



CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS CARPELOS Y MOLECULAR DE 3 GENOTIPOS DE ALGODÓN RESISTENTES Y UNA VARIEDAD NO RESISTENTE A TORMENTAS

Klein Lorena¹; Spoljaric Monica¹; Tcach Mauricio¹; Díaz Daniel²

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Mejoramiento y Protección Vegetal, Sáenz Peña

lklein@chaco.inta.gov.ar, 2 INTA Instituto de Genética E.A. Favret, CICVyA, Castelar

RESUMEN- Los sistemas de recolección de algodón stripers adoptado recientemente en Argentina, presentan menor costo, pero requieren mayor tiempo para realizar la tarea, por lo que son mayores los riesgos de pérdidas de algodón a campo. Se hace necesario incorporar la característica Stormproof a las variedades de buen comportamiento agronómico. El objetivo del trabajo fue caracterizar la morfología de los carpelos y la variación molecular de tres genotipos resistentes a tormentas y de la variedad Poraite INTA a la que se pretende transferir este rasgo por retrocruza. Se estudiaron las variables ángulo de apertura y grado de ondulación de los carpelos. La primera mostró diferencias significativas entre BGSP-00428 (D3) respecto de BGSP-00459 (D1), BGSP-00404 (D2) y Poraite INTA (R). Para la variable ondulación de los carpelos, BGSP-00428 exhibió el mayor grado respecto a los demás materiales evaluadas. De los 52 Microsatélites amplificados solo 17 generaron polimorfismos en los genotipos considerados. Sin embargo el número de marcadores polimórficos vario entre 13 considerando R-D1 a 8 en R-D2, pasando por un valor medio de 12 para R-D3. En función de ambas caracterizaciones el genotipo BGSP-00428, fue el que mejor expreso el carácter Stormproof, siendo el indicado para donar la característica.

Palabras-clave: *Stormproof, SSRs, Retrocruzas*

INTRODUCCIÓN

Una de las prácticas recientemente adoptadas en el cultivo de algodón en Argentina es la siembra en surcos estrechos y alta densidad de plantas por unidad de superficie. Esta técnica de producción requiere el ajuste del paquete tecnológico tradicionalmente empleado en los distanciamientos convencionales superiores a 0,75 m entre surco. Uno de los aspectos importantes es la cosecha realizada con sistemas stripper. Estos tienen menores costos operativos, pero requieren mayor tiempo para realizar la tarea, lo cual podría incrementar el tiempo comprendido entre la apertura de la cápsula y su recolección, aumentando la exposición a condiciones desfavorables. Al respecto Faircloth et al. (2004), observaron pérdidas significativas de algodón en bruto por hectárea por exposición prolongada, destacando que estas variaron en función del año agrícola, el tiempo de

exposición y la variedad. Sobre el último factor Quisenberry et al. (1981) observaron genotipos con menores pérdidas, asociadas a menor apertura de los carpelos. Esta característica fue denominada *Stormproof*. Quisenberry et al. (1980) determinaron que la heredabilidad del carácter es alta; por lo tanto es posible incorporar la resistencia a tormentas a variedades de comportamiento agronómico conocido. Para ellos es necesario diseñar estrategias eficientes de crianza que permitan la transferencia de la característica en un periodo corto. Allard (1960) destacó la metodología de retrocruzas para caracteres controlados por pocos genes. Por otro lado el estudio de la variabilidad molecular permite realizar un seguimiento del recupero del fondo genético del padre recurrente lo cual podría incrementar la eficacia de la técnica mencionada. Zhang et al. (2008) destacaron que los avances en biotecnología y genómica de algodón podrían potenciar a las técnicas convencionales. Actualmente la base de datos de algodón (CMD-Cotton Marker Database, www.cottonmarker.org) contiene casi 12000 microsatélites (SSRs) además de otros marcadores, si bien no todos ellos son polimórficos en el algodón cultivado. Por otra parte, recientemente Xiao et al. (2009) publicaron una base de datos de 2907 pares de primers que amplifican un total de aproximadamente 4000 SSRs únicos en el genoma de algodón tetraploides. El objetivo del trabajo es caracterizar la morfología de los carpelos y la variación molecular de tres genotipos resistentes a tormentas y una variedad de alta productividad llamada Poraite INTA.

METODOLOGIA

Material Vegetal

Fueron empleados 3 genotipos de algodón, obtenidos de la colección del Banco de Germoplasma de la Estación Experimental de Presidencia Roque Sáenz Peña INTA, los cuales adoptaron la siguiente denominación BGSP-00459 (D1), BGSP-00404 (D2) y BGSP-00428 (D3). Estos genotipos se caracterizan por presentar el rasgo denominado "*Stormproof*". Cabe destacar que forman parte del grupo de líneas obsoletas conservadas por dicha característica. También fue empleada la una variedad de reciente inscripción en los registros de propiedad, llamada Potaite INTA, la cual presenta excelente comportamiento agronómico y muy buena adaptación a cultivos en alta densidad, sin embargo no posee el rasgo *Stormproof*, siendo esta última denominada con la letra R.

La investigación se dividió en trabajos de campo, para la caracterización morfológica de los carpelos, y en laboratorio para la caracterización molecular. Para ello se sembró a campo los 4 genotipos (D1; D2; D3 y R) y, el sistema de siembra adoptado fue labranza cero con distanciamiento a 1 metro.

Caracterización Morfológica de los carpelos

La recolección de los capullos se realizó manualmente a fin de ciclo. El número de capullo para cada genotipo fue de 60, obtenidos de la rama fructífera número 9 posición 1. Las variables de estudio fueron: ángulo de apertura de carpelos y ondulación de los carpelos.

El instrumento de medición para la primera variable fue un semicírculo geométrico, haciendo coincidir el punto medio del mismo con el punto de inserción de todos los carpelos y la segunda mediante la observación directa siguiendo la siguiente categoría: 1) No ondulado; 2) poco ondulado; 3) ondulado.

El análisis de datos se realizó mediante el programa estadístico InfoStat, utilizando medias, coeficiente de variación, tabla de frecuencia y análisis de varianza (ANAVA).

Caracterización Molecular

La extracción de ADN a partir de hojas jóvenes de los 4 genotipos sembrados a campo. Para realizar esta actividad se utilizó el protocolo establecido por el kit DNeasy Plant Mini de Qiagen.

Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20 µL conteniendo 100 ng de ADN, 1X de buffer de PCR (20 mM; Tris-ClH pH 8,4; 50 mM ClK), 2mM de Cl₂Mg, 0,2 mM de cada dNTP, 0,20 µM de cada oligonucleótido y 1 U de Taq DNA-polimerasa (Invitrogen).

El programa de ciclado estuvo compuesto por: 1 ciclo (96°C, 6min.); 39 ciclos (94°C, 30 seg.; 55°C “-0,5°C x ciclo”, 30 seg. y 72°C, 50 seg.); 1 ciclo 72°C, 50seg.

Los productos de amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida 6% teñidos con nitrato de plata.

Los datos fueron analizados a partir de la lectura de las bandas amplificadas diferenciando los primers polimórficos con los cuales se construyó un patrón genético para los 4 genotipos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Una de las características de resistencia a tormentas (*Stormproof*) estaría asociada según Quisenberry et al. (1981) a la menor apertura de los carpelos. Los resultados obtenidos para la caracterización morfológica de dicha variable demuestra que D3 presenta el menor ángulo de apertura

147,94° mientras que D1 presenta 155,65° y D2 154,65°; por otro lado el padre recurrente Poraite INTA registro 155,82°. Estos tres últimos valores fueron significativamente mayores a D3 (Tabla 1).

Para la variable ondulación de los carpelos la frecuencia relativa de cada categoría indica que la mayor ondulación fue registrada en D3 con 88% de las capsulas en la categoría 3. En los genotipos D1 y D2 la categoría predominante fue la número 2, observándose 65% en ambas. La diferencia entre D1 y D2 está dada por las frecuencias de las categorías 1 y 3. El genotipo D1 presenta solo un 6% en categoría 3 mientras que D2 no presenta individuos en la categoría 1. En Poraite INTA (R) los individuos se dividen en partes iguales entre las categorías 1 y 2 (Tabla 2).

Para la caracterización molecular se evaluaron un total de 59 Microsatélites para los genotipos D1, D2, D3 y R, de los cuales solo 52 generaron productos de amplificación. El número de bandas por SSRs fue de 98, presentando una variación de 1 a 6 por primer, similar a la observada por Gómez (2007). En función de los datos publicados en la base de Microsatélites de algodón la cual se tomo como referencia para la lectura de las bandas en los geles de poliacrilamida (LIU et al., 2000; CMD), los pesos moleculares variaron entre 210 y 280 pb (Figura 1-A).

Solo 17 primers generaron polimorfismos para los genotipos considerados R (Poraite INTA) y D1, D2, D3. Sin embargo el número de marcadores polimórficos vario entre 13 considerando R-D1 a 8 en R-D2, pasando por un valor medio de 12 para R-D3 (Tabla 3). Los datos obtenidos a partir de los polimorfismos observados permitieron generar un patrón de diferencias entre R (Poraite INTA) y D1, D2, D3 (Figura 1-B), generando una señal específica para cada genotipo independiente del ambiente en el cual crecieron las plantas.

CONCLUSION

Para las características evaluadas, los progenitores presentaron diferencias, lo cual permitirá realizar un mejor seguimiento de la selección en retrocruzas avanzadas. El genotipo D3, fue el que mejor expresión demostró para el carácter *Stormproof*, siendo el indicado para donar la característica. Además fueron encontrados 12 marcadores presentes en R (Poraite INTA), los cuales no fueron observados en D3. Estas diferencias permitirán evaluar progenies de retrocruzas avanzadas, con previa selección agronómica incrementando la eficacia de la etapa de crianza realizada en invernadero.

BIBLIOGRAFÍA

ALLARD, R. W. **Principles of plant breeding**. New York: John Wiley, 1960.

GÓMEZ, G. M. Estimación de la Diversidad Genética Mediante Marcadores Microsatélites en Entradas de Algodón (*Gossypium hirsutum* L.) del Banco de Germoplasma INTA. IDEA XXI **Cultivos Industriales**, v. 8, n. 10 jul. 2008. p.10-13, 2007.

FAIRCLOTH, J.; STEWART, A.; HARPER, A.; EDMISTEN, K.; WELLS, R. Investigating Storm Resistance in Spindle-Picked Upland Cotton. Plant Management Network. 2004.

FANG, D.; XIAO, J.; CANCI, P. C.; CANTRELL, R. G. A new SNP haplotype associated with blue disease resistance gene in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) **Theor. Appl. Genet.** v. 120, p. 943–953, 2010.

QUISENBERRY, J. E.; DILBECK, R. E.; ROARK, B. R. Stormproof boll in upland cotton II. heritability and agronomic relationships. **Crop Sci.** v. 20, p. 387-389, 1980.

QUISENBERRY, J. E.; DILBECK, R. E. Stormproof boll in upland cotton III. Genotype-environment interaction and genetic analysis. *Crop Sci.* 21:511-514. 1981.

SHU, YE; DHILLON, S.; XIAYI, KE; COLLINS, A. R.; AY, I.,N. M. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphism. **Nucleic Acid Research**, v. 29, n.17, p. 88, 2001.

XIAO, J. K.; DAVID, D. F.; DAVID, M.; STELLY, J. Y. ; CANTRELL, R. G. New SSR Markers for Use in Cotton (*Gossypium* spp.) Improvement. **Journal of Cotton Science**, v. 13, n. 75 p.157, 2009.

ZHANG, H.-B.; Y. LI; B. WANG; P. W. CHEE. Recent advances in cotton genomics. **International Journal of Plant Genomics** 2008. 20 p.

Tabla 1: Ángulo de apertura de los carpelos de tres genotipos del banco de germoplasma caracterizados como *Stormproof* (D1, D2, D3), y una variedad de comportamiento agronómico conocido Poraite INTA(R). Letras distintas indican diferencias significativas al 5 %.

Genotipos	Ángulo de apertura de carpelos, promedio de 60 capsulas
D3	147,94 A
D2	154,65 B
R	155,82 B
D1	155,88 B
CV	3,54

Tabla 2: Frecuencias Relativas en el grado de ondulación de los carpelos, clasificados en tres categorías para tres genotipos del banco de germoplasma caracterizados como *Stormproof* (D1, D2, D3), y una variedad de comportamiento agronómico conocido Poraite INTA (R). Medido a partir de un N° total de 60 capsulas.

Categoría	Genotipos			
	D1	D2	D3	R
1	29%	0%	0%	47%
2	65%	65%	12%	53%
3	6%	35%	88%	0%

Tabla 3: Número de marcadores amplificados a partir de 17 Microsatélites (SSRs) en tres genotipos del banco de germoplasma caracterizados como *Stormproof* (D1, D2, D3), y una variedad de comportamiento agronómico conocido R: Poraite INTA.

Genotipo	Nº Primers Polimórficos	Nº marcadores polimórficos	Nº marcadores Monomórficos
R	0	0	0
D1	10	13	13
D2	7	8	16
D3	8	12	11

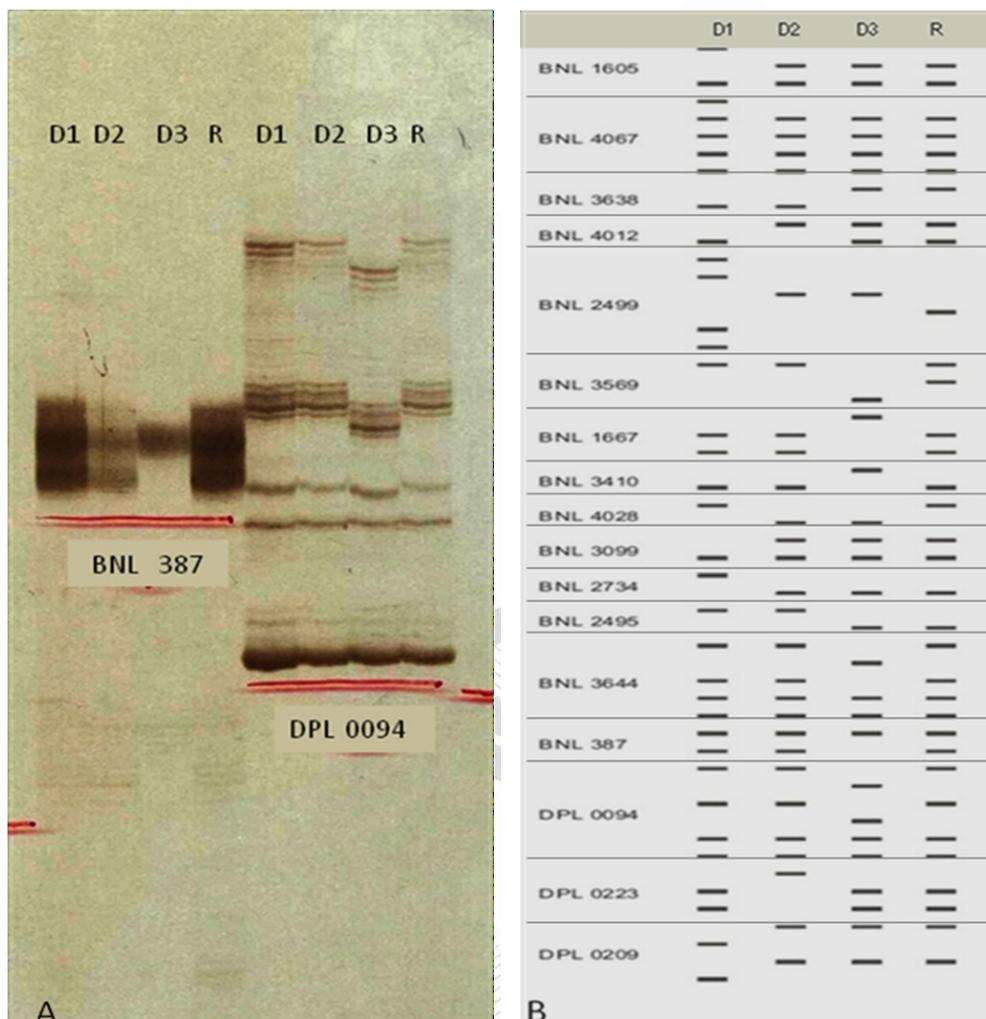


Figura 1: A-Amplificación de 2 pares de primers SSRs BNL 387 y DPL 0094 para tres genotipos del banco de germoplasma caracterizados como *Stormproof* (D1, D2, D3), y una variedad de comportamiento agronómico conocido Poraite INTA. B-Patrón molecular construido con marcadores SSRs obtenidos a partir de 17 primers, los que representan el nivel de polimorfismo entre R (Poraite INTA y tres genotipos del banco de germoplasma del INTA D1, D2 y D3).



Figura 2: Criterio de clasificación por categorías del grado de ondulación de los carpelos