

TÍTULO: Equipamiento para Laboratorios de Biotecnología dedicados a sumar competitividad y sustentabilidad a la cadena de trigo

Resumen del Proyecto

El trigo representa el 17% del área mundial cultivada, lo cual corresponde a unas 220 millones de ha. Su importancia social es enorme ya que el 55% de los carbohidratos consumidos por el hombre provienen de este cereal. En Argentina la superficie promedio de siembra es de 6,1 millones de ha., con una producción total de 14,8 millones de Tn, con un valor estimado en 1300 millones de USD. El Rendimiento Promedio a nivel país es de ca. 2,5 Tn/ha, muy por debajo del equivalente en países europeos como Francia (6,5 Tn/ha) e Inglaterra (7,2 Tn/ha) debido a diferencias en los fondos genéticos de los materiales y a limitantes de índole ambiental. Sin embargo, la brecha entre el rendimiento actual y el potencial en muchas zonas productoras puede llegar al 70%, lo que indica que aún hay potencial para incrementar el rendimiento promedio. El mercado interno consume en promedio 4,8 millones de Tn y el resto se exporta mayormente como clase única, a un precio inferior a los trigos pan diferenciados de países competidores (en promedio FOB 141 USD/Tn frente a USD 150-170, según el tipo y origen de trigo pan a que se haga referencia, lo que a valores del 2003 representa pérdidas entre 100 y 300 millones de dólares (considerando un saldo exportable de 10 millones de Tn). Estas diferencias se incrementan en momentos de cosecha y fuera del Mercosur, cuando la Argentina compite con trigos blandos baratos, restituciones a las exportaciones de la U.E. y con las ofertas del Mar Negro. Un segundo factor a considerar en la escasa valoración del trigo argentino es la difusión en los últimos años de variedades de calidad panadera deficiente y la usanza de mezclar esta producción con la de variedades de buena calidad, perdiéndose el atributo de buena calidad. Por otro lado el mercado mundial ha cambiado, creándose nuevas demandas más específicas en función del consumidor, lo cual ha generado condiciones ventajosas para el comercio de partidas de trigo de calidades diferenciadas, lo que se refleja en las cotizaciones. Para dar una respuesta adecuada a esta demanda se requerirá el desarrollo de variedades y sistemas de producción orientados a producir calidades particulares. Un tercer factor que afecta negativamente la productividad y en ciertos casos la calidad e inocuidad del trigo (como por ejemplo, la fusariosis de la espiga), es la ocurrencia de enfermedades en el cultivo. Un importante número de ensayos conducidos en el país ofrecen una idea del potencial de las enfermedades para limitar la expresión de rendimientos, destacándose la roya de la hoja con pérdidas entre el 13 y 44% y la fusariosis de la espiga con pérdidas entre el 10 y el 30%. En este sentido es importante destacar un limitado uso de fuentes efectivas de resistencia genética a los principales patógenos por parte de los programas de mejoramiento.

En relación a la sustentabilidad de los sistemas productivos, la posibilidad de generar trigos adaptados a las nuevas regiones productivas del norte de Argentina y la mejora en el rendimiento potencial (sin resignar calidad comercial e industrial) hará al cultivo de trigo una alternativa más atractiva para su incorporación en los esquemas de rotaciones, especialmente en el secuencia trigo-soja..

El objetivo general de este proyecto es complementar y modernizar el equipamiento para una red nacional multidisciplinaria de laboratorios dedicados al uso de tecnologías emergentes y de los nuevos desarrollos moleculares (genómica, marcadores moleculares, transformación, tillig) combinadas con aspectos ecofisiológicos, que contribuirá a

incrementar la competitividad y sustentabilidad de la cadena de valor del trigo. Se propone capitalizar los recientes avances en el área de biología molecular y genómica de trigo y de modelos emparentados filogenéticamente como maíz, arroz, sorgo, cebada, etc. para acelerar el proceso de obtención de nuevas variedades.

El objetivo final es que los mejoradores cuenten con métodos de evaluación confiables y precisos para: (1) incorporar variabilidad genética de interés, (2) clasificar y seleccionar eficientemente el germoplasma para asistir a los programas de mejoramiento y la posterior selección de las progenies obtenidas y (3) conocer con mayor exactitud como varía la expresión génica en distintos ambientes.

Estos desarrollos requieren de una red de laboratorios con equipamiento especializado y que cubran los distintos aspectos que contempla el proyecto.

La transferencia tecnológica se consolidará a través del trabajo con empresas privadas demandantes de la tecnología (criaderos), que en muchos casos no cuentan con laboratorios propios y que forman parte del proyecto de área estratégica.

En función de estos objetivos la red propone:

- 1.- Caracterizar, evaluar y desarrollar germoplasma, a fin de identificar bases genéticas con potencialidad para diversificar la calidad e incrementar la sanidad, productividad, adaptabilidad y sustentabilidad del cultivo.
- 2.- Desarrollar marcadores moleculares asociados a las bases genéticas identificadas, que permitan agilizar su transferencia a germoplasma adaptado localmente, mediante selección asistida.
- 3.- Contribuir a la adopción del uso rutinario de marcadores moleculares en programas de mejoramiento mediante: a) utilización y adaptación de marcadores moleculares disponibles en el dominio público y aquellos desarrollados en el marco de este proyecto, b) desarrollar recursos genéticos públicos que pongan en condiciones de uso bases genéticas disponibles en germoplasma no adaptado localmente (especies afines, germoplasma exótico, germoplasma obsoleto).
- 4- Desarrollar protocolos de transformación, TILLING, VIGS, etc. como herramientas útiles para a) determinar la función de genes de interés agronómico mediante genética reversa o disección génica, b) ampliar la variabilidad genética presente en el germoplasma de trigo, c) desarrollar estudios de interacción huesped-patógeno utilizando como modelo trigo, etc.
- 5.- Evaluar el comportamiento de los materiales obtenidos en distintos ambientes a los efectos de establecer la expresión del carácter bajo distintas condiciones de manejo.
- 6.- En función de la similitud genómica entre trigo y cebada, la posibilidad de interactuar con fisiólogos del cultivo y el interés mostrado por el sector privado se decidió incorporar cebada, de manera de estudiar las bases genéticas y fisiológicas del brotado precosecha.
- 7.- Conformar una red de laboratorios que presten servicios de selección asistida por marcadores moleculares.
- 8.- Elaborar un sitio en Internet como principal vía de divulgación de las actividades y productos obtenidos a partir de este proyecto, incluyendo descripción de las poblaciones de mapeo, los marcadores, los protocolos, germoplasma público generado, informes de reuniones anuales, etc.
- 9.- Formar recursos humanos en el área a distintos niveles: maestrías, doctorados y especialización.
- 10.- Divulgar los resultados obtenidos por medio de publicaciones en revistas del ámbito nacional e internacional y en congresos del área.

11.- Estimular el trabajo en red entre los distintos actores de la cadena del trigo (productores, mejoradores, molineros, industria, exportadores, académico-institucional, etc.) a través de la organización de talleres, seminarios, etc

Entidades participantes

El presente proyecto consta de 7 Nodos que comprenden parte del Proyecto de Área Estratégica denominado: Herramientas de biotecnología aplicadas a sumar competitividad y sustentabilidad a la cadena de trigo (IP-PAE 37108).

Participan de este PME las siguientes Instituciones: INTA (EEA Marcos Juárez, INTA Castelar: Instituto de Genética e Instituto de Biotecnología) Universidad Nacional del Sur, Universidad Nacional de Río Cuarto, Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida (CERZOS, CONICET) y la Facultad de Agronomía de la UBA (FAUBA). No obstante ello todas las Instituciones participantes del proyecto tendrán acceso al equipamiento mencionado.

Destino del equipamiento

El equipamiento solicitado apoyará a los siguientes instrumentos de la ANPCyT que conforman el proyecto de Área Estratégica, al resto de la red constituida para tal fin y a proyectos relacionados:

I. IP-PAE PICT: Identificación y transferencia de genes asociados a calidad, sanidad y tolerancia a bajas temperaturas en trigo candeal

Grupo Responsable

Dra. Alicia Delia Carrera. CERZOS y Dpto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur

Ing. Carlos Jensen, Chacra Experimental Integrada de Barrow

Dr. Gerardo Cervigni. Dpto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CERZOS (CONICET)

Dra. Nélida Winzer, Dpto. de Matemática, Universidad Nacional del Sur

Dra. Cecilia Farnochi. Dpto de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto

Ing. Agr. MSc María Laura Appendino. Cátedra de Genética, FAUBA

Grupo Colaborador

Ing. María Laura Seghezzo (investigador)

Dra. Viviana Echenique (investigador)

Lic. MSc. Diego Zappacosta (investigador)

Marta Miravalles (investigador)

Ing. Rubén Miranda (investigador)

Dr. Marcelo Helguera (investigador)

Dra. Sofía Noemí Chulze (investigador)

Dra. María Laura Ramírez (investigador)

Leonardo Vanzetti (Becario)

Ing. Pablo Roncallo. (Becario)

Se incorporará al menos un becario

Instituciones participantes:

Dpto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CERZOS (CONICET)
ACA.

Dpto de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto
INTA Marcos Juárez
INTA Barrow
INTA Castelar
FAUBA
Buck Semillas

Resumen

La sémola de trigo candeal, *Triticum turgidum* L. var. *durum*, constituye la materia prima para la industria de fabricación de pastas. El cultivo de candeal en la Argentina declinó considerablemente en las últimas campañas. Este proceso puede atribuirse a una combinación de factores: a) pérdida de mercados internacionales, b) nuevas demandas de variedades con calidades diferenciadas, c) avance de cultivos con mayor rentabilidad en la zona agrícola argentina d) disminución en el rendimiento y la calidad por enfermedades fúngicas. En los últimos años, nuestro grupo ha trabajado en el mapeo de caracteres relacionados con calidad de trigo candeal. Genes de lipoxigenasas y QTLs para color en sémola y pasta fueron posicionados sobre un mapa genético de marcadores microsatélites y se han identificado marcadores moleculares asociados. Asimismo, se trabajó en la localización de QTLs relacionados con la fuerza de gluten y en la identificación de un gen que confiere un mayor contenido de proteína en grano. Durante la elaboración de la propuesta IP-PAE se han fortalecido interacciones pre-existentes con grupos de investigación en trigo (Instituto de Recursos Biológicos – INTA Castelar, Chacra Experimental Integrada Barrow, ACA Asociación de Cooperativas Argentinas) y se han iniciado nuevas colaboraciones (FAUBA, Universidad Nacional de Río Cuarto, Buck semillas). En base a esta interacciones el presente proyecto propone contribuir a la obtención de cultivares de trigo candeal con características mejoradas de calidad, resistencia a la fusariosis de la espiga y/o tolerancia a heladas, a través de la evaluación de germoplasma de origen diverso y la aplicación de herramientas moleculares.

II. PICT 2006. Categoría Jóvenes Investigadores: Mapeo de regiones genómicas y análisis del patrón de expresión de genes de lipoxigenasas en trigo candeal (*Triticum turgidum* ssp. *durum*). (Código 2115, 24856 pesos).

Investigadora: Dra. Ingrid Garbus (CERZOS, CONICET)

Colaboradora: Lic. Natalia Moirano (becaria CONICET)

Resumen:

En trigo candeal, el color amarillo del grano es un factor de calidad de gran importancia, particularmente para la producción de pasta. Este color se debe a la presencia de pigmentos carotenoides en las semillas. Adicionalmente, los pigmentos carotenoides contribuyen al incremento de la calidad nutricional de la pasta por sus propiedades antioxidantes. Sin embargo, un alto nivel de carotenos en el grano o en la sémola no es garantía de un alto color en la pasta, sino que el color final depende del balance entre el contenido inicial y el contenido residual después del almacenamiento y molienda del grano y de la degradación oxidativa de los pigmentos durante amasado por acción de las

enzimas lipoxigenasas (LOX). Las LOX son desoxigenasas con hierro no hémico que catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados produciendo radicales libres intermedios que son los responsables de la degradación oxidativa de los pigmentos.

En trigo hexaploide (AABBDD), las isoenzimas de LOX fueron asignadas al locus Lpx-1 en el cromosoma 4 (Lpx-A1, Lpx-B1 y Lpx-D1, en los cromosomas 4A, 4B y 4C, respectivamente) y al locus Lpx-2 del cromosoma 5 (locus Lpx-A2, Lpx-B2 y Lpx-D2, en los cromosomas 5A, 5B y 5C), a través del uso de líneas nuli/tetrasómicas (Hart y Langston, 1977). Estudios más recientes confirmaron estos resultados (Li y col., 1999, Nachit y col., 2001).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo, en colaboración con la Universidad de California (UCDavis), demostró la existencia, en el cromosoma 4 de trigo candeal, de un locus que se corresponde con el gen Lox-B de cebada, que fue denominado Lpx-3 (Carrera y col., 2007). Para ello se utilizó una población de 93 RILs derivadas del cruzamiento entre la var. Kofa y la línea UC1113 de *Triticum turgidum* ssp. *durum* (AABB). Además, a través de primers inespecíficos, diseñados a partir de los genes de cebada LoxA, LoxB y LoxC, se logró amplificar secuencias de los loci Lpx-1 del cromosoma 4B, Lpx-2 de los cromosomas 5A y 5B y Lpx-3 de los cromosomas 4A y 4B. Utilizando un mapa basado en microsatélites del mismo grupo (Cervigni y col, 2005), se mapearon los loci Lpx-B1 y Lpx-A3. Asimismo, se identificó una combinación de alelos que resulta en un 10% de incremento en el color de la pasta.

Kofa y UC1113 son una variedad y una línea del programa de mejoramiento de la Universidad de California, que difieren en sus características de color, fuerza de gluten y rendimiento.

Los objetivos generales de este proyecto apuntan a continuar con esta línea de investigación, a través de la búsqueda de nuevos polimorfismos, el mapeo de los genes de las diferentes isoformas de la enzima lipoxigenasa y el estudio de sus patrones de expresión a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo del grano. De esta manera, se espera realizar un aporte al conocimiento de la relación entre la actividad LOX y el color de la sémola y pasta que proporcionará herramientas moleculares claves para la manipulación de estas características y/o selección por baja actividad de LOX en los programas de mejoramiento de trigo candeal para la futura selección de variedades con elevados niveles de caroteno y baja actividad de LOX.

III. PICT 2006. Prioridades Regionales. Bonaerense: Análisis genómico de caracteres de calidad y componentes del rendimiento en trigo candeal (Código: 1011). \$ 232.440

Grupo Responsable

Dra Viviana Echenique. Dpto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur

Dr. Marcelo Helguera. INTA EEA Marcos Juárez

Grupo Colaborador:

Dr. Gerardo Cervigni (investigador)

Dra. Alicia Carrera (investigadora)

Ing. Rubén Miranda (investigador)

Ing. Carlos Jensen (investigador)

Ing. Patricia Gómez (becaria INTA)

Se incorporará un becario

Instituciones participantes:

Dpto. de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CERZOS (CONICET)

ACA.

INTA Marcos Juárez

INTA Barrow

INTA EEA Balcarce

Resumen

Los trigos tetraploides (*Triticum turgidum* L. var. *durum*), destinados a la elaboración de pastas, se comenzaron a cultivar en el país casi simultáneamente con los trigos pan, alrededor de 1870. Según la *Foreign Agricultural Service (FAS)* dependiente del *USDA* (<http://www.fas.usda.gov>) la Argentina incrementó el área dedicada al cultivo de trigo candeal de 22 mil hectáreas (ha) en la cosecha 1989/90 a 83 mil ha en la cosecha 1996/97. Sin embargo, esta misma fuente indica que la superficie estimada del cultivo en la campaña 2005/06 fue en 54 mil ha, un 5% menos que en 2004/05, y se esperan superficies aún menores para las próximas campañas. Este retroceso en el área dedicada a este cultivo se debe básicamente a la preferencia, por parte de los productores, de cultivos de mayor rentabilidad como soja de primera y también girasol. Estos *commodities* han visto favorecida su producción, no sólo por las mejoras genéticas que elevaron su rendimiento, sino también, por su alto valor en el mercado internacional.

La demanda a nivel mundial de calidades específicas ha generado condiciones favorables para el comercio de partidas de trigo de alta calidad. Es necesario entonces, desarrollar variedades que reúnan buena calidad de pasta y elevados rendimientos, combinando ventajas para productores y consumidores. En el caso del candeal los parámetros de calidad tienen que ver con el color amarillo de la pasta, buena fuerza de gluten para dar firmeza al fideo y alta proteína, que garantice su valor nutricional.

En los últimos seis años, nuestro grupo trabajó en la evaluación de una población de líneas recombinantes endogámicas (RIL), derivada del cruzamiento entre la línea UC1113 y el cv. Kofa. Genes de lipoxigenasas y QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para color de sémola y pasta fueron posicionados sobre un mapa genético de marcadores microsatélites. Asimismo, trabajó en la identificación de un gen que confiere un mayor contenido de proteína en grano. El objetivo del presente proyecto es avanzar en el conocimiento de los factores determinantes del color de la pasta e iniciar estudios biométricos de rendimiento, cantidad de proteína y fuerza de gluten y el mapeo de regiones genómicas asociadas. Las técnicas biométricas y la metodología de marcadores moleculares son de utilidad en la comprensión de la base genética de los mencionados caracteres. Los marcadores moleculares ligados a los QTL mapeados serán amplificados en variedades y líneas de trigo candeal de distinto origen y genealogía. En base a los antecedentes expuestos, el presente proyecto tiene como objetivo general *i*) caracterizar genéticamente y biométricamente en varios ambientes los caracteres rendimiento y sus componentes, cantidad y calidad de proteínas, fuerza de gluten, pigmentos e *ii*) identificar regiones genómicas (QTLs) asociadas a estos caracteres complejos.

Equipamiento solicitado (Proyectos I, II y III)

1. Microcentrifuga refrigerada

La microcentrifuga deberá poseer dimensiones aceptables para ser utilizada sobre mesada de laboratorio, un peso aproximado de 30-38 Kg y funcionar con una tensión eléctrica de 220-230 V/50 Hz con un consumo aproximado de 380 W.

Como características específicas, la temperatura debe ser ajustable en rangos de -9 a 42°C. La variación de temperatura desde el estado estacionario de 4°C a 37°C con incrementos de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

El equipo debe permitir el uso de al menos tres tipos de rotores fijos o de ángulo variable: 1) para tubos de 1,5 – 2,0 ml; 2) 15 ml y c) 50 ml. La centrifuga deberá ser capaz de detectar el tipo de rotor automáticamente por medio de un programa apropiado.

La disponibilidad de una centrifuga refrigerada es indispensable para la extracción de ADN. Los diferentes tipos de rotores que pueden acoplarse permitirán extraer ADN en pequeñas cantidades (útiles en técnicas como la PCR) o bien cantidades mayores, necesarias en técnicas de hibridización como southern blot y preparaciones de plásmidos con genes de interés. Este equipo se instalará en el CERZOS. Se carece de una centrífuga de tales características (para tubos de 15 y 50 ml). Actualmente se utiliza una perteneciente a otro Instituto del CCT Bahía Blanca.

2. Campana extractora de gases

Construida en acero inoxidable. Con puerta guillotina contrapesada, y vitrea de seguridad, con contrapesos guiados de desplazamiento interno. Mesada de trabajo en chapa de acero inoxidable con perfil antidesborde y sopapa de desagote. Hasta (4) picos internos con toma para manguera para gas, agua, vacío y aire comandados desde el exterior mediante válvulas aguja. Cañerías en caño de cobre con conexiones de bronce y salida lateral o inferior. Iluminación interior Doble sistema de aspiración permanente. Boca de inyección para compensar el ingreso de aire cuando se trabaja con la puerta baja. Ventilador centrífugo para extracción. Dimensiones aproximadas: Frente: 1.160 mm., Prof.: 670 mm., Alto: 2.600mm.

Esta campana será utilizada en el proyecto de Fusariosis para trabajar en condiciones de seguridad durante la extracción de micotoxinas y de ADN de poblaciones de *Fusarium*. Se instalará en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, que carece de dicha instalación

3. - Cámara de crecimiento para cultivos

De 4m³, con control independiente de temperatura (rango +30C -10C), fotoperiodo y humedad (origen nacional). Se construirá con materiales nacionales puesto que resulta más económico que comprar una cámara equivalente que podría tener problemas de reparación, sobre todo si fuera importada.

La caracterización de la respuesta de distintos genotipos a determinadas condiciones ambientales requiere, en muchos casos, de poder contar con condiciones de temperatura y humedad controladas. Esto permite independizar las evaluaciones del condicionamiento que impone la ocurrencia de condiciones naturales favorables al objeto de estudio. No se cuenta con un equipo como el solicitado en la Institución que pueda ser usado para esta propuesta. Este equipo se instalará en la FAUBA y el objetivo principal será la selección de materiales de trigo en función de su respuesta a estreses abióticos. Una vez seleccionados los materiales se realizarán los correspondientes estudios en condiciones de campo.

4. Liofilizador.

El equipo está contenido en un gabinete compacto con terminación en pintura horneada y tapa superior en acero inoxidable, apto para instalar sobre mesada. Dimensiones

exteriores: 1100 mm de frente, 740 mm de profundidad y 900 mm de altura (incluyendo la cámara). La alimentación eléctrica es monofásica de 220 V – 50 Hz. Se encuentra integrado por los siguientes componentes:

Cámara de secado: de acrílico cristal transparente que permite visualizar el producto que está en proceso, de forma cilíndrica, de eje vertical, tiene un diámetro de 340 mm y 300 mm de altura. Está ubicada sobre el gabinete y es totalmente desarmable.

Estante: de forma circular de 320 mm de diámetro, construido en aluminio para una mejor conducción del calor.

Es posible congelar el producto a temperaturas del orden de los – 35°C. Posee un sistema de calefacción eléctrica en baja tensión que permite alcanzar temperaturas de calefacción de + 40 °C.

Capacidad: 140 frascos de 23 mm de diámetro (10 cm³)

Condensador: construido en acero inoxidable AISI 316, dispuesto en forma vertical y ubicado debajo de la cámara. Temperatura de condensación hasta -40°C.

Sistema de vacío: mediante una bomba de doble etapa de 140 Lts/min de caudal y un vacío final del orden de 20 micrones de Hg, ubicada fuera del gabinete. Con válvula de seguridad de accionamiento automático ante eventuales cortes de energía eléctrica.

Sistema de taponado: de accionamiento manual permite realizar la operación bajo condiciones de vacío, taponando frascos de hasta 120 mm de altura.

Panel de comando e instrumentación de tipo manual. El equipo es de funcionamiento manual, posee llave general de corte y control eléctrico individual para cada operación del proceso. Posee en siguiente instrumental: medidor de temperatura de producto-estante y condensador. Lectura digital, rango –40 a + 40°C.

Medidor de vacío cámara-condensador: lectura digital, rango de medición desde 760 mm a 0,001 mm de Hg.

Accesorios: Una (1) Pinza precintadora manual de frascos para 140 - 300 frascos de 10 cm³ ,de vidrio para liofilizar, con su correspondiente tapón y precinto de aluminio.

La disponibilidad de un liofilizador permitirá una mejora sustancial en el almacenamiento a largo plazo de muestras vegetales para distintos usos posteriores vinculados a las actividades a desarrollar en este proyecto (extracción de ADN, proteínas, etc.). En el CERZOS no se dispone de un equipo de estas características y cuando se requiere de este proceso se deben transportar las muestras hasta el edificio del Dpto. de Agronomía, localizado a 10 km, transportandolas en nitrógeno líquido. El transporte con nitrógeno líquido, por condiciones de seguridad, debe realizarse en camioneta (difícil de conseguir ya que tienen mucha demanda) y con muchos recaudos.

5. Lisador de tejidos

El equipo deberá ser capaz de homogeneizar muestras en placas de tamaño 2 x 96 muestras en al menos 2-4 minutos. La homogenización del material deberá realizarse, especialmente, en tubos que puedan ser cerrados herméticamente para disminuir la contaminación cruzada. La metodología de homogenizado debe ser altamente reproducible. El equipo debe tolerar el uso de diferentes de diferentes soluciones buffers y tejidos para extraer ADN, ARN, proteínas, etc. Funcionamiento a 220-240 V, 50/60 Hz.

Se solicita la compra de este equipo para procesar y agilizar la extracción de DNA a partir de tejido vegetal. En el proyecto se contempla la realización de numerosos cruzamientos y retrocruzadas, lo que implica una gran cantidad de material para procesar, situación que se facilitaría enormemente con la disponibilidad de un equipo que permite

moler un gran número de muestras. Esto redundaría en una mayor eficiencia de trabajo, especialmente en lo concerniente al ahorro de mano de obra y rapidez en el proceso de análisis de datos para acelerar la selección. Se instalará en la UNS-CERZOS, donde se destinará a la evaluación de poblaciones de mapeo de trigo candeal. Se trata del equipo más sencillo para este tipo de trabajo. La alternativa es hacer el procesado a mano pero es lento y se requeriría del tiempo de becarios o técnicos que podrían estar afectados a tareas menos rutinarias. Este equipo simplifica y acelera mucho el proceso.

IV. IP-PAE PICT: Desarrollo de nuevas tecnologías basadas en la manipulación de ADN adaptadas al trigo

Grupo Responsable:

Dr. Marcelo Helguera INTA EEA Marcos Juárez

Ing. Agr.. Antonio Díaz Paleo Instituto de Genética INTA Castelar

Dra. Dalia Lewi Instituto de Genética INTA Castelar

Grupo colaborador:

Dra. Mariana del Vas Instituto de Biotecnología INTA Castelar

Dra. María José Diéguez (investigador)

Dr. Francisco Sacco (investigador)

Dra. Paula Faccio (investigadora)

Lic. Leonardo Vanzetti (investigador)

Instituciones participantes:

INTA:

EEA Marcos Juárez

Castelar Instituto de Genética

Castelar Instituto de Biotecnología

Resumen

En la actualidad los genomas enteros de plantas como *Arabidopsis* y arroz han sido completamente secuenciados y la información sobre la totalidad de los genes que componen estos genomas está a libre disposición. Esta información es de gran utilidad para descubrir nuevos genes vinculados a caracteres de interés agronómico en trigo o, alternativamente, incorporar nuevas características al cultivo mediante el desarrollo de transgénicos. Tanto para el descubrimiento de genes como para el desarrollo de transgénicos se requiere la organización y consolidación de grupos de investigación en nuevas tecnologías para el cultivo de trigo en el país que permitan capitalizar el conocimiento actual sobre genomas de plantas. Este proyecto propone conformar una red multidisciplinaria de capacidades en el uso de tecnologías emergentes del ADN (específicamente, transformación, silenciamiento génico y TILLING) que contribuya a desarrollar herramientas para resolver problemáticas del mejoramiento de trigo.

V. IP-PAE PICT: Utilización de la variabilidad genética presente en genes asociados a la definición del uso industrial potencial de trigo pan para desarrollar germoplasma con calidades diferenciadas

Grupo Responsable:

Dra. Gabriela Tranquilli. INTA Castelar, Instituto de Recursos Biológicos

Dra. Laura Pflüger. INTA Castelar, Instituto de Recursos Biológicos

Grupo Colaborador

Dr. Marcelo Helguera (investigador)
Ing. Carlos Bainotti (investigador)
Ing. Beatriz Formica (investigador)
Dra. Silvina Lewis (investigador)
Dra. Marcela Manifesto (investigador)
Lic. Marcos Bonafede (investigador)
Lic. Leonardo S Vanzetti (investigador)
Lic. Mariana Cativelli (becaria)

Resumen

Algunos de los caracteres más importantes que definen la calidad para el uso final de una harina de trigo son: a) elasticidad y extensibilidad del gluten, determinadas por proteínas de reserva, b) contenido de proteína en el grano, c) la composición del almidón, y d) textura del grano, determinada por puroindolinas.

Este subproyecto propone contribuir al conocimiento del efecto de genes asociados a caracteres mencionados previamente, y al desarrollo de herramientas biotecnológicas que faciliten su manipulación a fin de obtener trigos con calidades diferenciadas. Particularmente, los objetivos específicos sobre los que se trabajarán son: 1) Desarrollar / implementar marcadores para caracterizar la variabilidad de los genes *Glu-A3*, *Glu-B3* y *Glu-D3*, que codifican para gluteninas de bajo peso molecular (*LMWGs*), 2) Desarrollar poblaciones segregantes para evaluar el efecto de ciertos alelos de proteínas de endosperma sobre parámetros de calidad industrial (variante alélica *Glu-B1a* de *HMWGs*, gliadinas), 3) identificar y caracterizar genes asociados a mayor contenido de proteína en grano, 4) implementar el desarrollo de germoplasma de trigo hexaploide con aptitud fideera a partir de la manipulación de bases genéticas asociadas a textura de grano, pigmentación de la harina, contenido de proteína en grano y fuerza del gluten.

Equipamiento solicitado para proyectos IV y V

1- Cámara de crecimiento

Para cultivos con control independiente de temperatura y fotoperíodo. 1.1 m³ de espacio interior. Se utilizará para realizar los ensayos de desarrollo de protocolos de transformación genética de trigo utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Se necesita contar con espacios de cultivo con condiciones controladas debido a que: i) las plantas y los tejidos tratados se crían in vitro, bajo condiciones de luz, temperatura y fotoperíodo controlados para la obtención de plantas regeneradas a partir de callos embrionarios; ii) las plantas obtenidas in vitro se deben aclimatar para pasar a las condiciones de invernáculo también en condiciones controladas, y iii) para preservar las condiciones de bioseguridad requeridas por la CONABIA cuando se desarrollan este tipo de experimentos. Por otro lado, la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) se utiliza para la caracterización funcional de genes candidatos. En contraste con la mutagénesis tradicional la técnica de VIGS no altera el gen en sí mismo sino que suprime temporalmente la expresión del mismo mediante el desencadenamiento de la degradación de los mRNAs específicos derivados de él derivados. Para lograr una correcta interpretación de los fenotipos resultantes, es fundamental realizar este tipo de

ensayos en condiciones ambientales regulares y estandarizadas como aquellas provistas por el tipo de cámara solicitada.

2. Termociclador de tiempo real

En general todos los equipos cumplen básicamente la misma función pero algunos ofrecen mayores posibilidades la principal diferencia es el rango de dinámica, el número de reacciones, la longitud de onda de exitación y el número de canales de detección. El equipo solicitado debería reunir las siguientes características: Equipo para 96 muestras con la posibilidad de detectar 5 fluoróforos diferentes en forma simultánea (verde, amarillo, organ, rojo y crimson). Disponer de tecnología High resolution melt para detección de SNPs. Unfomidad de temperatura: ± 0.01 grados, resolución de temperatura: ± 0.02 grados. Max. Ramp Rate: 10 grados/segundo (aire): Detector: photomultiplier (PMT) con posibilidad de programarse en forma automática o variable. Dimensiones: 37cm ancho x 42cm profundidad x 27,5cm alto, 14 Kg de peso. Alimentación eléctrica: 100-120V 60Hz, 200-240V 50Hz. Software incluído: Extensive analysis, graphics and statistical functions built-in PC Pentium IV con Windows XP o superior, puerto USB USB. Tiempo de corrida: 40min a 1.5hs. Volúmenes de reacción: 5 a 100 ul (dependiente del rotor). Garantía: al menos 1 año. Disponibilidad de service con representante en Argentina.

Se utilizará para detectar los SNPs identificados y generados por TILLING en poblaciones segregantes. Esta tecnología permite la amplificación y detección precisa en tiempo real de 2 o más alelos diferentes en muestras de ADN genómico, lo que incrementaría significativamente la capacidad de producción de datos moleculares del laboratorio de biotecnología de la EEA Marcos Juárez y de los otros laboratorios de la red.

También permitirá contribuir al conocimiento del efecto de los genes asociados a los caracteres más importantes que definen la calidad para el uso final de una harina de trigo (a. elasticidad y extensibilidad del gluten, determinadas por proteínas de reserva, b. contenido de proteína en el grano, c. la composición del almidón, y d. textura del grano, determinada por puroindolinas) a través de estudios de expresión. De esta manera permitirán el desarrollo de herramientas biotecnológicas que faciliten su manipulación a fin de obtener trigos con calidades diferenciadas.

VI. IP-PAE PID: Introgresión de genes de resistencia a roya de la hoja en cultivares de trigo, asistida por marcadores.

Grupo Responsable

Ing. Agr. Francisco Sacco. INTA Castelar, Instituto de Genética

Ing. Agr. Héctor Saione. INTA Castelar. Instituto de Genética

Grupo Colaborador

Dra. María José Diéguez (investigadora)

Dra. Lorena Romina Ingala (becaria de postdoctoral)

Se incorporarán dos becarios

Empresas aportantes:

Buck Semillas SA

Criadero Klein SA

Nidera Semillas SA
Relmó SA
Don Mario SA
Bioceres SA
ACA

Resumen

En Argentina, la roya de la hoja es una de las enfermedades más importantes, provocando pérdidas anuales estimadas en un 5-10% de la producción, con un valor económico que supera los 15 millones de dólares anuales. Existen algunas variedades tradicionales de trigo que muestran resistencia durable a esta enfermedad, como Sinvaloch y Buck Manantial, a partir de las cuales se han aislado genes de resistencia en planta adulta como SV1, SV2 y BMP1. Estos genes han demostrado buen comportamiento a campo y son los principales determinantes genéticos de la durabilidad en estas variedades. Este tipo de genes no se expresa al estado de plántula, sino que comienzan a expresarse a medida que la planta completa el desarrollo de sus hojas, incluyendo la hoja bandera. Se han caracterizado también marcadores moleculares asociados a los mismos y sus distancias genéticas. En el presente proyecto se propone incorporar estos genes en variedades precomerciales y/o comerciales de 7 criaderos (Buck, Klein, Relmó, Nidera, ACA, Don Mario y Bioceres) mediante retrocruzadas asistidas con marcadores moleculares. La metodología consistirá en realizar cruzamientos de las variedades a mejorar con líneas portadoras de estos genes o combinaciones de los mismos, obtener las F1 y posteriormente realizar retrocruzadas por las variedades recurrentes para asegurar al menos un 95% del background genético de las mismas. A partir de la primera retrocruza se seleccionarán los genes de resistencia con marcadores moleculares ligados, y entre las plantas selectas, se realizará adicionalmente una selección usando marcadores por parecido al background del parente recurrente. Se prevé realizar 2 generaciones anuales y un periodo de 3 años para incorporar al menos uno de los genes de resistencia en la variedad recurrente elegida.

Equipamiento solicitado proyecto VI

1. Lisador de tejidos

El equipo deberá ser capaz de homogeneizar muestras en placas de tamaño 2 x 96 muestras en al menos 2-4 minutos. La homogenización del material deberá realizarse, especialmente, en tubos que puedan ser cerrados herméticamente para disminuir la contaminación cruzada. La metodología de homogenizado debe ser altamente reproducible. El equipo debe tolerar el uso de diferentes de diferentes soluciones buffers y tejidos para extraer ADN, ARN, proteínas, etc. Funcionamiento a 220-240 V, 50/60 Hz.

Se solicita la compra de este equipo para procesar y agilizar la extracción de DNA a partir de tejido vegetal. En el proyecto se contempla la realización de numerosos cruzamientos y retrocruzadas, lo que implica una gran cantidad de material para procesar, situación que se facilitaría enormemente con la disponibilidad de un equipo que permite moler un gran número de muestras. Esto redundaría en una mayor eficiencia de trabajo, especialmente en lo concerniente al ahorro de mano de obra y rapidez en el proceso de análisis de datos para acelerar la selección. Se instalará en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” del INTA Castelar, donde se destinará al proyecto de introgresión de genes de resistencia a roya de la hoja en materiales de las empresas adoptantes. Se trata

del equipo más sencillo para este tipo de trabajo. La alternativa es hacer el procesado a mano pero es lento y se requeriría del tiempo de becarios o técnicos que podrían estar afectados a tareas menos rutinarias. Este equipo simplifica y acelera enormemente el proceso.

VII. IP-PAE PID: Mejora de la calidad maltera a través de la modificación de los mecanismos de dormición y el contenido endógeno de nitrógeno en los granos de cebada.

Grupo Responsable

Dr. Roberto Benech-Arnold. IFEVA. Cátedra de Cerealicultura. FAUBA

Dr. Daniel Julio Miralles. IFEVA. Cátedra de Cerealicultura. FAUBA

Dr. Gabriela Abeledo. IFEVA. Cátedra de Cerealicultura. FAUBA

Grupo colaborador:

Santiago Schalamuk (Becario)

Guillermina Mendiondo (Becaria)

Verónica Rodríguez (Becaria)

Ignacio Alzuela (Becario)

Instituciones participantes:

IFEVA. Cátedra de Cerealicultura. Facultad de Agronomía. UBA

Empresas adoptantes:

Maltería Pampa SA

Maltería Quilmes SA

Resumen

Dos de los inconvenientes que se presentan en la producción de cebada, vinculados con la calidad comercial e industrial del cultivo son el riesgo de brotado pre-cosecha y las variaciones en el contenido endógeno de nitrógeno en los granos.

La dormición se define como un bloqueo interno de las semillas que previene la germinación aún bajo condiciones adecuadas de temperatura, disponibilidad hídrica y gaseosa (Black, Butler, y Hughes, 1987). Este proceso, ha sido un problema en semillas de plantas cultivadas para fines comerciales: una dormición persistente haría fracasar la siembra de un cultivo o la utilización industrial de la semilla en el caso de que la misma requiera de su germinación (malteado de cebada cervecera). Por otro lado, una salida de la dormición demasiado anticipada, expondría al grano a sufrir brotado pre-cosecha (BPC) en el caso de que ocurrieran lluvias previas a la cosecha. La posibilidad de ajustar la dinámica de la salida de la dormición de los granos a una precisa ventana de tiempo después de la cosecha del cereal, requiere de un conocimiento detallado de los mecanismos fisiológicos y moleculares responsables de la imposición y la expresión de la dormición.

Sobre la base de la información existente para la cebada en relación a los mecanismos fisiológicos que estarían detrás de la diferente expresión de la dormición en los granos de estos cereales cuando son incubados a distintas temperaturas, y del conocido antagonismo ABA/GAs en la imposición y en la

expresión de la dormición, es que se puede proponer el análisis de la expresión de algunos genes candidatos para comenzar a dilucidar las bases moleculares de la expresión de la dormición en el grano cebada. Estos genes candidatos incluyen a los que participan en el metabolismo y/o inactivación, síntesis y señalización del ABA y GAs en cebada cervecera.

Por otro lado, variaciones en el contenido de nitrógeno en los granos determina cambios en algunos atributos vinculados con los procesos industriales del malteado como por ejemplo, el rendimiento del extracto de malta. Muchas veces un mayor contenido de proteína en los granos está acompañado de granos de menor tamaño debido a un mayor macollaje del cultivo, disminuyendo el efecto de dilución de los granos. Sin embargo, en los últimos años con la introducción de los materiales europeos de alto potencial de rendimiento, el contenido de proteína granos ha bajado a valores cercanos o menores a 8% por lo cual el problema pasó de ser el exceso a ser el déficit proteico. Si bien este efecto está claramente documentado, lo complejo es poder contar con un modelo sencillo que permita predecir el contenido de proteína en los granos en estado anteriores o cercanos a la espigazon, teniendo en cuenta los niveles iniciales de disponibilidad del nutriente, de modo tal de poder corregir las eventuales deficiencias y alcanzar al momento de la cosecha un contenido adecuado de proteína en los granos.

Equipamiento solicitado para el proyecto VII y V

En general todos los equipos cumplen básicamente la misma función pero algunos ofrecen mayores posibilidades la principal diferencia es el rango de dinámica, el número de reacciones, la longitud de onda de exitación y el número de canales de detección. El equipo solicitado para proyecto requiere la posibilidad de detectar 2 fluoróforos al mismo tiempo y las siguientes características adicionales: Bloque de 96 muestras. Uniformidad de temperatura: ± 0.01 grados, resolución: ± 0.02 grados. Max. Ramp Rate: 10 grados/segundo (aire): Detector: photomultiplier (PMT) con posibilidad de programarse en forma automática o variable. Dimensiones: 37cm ancho x 42cm profundidad x 27,5cm alto, 14 Kg de peso. Alimentación eléctrica: 200-240V 50Hz. Software incluído: Extensive analysis, graphics and statistical functions built-in. PC Pentium IV con Windows XP o superior, puerto USB. . Tiempo de corrida: 40min a 1.5hs. Volúmenes de reacción: 5 a 100 ul (rotor dependiente). Garantía: al menos 1 año. Disponibilidad de service con representante en Argentina.

Este equipo se utilizaría para evaluar expresión de genes vinculados con el brotado de grano, carácter importante en la calidad de grano de trigo y cebada.

Este equipo también sería utilizado por el grupo de la Dra. Tranquilli, Instituto de Recursos Biológicos, INTA Castelar.

Funcionamiento de la RED y líneas prioritarias a cubrir

La red proveerá de servicios especializados y capacidad de formación de recursos humanos para aquellos grupos de investigación y empresas dedicados al mejoramiento de trigo. Paralelamente, se harán esfuerzos para conformar una red virtual que permita la comunicación horizontal entre los grupos participantes, el procesamiento y el almacenamiento de la información accesible para todos los grupos. En función de la problemática que se aborda en este proyecto (limitada competitividad de la cadena de trigo) y de la propuesta para resolver esta problemática (generar una red interdisciplinaria de capacidades en genómica, marcadores moleculares, transformación, tilling, fisiología vegetal, etc. para apoyar a los programas de mejoramiento del país y

demás actores de la cadena, en la solución de esta problemática), el área estratégica que mejor encuadra la propuesta de este proyecto es " Competitividad y diversificación sustentable de la producción argentina".

Dentro de esta Área Estratégica se describen una serie de líneas prioritarias de investigación, desarrollo e innovación que son pertinentes a las actividades propuestas en este proyecto, ellas son: (1) "Diversificación de exportaciones de productos tradicionales y nuevos productos", "Calidad de materia prima y procesos industriales en la producción de alimentos, (2) "Nuevos usos o usos alternativos de la producción agropecuaria". En consonancia con estas dos líneas, este proyecto propone organizar una red de capacidades para generar herramientas moleculares y fisiológicas que faciliten el desarrollo de trigos adaptables a nuevas zonas productivas (nuevos núcleos productores y exportadores) con calidades industriales diferenciadas que sean demandadas por los distintos actores de la cadena de trigo. (3) "Desarrollo de resistencias genéticas a factores adversos (bióticos y abióticos)". En relación con esta línea de investigación priorizada, este proyecto propone desarrollar herramientas moleculares para incrementar la base genética de resistencia a las principales enfermedades del cultivo (roya de la hoja y fusariosis de la espiga, entre otras)..