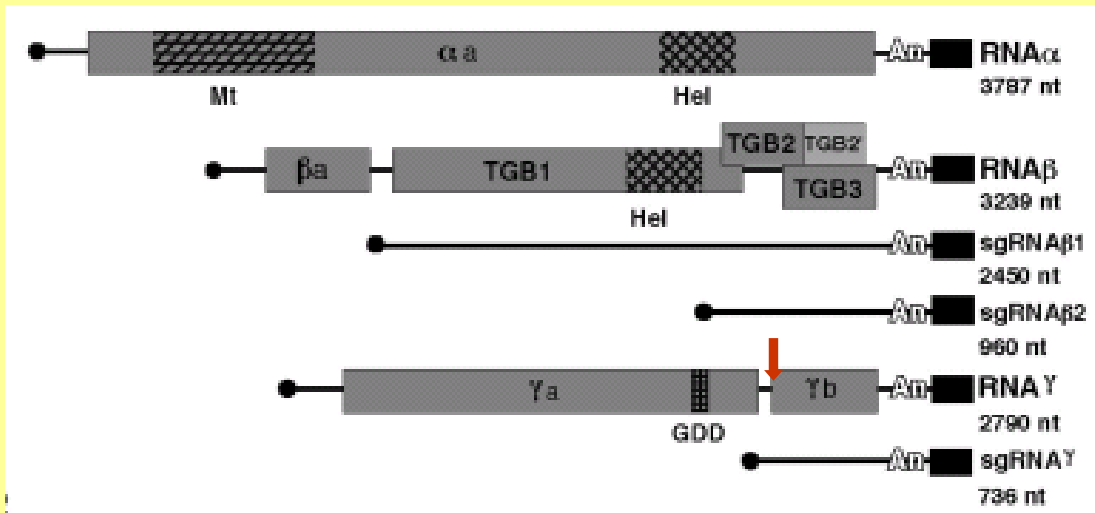
CRONOGRAMA

Actividades	1 ^{er}		2 ^{do}		3 ^{er}	
	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}
1.1) Diseño y construcción de vectores.	X	X				
1.2) Optimización del sistema de transferencia génica.		X	X	X	X	
1.3) Optimización de la transformación con genes marcadores.			X	X	X	X
1.4) Ajuste del protocolo para la eliminación de <i>A. tumefaciens</i> residual en cultivo <i>in vitro</i> .		X	X	X		
2.1) Amplificación y clonado de genes con actividad detectable en cereales.	X					
2.2) Construcción de vectores para TIGS de genes con actividad detectable en trigo.		X	X			
2.3) Construcción de vectores basados en BSMV para VIGS de genes con actividad detectable en cereales y transcripción <i>in vitro</i> de los RNAs virales.		X	X			
2.4) Determinación de las condiciones experimentales para desencadenar TIGS de genes con actividad detectable en cereales.				X	X	
2.5) Determinación de las condiciones experimentales para desencadenar VIGS de genes con actividad detectable en cereales.				X	X	
2.6) Evaluación del efecto del silenciamiento de los genes de trigo <i>Lr1</i> , <i>RAR1</i> y <i>SGT1</i> sobre la resistencia a roya.					X	X
3.1) Desarrollo de una población mutagenizada M2.	X	X	X			
3.2) Identificación de SNPs	X	X	X	X	X	X
3.3) Desarrollo de la técnica de TaqMan PCR		X	X	X	X	X

Resultado Esperado

- ❖ adquisición de un protocolo eficiente y reproducible de transformación de trigo a través de *Agrobacterium tumefaciens*

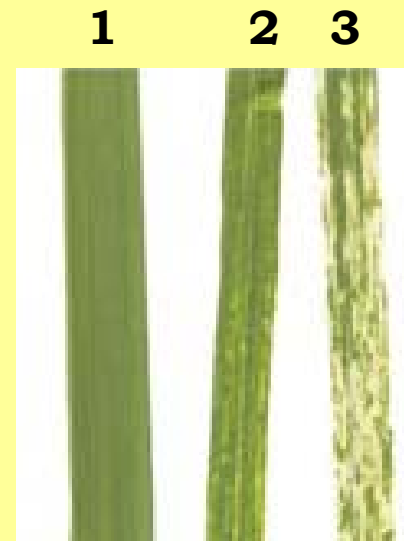
Silenciamiento génico por VIGS (Virus Induced Gene Silencing)



Se utiliza como vector de VIGS al Barley stripe mosaic virus (BSMV) que es capaz de infectar cebada y trigo y expresarse en venas, mesofilo y epidermis

Procedimiento:

- 1) Amplificación y clonado del gen que se desea silenciar en los vectores de BSMV (flecha roja).
- 2) Transcripción *in vitro* de los segmentos α , β y γ recombinante.
- 3) Inoculación mecánica de la primera hoja con los tres RNAs virales.
- 4) Observación de fenotipo y síntomas.
- 5) Cuantificación de la cantidad de mRNA del gen de interés por qRT-PCR



1 control

2 BSMV wt

3 BSMV:PDS
(PDS: fitoeno desaturasa: su silenciamiento da manchas blancas)

Objetivos Específicos

Silenciamiento génico:

- (1) Amplificar y clonar genes con actividad detectable en trigo (PDS, *Lr* y genes que actúan río abajo en la cascada de señalización de los genes *Lr*).**
- (2) Construir vectores plasmídicos para desencadenar TIGS y VIGS en trigo.**
- (3) Determinar las condiciones experimentales para desencadenar TIGS y VIGS de genes con actividad detectable en trigo**
- (4) Evaluar el efecto del silenciamiento de los genes de trigo *Lr1*, *RAR1* y *SGT1* sobre la resistencia a roya.**

CRONOGRAMA

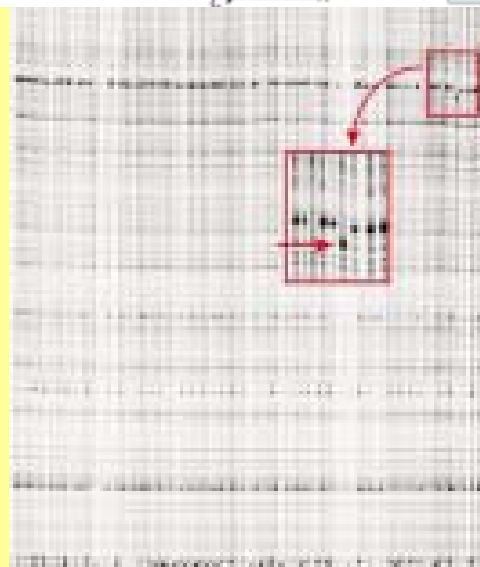
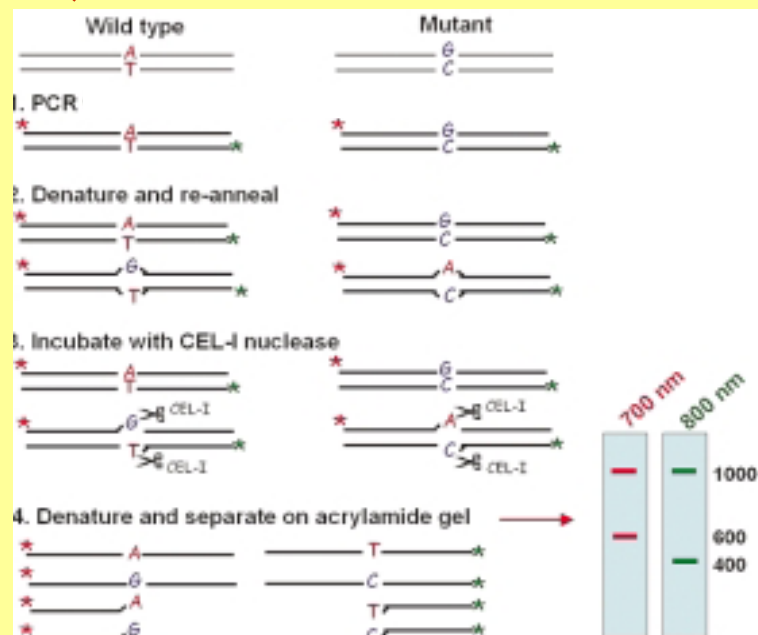
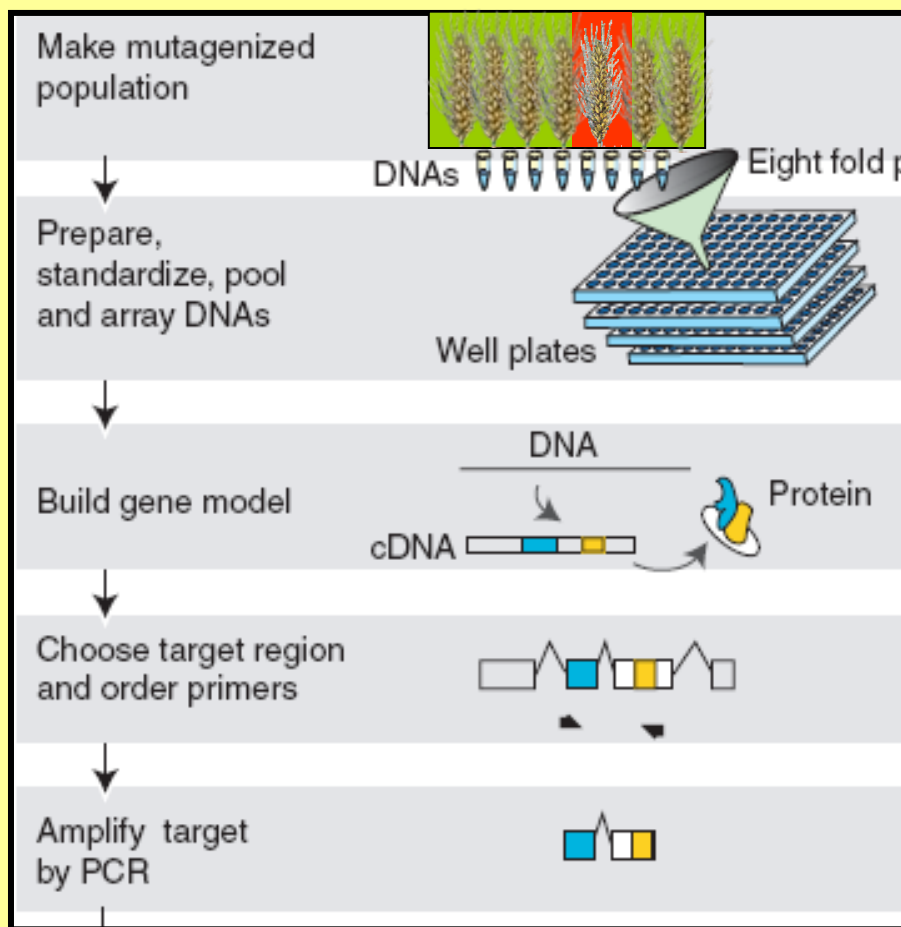
Actividades	1 ^{er}		2 ^{do}		3 ^{er}	
Semestre	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}
1.1) Diseño y construcción de vectores.	X	X				
1.2) Optimización del sistema de transferencia génica.		X	X	X	X	
1.3) Optimización de la transformación con genes marcadores.			X	X	X	X
1.4) Ajuste del protocolo para la eliminación de <i>A. tumefaciens</i> residual en cultivo <i>in vitro</i> .		X	X	X		
2.1) Amplificación y clonado de genes con actividad detectable en cereales.	X					
2.2) Construcción de vectores para TIGS de genes con actividad detectable en trigo.		X	X			
2.3) Construcción de vectores basados en BSMV para VIGS de genes con actividad detectable en cereales y transcripción <i>in vitro</i> de los RNAs virales.		X	X			
2.4) Determinación de las condiciones experimentales para desencadenar TIGS de genes con actividad detectable en cereales.				X	X	
2.5) Determinación de las condiciones experimentales para desencadenar VIGS de genes con actividad detectable en cereales.				X	X	
2.6) Evaluación del efecto del silenciamiento de los genes de trigo <i>Lr1</i> , <i>RAR1</i> y <i>SGT1</i> sobre la resistencia a roya.					X	X
3.1) Desarrollo de una población mutagenizada M2.	X	X	X			
3.2) Identificación de SNPs	X	X	X	X	X	X
3.3) Desarrollo de la técnica de TaqMan PCR		X	X	X	X	X

Resultados Esperados VIGS

Desarrollar una herramienta útil para la identificación de genes de trigo y cebada de interés biotecnológico.

Aplicar esta herramienta para el estudio de la relación hospedante-patógeno en el sistema trigo-roya de la hoja y trigo-MRCV (*Mal de Río Cuarto virus*).

Caracterización de lesiones en regiones específicas del genoma (TILLING)



mutación 1/24kb Ta vs 1/170kb At

1152 individuos analizados

196 nuevos alelos para Wx-A1 y Wx-D1

74 alelos nulos (Slade et al. 2005)

Objetivos Específicos

Caracterización de lesiones sobre regiones específicas del genoma (TILLING):

- (1) Desarrollar una población M3 de al menos 300 individuos para la técnica de TILLING.**
- (2) Determinar la frecuencia de mutaciones nulas homocigotas en individuos M3 utilizando genes de proteínas de reserva.**
- (3) Implementar la técnica de TILLING para identificar SNPs en genes de interés agronómico (VRT2).**
- (4) Implementar la técnica de real time PCR para la detección de SNPs detectados por TILLING.**

CRONOGRAMA

Actividades	1 ^{er}		2 ^{do}		3 ^{er}	
Semestre	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}	1 ^{er}	2 ^{do}
1.1) Diseño y construcción de vectores.	X	X				
1.2) Optimización del sistema de transferencia génica.		X	X	X	X	
1.3) Optimización de la transformación con genes marcadores.			X	X	X	X
1.4) Ajuste del protocolo para la eliminación de <i>A. tumefaciens</i> residual en cultivo <i>in vitro</i> .		X	X	X		
2.1) Amplificación y clonado de genes con actividad detectable en cereales.	X					
2.2) Construcción de vectores para TIGS de genes con actividad detectable en trigo.		X	X			
2.3) Construcción de vectores basados en BSMV para VIGS de genes con actividad detectable en cereales y transcripción <i>in vitro</i> de los RNAs virales.		X	X			
2.4) Determinación de las condiciones experimentales para desencadenar TIGS de genes con actividad detectable en cereales.				X	X	
2.5) Determinación de las condiciones experimentales para desencadenar VIGS de genes con actividad detectable en cereales.				X	X	
2.6) Evaluación del efecto del silenciamiento de los genes de trigo <i>Lr1</i> , <i>RAR1</i> y <i>SGT1</i> sobre la resistencia a roya.					X	X
3.1) Desarrollo de una población mutagenizada M2.	X	X	X			
3.2) Identificación de SNPs	X	X	X	X	X	X
3.3) Desarrollo de la técnica de TaqMan PCR		X	X	X	X	X

Resultados Esperados

- (1) Disponer de una población de individuos mutagenizados que funcione como banco para seleccionar mutaciones de virtualmente cualquier gen del genoma de trigo.**
- (2) Silenciamiento de genes (VRT2, gliadinas, puroindolinas)**
- (3) Generar y seleccionar nueva variabilidad en genes de interés agronómico (adaptación)**

Presupuesto

<u>Año</u>	<u>Rubro</u>	<u>Subsidio</u>	<u>Total</u>
1	Beca Doctoral	16992.0	16992.0
1	Ser téc es	6000.0	6000.0
1	Insumos	40000.0	40000.0
1	Viajes y viáticos	9000.0	9000.0
1	GAS ADM	2879.68	2879.68
1	TOTAL ANUAL	74871.68	74871.68
2	Beca Doctoral	16992.0	16992.0
2	Ser téc es	6000.0	6000.0
2	Insumos	40000.0	40000.0
2	Viajes y viáticos	9000.0	9000.0
2	GAS ADM	2879.68	2879.68
2	TOTAL ANUAL	74871.68	74871.68
3	Beca Doctoral	16992.0	16992.0
3	Ser téc es	6000.0	6000.0
3	Insumos	25947.0	25947.0
3	Viajes y viáticos	9000.0	9000.0
3	GAS ADM	2317.56	2317.56
3	TOTAL ANUAL	60256.56	60256.56
	TOTAL GENERAL	209999.92	209999.92

