

## Desarrollo de poblaciones mutagenizadas en girasol

Fass, M.I.<sup>1\*</sup>; Conte, M.<sup>1</sup>; Puebla, A.<sup>1</sup>; Nishinakamasu, V.<sup>1</sup>; Ben Guerrero, E.<sup>1</sup>; Landau, A.M.<sup>2</sup>; Prina A.<sup>2</sup>; Dominguez M.<sup>3</sup>; Gonzalez, S.<sup>1</sup>; Alvarez, D.<sup>4</sup>; Lia V.V.<sup>+1</sup>; Paniego N.B.<sup>+1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), INTA-CONICET, Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Instituto de Genética "Ewald A. Favret", INTA, Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Estación Experimental Agropecuaria Pergamino, INTA, Buenos Aires, Argentina. <sup>4</sup>Estación Experimental Agropecuaria Manfredi, INTA, Córdoba, Argentina. + comparten autoría, \*fass.monica@inta.gov.ar.

### Introducción

Desde hace unos años el grupo de girasol del INTA ha incorporado poblaciones mutagenizadas como herramienta de suministro de nueva variabilidad y de aplicación de genética reversa y directa. Dada la importancia de contar con esta herramienta, se planteó el objetivo de determinar el efecto de distintos tratamientos mutagénicos sobre tres genotipos de girasol y evaluar de forma integrada su capacidad de supervivencia, fertilidad y generación de mutaciones heredables.

### Evaluación M1 → M2

**Materiales y métodos 1** Siembra en invernáculo de cuatro réplicas de 100 semillas M1 de los genotipos HA89, PAC2 y 51084 tratadas con A) 0,1% EMS; B) 0,125% EMS; C) 15 kR rayos X seguido de 10<sup>-4</sup> M azida sódica; D) 15 kR rayos X seguido de 10<sup>-3</sup> M azida sódica o E) con buffer fosfato (control). Medición de la proporción de germinación y progresión a plántula. Trasplante a campo de 35 plántulas por réplica y tratamiento/genotipo. Medición de la proporción de plantas que generaron capítulo y de plantas que generaron semilla. Diseño de cuatro bloques al azar. Estadística: modelos lineales generalizados mixtos con distribución binomial (fijos: genotipo y tratamiento; aleatorio: bloque). Comparaciones por prueba DGC ( $\alpha=0,05$ ). Software InfoStat v 2020 (Di Rienzo et al.).

Resultados 1

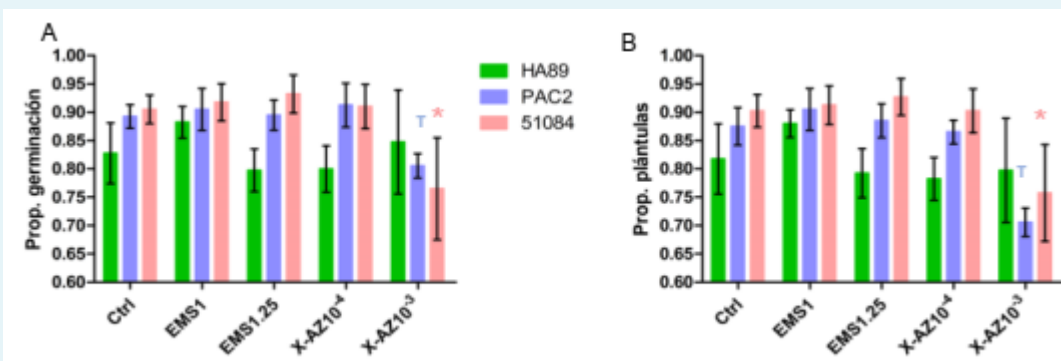


Figura 1. Media ± SD de A- proporción de semillas germinadas B- proporción de semillas que avanzaron a estadio de plántula. Los símbolos señalan los tratamientos que tuvieron el mayor efecto en cada genotipo [HA89: Φ; PAC2: T; 51084: \*].

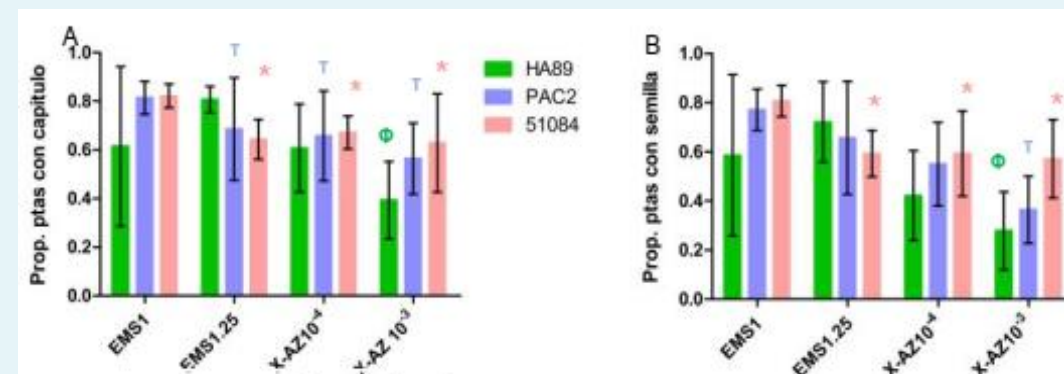
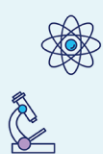
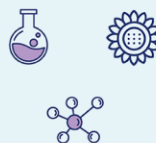


Figura 2. . Media ± SD de A- proporción de plantas que desarrollaron capítulo; B- proporción de plantas que generaron semillas. Los símbolos señalan los tratamientos que tuvieron el mayor efecto en cada genotipo [HA89: Φ; PAC2: T; 51084: \*].

**Síntesis 1** Se observó una respuesta diferencial de los genotipos a los diferentes tratamientos de mutagénesis en cada variable analizada. 51084, seguido de PAC2, fueron los genotipos más proclives a reducir su germinación, supervivencia y fertilidad. El tratamiento D generó la mayor reducción en la tasa de supervivencia de todos los genotipos evaluados.



# TALLER CIENTÍFICO



UNIVERSIDAD NACIONAL de MAR DEL PLATA  
FACULTAD de CIENCIAS AGRARIAS



## Evaluación M2 → M4

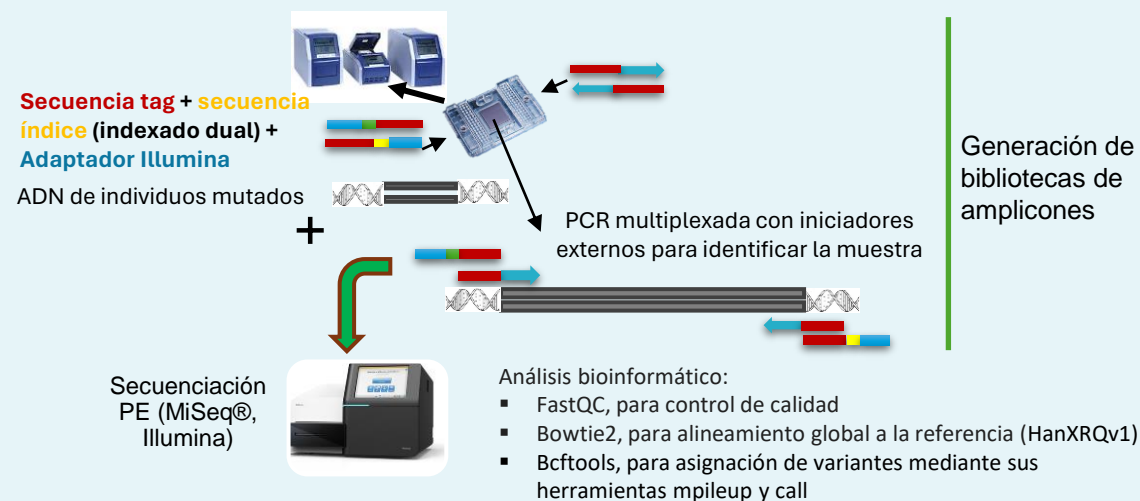
**Materiales y métodos 2** Para la generación de semilla M3 se sembraron 35 semillas de cada familia M2 de la línea HA89 en los tratamientos B y D, y 5 semillas de cada familia M2 para el resto de las combinaciones genotipo-tratamiento. Los individuos segregantes M3 de HA89\_B y HA89\_D progresaron por descendencia de semilla única a la generación M4.

Tabla 1. Número de familias por generación en cada combinación genotipo/tratamiento. En verde se indica la cantidad de semillas que se sembraron por familia en la siguiente generación..

# familias	HA89_A	HA89_B	HA89_C	HA89_D	51084_A	51084_B	51084_C	51084_D	PAC2_A	PAC2_B	PAC2_C	PAC2_D
M2	62	78	40	18	80	63	61	50	58	69	49	19
M3	58	807	32	102	176	177	111	95	92	119	66	26
M4	-	en trilla	-	en trilla	-	-	-	-	-	-	-	-

Resultados 2

**Materiales y métodos 3** Se realizó una búsqueda de mutaciones sobre 48 individuos en M2 de una población de TILLING desarrollada sobre la combinación HA89\_B. La búsqueda de mutaciones se restringió a 48 regiones génicas (R) correspondientes a 34 genes candidatos (G), que involucran a los siguientes caracteres agronómicos: resistencia a PHC (podredumbre húmeda del capítulo por *S. sclerotiorum*; 15R, 12G), resistencia a MV (marchitez por *V. dahliae* - Vd -; 8R, 8G), retraso de la senescencia (3R, 3G), IH (genes asociados a la inducción de haploides; 21R, 10G) y contenido de aceite (1R,1G).



Resultados 3

Tabla 2. Resumen de las mutaciones halladas en las regiones amplificadas y las modificaciones inferidas en la proteína.

Caracter	Gen	Pos. gen	Mutación	Modificación
IH	DMP-2	470	T/C	V/A
IH	DMP-6	191	G/A	R/Q
IH	DMP-6	356	T/C	L/S
IH	CENH3-3	973	C/T	En intrón
PHC	G33	1697	T/C	L/P
PHC	G33	1760	G/A	G/Q
PHC	G33	1867	G/A	G/Q
PHC	G33	1898	C/T	Sin cambio
PHC	RhoBP_B.1	590	A/G	En intrón
PHC	HeAn_12835.1	3197	T/C	En intrón
PHC	18494-fin	3888	T/A	3' UTR
PHC	18494-start	654	C/T	5' UTR
Senes	NAM-1	1230	C/T	S/L
Vd	RAPG-561221	139	G/A	A/T
Vd	LRR-RK-307821	3515	C/T	Sin cambio
Vd	PAD4-309421	1773	G/A	A/T
Vd	PAD4-309421	1877	C/T	Sin cambio
Vd	PAD4-309421	1938	G/A	D/N

**Síntesis 2** Se dispone de semillas en generación M3 y M4. Se observa variabilidad fenotípica entre plantas de igual familia M2, consistente con la segregación alélica esperada.

**Síntesis 3** Se detectaron 18 posibles mutaciones, halladas en heterocigosis, distribuidas sobre 11 genes distintos en 12 individuos (Tabla 2). La tasa de mutaciones encontrada en este estudio preliminar fue de 1/39 kb.

Conclusiones

Se dispone de germoplasma mutagenizado para realizar evaluaciones de genética directa y reversa.

La evaluación conjunta de los efectos en el desarrollo y en la tasa de mutaciones permitirá seleccionar el tratamiento más adecuado para cada genotipo y generar una valiosa herramienta para la validación de genes de importancia en el mejoramiento.

Figura 3. Amplificación de genes candidatos por PCR multiplexada usando tecnología de microfluídica (Access Array, Fluidigm, EEUU) acoplada a secuenciación de alto rendimiento por medio de tecnología Illumina.