

Caracterización genética de variedades locales españolas de trigo duro y trigo blando para su uso en pre-mejora

L. Pascual¹, E. Benavente¹, M.J. Callejo², J.M. Carrillo¹, J.M. González³, P. Hernández⁴, Y. Loarce³, M. López-Fernández¹, F. Martínez-Moreno⁵, M. Ruiz⁶, J.F. Vázquez¹ y P. Giraldo¹

¹Departamento de Biotecnología-Biología vegetal. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid. Avda Puerta de Hierro 2, 28040 Madrid.

²Departamento de Química y Tecnología de Alimentos. ETSIAAB. Universidad Politécnica de Madrid. Avda Puerta de Hierro 2, 28040 Madrid.

³Dpto. Biomedicina y Biotecnología. Universidad de Alcalá de Henares. 28871 Alcalá de Henares. Madrid.

⁴Dpto. Agronomía. Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC). Alameda del Obispo s/n, 14004 Córdoba.

⁵Dpto. Ciencias Agroforestales, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad de Sevilla, Ctra Utrera km1, 41013 Sevilla.

⁶Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos. Finca La Canaleja. 28800 Alcalá de Henares, Madrid.

Palabras clave: *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, roya, raíz, recursos fitogenéticos

Resumen

Las variedades locales de trigo constituyen un recurso de gran interés para la búsqueda de variación genética relacionada con características que confieran una mayor adaptabilidad, una mejor respuesta frente a estreses y un incremento de la calidad. Nuestro grupo, está realizando la caracterización genética de dos colecciones de variedades locales españolas de trigo duro (190 entradas) y de trigo blando (196 entradas), disponibles en el Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos del INIA. Ambas colecciones se han sometido a técnicas de genotipado masivo (mediante DArTseq) y se están caracterizando para su diversidad alélica en relación a distintos caracteres de interés, como son: hábito de crecimiento y fotoperiodo, tolerancia a estrés hídrico, eficiencia en el uso del nitrógeno, resistencias a royas, y proteínas implicadas en la calidad funcional. En el presente trabajo se detallan los resultados de la caracterización genética de la colección de trigo duro, así como los resultados de la primera caracterización fenotípica para caracteres relacionados con resistencia a estreses bióticos y abióticos en la colección nuclear de trigo duro, como son, la resistencia a royas y la arquitectura de raíz. La caracterización genética exhaustiva de la diversidad genética de este material permitirá la realización de estudios de asociación y su aprovechamiento en programas de pre-mejora.

INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos más importantes de la mejora del siglo XXI es el desarrollo de cultivares que permitan mantener los rendimientos actuales en un escenario climático variable. En este contexto, las variedades tradicionales españolas presentan un gran potencial.

La colección más numerosa y antigua de variedades tradicionales españolas de trigo se conserva en el Centro Nacional de Recursos Fitogenéticos (CRF) del INIA. La colección

activa está formada por 3.722 accesiones, de las que 1.551 son variedades españolas (<http://wwwx.inia.es/inventarionacional>). En el caso del trigo duro se ha desarrollado una colección nuclear a partir de estas entradas (Ruiz et al., 2012, 2013). La variabilidad genética de dicha colección y su potencial se ha puesto de manifiesto en estudios previos (Giraldo et al., 2016 y Ruiz et al., 2018). En el caso de trigo blando se ha desarrollado también una colección nuclear, que se está estudiando actualmente en el marco del proyecto AGL2016-77149-C2-1P del MINECO.

Uno de los factores limitantes de la producción de trigo son los estreses. En cuanto a estrés bióticos, la roya de la hoja (causada por el hongo *Puccinia triticina*) es una de las plagas más importantes. En cuanto a estreses abióticos, la disponibilidad de agua y nutrientes determinan en gran medida los rendimientos que se obtienen, por lo que las diferencias en la arquitectura radicular presentan un potencial inexplorado para la mejora de la resistencia a estreses.

En el presente trabajo se muestran los resultados de la caracterización genética de la colección de trigo duro. Así como los primeros resultados de la caracterización fenotípica para resistencia a roya y arquitectura de raíz.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material vegetal incluye 190 variedades tradicionales de trigo duro, incluyendo las subespecies *dicoccon* (13), *turgidum* (37) y *durum* (139) recogidas de 9 zonas agroecológicas diferenciadas. Así como 27 variedades cultivadas habitualmente en España de la subespecie de *durum*.

La totalidad de estas accesiones se genotipó con la tecnología DArTseq de Diversity Arrays Technology (Canberra, ACT, Australia) (Kilian et al., 2012). Las secuencias obtenidas se mapearon contra el genoma de *Triticum aestivum* (genomios AABBDD), especie estrechamente relacionada con la tetraploide *Triticum durum* (genomios AABB). La identificación de polimorfismos SNPs se realizó respecto a este mismo genoma. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R (<http://www.cran.r-project.org/>). Previo a la realización de los análisis los marcadores se filtraron, eliminando los marcadores con idéntico perfil en las accesiones analizadas, los marcadores con más de un 10% de datos faltantes y con un valor de MAF (Minimum Allele Frequency) inferior a 0.05. Los análisis de PCoA se llevaron a cabo con la librería dartR (Gruber et al., 2018).

De las 190 accesiones caracterizadas genéticamente, se seleccionaron las pertenecientes a la colección nuclear española de trigo duro para realizar la caracterización fenotípica. Se analizaron características relacionadas con la tolerancia a estreses bióticos y abióticos. Para la caracterización de la arquitectura de raíz, se emplearon 94 accesiones (10 *dicoccon*, 32 *turgidum*, y 52 *durum*), y 12 granos por accesión. Se procedió como se describe en Ruiz et al., (2018). Para la resistencia a roya de la hoja se emplearon 91 accesiones (9 *dicoccon*, 31 *turgidum*, y 51 *durum*), y la variedad de trigo duro Don Rafael como control susceptible. Se caracterizaron 4 hojas primarias por accesión. La inoculación se llevó en condiciones de invernadero 14 días tras el sembrado. Entonces 24mg de esporas del aislado Jerez Don José 13 se homogeneizaron con 1g de polvo de talco. La mezcla se pulverizó sobre las plantas que posteriormente se incubaron a 100% de humedad y temperaturas de 17-20°C y 15 horas de oscuridad. Doce días tras la inoculación la infección se caracterizó de acuerdo a la escala McNeal (McNeal et al., 1971). Se consideraron resistentes las accesiones con un valor inferior a 7.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización genética con marcadores de alta densidad

Mediante el genotipado masivo con la tecnología DArTseq se han obtenido un total de 51751 SNPs y 98983 DArTs polimórficos en la colección de accesiones analizadas. Dichos marcadores se encuentran repartidos por todo el genoma. Tras el filtrado se ha obtenido un set de 9324 SNPs y 38700 DArTs altamente informativos.

El análisis de la estructura poblacional con marcadores SNPs (Fig.1), nos permite distinguir claramente las tres subespecies. Las accesiones de *durum* se diferencian de las otras subespecies por el eje 1, sin embargo es el eje 2 el que permite separar *turgidum* y *dicoccon*, por lo que diferentes marcadores están implicados en estas diferencias. Los marcadores obtenidos representan un recurso valioso para realizar estudios de asociación.

Diversidad fenotípica presente en la colección

Dentro de la colección se observa variabilidad para los dos caracteres analizados. Respecto a la resistencia a roya, la mayoría de accesiones resultaron ser susceptibles al aislado Jerez Don José 13 (76/91) (Figura 2). Pero también se han detectado algunos genotipos resistentes pertenecientes a las tres subespecies que podrían ser de gran utilidad en mejora.

La caracterización de la arquitectura radicular reveló la existencia de fenotipos específicos en cada subespecie (Figura 3). Se ha encontrado variabilidad tanto para longitud, diámetro y número de raíces, como para la distribución espacial de las mismas. La variabilidad identificada constituye un valioso recurso para la mejora de resistencia a estrés hídrico.

En el proyecto en curso, ambas colecciones de trigo van a ser fenotipadas para éstos y otros caracteres y, la colección de trigo blando ya se está genotipando con el mismo tipo de marcadores. Una vez obtenidos todos los datos, los marcadores identificados serán correlacionados con los fenotipos analizados con el objetivo de identificar los posibles genes implicados en el control de estos caracteres y seleccionar marcadores moleculares susceptibles de ser incorporados en programas de mejora.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado con la financiación del proyecto AGL2016-77149-C2-1P del MINECO.

Referencias

- Giraldo, P., Royo, C., Gonzalez, M., Carrillo, J.M., y Ruiz, M. 2016. Genetic diversity and association mapping for agromorphological and grain quality traits of a structured collection of durum wheat landraces including *subsp. Durum*, *turgidum* and *dicoccon*. PLoS ONE. 11: e016677.
- Gruber B., Unmack, P.J., Berry, O. y Georges, A. 2018. dartR: an R package to facilitate analysis of SNP data generated from reduced representation genome sequencing. Mol Ecol Resour. doi: 10.1111/1755-0998.12745.
- Kilian, A., Wenzl, P., Huttner, E., Carling, J., Xia, L., Blois, H., et al. 2012. Diversity arrays technology: a generic genome profiling technology on open platforms. Methods Mol. Biol. 888: 67–89.
- McNeal, F.H., Konzak, C.F., Smith, E.P., Tate, W.S. y Russell, T.S. 1971. A uniform system for recording and processing cereal research data. USDA, Agricultural Research Service, Washington, D.C. ARS: 34-121.

- Ruiz, M., Giraldo, P., Royo, C., Villegas, D., Aranzana, M.J., y Carrillo, J.M. 2012. Diversity and Genetic structure of the Spanish collection of durum wheat (*Triticum turgidum* L) landraces. *Crop Science*. 52:2262-2275.
- Ruiz, M., Giraldo, P., Royo, C., y Carrillo, J.M. 2013. Creation and Validation of the Spanish Durum Wheat Core Collection. *Crop Science*. 53:2530-2537.
- Ruiz, M., Giraldo, P. y Gonzalez, J.M. 2018. Phenotypic variation in root architecture traits and their relationship with eco-geographical and agronomic features in a core collection of tetraploid wheat landraces (*Triticum turgidum* L.). *Euphytica*. 214: 54.

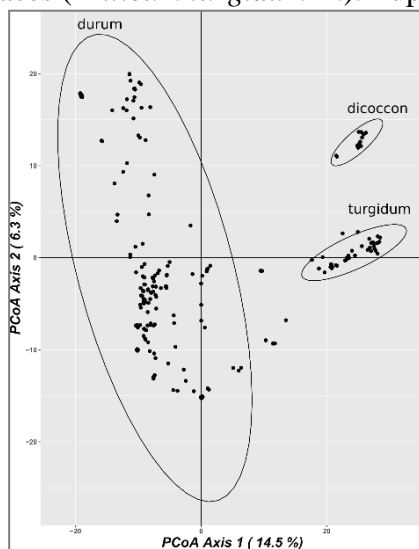


Fig. 1 Análisis PCoA, basado en los marcadores SNPs identificados en la colección de accesiones de trigo duro

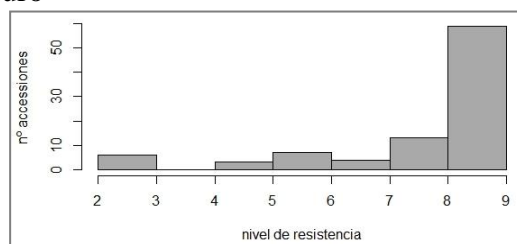


Fig. 2 Histograma con los niveles de resistencia a roya encontrados.



Fig.3 Ejemplos de arquitectura de raíz en semillas de 8 días. a y b subsp. *dicoccon*; c y d subsp. *turgidum*; y e, f, g, h subsp. *durum*. Barra de escala 1 cm (adaptado de Ruiz et al., 2018)