



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Agronomía. Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE MARCADORES MOLECULARES Y CARACTERES FENOTÍPICOS (MORFO-FISIOLÓGICOS Y AGRONÓMICOS) RELACIONADOS CON TOLERANCIA A ESTRÉS HÍDRICO, EN LÍNEAS RECOMBINANTES CON SUSTITUCION DE CROMOSOMAS (RCSLs) DE CEBADA Y LOS GENOTIPOS HARRINGTON Y CAESAREA 26-24.**

**ASSOCIATION ANALYSIS OF MOLECULAR MARKER AND PHENOTYPIC (MORPHO-PHYSIOLOGICS AND AGRONOMICS) TRAITS RELATED TO WATER STRESS TOLERANCE IN CHROMOSOME SUBSTITUTION LINES (RCSLs) AND GENOTYPES HARRINGTON AND CAESAREA 26-24.**

DALMA GERALDINE CASTILLO ROSALES

CONCEPCIÓN-CHILE

2011

Profesor Guía: Erick Zagal Venegas

Dpto. de suelos, Facultad de agronomía

Universidad de Concepción

## RESUMEN

De una población inicial de 80 líneas recombinantes con sustitución de cromosomas, se seleccionaron según su respuesta a condiciones ambientales contrastantes, 24 RCSLs las cuales fueron evaluadas durante las temporadas 2007/08 y 2008/09 en Cauquenes (secano) y Santa Rosa (riego). Los caracteres evaluados fueron conductancia estomatica (gs), concentración de carbohidratos solubles en tallo en anthesis (CSTa) y madurez (CSTm), discriminación isotópica de  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), materia seca total (DM), peso hectolitro (PH), altura de planta (AP), índice de cosecha (IC), granos/espiga (GPE), peso de mil granos (PMG) y rendimiento final (GY).

Bajo los objetivos de determinar la diversidad génica derivada de la introgresión de *H. spontaneum*, identificar y establecer la asociación entre marcadores moleculares del tipo SSR con caracteres morfofisiológicos y agronómicos relacionados con la tolerancia a estrés hídrico y además identificar genes candidatos o secuencias génicas relacionadas con tolerancia a dicho estrés, se realizaron estudios de análisis cluster, asociación de SSR con caracteres relacionados con tolerancia a estrés hídrico, determinación del aporte génico de *H. spontaneum* y un estudio de la expresión génica de CST entre individuos contrastantes.

El **análisis cluster** de las 24 RCSLs y cv. Harrington, en condiciones de sequía, da cuenta de la existencia de 3 grupos genotípicos con una alta variabilidad dentro de cada subgrupo (76%), así como también entre los tres grupos (24%). En los grupos 1 y 2 se presentan líneas tolerantes y susceptibles a la condición de sequía. Esta situación podría deberse a que los segmentos de material génico proveniente de *H. spontaneum* son coincidentes. Al analizar dichas introgresiones fue posible determinar que algunas de ellas se presentan solo en las RCSLs 2, 53 y 89, reportadas como susceptibles y se identifican con los marcadores bmag0013, bmag353, bmag310, bmag500, bmag173, bmac18, bmac40 y bmac507 en los cromosomas 3, 4, 6 y 7. Los marcadores mencionados también se presentan en las líneas tolerantes, sin embargo, en ese caso no corresponden a introgresiones, sino que a material genético heredado de Harrington, (*H. vulgare*). El estudio de **asociación marcadores moleculares/caracteres morfofisiológicos y agronómicos** se realizó con un total de 60 SSRs, usando GLM implementado en el programa TASSEL. Como resultado se identificaron 30 regiones cromosómicas asociadas con caracteres implícitos en los mecanismos de tolerancia a estrés hídrico y que coinciden además con QTLs reportados para los mismos caracteres por diversos autores. Así fue posible determinar 8 asociaciones con AP, 6 con PH y DM, 7 asociaciones con IC, 3 con GPE, 4 con GY, 2 con PMG, y 3 con CSTm. También se analizó el **aporte genético de H.**

***spontaneum*** puesto que se postula que la introgresión de su genoma tendría efectos sobre características que confieren adaptabilidad o tolerancia al estrés abiótico, en particular a la sequía. Las observaciones realizadas en este análisis, permiten concluir que el aporte de *H. spontaneum* resultó negativo para AP, reduciéndola aproximadamente 16,7%, ocurriendo lo mismo con PMG, MS y CSTm que se reducen en un 8,49%, 57,42 y 46,43% respectivamente, lo cual resulta favorable para el desarrollo de estas líneas bajo condiciones de estrés hídrico. Por otro lado, *H. spontaneum* constituyó un aporte positivo, para los caracteres PH (22,17%), IC (29,28%), GPE (79,26%) y RG (43,54%). Lo cual ratifica la riqueza génica de las RCLSs posible de ser usada como modelo para estudios fisiológicos y genéticos. Finalmente el **análisis de expresión génica** Las grandes diferencias entre los resultados de expresión de las líneas identificadas como tolerantes o susceptibles. Las líneas tolerantes (RCLSs 76 y 78) sometidas a estrés hídrico fueron capaces de recuperar la expresión de los caracteres considerados a niveles similares al obtenido en ambientes favorables, lo cual podría deberse a que se activarían mecanismo fotoprotectores, contrario a lo que pasó con las líneas susceptibles (RCLSs 53 y 89) que no fueron capaces de recuperar sus niveles de expresión bajo condiciones de estrés, minimizando su capacidad fotosintética.

#### **ABSTRACT**

From an initial population of 80 recombinant chromosome substitution lines (RCLSs), 24 lines were selected according to their evaluation in two contrasting environmental conditions, Cauquenes (rainfed) and Santa Rosa (irrigation) during the seasons 2007/08 and 2008/09. The traits evaluated were stomatal conductance (sc), concentration of soluble carbohydrates in the stem at anthesis (SCSa) and maturity (SCSm), isotope discrimination  $^{13}\text{C}$  ( $\Delta^{13}\text{C}$ ), total dry matter (DM), hectoliter weight (HW), plant height (PH), harvest index (HI), grains per ear (GPE), thousand kernel weight (TKW) and grain yield (GY).

The objectives were determining the genetic diversity resulting from the introgression of *H. spontaneum*, identify and establish the association between SSR molecular markers and morphophysiological and agronomic traits related to tolerance to water stress and identify candidate genes or gene sequences related to tolerance to this stress. Studies of cluster analysis, association of SSR with traits related to drought stress tolerance, determination of genetic contribution from *H. spontaneum* and a study of the CST gene expression between contrasting individuals, were performed.

Cluster analysis of the 24 RCLSs and cv. Harrington, under drought conditions, accounts for the existence of 3 groups with a high genotypic variability (76%) within each subgroup, as well as between the three groups (24%). In groups 1 and 2 are tolerant and susceptible lines to drought conditions. This could be due to segments of genetic material from *H.*

*spontaneum* are coincident in lines present in both groups. By analyzing these introgressions was possible to determine that some of them occur only in the RCSLs 2, 53 and 89, reported as susceptible and are identified with markers bmag0013, bmag353, bmag310, bmag500, bmag173, bmac18, bmac40 and bmac507 on chromosomes 3, 4, 6 and 7, respectively. Mentioned markers are also present in the tolerant lines, however, in this case the alleles inherited were from Harrington (*H. vulgare*). The association between molecular markers / morphophysiological and agronomic traits was conducted with a total of 60 SSRs, using GLM implemented in TASSEL. As a result were identified 30 chromosomal regions associated with characters related with the mechanisms of tolerance to water stress and also coincide with QTLs reported for the same characters by different authors. Thus it was possible to determine 8 associations with PH, 6 with HW and DM, 7 with HI, 3 with GPE, 4 with GY, 2 with TKW, and 3 with SCSm. We also analyzed the genetic contribution of *H. spontaneum* as it is postulated that introgression of its genome would have effects on adaptability or characteristics that confer tolerance to abiotic stress, particularly drought. Base on the results of this analysis, we can conclude that the contribution of *H. spontaneum* was negative for plant height, ie the reduced about 16.7%, which is favorable for the development of these lines under water stress conditions, since in this way would make more efficient use of water.

Base on the results of this analysis, we can conclude that the contribution of *H. spontaneum* was negative for plant height, with reduction of 16.7%, the same thing happened with TWG, DM, SCSm wich were reduced 8.49%, 57.42% y 46.43% respectively which resulted favorable for the development of these lines under water stress conditions. On the other hand, *H. spontaneum* was a positive contribution to the character HW (22.17%), HI (29.28%), GPE (79.26%) and GY (43.54%). This confirms the genetic wealth of RCSLs that can be used as a model for physiological and genetic studies.

Finally in the analysis of gene expression, there were remarkable differences between the lines identified as tolerant and susceptible. Tolerant lines (RCSLs 76 and 78) under stress, were able to recover optimum levels of the trait evaluateb which could be due to the activation of photoprotective mechanisms. In contrast, in susceptible RCSLs were unable to recover from the stress reducing their photosynthetic capacity to a minimum. As in other studies *H. spontaneum* showed a good tolerance to stress, specifically maintaining the capacity of the plant to adjust to the lack of water, since their rate of photosynthesis is less sensitive to declining leaf  $\Psi_w$ , so this species could be suggested for be used in improving adaptation to water stress of barley as a new source of genes.