

# IV SIMPOSIO NACIONAL II CONFERENCIA INTERNACIONAL DE SORGO

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



## GENÉTICA Y MEJORAMIENTO GENÉTICO VEGETAL



## **MAPEO POR ASOCIACIÓN PARA CARACTERES RELACIONADOS A CAPACIDAD FOTOSINTÉTICA Y DE CRECIMIENTO EN LÍNEAS DE SORGO**

Rosas, M. B<sup>1</sup>; Pratta, G.<sup>2</sup>; Guiamet, J.J.<sup>3</sup>; Ortiz, D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> EEA INTA Manfredi, Córdoba, Argentina. <sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Centro Científico Tecnológico Rosario, Instituto de Investigaciones en Ciencias Agrarias de Rosario, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina. <sup>3</sup> CONICET, Centro Científico Tecnológico La Plata, Instituto de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

belenrosas1604@gmail.com

GWAS FOR TRAITS RELATED TO PHOTOSYNTHETIC AND GROWTH  
CAPACITY IN SORGHUM LINES

### **ABSTRACT**

GWA Studies aim to capture crop diversity and provide an excellent opportunity to discover and explore the genetic architecture of traits. The objective of this work was to detect in a multienvironmental study genomic regions associated with photosynthetic capacity and growth in sorghum. Three experiments were performed in INTA Manfredi Exp Station, two in the field and one in a greenhouse, using 150 genotypes of the Sorghum Association Panel. The following variables were evaluated: plant height (ALT), chlorophyll leaf content (SPAD), efficiency of energy captured by open PSII reaction centers ( $F_v'/F_m'$ ), stomatal density (SD) and specific leaf area (SLA). Data were analyzed with a mixed model, and LS means obtained were used in a GWAS for each variable per year with the software TASSEL. The genotypes presented sufficient phenotypic variability for the traits analyzed. Significant correlations were found in the three years evaluated. Significant genomic regions were detected for ALT in all three years and on all chromosomes, for SLA in year 2 on all chromosomes and for SD in year 3 on chromosome 2. The results indicate consistent associations for the ALT variable for the three years evaluated.

### **Palabras claves**

Mapeo por asociación, crecimiento, capacidad fotosintética, sorgo.

### **Key words**

GWAS, growth, photosynthetic capacity, sorghum.

## INTRODUCCIÓN

El mapeo por asociación es una técnica que permite identificar lugares específicos del genoma relacionados con la variación de un carácter fenotípico de interés. Estos estudios de mapeo a partir de paneles que

capturan la diversidad del cultivo brindan una excelente oportunidad para descubrir y explorar la arquitectura genética de la fotosíntesis y crecimiento en sorgo.

## OBJETIVOS

Detectar en un ensayo multiambiente regiones genómicas asociadas con la capacidad fotosintética y crecimiento en sorgo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres ensayos en la EEA INTA Manfredi (39° 49' S, 63° 46' O), dos a campo y uno en invernadero, en los que se evaluaron caracteres relacionados a capacidad fotosintética y de crecimiento, utilizando el Panel de Asociación de Sorgo (Sorghum Association Panel), que cuenta con 357 genotipos y representa una muestra representativa de su diversidad genética.

- *Ensayos a campo*

Durante la campaña 2018/2019 se llevó a cabo uno de los ensayos a campo con 334 genotipos, el diseño experimental fue un  $\alpha$ -lattice con dos repeticiones. En la campaña 2019/2020 se realizó el segundo ensayo a campo con 304 genotipos, también con un diseño  $\alpha$ -lattice dispuesto en dos repeticiones. En ambos se hicieron los controles de malezas, plagas y enfermedades correspondientes, como así también fertilización. Se midieron los caracteres:

Altura de planta (ALT): se midió semanalmente en dos plantas por parcela la altura de la planta hasta la última hoja expandida, desde el estado de 6 hojas hasta floración. La altura final de planta se tomó desde la base de tallo hasta la parte más alta de la panoja.

Contenido de clorofila en hoja (SPAD): esta medición se realizó cada dos semanas en dos plantas por

parcela, desde el estado de 6 hojas hasta floración en la última hoja expandida con un SPAD-502.

Estomáticos: sobre la última hoja expandida se le colocó esmalte para uñas transparente en una superficie aproximada de 2 cm<sup>2</sup> en la parte media de la hoja, se lo dejó secar y se le colocó una cinta transparente para retirar esa lámina y ponerlo sobre un portaobjetos de vidrio. Se tomó una fotografía de la muestra utilizando un microscopio trinocular y utilizando el software ImageJ se procesó para determinar área de estoma, número de estomas, tamaño de estoma y densidad estomática (DE).

Área foliar específica (AFE): utilizando la misma hoja que para DE, se tomó área foliar, largo y ancho de hoja a través de una fotografía que se procesó con software ImageJ, luego se colocó en estufa a 60°C, se determinó así el área foliar específica tomando el área foliar de la hoja dividido por su peso seco (AF/PS, cm<sup>2</sup>/g).

Eficiencia de energía capturada por fotosistema II (Fv'/Fm'): se midió en una planta por parcela sobre la última hoja expandida alrededor de floración. Se utilizó para el primer año de ensayo un Pocket PEA y para el segundo año un analizador portátil LICOR 6400 XT. En el caso del segundo ensayo a campo por cuestiones climáticas se lograron medir 162 parcelas.

- *Ensayo en invernadero*

Durante los meses de febrero-abril de 2021 se evaluaron en el invernadero de la estación experimental 150 genotipos que fueron previamente seleccionados de los dos ensayos a campo a través de un análisis multivariado (Análisis Factorial Múltiple). La siembra se realizó en bandejas de germinación en el mes de enero y en el estado de 3 hojas se implantaron en macetas de 5 litros en un diseño  $\alpha$ -lattice con tres repeticiones. Cada maceta corresponde a un genotipo. Se realizó control de malezas, plagas y enfermedades, como así también una fertilización controlado con Hydrocomplex. Las mediciones que se llevaron a cabo fueron ALT, SPAD, DE,

AFE y  $Fv'/Fm'$  en todas las plantas del trabajo experimental.

Para el análisis de datos conjunto de los tres años se utilizó el siguiente modelo mixto

$$Y = \mu + R + F(R) + C(R) + G + A + G \times A + \varepsilon$$

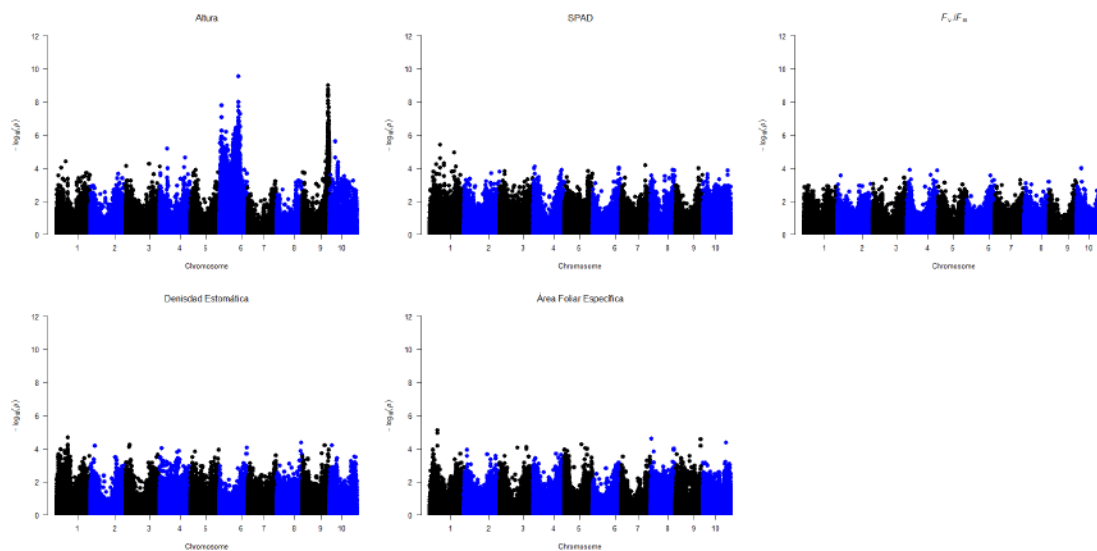
donde Y es la variable respuesta,  $\mu$  es la media general, R es la repetición, F es la fila anidada a repetición, C es la columna anidada a repetición, G es el genotipo, A es el año,  $G \times A$  es la interacción de genotipo por año y  $\varepsilon$  es el residual. A partir de las medias de mínimos cuadrados obtenidos se realizó un mapeo por asociación para cada variable por año a través del software TASSEL. Además se calcularon las correlaciones por año entre variables a través de software estadístico R.

## RESULTADOS

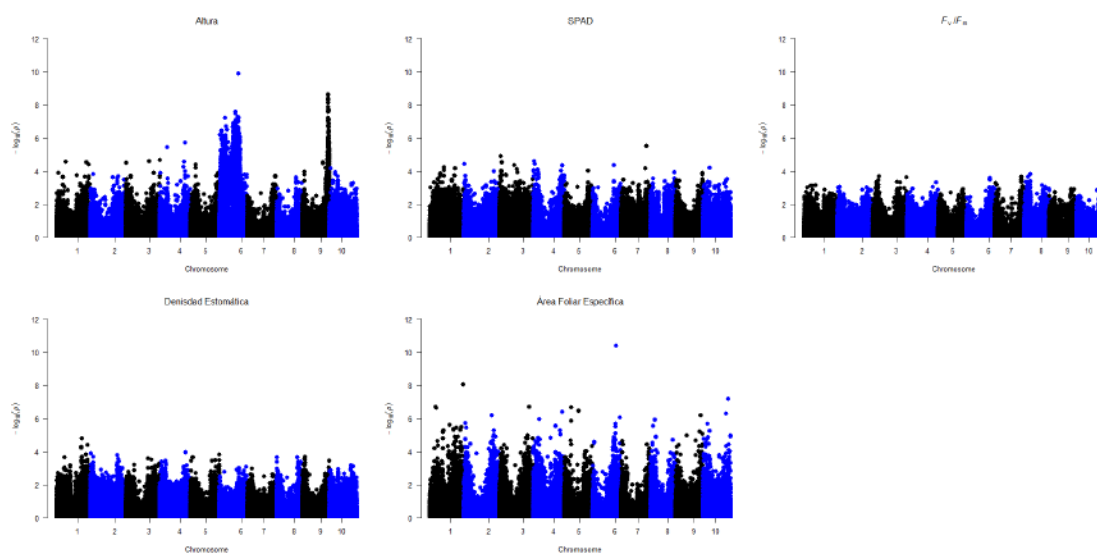
Se detectó una interacción  $G \times A$  altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) para todas las variables. Los genotipos en todos los años presentaron suficiente variabilidad fenotípica para las variables analizadas. Para el año 1 (campana 2018/2019) se encontró una correlación altamente significativa ( $p < 0.001$ ) y negativa entre ALT y SPAD ( $r = -0.30$ ). Para el segundo año (2019/2020), se observaron correlaciones altamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre algunas variables fenotípicas. Se encontraron tres correlaciones negativas: entre ALT y SPAD ( $r = -0.31$ ), entre ALT y  $Fv'/Fm'$  ( $r = -0.22$ ) y entre AFE y SPAD ( $r = -0.28$ ), y dos correlaciones positivas: entre ALT y AFE ( $r = 0.25$ ) y entre ALT y DE ( $r = 0.20$ ). Por ultimo para el ensayo en invernadero (año 3), se encontraron correlaciones significativas positivas entre ALT y AFE ( $r = 0.17$ ,  $p < 0.05$ ), entre DE y SPAD ( $r = 0.22$ ,  $p < 0.001$ ) y entre AFE y  $Fv'/Fm'$  ( $r = 0.28$ ,  $p < 0.001$ ), y una correlación negativa entre AFE y SPAD

( $r = -0.16$ ,  $p < 0.05$ ). Como se puede observar para los años 1 y 2 solo mantienen la correlación negativa entre ALT y SPAD, mientras que los años 2 y 3 mantienen la correlación positiva entre ALT y AFE y negativa entre SPAD y AFE.

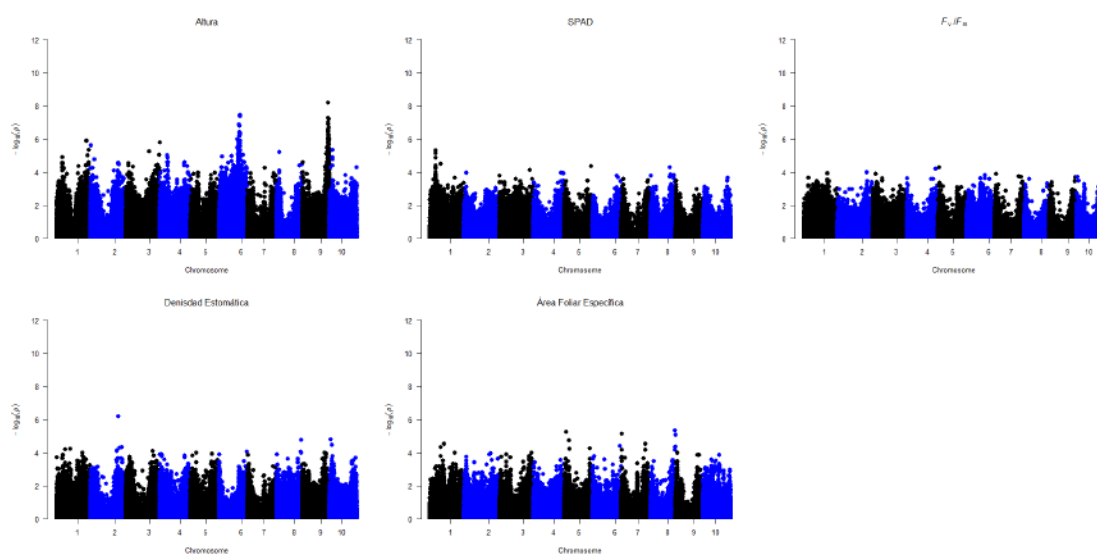
Con los datos obtenidos del mapeo por asociación se encontraron para el año 1 regiones genómicas significativas para ALT (Figura 1), en todos los cromosomas. Para el año 2 (Figura 2) se encontraron regiones genómicas significativas para dos de las cinco variables analizadas, para ALT y AFE en todos los cromosomas, y por ultimo para el último año se encontraron regiones genómicas significativas para ALT en todos los cromosomas y para DE en cromosoma 2 (Figura 3). Los marcadores significativamente asociados a la variable ALT incluyen en los 3 años las regiones en los cromosomas 6 y 9 previamente reportados (Zhao et al., 2016). Las regiones asociadas a las variables AFE y DE solo se reportaron en un año en particular.



**Figura 1:** Manhattan plots año 1. Línea roja indica significancia de regiones genómicas (FDR)



**Figura 2:** Manhattan plots año 2. Línea roja indica significancia de regiones genómicas (FDR)



**Figura 3:** Manhattan plots año 3. Línea roja indica significancia de regiones genómicas (FDR)

**CONCLUSIONES**

Se detectaron asociaciones consistentes, tanto con otros caracteres fenotípicos como con regiones genómicas, para la variable altura en los tres años evaluados. Sin embargo, dado que las asociaciones con otros caracteres fenotípicos varían entre años, se seguirán analizando en próximos ciclos del cultivo.

## **CITAS BIBLIOGRÁFICAS**

ZHAO, J., MANTILLA PEREZ, M. B., HU, J., & SALAS FERNANDEZ, M. G. (2016). Genomewide association study for nine plant architecture traits in Sorghum. *The Plant Genome*, 9(2), plantgenome2015-06.

ABSTRACT

GWA Studies aim to capture crop diversity and provide an excellent opportunity to discover and explore the genetic architecture of traits. The objective of this work was to detect genomic regions associated with photosynthetic capacity and growth by means of a multienvironmental study in sorghum. Three experiments were performed in INTA Manfredi Exp Station, two in the field and one in a greenhouse, using 150 genotypes of the Sorghum Association Panel. The following variables were evaluated: plant height (ALT), chlorophyll leaf content (SPAD), efficiency of energy captured by open PSII reaction centers (Fv’/Fm’), stomatal density (SD) and specific leaf area (SLA). Data were analyzed with a mixed model, and LS means obtained were used in a GWAS for each variable per year with the software TASSEL. The genotypes presented sufficient phenotypic variability for the traits analyzed. Significant correlations were found in the three years evaluated. Significant genomic regions were detected for ALT in all three years and on all chromosomes, for SLA in year 2 on all chromosomes and for SD in year 3 on chromosome 2. The results indicate consistent associations for the ALT variable for the three years evaluated.

INTRODUCCIÓN

El mapeo por asociación es una técnica que permite identificar lugares específicos del genoma relacionados con la variación de un carácter fenotípico de interés. Estos estudios de mapeo a partir de paneles que capturan la diversidad del cultivo brindan una excelente oportunidad para descubrir y explorar la arquitectura genética de la fotosíntesis y crecimiento en sorgo. El objetivo principal fue Detectar en un ensayo multiambiente regiones genómicas asociadas con la capacidad fotosintética y crecimiento en sorgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron tres experimentos en la EEA INTA Manfredi , dos en campo y uno en invernadero, utilizando 150 genotipos del Panel de Asociación de Sorgo. Se evaluaron las siguientes variables: altura de la planta (ALT), contenido de clorofila en hoja (SPAD), eficiencia de la energía captada por centros de reacción PSII abiertos (Fv’/Fm’), densidad estomática (DE) y área foliar específica (AFE). Los datos se analizaron con un modelo mixto, y las medias de mínimos cuadrados obtenidas se utilizaron en un mapeo por asociación para cada variable por año con el software TASSEL.

RESULTADOS

- Se detectó una interacción GxA altamente significativa (p<0.0001) para todas las variables analizadas.
- Los genotipos en todos los años presentaron suficiente variabilidad fenotípica para las variables analizadas:
  - Para el año 1 (campaña 2018/2019) se encontró una correlación altamente significativa (p<0.001) y negativa entre ALT y SPAD (r=-0.30).
  - Para el año 2 (2019/2020), se observaron correlaciones altamente significativas (p<0.001) entre algunas variables fenotípicas. Se encontraron tres correlaciones negativas: entre ALT y SPAD (r=-0.31), entre ALT y Fv’/Fm’(r=-0.22) y entre AFE y SPAD (r=-0.28), y dos correlaciones positivas: entre ALT y AFE (r=0.25) y entre ALT y DE (r=0.20).
  - Por ultimo para el ensayo en invernadero (año 3), se encontraron correlaciones significativas positivas entre ALT y AFE (r=0.17, p<0.05), entre DE y SPAD (r=0.22, p<0.001) y entre AFE y Fv’/Fm’ (r=0.28, p<0.001), y una correlación negativa entre AFE y SPAD (r=-0.16, p<0.05)(Tabla 1).
- Con los datos obtenidos del mapeo por asociación se encontraron para el año 1 regiones genómicas significativas para ALT (Figura 1), en todos los cromosomas. Para el año 2 (Figura 2) se encontraron regiones genómicas significativas para dos de las cinco variables analizadas, para ALT y AFE en todos los cromosomas, y por ultimo para el último año se encontraron regiones genómicas significativas para ALT en todos los cromosomas y para DE en cromosoma 2 (Figura 3).
- Los marcadores significativamente asociados a la variable ALT incluyen en los 3 años las regiones en los cromosomas 6 y 9 previamente reportados (Zhao et al., 2016). Las regiones asociadas a las variables AFE y DE solo se reportaron en un año en particular.

Tabla 1: Correlaciones fenotípicas. \* p<0,01 \*\*p<0,001

| Año 1   |           |           |          |         |         |
|---------|-----------|-----------|----------|---------|---------|
|         | ALT       | SPAD      | AFE      | DE      | Fv’/Fm’ |
| ALT     | 1         |           |          |         |         |
| SPAD    | -0.3004** | 1         |          |         |         |
| AFE     | -0.0382   | -0.1147   | 1        |         |         |
| DE      | 0.1318    | -0.0436   | -0.0002  | 1       |         |
| Fv’/Fm’ | -0.0580   | 0.0131    | 0.3432   | 0.0134  | 1       |
| Año 2   |           |           |          |         |         |
|         | ALT       | SPAD      | AFE      | DE      | Fv’/Fm’ |
| ALT     | 1         |           |          |         |         |
| SPAD    | -0.3162** | 1         |          |         |         |
| AFE     | 0.2511**  | -0.2835** | 1        |         |         |
| DE      | 0.2036**  | 0.0143    | 0.1062   | 1       |         |
| Fv’/Fm’ | -0.2222** | 0.1207    | 0.0487   | -0.0735 | 1       |
| Año 3   |           |           |          |         |         |
|         | ALT       | SPAD      | AFE      | DE      | Fv’/Fm’ |
| ALT     | 1         |           |          |         |         |
| SPAD    | 0.1206    | 1         |          |         |         |
| AFE     | 0.1740*   | -0.1651*  | 1        |         |         |
| DE      | -0.0627   | 0.2211**  | -0.0930  | 1       |         |
| Fv’/Fm’ | -0.0475   | -0.1221   | 0.2899** | -0.1224 | 1       |

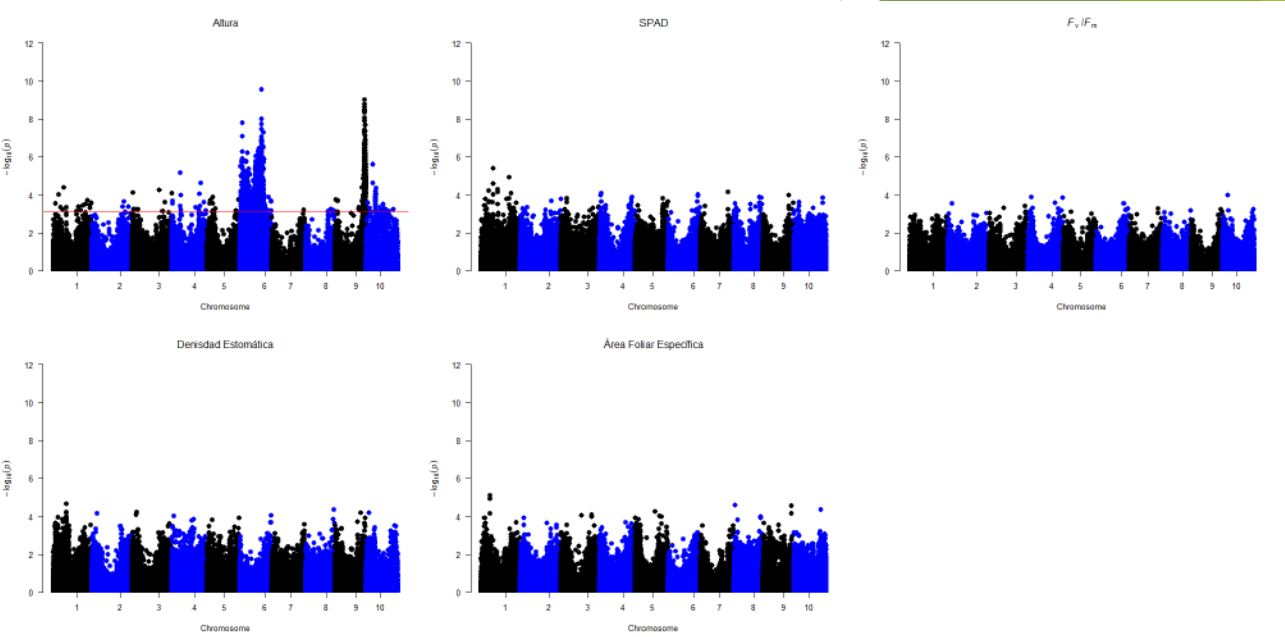


Figura 1: Manhattan plots año 1. Línea roja indica significancia de regiones genómicas (FDR)

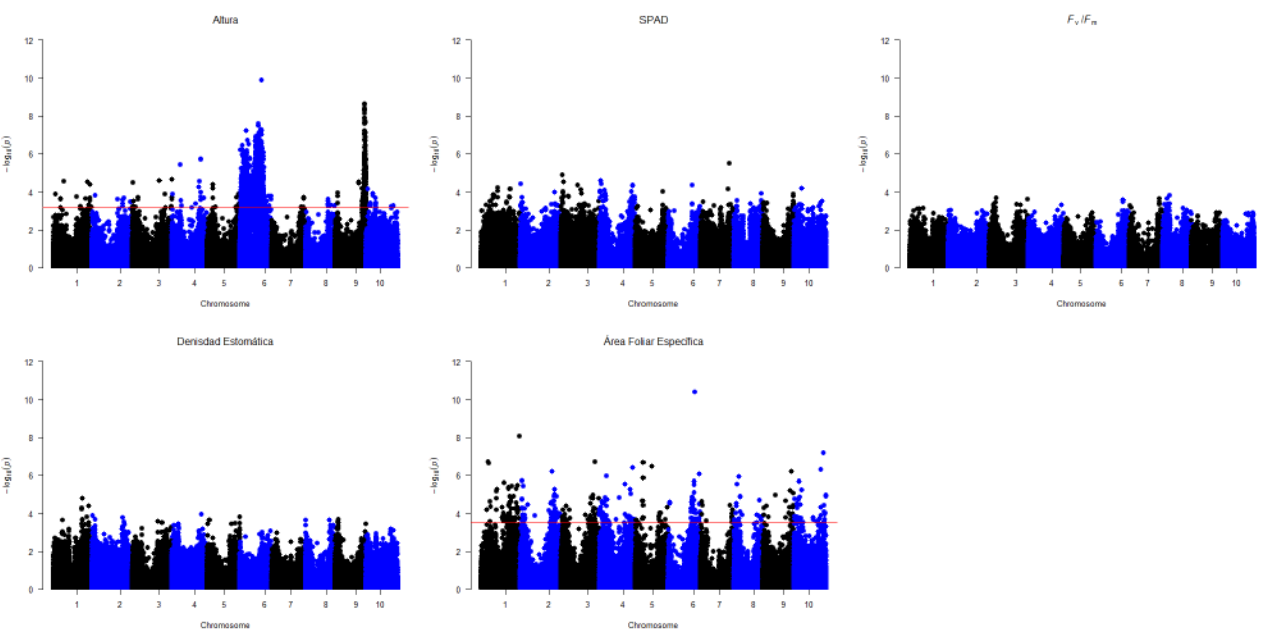


Figura 2: Manhattan plots año 2. Línea roja indica significancia de regiones genómicas (FDR)

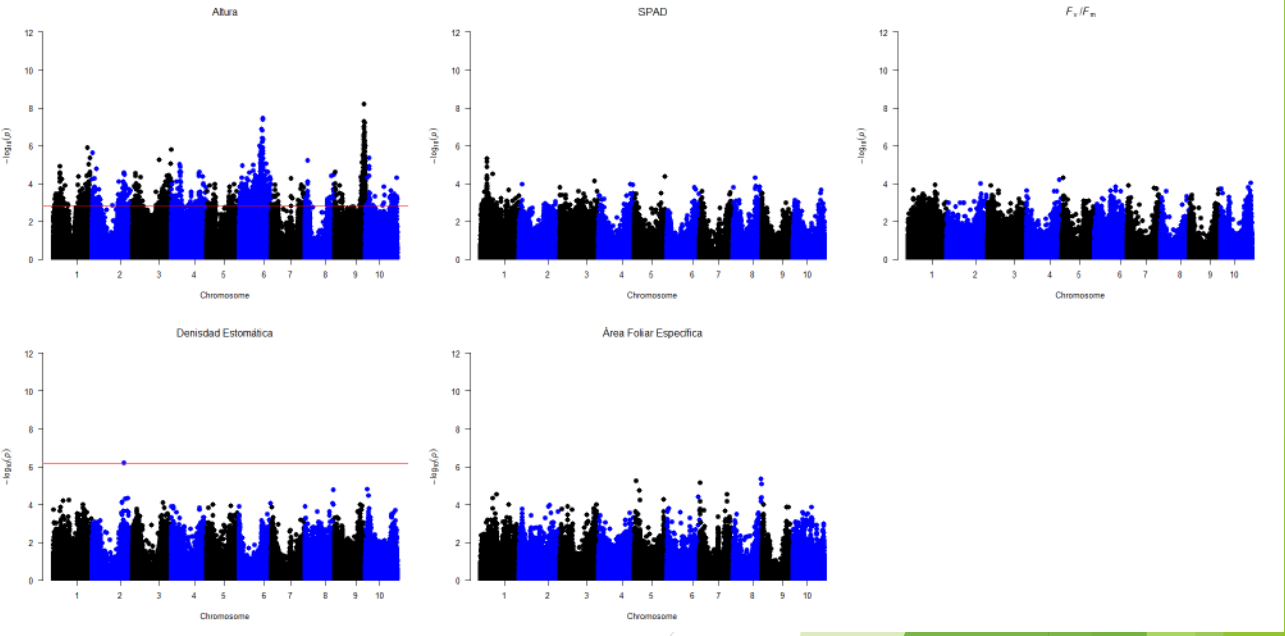


Figura 3: Manhattan plots año 3. Línea roja indica significancia de regiones genómicas (FDR)

CONCLUSIÓN

Se detectaron asociaciones consistentes, tanto con otros caracteres fenotípicos como con regiones genómicas, para la variable altura en los tres años evaluados. Sin embargo, dado que las asociaciones con otros caracteres fenotípicos varían entre años, se seguirán analizando en próximos ciclos del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Zhao, J., Mantilla Perez, M. B., Hu, J., & Salas Fernandez, M. G. (2016). Genome-wide association study for nine plant architecture traits in Sorghum. The Plant Genome, 9(2), plant genome2015-06.