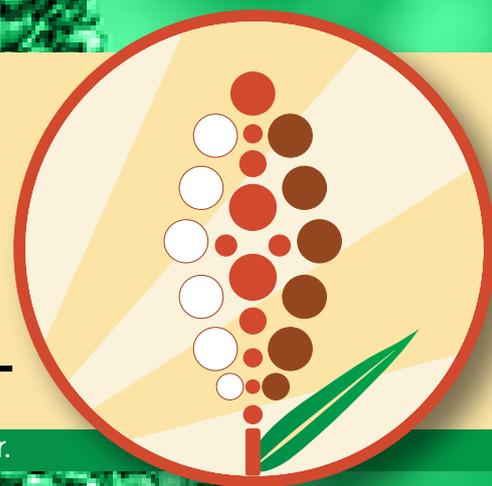


IV SIMPOSIO NACIONAL
II CONFERENCIA INTERNACIONAL
DE
SORGO

La alternativa rentable, segura, y sustentable para el productor.



**GENÉTICA Y MEJORAMIENTO
GENÉTICO VEGETAL**

MAPEO DE QTL DE DORMICIÓN EN SORGO GRANÍFERO USANDO UNA POBLACIÓN DE LÍNEAS ENDOCRIADAS RECOMBINANTES.

Rodríguez, M.V.¹, Sánchez, D.H.¹, Díaz, S.M.¹, Rentería, S.², Pardo, P.², Benech-Arnold R.L.¹.

¹IFEVA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires / CONICET, Av. San Martín 4453 (C1417DSE) CABA, Argentina. ²Advanta Semillas SAIC Ruta 226 km 60.5, Balcarce (7620), Argentina. Contacto: mvr@agro.uba.ar

ABSTRACT

Pre-harvest sprouting (PHS) can be a serious problem for sorghum production in the central region of Argentina, as grain maturation often takes place during moist and rainy weather. The identification of molecular markers quantitatively associated with dormancy in sorghum will help to improve PHS tolerance. To approach this objective, two sorghum inbred lines with contrasting dormancy (IS9530 and Redlan) were used as parents to obtain a mapping population of RILs. Field trials were conducted for phenotyping germination/dormancy traits on two consecutive years at the experimental field in FAUBA (Bs. As.). A genetic map encompassing 156 SNP markers was built. QTL analysis identified a major dormancy QTL (qDOR-9) in Chromosome 9, explaining 32-40% of variance for germination traits, and close to the Dwarf1 locus. Genotype-By-Sequencing (GBS) analysis showed that the dw1 allele was introduced to Redlan along with a 3.2 Mbp segment from the original donor parent, Dwarf Yellow Milo. The dw1 is not causal for the low dormancy phenotype, as both "Dwarf" and "Standard" Yellow Milos display similar (very low) dormancy. We hypothesize that Yellow Milo background harbors a low dormancy allele linked to Dw1/dw1 locus. Positional cloning using NILs will allow us to narrow the dormancy QTL and separate both traits in breeding programs.

Palabras claves

Brotado pre-cosecha, análisis de qtl, sorgo, dormición, altura de planta.

Key words

Pre-harvest sprouting, qtl analysis, sorghum, dormancy, plant stature.

INTRODUCCIÓN

La susceptibilidad al brotado pre-cosecha (BPC) es consecuencia de la disrupción de los mecanismos de dormición primaria. La dormición está controlada genéticamente, y también está fuertemente modulada por el ambiente. En especies silvestres la dormición presenta una clara ventaja adaptativa. Durante la domesticación y mejoramiento de los cereales, la selección en contra de la dormición se debió al interés por una germinación rápida inmediatamente a la cosecha (para el caso en que el destino fuera el malteado), así como una emergencia rápida y uniforme a campo luego de la siembra. En algunos casos también se afectó la dormición en forma involuntaria, por estar ligado este carácter a otros caracteres relevantes como la pigmentación (por ej., en arroz y trigo), y la preferencia por granos no pigmentados favoreció genotipos con menor dormición. En estos casos se trata de efectos pleiotrópicos de genes que controlan vías de síntesis de flavonoides y el metabolismo o señalización hormonal, en especial del ácido abscísico (ABA). Sin embargo, la dormición es un carácter complejo y son muchos los genes que pueden afectar este carácter, y no todos están implicados en la pigmentación del grano. En sorgo granífero existe variabilidad intraespecífica para la dormición y la susceptibilidad al BPC,

aunque se desconocen los genes responsables de esta variabilidad. Esto fue abordado en un primer trabajo de mapeo de QTL, utilizando una población bi-parental derivada de IS9530 (alta dormición) y Redlan (baja dormición) donde se identificaron 6 QTL para dormición (Cantoro et al., 2016). Estudios fisiológicos y moleculares mostraron que la sensibilidad del embrión a la hormona ácido abscísico (ABA) es la variable fisiológica que mejor explica las diferencias en dormición entre estas dos líneas (Benech-Arnold y Rodríguez, 2018). A la vez, estas líneas son bajo tanino y pertenecen al grupo de sorgos rojos, por lo que se espera que los genes causales de la diferente dormición no estén asociados con la pigmentación del grano (flobafenos y taninos). Estas líneas a su vez provienen de programas de mejoramiento separados; Redlan fue originada y registrada en EEUU por la USDA (Madison, WI, 1954) mientras que IS9530 fue obtenida por el ICRISAT. Debido a esto es que ambas líneas contrastan para otros caracteres además de la dormición de grano. Con el objetivo de validar los QTL identificados previamente y avanzar en el mapeo fino, llevó a cabo un nuevo análisis de QTL utilizando una población de RILs derivada de las líneas IS9530 y Redlan, y para la cual se obtuvieron datos fenotípicos de dormición y altura de planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención, cultivo y fenotipado de la población de RILs: A partir de la población de mapeo F3 y mediante el método de descendencia por semilla única, en el INTA Castelar se obtuvo una población F6 de 168 RILs (líneas recombinantes endocriadas). Esta población de RILs (y su progenie, F7) fue cultivada en la FAUBA (5 m lineales de cada genotipo, replicado en tres bloques) y se registró fecha de antesis

para cada planta. El fenotipado de dormición se hizo mediante pruebas de germinación en laboratorio a los 35 y 42 días post-antesis (DPA) durante las campañas 2014/15 y 2015/16. En la segunda campaña se evaluó además el porcentaje de brotado a campo (que ocurrió naturalmente en 2016) y altura de planta a madurez de cosecha (altura a la base de la panoja). Los ensayos de germinación se hicieron con granos enteros (sin glumas) incubados a 25°C (30 granos por placa de Petri 9cm + 6ml agua destilada, sin luz). Se contaron granos germinados cada 3

días y se calculó un índice de germinación (Rodríguez et al., 2021) y se calculó también el porcentaje final germinado a los 12 días.

Genotipado, análisis de ligamiento y mapeo de QTL: El genotipado se llevó a cabo en College Station, Texas, EEUU, en colaboración con la empresa ADVANTA. Se diseñaron unos 200 markers SNP polimórficos entre los parentales y distribuidos de manera uniforme en el genoma de sorgo. Se seleccionaron algunos marcadores ubicados en las regiones de los QTL detectados previamente por Cantoro et al. (2016). A partir de hojas de plántulas se realizó la extracción de ADN mediante CTAB, y se realizó el genotipado por PCR alelo-específica y detección fluorescente mediante técnica KASPar. Los grupos de ligamiento se armaron usando algoritmos eficientes basados en minimal spanning trees (MSTmap) a través de R/ASMap en el entorno del software libre "R". El análisis de QTL se hizo mediante CIM y MTM. Se estimó el LOD crítico mediante permutaciones (10000 repeticiones, $\alpha < 0.1$). El porcentaje de la variación fenotípica explicado por cada QTL y los efectos génicos (dominancia y aditividad) fueron derivados del análisis CIM. La asociación estadística entre marcadores informativos y fenotipos,

estableciendo áreas de QTL, se llevó a cabo con el paquete R/qtl (Broman and Wu 2016).

Cultivo y fenotipado de sorgos Milo Amarillo: Para evaluar un posible rol de *Dwarf1* en la dormición, se utilizó el sorgo milo amarillo "enano" (Dwarf Yellow Milo, DYM) donde surgió espontáneamente la mutación *dw1* en 1905 (Quinby y Karper, 1961), y se lo comparó con el milo amarillo "alto" (Standard Yellow Milo, SYM). Ambos genotipos fueron provistos por la USDA (GRIN) y se cultivaron en FAUBA en 2017 y 2018. En 2017/2018 se cultivaron los sorgos milo amarillo ("Standard" y "Dwarf") junto al BTx623, Redlan e IS9530, en tres bloques a campo. Se realizaron ensayos de germinación cada 5 días desde los 15 a 40 DPA.

Genotipado por "GBS" (Genotype By Sequencing) de líneas parentales y sorgos Milo Amarillo: Se realizó en colaboración con el INTA Castelar (Dra. Norma Paniego y col.) en las líneas parentales (IS9530 y Redlan) y ambos sorgos milo amarillo (alto y enano). Las secuencias obtenidas se alinearon al genoma de referencia (BTx623, V3.1.1).

RESULTADOS

Se obtuvo un mapa de ligamiento con 156 SNP en 163 RILs. Se identificaron 2 QTL asociados con el fenotipo de germinación, en los cromosomas 1 y 2, que explican entre el 1-3% (qDOR-1) y entre el 33-40%

(qDOR-9) de la variabilidad fenotípica según el carácter analizado. En la Tabla de abajo se muestran los resultados del mapeo por intervalos compuesto (CIM) para una de las variables fenotípicas (IG42 DPA, 2016).

En la **Figura 1** se presentan las variaciones del LOD para las diferentes

variables fenotípicas (incluyendo altura de planta) en la región distal del

IG42DAP (2016)					
Linkage.Group	Position (cM)	LOD	Additive.effect	Dominance.Effect	R2
1	109,62	6,137	2,4582	3,419	3,43%
9	114,13	10,187	3,8636	-1,06	33,03%

cromosoma 9. Se muestra la posición aproximada del locus *Dwarf1*. El análisis de QTL con los datos de brotado a campo (%BPC) no resultó en una asociación significativa (LOD < LOD crítico). Sin embargo, esta variable se correlacionó significativamente con los datos de germinación en laboratorio, por ej., con % de germinación a los 35DPA (Figura 2 A). A su vez, todas las variables de germinación (también %BPC), se correlacionaron negativa y significativamente con la altura de planta (Figura 2 B; se muestra solo %G35DPA).

Para evaluar un posible rol del gen *Dwarf1* en la dormición de grano, se cultivaron los sorgos milo amarillo "estándar" y "enano" (SYM, y DYM; portadores del alelo *Dw1* y *dw1* respectivamente) y se fenotiparon para dormición. No se observaron diferencias entre ambos genotipos, y la dinámica de salida de la dormición fue similar a la

de Redlan y BTx623 (Figura 3). Estos genotipos mostraron una salida de la dormición anticipada y se evidencian como altamente susceptibles al BPC.

Mediante el alineamiento de los polimorfismos obtenidos para IS9530, Redlan, SYM y DYM con el genoma de referencia publicado para sorgo (BTx623, V3.1.1) se pudo comprobar que tanto BTx623 como Redlan y el milo amarillo comparten la porción distal del cromosoma 9 que incluye *dw1* y el QTL detectado, qDOR-9. Los sitios de recombinación del fragmento original proveniente del milo amarillo enano (DYM) se ubicaron cerca de 55.19 Mb para BTx623 y 56.1 Mb para Redlan. Esta región (de aprox. 4.2 Mb) contiene unos 400 genes según el genoma de referencia. La línea IS9530, por el contrario, muestra polimorfismos a lo largo de toda esta región con respecto al genoma de referencia.

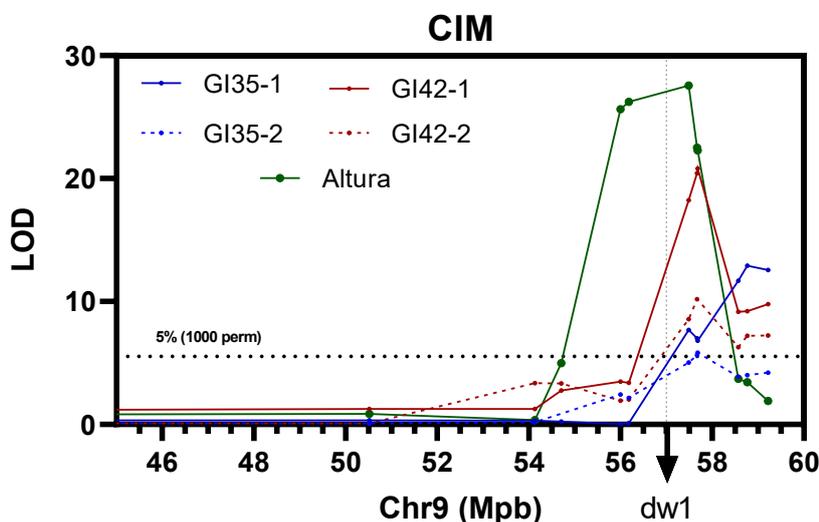


Figura 1. Resultados de análisis de QTL (CIM). Valores de LOD para las variables de germinación IG35 e IG42 DPA, en dos años. Se incluye el LOD para altura de planta, asociada con el locus *dw1/Dw1*.

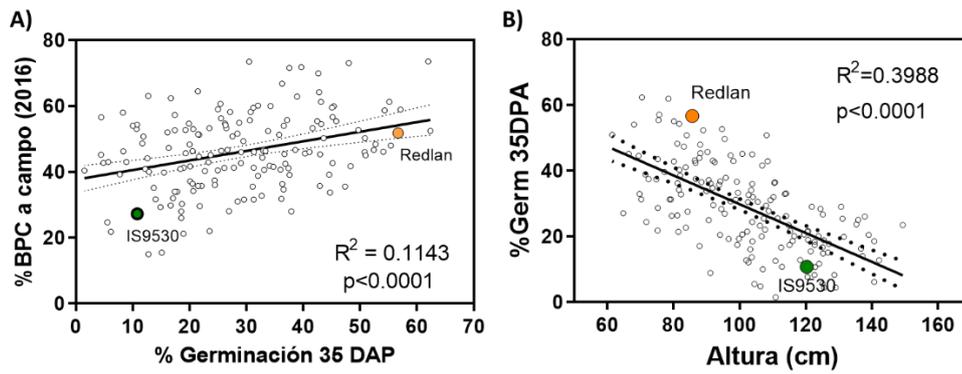


Figura 2. A) Porcentaje de brotado en panoja (a campo, abril 2016) en función de los valores de % de germinación "in vitro" a los 35 DPA para las RILs cultivadas a campo. B) Relación entre valores de % de germinación a los 35 DPA y la altura de planta a madurez de cosecha. En ambos casos se muestran los parentales de la población de RILs.

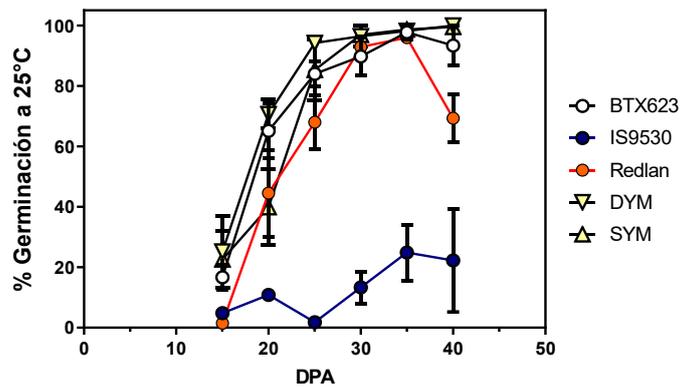


Figura 3. Dinámica de salida de la dormición en Redlan, BTx623, milo amarillo enano (DYM) y estándar (SYM), e IS9530.

CONCLUSIONES

Se identificó un QTL principal para dormición en el extremo del brazo largo del cromosoma 9 (en la misma región señalada por Cantoro et al., 2016) y próximo al gen de altura, *Dwarf1*. Esto explicaría la alta correlación entre altura de planta y todas las variables de dormición y porcentaje de brotado a campo (Gianzanti, A., 2018). El gen causal del fenotipo de dormición qDOR-9 sería un gen ligado al locus *Dwarf1*; el alelo de "baja dormición" provendría del parental milo amarillo, que tiene una muy baja dormición. El fenotipado de las QTL-NILs para la región del qDOR-9 se llevará a cabo próximamente; esto, sumado a otras estrategias complementarias (secuenciación de los parentales, expresión diferencial de genes en QTL-NILs), permitirá identificar el gen causal de este QTL.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benech-Arnold RL, Rodríguez MV (2018) Pre-harvest sprouting and grain dormancy in Sorghum bicolor: what have we learned? *Frontiers in Plant Science*, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00811>
- Broman KW, Wu H (2016). qtl: Tools for Analyzing QTL Experiments. R package version 1.40-8, URL <https://CRAN.R-project.org/package=qtl>.
- Cantoro R, Fernández LG, Cervigni GDL, Rodríguez MV, et al. (2016) Seed dormancy QTL identification across a Sorghum bicolor segregating population. *Euphytica* 211: 41-56.
- Gianzanti, A. (2018) Trabajo Final Ing.Agr. FAUBA: "Fenotipado de una población de RILs de sorgo granífero en relación al carácter brotado pre-cosecha" (Repositorio digital FAUBA)
- Quinby JR, Karper RE (1961) Inheritance of height in sorghum. *Agron.J.*46:211-216.
- Rodríguez MV, Arata GJ, Díaz SM, Rentería S, Benech-Arnold RL (2021). Phenotyping for resistance to pre-harvest sprouting in grain sorghum. *Seed Science Research* 1–10.

Financiamiento

ANPCyT (PICT 2017-4098). Los ensayos se realizaron en la Estación Experimental de ADVANTA con aportes materiales y logísticos de la empresa.