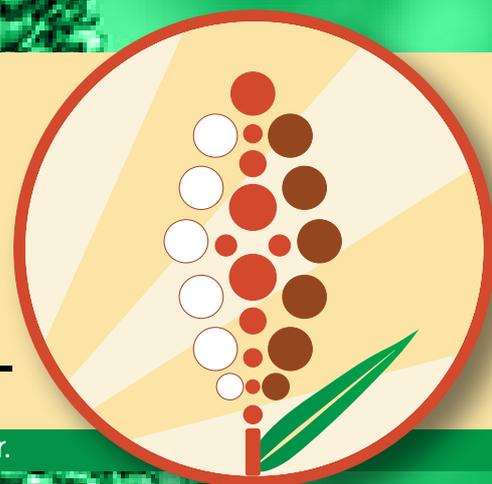


IV SIMPOSIO NACIONAL II CONFERENCIA INTERNACIONAL DE SORGO

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



GENÉTICA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL

FENOTIPADO DE RESISTENCIA AL BROTADO PRE-COSECHA EN SORGO GRANÍFERO

Rodríguez M.V.^{1,2}; Arata G.J.^{1,2}; Díaz S.M.²; Rentería S.⁴; Benech-Arnold R.L.^{1,3}

¹IFEVA, Universidad de Buenos Aires, CONICET, Facultad de Agronomía, Av. San Martín 4453, C1417DSE Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; ²Cátedra de Fisiología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, C1417DSE Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; ³Cátedra de Cultivos Industriales, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Av. San Martín 4453, C1417DSE Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina y ⁴Advanta Semillas SAIC, Estación Experimental, Venado Tuerto, Santa Fe, Argentina.

PHENOTYPING FOR RESISTANCE TO PRE-HARVEST SPROUTING
IN GRAIN SORGHUM

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 rainy weather. Susceptibility to PHS is higher in sorghum genotypes displaying low levels of seed dormancy before harvest maturity. Susceptibility to PHS is affected by other attributes such as glume or panicle morphology. In this work, we tested germination under laboratory conditions using detached grains and intact panicles for a panel of 20 sorghum genotypes including 11 parental lines, 6 hybrids and 3 reference inbred lines with contrasting PHS response. Multivariate analyses of germination data allowed separation of genotypes into two major categories (resistant and susceptible to PHS). Laboratory germination data correlated significantly with PHS in the field. In most genotypes, the glumes had a significant, inhibitory effect on germination. This phenotyping protocol allowed the classification of sorghum genotypes according to their susceptibility to PHS and the identification of different attributes useful for breeding for PHS resistance in this crop.

Palabras claves

Brotado pre-cosecha, sorgo, dormición, fenotipado.

Key words

Pre-harvest sprouting, sorghum, dormancy, phenotyping.

INTRODUCCIÓN

Una de las limitaciones en la producción de sorgo granífero es el brotado pre-cosecha (BPC), es decir, la germinación de los granos cuando aún están en la planta madre. En sorgo granífero, la domesticación redujo la dormición primaria aumentando el riesgo de BPC en regiones con determinadas condiciones climáticas (Rodríguez et al., 2015).

La dormición, asociada adaptativamente con la evasión del viviparismo y la dispersión de la germinación en tiempo y espacio, es un rasgo cuantitativo gobernado por múltiples genes. En sorgo granífero se observa una gran variabilidad intraespecífica en el patrón de salida de la dormición y la susceptibilidad al BPC, existiendo genotipos resistentes y otros susceptibles al BPC. Además de un bajo nivel de dormición, para que ocurra el BPC se requieren condiciones ambientales favorables a la imbibición de los granos en la planta, como periodos de lluvia y alta humedad ambiental.

El grano de sorgo es un cariopse, las capas de tejido y los órganos que rodean el embrión (glumas, pericarpio, testa y endospermo) puede imponer dormición al restringir el intercambio de gases o la difusión de compuestos

MATERIALES Y MÉTODOS

Veinte genotipos que incluyen 11 líneas parentales (5 madres F1 a F5 y 6 padres M1 a M6) y 6 híbridos F1 (el nombre de sus parentales; por ejemplo, H1 × 1 es el F1 de la cruce F1 × M1) se sembraron en el campo de la estación experimental de Advanta Semillas (Venado Tuerto, Santa Fe), en dos fechas (SD1: 24/09/19 y SD2: 12/12/19). Se registró la fecha de antesis promedio (50% de panojas) para cada genotipo, y las panojas con la misma fecha de antesis fueron etiquetadas para los ensayos de germinación.

solubles, o proporcionando directamente inhibidores al embrión. La dormición en sorgo está regulada por los efectos antagónicos de las hormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GA). Líneas endogámicas que muestran una respuesta contrastante en el BPC y que fueron utilizadas como materiales de referencia en este trabajo son: Redlan y BTx623 (baja dormición, susceptibles a BPC) e IS9530 (alta dormición, tolerante a BPC). IS9530 y Redlan son ambos de grano rojo y no tienen taninos condensados: IS9530 es relativamente alto (> 2 m) mientras que BTx623 y Redlan (también denominado BTx378) son líneas triple enanas (1,3 m).

En este trabajo se propuso un protocolo adecuado para fenotipar y clasificar los distintos genotipos de sorgo según su susceptibilidad a BPC. Los resultados de laboratorio también se compararon con registros de brotado natural en el campo y se exploraron posibles asociaciones entre la dormición del grano y otros rasgos morfológicos como pigmentación del grano (testa y pericarpio), tamaño y color de las glumas, altura de la planta y tiempo a floración. Estos resultados se publicaron recientemente (Rodríguez et al., 2021).

A los 40 días después de antesis (DAA) se cosecharon 6 panojas por genotipo. Por cada panoja (una repetición biológica), dos réplicas de 30 granos con glumas y dos réplicas de granos desnudos (sin glumas) fueron incubados en placas de Petri de 9 cm de diámetro sobre dos capas de papel de filtro y 6 ml de agua destilada, y se mantuvieron durante 12 días a 25 °C en oscuridad. Los granos germinados fueron contados (y eliminados) cada tres días (3, 6, 9 y 12 d) bajo luz natural. Se calculó el índice de germinación (IG) (Rodríguez et al., 2021).

A los 45 DAA, se recolectaron seis panojas por genotipo y se

expusieron a una ducha constante de agua corriente durante 10 min; todo el set fue cubierto con plástico y se dejó escurrir durante 15 min a la sombra, después de lo cual las panojas se pesaron individualmente y se colocaron de nuevo en la base. Se cubrieron con plástico para evitar la evaporación y se almacenaron en una habitación con aire acondicionado a 24–25 ° C. A los 3 y 7 días de incubación se cortaron 3 ramas (una de cada posición; basal, media y apical) y se realizó el conteo de granos germinados (radícula o coleoptilo visibles) y se expresó como porcentaje del total. El día 3, las panojas fueron expuestas a una segunda ducha de 10 minutos, cubiertas con plástico e incubadas a 24–25 ° C nuevamente durante 4 días más.

Otros rasgos registrados y utilizados en los análisis fueron: Porcentaje de retención de agua de la panoja (PWR), altura de la planta a madurez de cosecha, días hasta floración (DTA), gluma y rasgos morfológicos del grano y datos de BPC

(expresadas como porcentaje; % BPC-campo) obtenidos después de eventos de brotado natural. El color exterior de los granos post-madurados se evaluó comparando con la tabla de colores del suelo de Munsell. El tipo de color de la gluma se convirtió a escala numérica de la siguiente manera: Tan = 4, Roja = 3, Violeta = 2 y Negra = 1.

Se determinaron los taninos condensados para la mayoría de los genotipos por el método de Folin-Denis y cualitativamente (para todos los genotipos) utilizando la prueba de "bleaching". Y se clasificaron como Bajo Tanino (LT) o Alto Tanino (HT). Los datos fenotípicos se sometieron a un análisis multivariado. Para PCA y análisis de conglomerados, las variables fueron: IG de granos cosechados 40 DAA con y sin glumas (GI + Glu y GI-Glu, respectivamente); y porcentaje de germinación en panojas cosechadas 45 DAA, expuestas a una simulación de lluvia e incubadas durante tres (SPR3d) y siete días (SPR7d).

RESULTADOS

Para IS9530, los valores de germinación y brotado fueron casi nulos (GI = 8 -Glu y GI = 0 +Glu, y sin brotar en panojas enteras) En Redlan los valores de GI alcanzaron alrededor de 70 para -Glu y 60 en +Glu, el porcentaje de brotado en panojas fue del 20%. Consideramos que un genotipo es susceptible si alguno de estos umbrales (GI + Glu = 60 y SPR7d = 20%) fue alcanzado o traspasado. De acuerdo con este criterio, varios de los genotipos probados se pueden clasificar como susceptibles (M1, M2, M3, M4, M5, M6 y H3 × 3). Todos estos genotipos susceptibles (llamadas M1 a M6) son líneas de élite que se comportan como el padre masculino en las cruzas para la producción de semillas híbridas F1. Al contrario, líneas élite utilizadas como hembras en las cruzas (denominadas F1 a F5) mostraron valores bajos de IG y de germinación

de panojas (SPR7d), mientras que los híbridos (H1 × 1, etc.) estaban entre las líneas de los padres o incluso más cerca a la madre progenitora.

En la fig. 1 se muestra un Biplot para PCA y grupos definidos por análisis de conglomerados. Los dos primeros componentes explicaron el 93,7% de variabilidad total (PC1, 60,5% y PC2, 33,2%). El análisis ubicó los genotipos profundamente dormantes en el rango negativo de PC1 en el grupo 1, que incluía 12 genotipos con valores bajos de IG y SPR en ambas fechas de siembra. Genotipos menos dormantes se incluyeron en los grupos 2 y 3 en el rango positivo en PC1 junto con los vectores SPR y IG. El grupo 2 incluyó ocho genotipos. con valores de IG y / o SPR más altos en una o ambas fechas; entre estos, cuatro genotipos, se separaron a lo largo de PC2 en el grupo 3. La diferencia entre el grupo 2

y 3 fue causado por un mayor brotado (SPR7d) en relación a IG (mientras que en el grupo 2, los valores de

SPR7d fueron generalmente más bajo que los de GI).

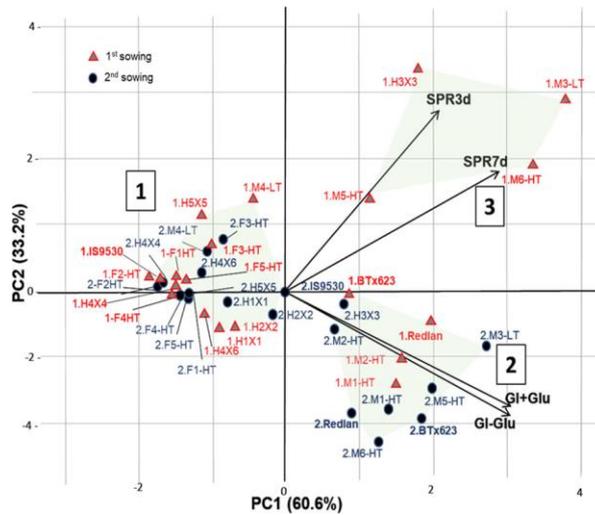


Figura 1. Biplot PCA para variables de germinación y brotado medidos en 20 genotipos de sorgo, sembrados en dos fechas diferentes (1: 24 de noviembre y 2: 12 de Diciembre de 2019)

Correlaciones más fuertes se observaron entre las variables de "grano desprendido" (es decir, IG con y sin glumas, $r = 0,948$) y entre las variables de "panoja completa" (SPR3d y 7d; $r = 0,751$), y la correlación fue más débil (pero también significativa) al comparar "grano desprendido" con "panoja entera". El IG de granos con glumas adheridas fue menor que el IG para

granos desnudos en la mayoría de los genotipos en ambas fechas de siembra. Dependiendo del genotipo, el efecto inhibitor de las glumas oscilaron entre 0 y 25 unidades IG. Entre los genotipos con valores altos de IG, solo dos (BTx623 y M6-HT) no mostraron efecto gluma en ambas siembras (valor IG similar con y sin glumas).

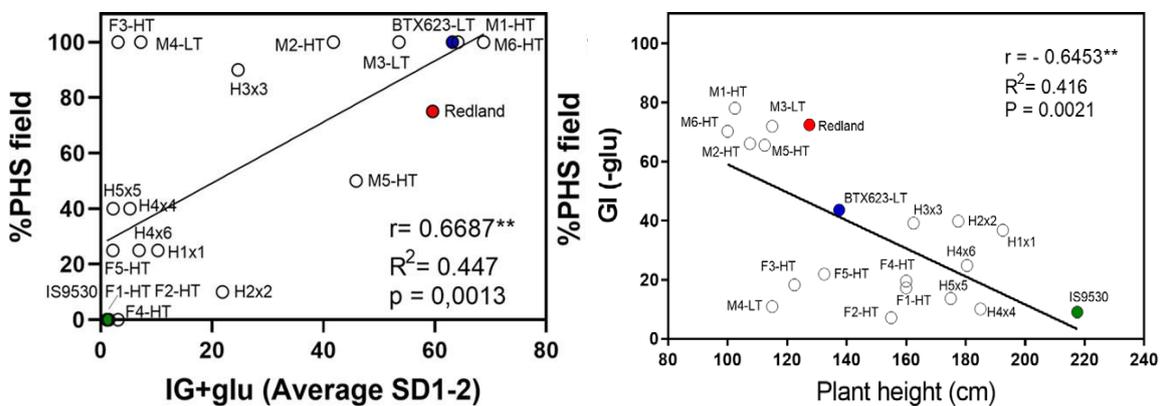


Figura 2. (A) Índice de germinación de granos desprendidos 40 DAA incubados con glumas (GI + Glu) correlacionado con el % BPC a campo. (B) Datos de germinación obtenidos con granos desprendidos (GI-Glu) asociados a altura de planta.

La mayoría de los genotipos se comportaron de manera similar en ambas siembras (la pendiente de regresión general no difirió de 1). Sin embargo, algunos genotipos mostraron una interacción con el medio ambiente tal como BTx623 y M5-HT (valores IG más altos en SD2 en comparación con SD1) y M2-HT (valores IG más altos en SD1 en comparación con SD2). Esto fue diferente para los resultados de laboratorio con panojas, lo que sugiere que ésta variable es menos estable y más sensible a las condiciones ambientales.

Para explorar posibles asociaciones con otros factores morfológicos y rasgos fenológicos, se realizaron múltiples correlaciones entre cada una de las variables relacionadas con la germinación (medidas en laboratorio) y otros rasgos medidos en los mismos ensayos de campo. Estos rasgos incluyeron la altura de la planta (HGT), el tiempo de floración (DTF), índice de retención hídrica en la panoja y variables relacionadas con el color del grano y el color y el tamaño relativo de la gluma. El análisis de correlación múltiple señaló una fuerte

asociación entre los ensayos de laboratorio (con granos desprendidos y panojas enteras) y niveles de BPC después del brotado "natural" en el campo (Fig. 2A). Los datos de germinación de panojas intactas presentaron una fuerte correlación con el % BPC a campo (por ejemplo, SPR7d; $r = 0,679$, valor $P = 0,001$) seguido de correlación con GI + Glu ($r = 0,636$, valor de $P = 0,003$). Las variables relacionadas con la germinación (laboratorio y campo) también fueron asociadas negativa y fuertemente con la altura de la planta. IG de granos desnudos (GI-Glu) se correlacionó negativamente con altura de la planta ($r = -0,6453$, valor $P = 0,002$) (Fig. 2B).

Finalmente, los rasgos de gluma y grano no fueron claramente correlacionados con las variables de germinación y brotado ni con el efecto de la gluma, sugiriendo que los rasgos relacionados con el grano (pigmentación de la gluma y del grano y tamaño de la gluma) tienen un pequeño efecto en las variables relacionadas con el brotado (laboratorio y campo) en comparación con otros factores.

CONCLUSIONES

Uno de los objetivos de este trabajo fue desarrollar un protocolo de fenotipado sencillo para caracterizar genotipos de sorgo de acuerdo con su susceptibilidad a PHS. Además, este protocolo tuvo como objetivo identificar los principales atributos que contribuyen a la resistencia al BPC.

Las discrepancias entre los datos de germinación de granos desprendidos y brotado en la panoja tanto en laboratorio como en las condiciones de campo pueden deberse a las características de la panoja que facilitan la imbibición de grano. Los resultados de laboratorio (obtenidos con granos desprendidos o con panojas intactas) se correlacionaron fuertemente con los registros de campo de BPC "natural". No se encontraron asociaciones claras entre características de la gluma, color de grano y variables de germinación o brotado. Sin embargo, un efecto de éstos no se puede descartar, y cualquier posible efecto que la pigmentación del pericarpio del grano, la testa y la gluma puede tener sobre la germinación y el brotado, posiblemente fue enmascarado por otros factores de mayor peso. Inesperadamente, los niveles de germinación y brotado fueron fuertemente correlacionado con la estatura de la planta. Esto puede deberse a un vínculo genético

entre uno de los loci enanos (*dw1*) que estaría ligado a un QTL de baja dormición proveniente del sorgo milo amarillo enano y mapeado en el cromosoma 9 (Cantoro et al., 2016). La asociación positiva entre el aumento de la dormición y floración tardía observada en los datos coinciden con los resultados de Harris y Burns (1970). El contenido de taninos tampoco presentó relación con la germinación, además, IS9530 resistente a BPC es un tipo de tanino bajo, lo que sugiere que existen otras fuentes relevantes de dormición independientemente de este carácter.

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Harris, H. B., and Burns, R. E. (1970). Influence of tannin content on preharvest seed germination in sorghum. Agronomy J. 62, 835–836. doi: 10.2134/agronj1970.00021962006200060051x
- 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.
- Rodríguez, M. V., Barrero, J., Corbineau, F., Gubler, F., and Benech-Arnold, R. (2015). Dormancy in cereals (not too much, not so little): About the mechanisms behind this trait. Seed Sci. Res. 25, 99–119.

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