

CARACTERIZACION FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LÍNEAS DE TRIGO QUE EXPRESAN EL TRANSGEN *SARK::IPT* BAJO ESTRÉS HÍDRICO.

*Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo
EEA Pergamino INTA*

*28 -29 de Agosto 2013
EEA Balcarce-INTA*

Bases ecofisiológicas y genéticas para
mejorar el rendimiento y
la calidad en trigo y cebada
IV Workshop Internacional



Observaciones:

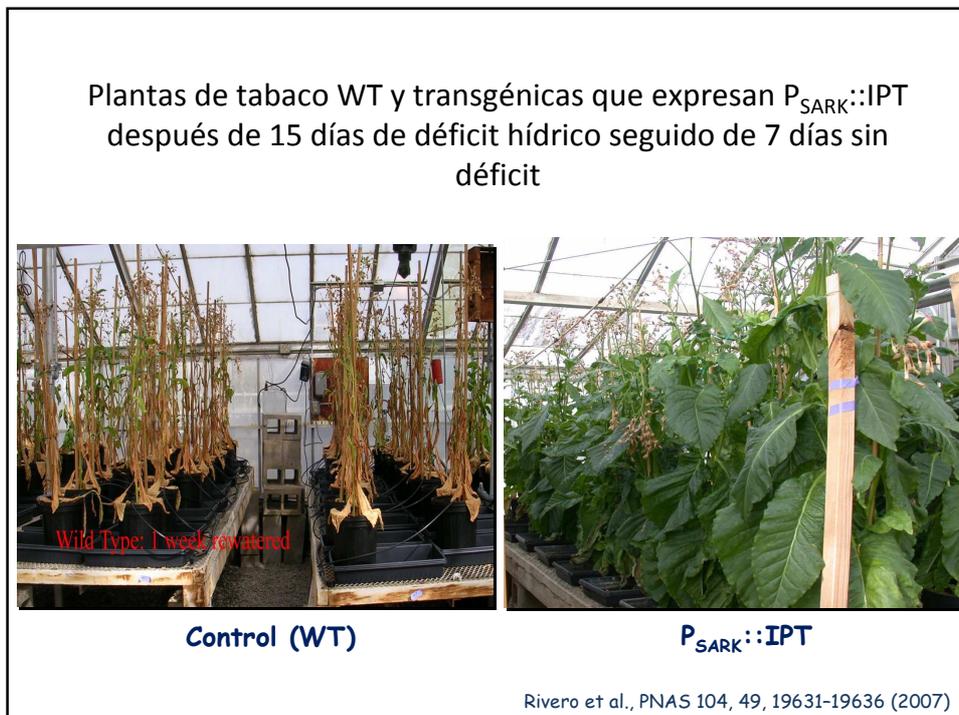
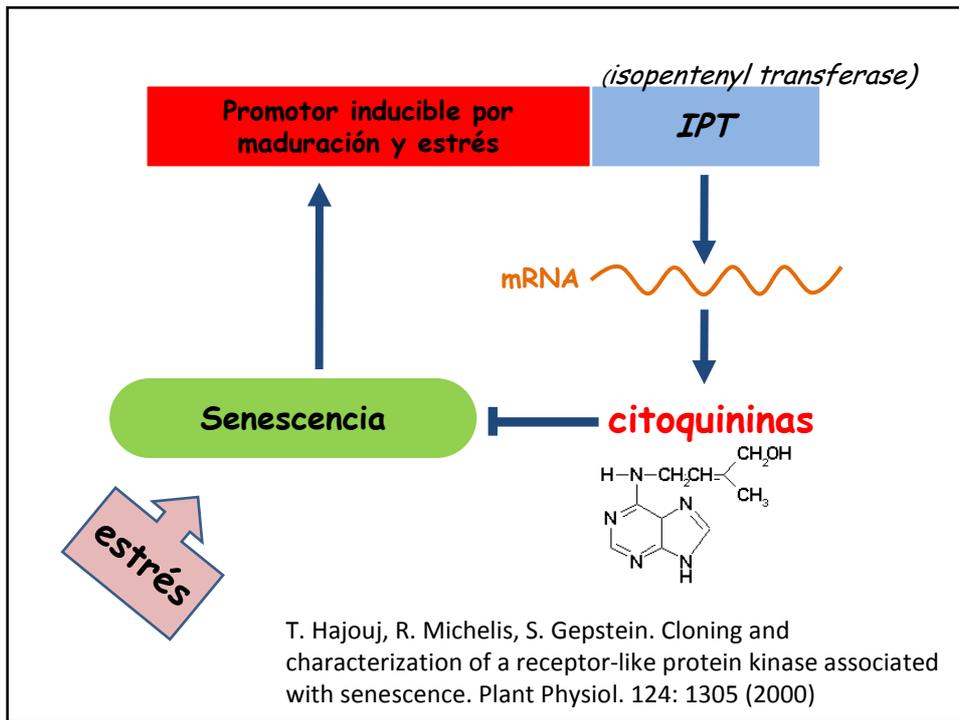
Los estreses hídrico y salino aceleran la senescencia de plantas, modificando las relaciones fuente/destino.

Hipótesis:

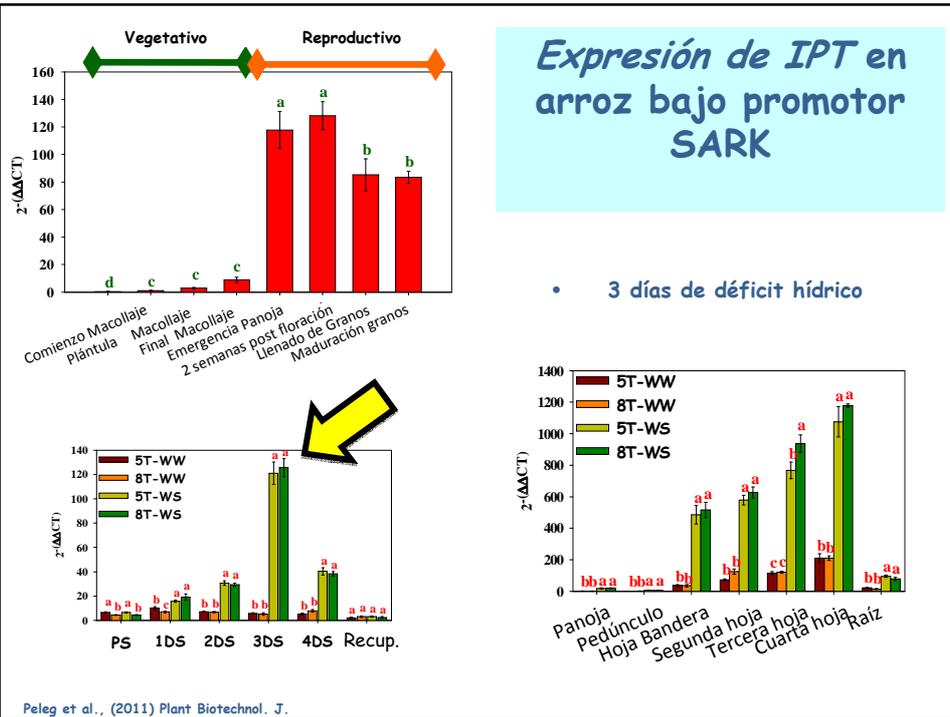
Es posible aumentar la tolerancia de las plantas al estrés abiótico retrasando la senescencia inducida por estrés, aumentando la adaptación de las fuentes y mejorando la relaciones fuente/destino.

Estrategia:

Expresión de IPT que pueda mantener niveles óptimos de citoquininas durante el estrés, retrasando la senescencia inducida por estrés y fortaleciendo los destinos.

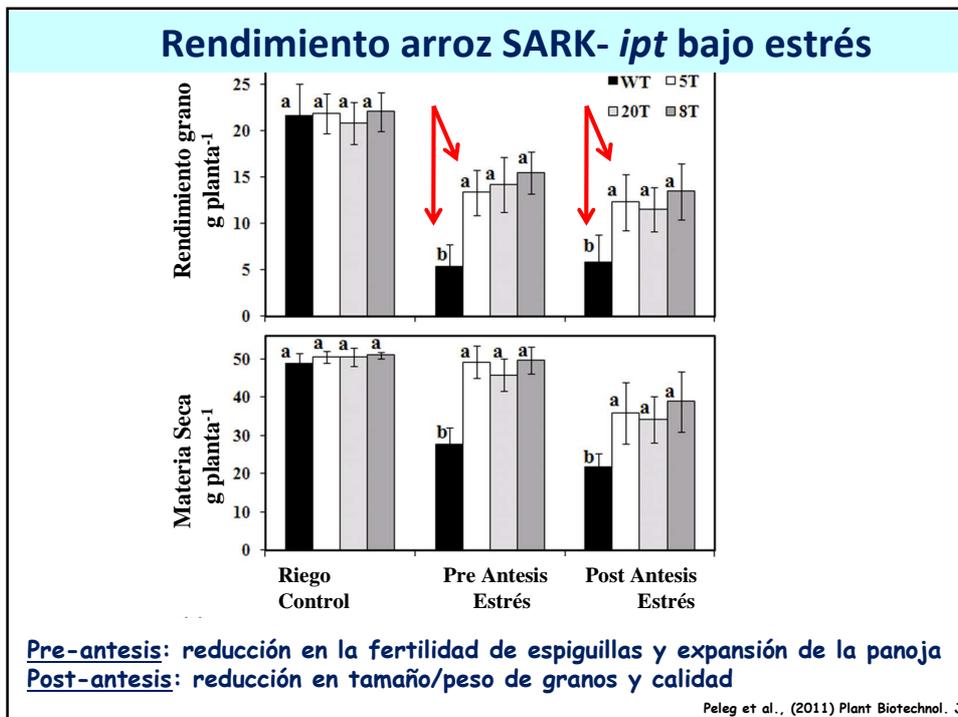


Expresión de IPT en arroz bajo promotor SARK



• 3 días de déficit hídrico

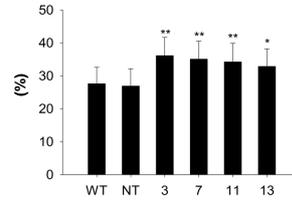
Rendimiento arroz SARK- *ipt* bajo estrés



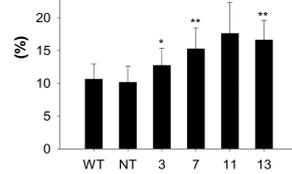
Rendimiento Maní *SARK ipt*



Porcentaje de vainas con 3 semillas

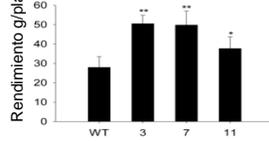


Porcentaje de vainas con 4 semillas

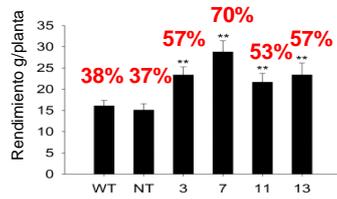


Qin et al., (2011) Plant Cell Physiol.

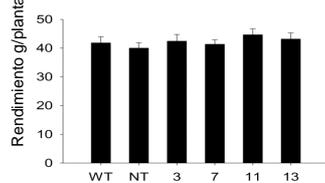
A. 2009 Ensayo en seco



B. 2010 Ensayo en seco



B. 2010 Ensayo bajo riego



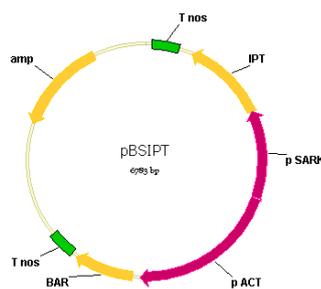
Qin et al., (2011) Plant Cell Physiol.

Rendimiento Maní *SARK ipt*

Trigo – Objetivos

- Estudiar los efectos de la expresión heteróloga en trigo de la secuencia *SARK::ipt* sobre la senescencia y la tolerancia al estrés hídrico.
- Objetivos específicos
- ✎ Obtener plantas transgénicas de trigo expresando la secuencia *SARK::ipt* a través del método balístico.
- ✎ Ensayos de desafío bajo condiciones óptimas y limitadas de riego: caracterización fisiológica y genética de las plantas transgénicas portadoras de *SARK::ipt* y los controles no transgénicos.

Metodología



- ✎ Se transformaron escutelos inmaduros de trigo de la variedad ProINTA Federal (PIF) con el vector pBSIPT mediante un acelerador de microprojectiles tipo *Particle Inflow Gun*.
- ✎ Se obtuvieron 6 eventos de transformación independientes.

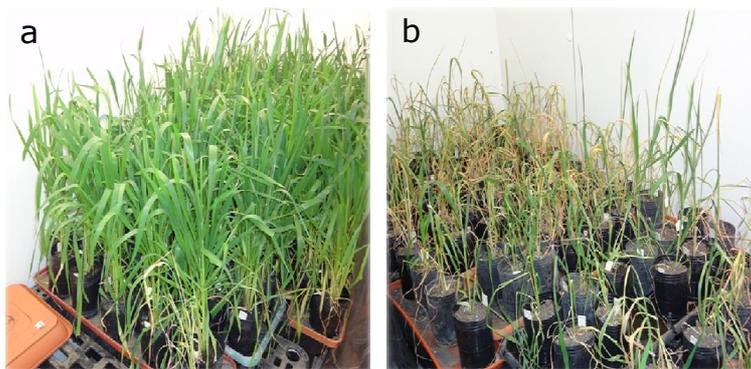


Caracterización de los eventos obtenidos

Planta T ₀	PCR <i>ipt</i>	PCR <i>bar</i>	Resistencia a PPT
1	+	+	+
2	+	+	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	-
6	+	+	+

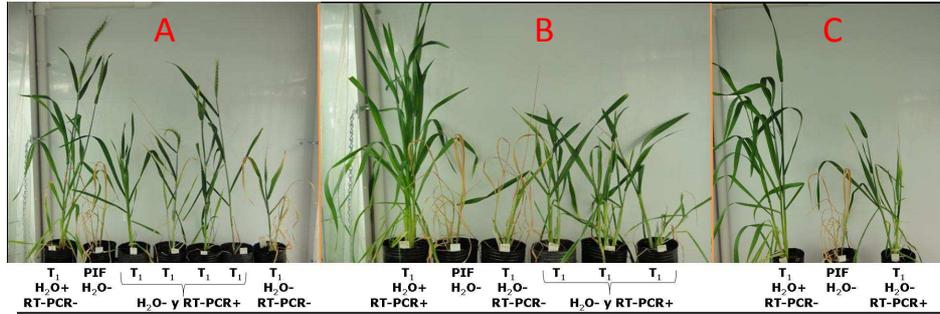


Caracterización de los eventos obtenidos



Progenies T₁ *SARK::ipt* al final del ensayo
a) riego normal, b) con déficit hídrico

Evaluación de las progenies bajo déficit hídrico



Progenies T_1 al final del período de DH derivadas de los eventos
A) 1 B) 2 C) 4

Obtención de líneas homocigotas

Por PCR y Southern blots de las progenies de las plantas T_1 obtenidas en @ (plantas T_2) y cruzamiento por PIF (retrocruzas) se identificaron plantas T_1 homocigotas para los IS del transgen de interés.

Línea	IS
TR 1	5
TR 2	2
TR 3	1
TR 4	5
TR 5	4
TR 6	1



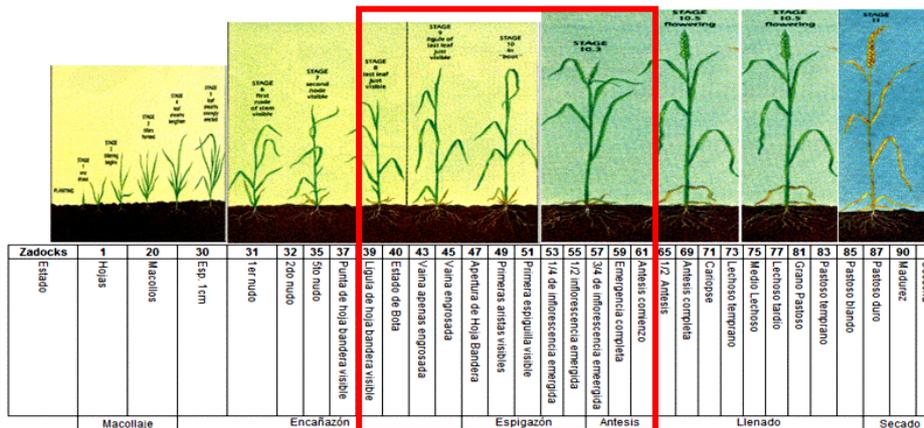
Progenies T_2 SARK::ipt

EVALUACIÓN BAJO DÉFICIT HÍDRICO DE LAS LÍNEAS

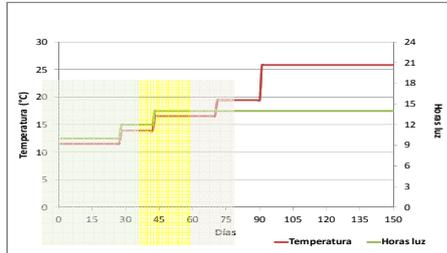
- ☞ TR 1, TR 2, TR 3, TR 4, TR 5 , TR 6 y ProINTA Federal (PIF)
- ☞ Dos condiciones de riego
- ☞ n=8 plantas por combinación de GxR
- ☞ N=112 plantas



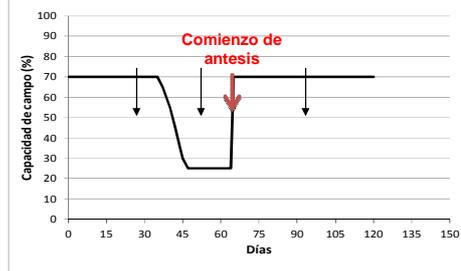
Deficit hídrico y estados fenológicos



Deficit hídrico y estados fenológicos



- 40: comienzo del estrés hídrico
- 64: Antesis. Finalización del estrés.
- 120: Finalización del llenado de grano. Madurez.
- 135: Supresión del riego.



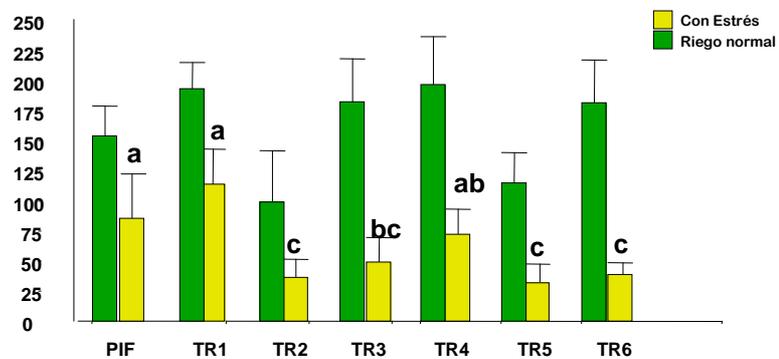
Efecto del déficit hídrico

En todos los genotipos hubo efectos significativos del déficit hídrico en las siguientes variables

- chl a, chl b y carotenos
- Peso de planta
- Número de espigas
- Fecha de antesis
- Número de espiguillas por espiga
- Número de granos por espiga
- Número de granos por espiguillas en las 4 espigas principales
- Número de granos totales
- Peso de granos por espiga
- Peso de granos por planta
- Índice de cosecha

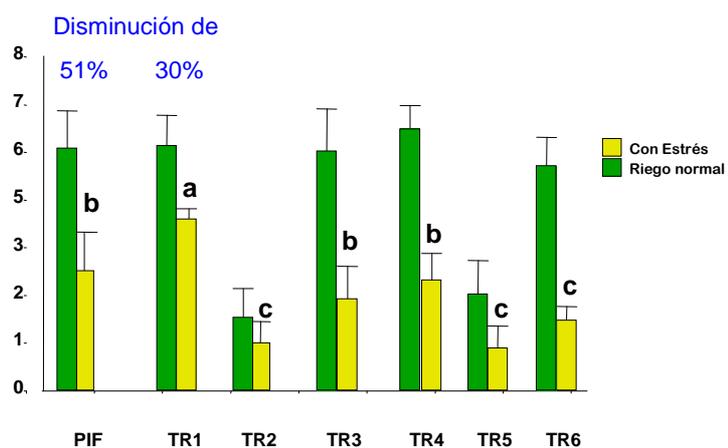


Número de granos por planta



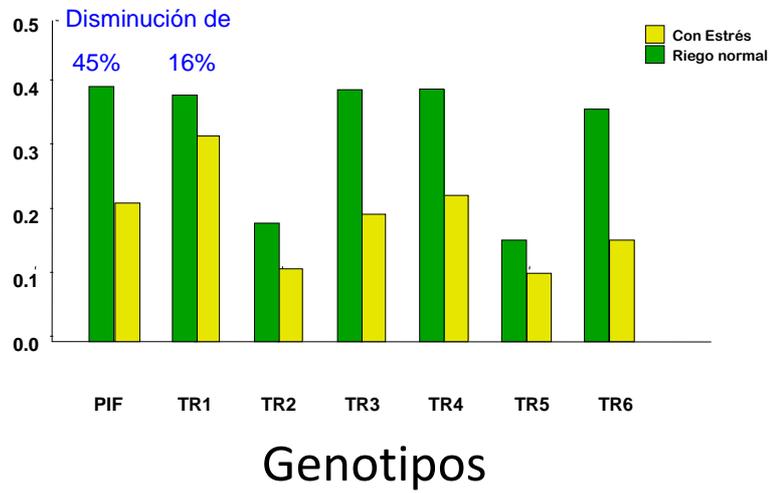
Genotipos

Peso de granos por planta



Genotipos

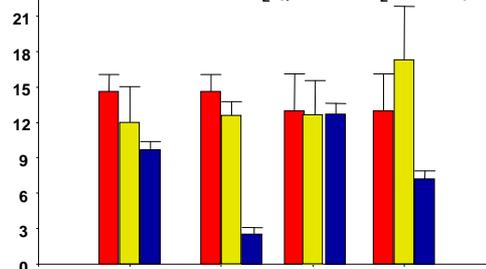
Indice de cosecha



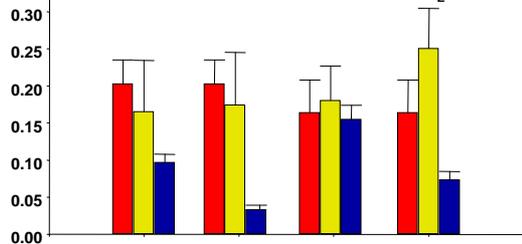
Variables Fotosintéticas



Asimilación de CO₂ ($\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)



Condutancia estomática ($\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)



Condición:

Riego Normal

Con estrés

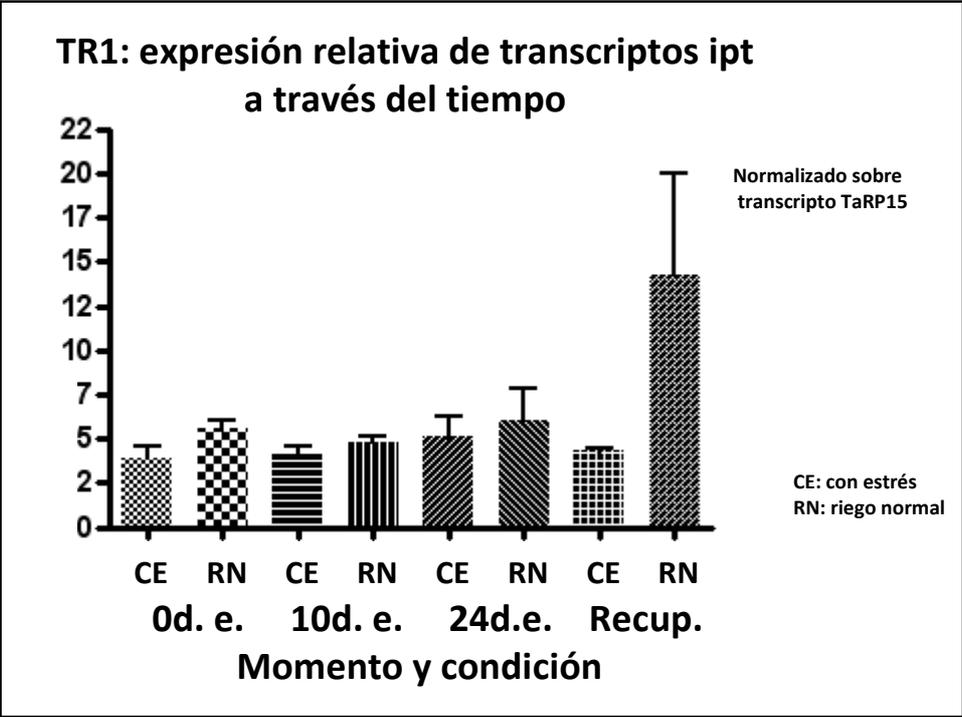
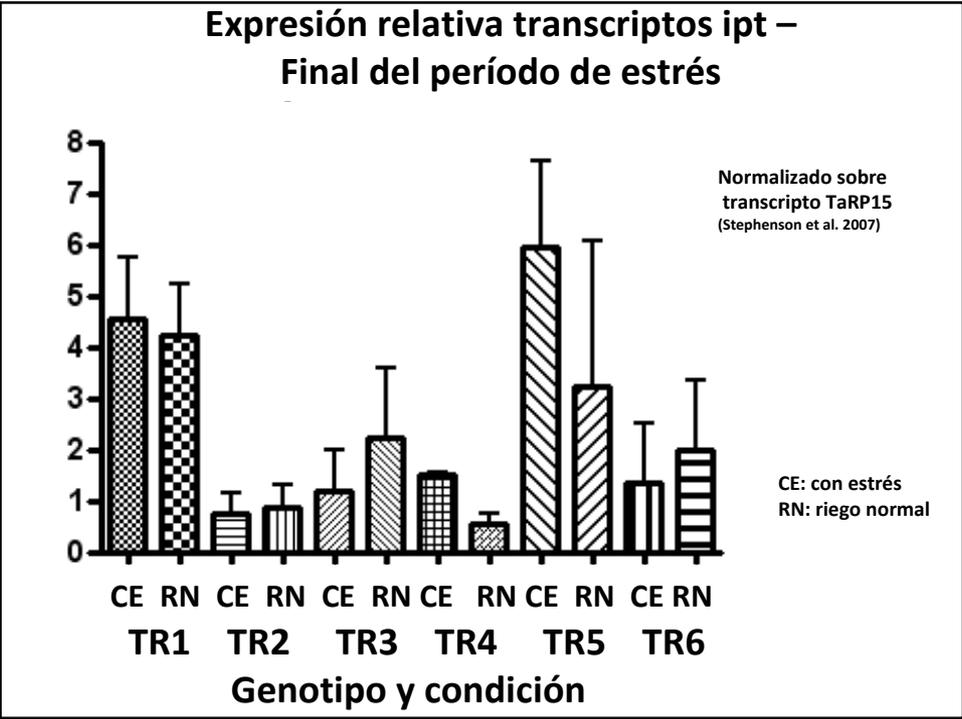
Riego Normal

Con estrés

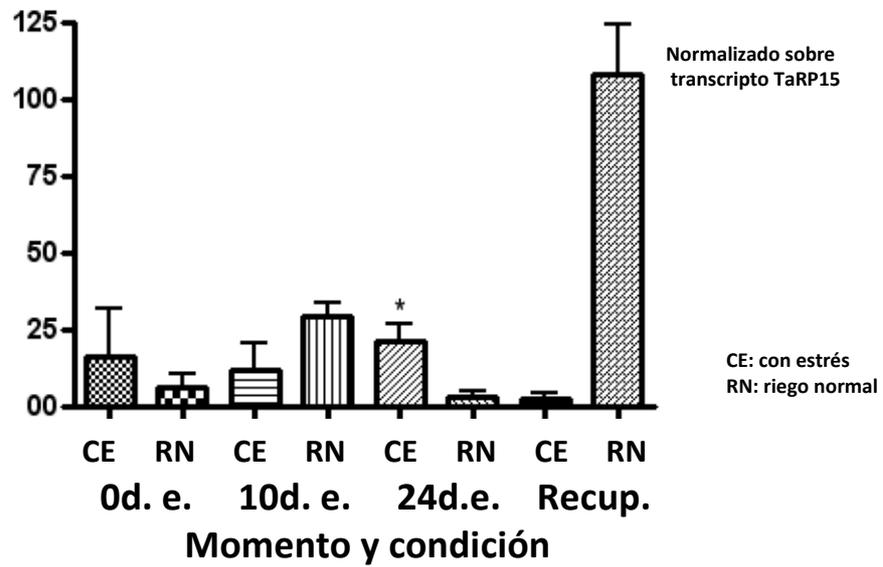
Genotipos:

PI F

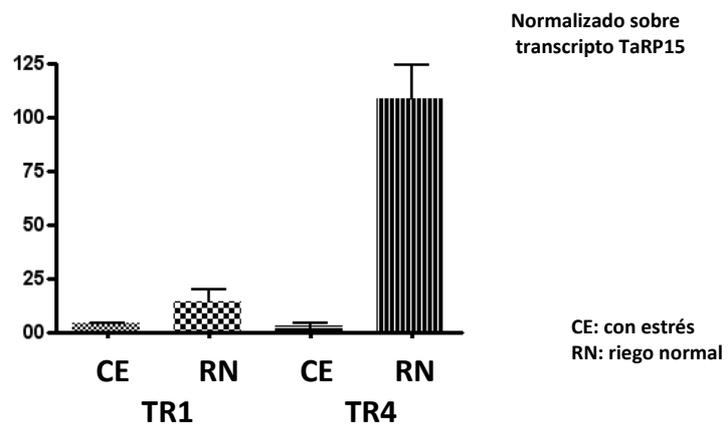
TR 1



TR4: expresión relativa de transcritos ipt a través del tiempo



Expresión relativa de transcritos ipt Período de Recuperación



Conclusiones

La expresión de IPT bajo el control transcripcional del promotor SARK demostró aumentar la tolerancia a déficit hídrico inducido bajo condiciones controladas en trigo. El mayor rendimiento de TR1 con respecto a ProINTA Federal se debería a una capacidad incrementada del ritmo de fotosíntesis bajo condiciones limitantes y a mayor protección de la maquinaria fotosintética que permite mejores eficiencias fotosintéticas una vez superado el estrés. Estos resultados coinciden con otros obtenidos en arroz y tabaco ya publicados.

No se pudo terminar de asociar las variaciones en la expresión cuantitativa de IPT como respuestas de adaptación a variaciones en el ciclo de estrés. Sin embargo se hallaron niveles elevados hacia el final del ciclo en respuesta muy posiblemente a senescencia. Estos “picos” de expresión subrayan la potencialidad del promotor para dirigir de forma autoregulada los aumentos de la transcripción frente a los estímulos del ambiente.

Nuevos Ensayos en Invernáculo TR1, TR4 y ProINTA Federal



Participantes

Ailin Beznec (beca CONICET)
Irene Baroli (CONICET-INTA)
Paula Faccio (INTA)
Gabriela Soto (CONICET-INTA)
Berta Llorente (UNLu)
Elba Pagano (INTA) Coordinadora PPT
Cristina Gomez (INTA)
Cecilia Decima (INTA)
Dalia Lewi (INTA)
Eduardo Blumwald (UC – Davis)
Antonio Díaz Paleo (INTA) Coord PE233251
Sara Ameijeiras (Apoyo técnico Lab)
Laura Lima (Apoyo técnico Lab)

Financiamiento

PE AEGR 3425 (2006/9)
PE AERG 233251 (2009/12)
PN BIO 113024 (2013)

Lugar de Trabajo

Instituto de Genética "E.A. Favret"
CICVyA, INTA Castelar

