

FENOTIPADO Y GENOTIPADO CON MARCADORES SSR DE LÍNEAS ENDOCRIADAS DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.), CONTRASTANTES PARA LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO

GRANDON Nancy^{1*}, MARTIN Eugenia², CICCONI Emanuel³, DIAZ Carolina⁴, MAMANÍ Eva¹, MORENO Ma. Valeria¹.

¹Laboratorio de Biotecnología, INTA-EEA Manfredi, Ruta Nac. N° 9, Km 636. (5988) Manfredi, Córdoba, Argentina. ²IICAR-CONICET, Campo Experimental Villarino, CC N° 14 (S2125ZAA), Zavalla, Santa Fe, Argentina. ³Asesor técnico. ⁴Estadística. Grupo Economía, INTA-EEA Manfredi. *E-mail: grandon.nancy@inta.gob.ar.

INTRODUCCION

El girasol (*Helianthus annuus* var. *macrocarpus*) es el segundo cultivo oleaginoso más importante en la Argentina. Desde hace varios años, se vienen realizando diferentes estudios agronómicos, fisiológicos y genéticos con materiales del Banco de Germoplasma de INTA-EEA Manfredi con el objetivo de abordar la problemática sobre la tolerancia al estrés hídrico en este cultivo.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar líneas endocriadas de girasol para la tolerancia al estrés hídrico en invernáculo y determinar su genotipo mediante marcadores microsatélites (SSR).

MATERIALES Y METODOS

Siete líneas endocriadas de girasol, desarrolladas en INTA-EEA Manfredi, fueron evaluadas en invernáculo durante el período vegetativo, bajo dos condiciones hídricas: a capacidad de campo (CC) y bajo estrés (EH: 70% de CC); el cual se aplicó a partir del estadio V8, durante 16 días (Figura 1). El consumo hídrico diario se determinó por método gravimétrico. A partir de las variables morfológicas área foliar, peso fresco y peso seco registradas al inicio y al final de la imposición del estrés, se estimaron ganancia de área foliar (GAF), transpiración total acumulada (Tta), tasa de asimilación neta (TAN), eficiencia del uso del agua (EUA) y la relación tasa transpiratoria (TT) vs. déficit de presión de vapor (DPV) (pendiente y punto C: *valor de DPV en el cual la TT diaria alcanza un máximo y se mantiene constante*). También se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) y se determinó la correlación de Pearson entre variables. Además, estas mismas líneas fueron genotipificadas con 127 marcadores SSR. La extracción de ADN se realizó mediante un protocolo modificado con CTAB y las amplificaciones se realizaron mediante PCR *multiplex* con dos o tres cebadores por reacción. A partir de estos datos genotípicos, se realizó un análisis de conglomerados mediante el cálculo de las distancias genéticas de Nei *Standard* (Nei, 1972). Para el análisis estadístico se utilizaron los programas InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011), SAS *University Edition* 3.6 (SAS, 2016) e Info-Gen (Balzarini y Di Rienzo, 2011).



Figura 1: Disposición de las macetas según un diseño *alpha-lattice* con seis repeticiones para siete líneas endocriadas de girasol, evaluadas bajo dos regímenes hídricos: a capacidad de campo (CC) y bajo estrés hídrico (EH), durante 16 días.



Muestreo de hoja

Extracción de ADN

RESULTADOS

Se encontraron diferencias significativas entre genotipos y entre tratamientos para todas las variables analizadas, como así también interacción significativa para EUA, TAN y el punto C. Bajo condiciones de estrés, todos los genotipos redujeron GAF y Tta en promedio un 18% y un 23%, respectivamente (Figura 2). Mientras que TAN y EUA mostraron un aumento promedio significativo del tratamiento EH con respecto a CC en 9% y 32%, respectivamente (Figura 3).

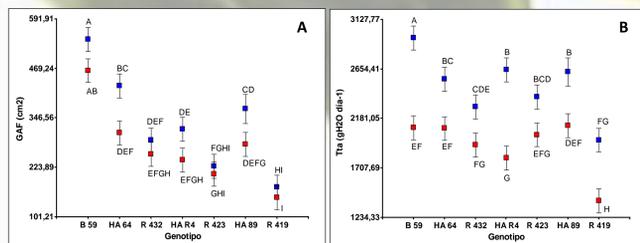


Figura 2: A) GAF y B) Tta para siete líneas endocriadas evaluadas bajo dos regímenes hídricos: CC (puntos azules) y EH (puntos rojos). Los datos corresponden a las medias ajustadas \pm EE de seis repeticiones. Los valores con igual letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

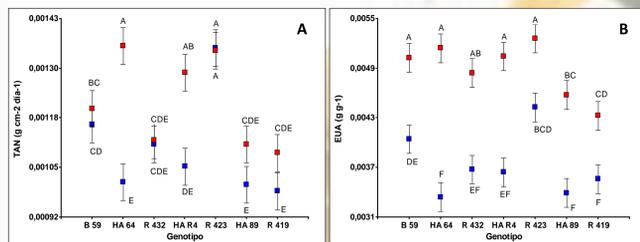


Figura 3: A) TAN y B) EUA para siete líneas endocriadas evaluadas bajo dos regímenes hídricos: CC (puntos azules) y EH (puntos rojos). Los datos corresponden a las medias ajustadas \pm EE de seis repeticiones. Los valores con igual letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

Para la relación TT-DPV, todos los genotipos mostraron bajo estrés, reducción tanto de la pendiente como del punto C en promedio un 6% y un 5%, respectivamente (Figura 4). Así, los genotipos que presentaron mayor pendiente, mostraron menor punto C (líneas en fucsia) (Figura 4 y 5A) y los genotipos que presentaron menor pendiente, mostraron mayor punto C (líneas en turquesa) (Figura 4 y 5A). Dicha relación TT-DPV se determinó mediante un modelo de regresión no lineal *Plateau* entre genotipos (Figura 5A) y entre tratamientos (Figura 5B).

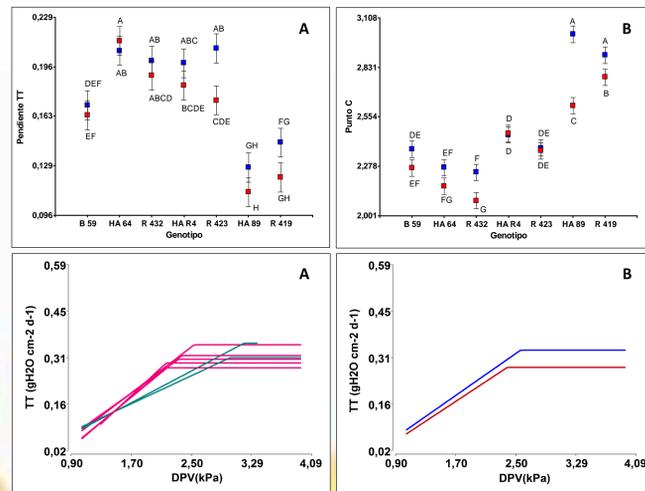


Figura 4: A) pendiente TT y B) punto C para siete líneas endocriadas evaluadas bajo dos regímenes hídricos: CC (puntos azules) y EH (puntos rojos). Los datos corresponden a las medias ajustadas \pm EE de seis repeticiones. Los valores con igual letra no son significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

Figura 5: Relación Tasa Transpiratoria (TT) vs. Déficit de Presión de Vapor, A) por genotipos y B) por tratamientos: CC (línea azul) y EH (línea roja).

El ACP explicó el 80% de la variabilidad total (Figura 6). La CP1 logró discriminar a HA89 y R419 de los demás genotipos debido a que presentaron menor pendiente TT y mayor punto C, mientras que la CP2 separó los genotipos por tratamientos con base en EUA y Tta ($r=0,60$, $p<0,0001$), y entre TAN y EUA ($r=0,77$, $p<0,0001$). Por el contrario, entre la pendiente TT y el punto C se encontró una alta correlación negativa ($r=-0,73$, $p<0,0001$).

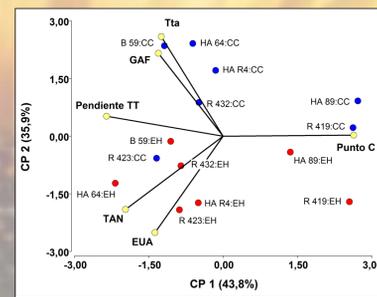


Figura 6: ACP con base en seis caracteres evaluados en las siete líneas endocriadas bajo dos tratamientos: CC (puntos azules) y EH (puntos rojos). GAF: ganancia de área foliar; Tta: transpiración total acumulada; TAN: tasa de asimilación neta; EUA: eficiencia del uso del agua.

Con base en el fenotipado, las líneas evaluadas se clasificaron como alta (HA64 y HAR4), intermedia (B59, R423 y R432) y baja eficiencia transpiratoria (HA89 y R419). Por otro lado, a partir de los marcadores SSR amplificados, se determinó el nivel de polimorfismo entre las líneas contrastantes para el carácter (Tabla 1) y además, se realizó un análisis de conglomerados que permitió discriminar dos grupos a una distancia de 1,05 (Figura 7).

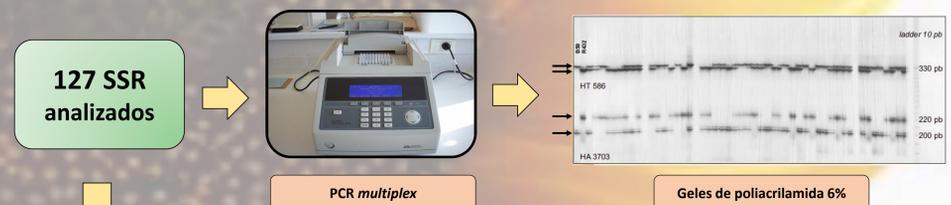


Tabla 1: Nivel de polimorfismo detectado entre las posibles combinaciones de parentales contrastantes para la tolerancia al estrés hídrico.

Combinación de parentales	Comportamiento frente al EH	Nivel de polimorfismo	Distancia genética de Nei <i>Standard</i>
R419	EB x EA	59%	1,08
R419	EB x EA	59%	1,01
HA89	EB x EA	43%	0,70
HA89	EB x EA	60%	1,08

Total: 262 alelos.
Promedio: 2,88 alelos/locus.
78% SSR detectaron entre dos y tres alelos.

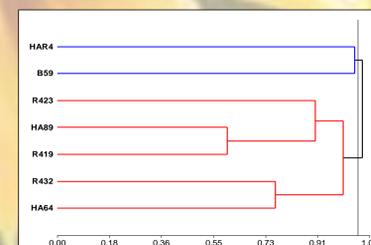


Figura 7: Dendrograma UPGMA calculado a partir de la distancia de Nei *Standard* para las siete líneas endocriadas con base en 91 marcadores SSR. Coeficiente de correlación cofenética: 0,71.

CONCLUSION

Con base en estos resultados, fue posible realizar una caracterización conjunta de las líneas mediante el fenotipado en invernáculo y el genotipado con marcadores SSR; lo cual permitirá la construcción de poblaciones segregantes para la tolerancia al estrés hídrico con base en el mayor contraste fenotípico, mayor polimorfismo y mayor distancia genética entre las líneas parentales.



Secretaría de Agroindustria



Ministerio de Producción y Trabajo
Presidencia de la Nación