

BV48. Secuenciación de Nueva Generación como herramienta para la caracterización de eventos transgénicos de trigo

Garibotto, M.D.B. (1,3)*; Vera, P. (2); Muñoz, M. (2); Beznec, A. (1); Carignano, H. (1), Puebla, A. (2); Bossio, E. (1).

(1) Instituto de Genética "Ewald A. Favret", CICVyA, INTA, Argentina. (2) Instituto de Biotecnología – IABIMO, CICVyA, INTA, Argentina. (3) CONICET, Argentina. * garibotto.belen@inta.gob.ar

El objetivo del presente trabajo es obtener información detallada a nivel molecular y genómico para el screening y selección de eventos transgénicos de poblaciones de trigo pan. De este análisis se obtendrá información sobre las zonas flanqueantes a las inserciones, la cual permitirá el diseño de oligonucleótidos específicos. Además, se determinará el número de inserciones y su localización dentro del genoma.

Actualmente se utiliza la técnica Southern Blot o el caminado cromosómico para la caracterización molecular de eventos transgénicos. Sin embargo, la complejidad y los altos costos de dichas técnicas representan una dificultad a la hora de analizar grandes poblaciones de especies con genomas poliploides y complejos, como el del trigo pan.

En este trabajo se puso a punto una novedosa técnica para la identificación de regiones flanqueantes a las inserciones en eventos transgénicos de trigo pan, utilizando el enriquecimiento de una secuencia blanco, combinada con secuenciación masiva.

Partiendo del vector de transformación utilizado para obtener el evento transgénico, se diseñaron sondas biotiniladas. Estas sondas se emplearon para la captura y enriquecimiento de las regiones de interés de una biblioteca de ADN genómico, previamente construida a partir del ADNg del trigo transformado. Luego de la captura, la biblioteca enriquecida fue secuenciada por secuenciación masiva.

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, altamente enriquecidas en la secuencia de interés, permitió encontrar diferentes combinaciones de inserciones en los cromosomas analizados: pares discordantes, secuencias de unión y la combinación de ambas. A partir de esta información, se identificaron 36 sitios calientes distribuidos en 19 de los 21 cromosomas de trigo, siendo cuatro de estos los más promisorios. Estos sitios calientes representan loci potenciales en los que pudo haberse insertado el transgén. Para cada uno de los locus promisorios, distribuidos en tres cromosomas, se diseñó una serie de oligonucleótidos específicos utilizando una base de datos de referencia (GrainGenes, GSP), mediante los cuales se verificará la presencia del transgén.