

BASES MOLECULARES DE LA FERTILIDAD DE LA ESPIGA EN TRIGO PAN

María Pía Alonso

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de
DOCTORA en CIENCIAS AGRARIAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA
Unidad Integrada Balcarce

Balcarce, Argentina

Marzo de 2018

BASES MOLECULARES DE LA FERTILIDAD DE LA ESPIGA EN TRIGO PAN

María Pía Alonso

Dr., Ing. Agr. Ana Clara Pontaroli

Directora

BASES MOLECULARES DE LA FERTILIDAD DE LA ESPIGA EN TRIGO PAN

María Pía Alonso

Aprobada por:

Dr., Ing. Agr. Ana Clara Pontaroli

Directora

Dra. Ana María Castro

Jurado

Dra. Giselle Martínez-Nöel

Jurado

Dr. Marcelo Helguera

Jurado

A mis bellos sobrinos.

AGRADECIMIENTOS

A la Ana Clara Pontaroli por ser una gran guía a nivel académico y personal, una directora y una gran amiga.

Al Grupo Trigo Balcarce de la EEA INTA Balcarce por su compañía y por haber brindado los recursos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A mis papás, hermanos y cuñados que me tocaron en suerte, que hacen de mi vida una bella vida.

A Francisco, mi compañero, mi amor.

A esos amigos, amigos/colegas y amigos/mentores por su contención y acompañamiento durante todo este período, especialmente a Nadia Mirabella, “mi persona” y mi gran compañera de trabajo; a Juan Panelo y a Fernandito Aramburu, por esas horas y horas de trabajo codo a codo.

A Leo Vanzetti, por su asesoramiento a la distancia, tanto en técnicas como en “tácticas”.

A los jurados que evaluaron esta tesis, que realizaron aportes para que este producto se convierta en un mejor producto.

Finalmente, a todas aquellas personas que dedicaron algo de su tiempo para que este trabajo saliera adelante.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

Alonso MP; Panelo JS, Abbate PE; Pontaroli AC. Asociación entre la variación alélica para genes de enanismo y la fertilidad de la espiga en una población biparental de trigo pan. XLIII Congreso Argentino de Genética. Octubre 2014. Bariloche, Argentina.

Alonso MP; Abbate PE; Panelo JS; Mirabella NE; Pontaroli AC. Sink/source limitation analysis in wheat commercial cultivars and unselected lines. International Wheat Conference. Septiembre 2015. Sydney, Australia.

Panelo JS, Alonso MP, Abbate PE, Bernardo AM, Pontaroli AC. Identificación de marcadores moleculares asociados con la fertilidad de la espiga en trigo pan. XLIV Congreso Argentino de Genética. 13 al 16 de Septiembre 2015, Mar del Plata, Argentina.

Alonso, M. P., Abbate, P. E., Mirabella, N. E., Merlos, F. A., Panelo, J. S., Pontaroli, A. C. (2018). Analysis of sink/source relations in bread wheat recombinant inbred lines and commercial cultivars under a high yield potential environment. *European Journal of Agronomy*, 93, 82-87.

Alonso MP, Mirabella NE, Panelo JS, Cendoya, MG, Pontaroli AC. Selection for high spike fertility in bread wheat increases grain yield's genetic progress and stability. *Euphytica* (en revisión)

El Instituto del CONICET de La Plata (IGEVE) entregó los datos de la genotipificación mediante el "chip" de SNPs Axiom Wheat Breeder's Genotyping Array el 6 de mayo de 2017 (1 año y 5 meses después de lo acordado), motivo por el cual se debió postergar la publicación de gran parte de los resultados de este estudio hasta después de la presentación de este manuscrito.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	X
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIV
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS PARTICULARES	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Material vegetal	8
Experimentos de campo	8
Genotipificación y análisis de QTL	12
Diseño y puesta a punto de marcadores moleculares asociados a la FE	13
RESULTADOS	16
Condiciones climáticas y fenología	16
Fertilidad de espiga, rendimiento y caracteres asociados	18
Determinación de componentes de varianza y heredabilidad	23
Correlaciones genéticas entre caracteres	24
Genotipificación y construcción del mapa de ligamiento	25
Análisis de QTL	31
Diseño de marcadores	36
Puesta a punto de marcadores desarrollados	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES	48
BIBLIOGRAFÍA	49
APÉNDICE	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Superficie sembrada (en ha) y producción (en toneladas) de trigo mundial en el período 1986-2016. (Fuente: FAOSTAT).....	2
Figura 2. Distribución de frecuencia de fechas de floración y madurez fisiológica (barras a la izquierda y a la derecha de la figura, respectivamente), medidas en días julianos, de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo) para los ciclos agrícolas 2013 (rojo), 2014 (azul) y 2015 (verde).....	17
Figura 3. Distribución de frecuencia de días de llenado (calculados como días comprendidos entre floración y madurez fisiológica) de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo) para los ciclos agrícolas 2013 (rojo), 2014 (azul) y 2015 (verde).	18
Figura 4. Distribución de frecuencia de la fertilidad de espiga (FE) de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo) para los ciclos agrícolas 2013 (rojo), 2014 (azul) y 2015 (verde).	19
Figura 5. Distribución de frecuencia de los Mejores Predictores Lineales Insesgados (“Best Linear Unbiased Predictors” - BLUP) de fertilidad de espiga (FE) de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo)	23
Figura 6. Mapa de ligamiento de la población construido a partir de los 857 marcadores SNPs. En barras a la derecha de cada cromosoma, QTL para los caracteres Fertilidad de Espiga (FE), Rendimiento (Rto), Peso de mil granos (PMG), Número de granos por m ⁻² (NG), Altura de planta, Días a floración (DAF). Las barras de error indican el intervalo de confianza del QTL hasta 2 unidades de LOD menos hacia ambos lados del pico con máximo LOD.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedios de temperatura media y radiación en los períodos “Siembra a floración” y “Floración a madurez fisiológica” para los tres años de evaluación fenotípica. Las medias históricas fueron calculadas para el período 1983/2015 para Balcarce.....	16
Tabla 2. Mediana, mínimo y máximo para las RIL y medias de los parentales Baguette 10 (B10) y Klein Chajá (KCJ) para los caracteres evaluados durante los ciclos agrícolas 2013, 2014 y 2015. PMG: peso de mil granos; NG: número de granos por m ² ; FE: fertilidad de espiga; PH: peso hectolítrico; NG/Esp: número de granos por espiga; PSE: peso seco de espiga sin grano. DE: desvío estándar.....	22
Tabla 3. Componentes de varianza de rendimiento, peso de mil granos (PMG), número de granos m ⁻² (NG), altura, peso hectolítrico (PH) y fertilidad de espiga (FE). σ_{ge}^2 : varianza genética; σ_{gea}^2 : varianza de la interacción genotipo x ambiente; σ_{res}^2 : varianza del error; h^2 : heredabilidad en sentido estricto.	24
Tabla 4. Diagonal hacia abajo: correlaciones genéticas estimadas a partir de los BLUPs entre los caracteres FE (fertilidad de espiga), Altura de planta, PMG (peso de mil granos), NG (número de granos m ⁻²), PH (peso hectolítrico) y Rendimiento. Diagonal hacia arriba: significación de las correlaciones: *:p-valor<0,05; ns: no significativo.	25
Tabla 5. Distribución de los 857 marcadores SNP utilizados para la construcción del mapa de ligamiento en los 21 cromosomas de trigo pan, número de loci asignados a cada cromosoma, longitud total, espaciamiento promedio y máximo en centiMorgan (cM).....	31
Tabla 6. QTL para altura de planta, días a floración (DAF), fertilidad de espiga (FE), peso de mil granos (PMG), número de granos por m ⁻² (NG) y rendimiento (Rto) detectados en la población B10xKCJ. ^a Marcador más cercano al pico con máximo LOD del QTL; ^b Posición genética del marcador; ^c LOD de pico; ^d Intervalo de confianza del QTL: intervalo de mapa que incluye hasta -2 unidades de LOD hacia ambos lados del pico de LOD; ^e Alelo parental que contribuye a incrementar el valor del carácter: Baguette 10 (B10) o Klein Chajá (KCJ); ^f Efecto aditivo: Altura de planta en cm; DAF en días; FE en número de granos/peso seco de espiga sin granos; PMG en g; NG en número de granos por m ⁻² ; Rto en g m ⁻² ; ^g Proporción de la varianza	

aditiva explicada por el modelo; ^h Proporción de la varianza fenotípica total explicada por todos los QTL para cada carácter.	33
Tabla 7. Posición en el mapa genético en cM (centimorgan) y distancia física del intervalo de confianza (intervalo de mapa que incluye hasta -2 unidades de LOD hacia ambos lados del pico con máximo LOD) en Mpb (mega pares de bases) y distancia física del pico con máximo LOD del QTL para los cuatro QTL de FE.	35
Tabla 8. Marcadores alelo-específicos desarrollados para cada uno de los marcadores SNP de los intervalos de confianza de los cuatro QTL de fertilidad de espiga. En negrita, marcadores SNP del pico de LOD. ^a identificación del iniciador “forward”; ^b identificación del iniciador “reverse”; ^c identificación del iniciador anidado, indicando con letras F/R (“forward/reverse”) y polimorfismo al cual es específico (C/T/G/A); ^d Sitio de reconocimiento y corte de la enzima de restricción.	38
Tabla 9. Temperatura de annealing determinada para cada marcador del QTL _{ife.bce.2DL} y tamaño de fragmentos del amplicón homeólogo-específico y del fragmento del amplicón alelo-específico. Ambos tamaños se basan en la secuencia de la base de datos de EnsemblPlants (Ref.Seq V.1; variedad Chinese Spring). Alelo específico de uno de los dos progenitores, Baguette 10 (B10) o Klein Chajá (KCJ). N/A: no aplica. TD: touchdown.	41

RESUMEN

El trigo pan es uno de los cultivos de granos más importantes del mundo. Uno de los principales objetivos del mejoramiento genético a nivel mundial es el aumento del rendimiento en grano. El rendimiento es un carácter complejo, controlado por un elevado número de genes, con alta influencia ambiental e interacción genotipo por ambiente. Sumado a esto, el trigo es una especie alohexaploide de origen muy reciente (~8000 años) y por esto, las relaciones entre genes homeólogos son complejas. Por lo tanto, el desafío de continuar mejorando sostenidamente el rendimiento requiere de la identificación de caracteres asociados al rendimiento de fácil medición y del trabajo interdisciplinario (ecofisiología, mejoramiento genético tradicional, genética molecular, bioinformática, estadística, entre otras).

En este sentido, el objetivo del proyecto fue identificar regiones genómicas asociadas a la fertilidad de espiga (FE), un carácter de fácil medición a madurez, que está fuertemente asociado al número de granos por superficie, el principal determinante del rendimiento en trigo pan. Para esto, se utilizó una población de 146 líneas endocriadas recombinantes (RIL) derivadas del cruzamiento entre Baguette 10 (madre de alta FE) y Klein Chajá (padre de baja FE). Se realizaron tres ensayos a campo, durante los ciclos agrícolas 2013, 2014 y 2015, para determinar la FE, como así también el rendimiento y sus componentes para cada una de las líneas y sus parentales, además de otros caracteres de interés agronómico. Se analizó la correlación genética entre caracteres medidos y se estimaron los componentes de varianza de los mismos para calcular su heredabilidad en sentido estricto. Un grupo de 126 RIL fue genotipificado con un “chip” comercial (Axiom® 35K SNP Wheat Breeder’s Array, Affimetrix). Se construyó un mapa de ligamiento con 857 marcadores SNP en 80 RIL, y se realizó un mapeo de QTL para los caracteres medidos a campo.

La distribución de frecuencia de la FE para la población mostró una forma acampanada para los tres años de evaluación fenotípica, y segregación transgresiva hacia ambos lados de la distribución. La heredabilidad en sentido estricto del carácter fue de 0,84, con sólo un 11% de varianza total debida a la interacción genotipo x ambiente. La FE estuvo positivamente asociada al número de granos por unidad de superficie ($r=0,48$) mientras que estuvo negativamente asociada al peso de mil granos ($r=-0,49$). El rendimiento estuvo asociado al número de granos por superficie, mientras que no presentó asociación con el peso de mil granos.

Se encontraron cuatro regiones genómicas (QTL) asociadas a la FE, en los cromosomas 1B, 2D, 5B y 7A. En total, estas regiones explicaron un 26% de la variación total en FE, no hubo interacción QTL por año y no hubo ninguna interacción entre QTL ($p>0,05$). Se desarrollaron marcadores homeólogo-específicos y alelo-específicos para cada uno de los marcadores contenidos en el intervalo de confianza de cada uno de los QTL. Cinco de los seis marcadores desarrollados para el QTL del cromosoma 2D fueron probados en un grupo de individuos de la población genotificada, pero no fue posible amplificar el polimorfismo correspondiente de manera consistente. Debido al amplio intervalo de mapa de las regiones genómicas que mostraron asociación con la FE, no fue posible avanzar en la búsqueda de genes candidatos para el carácter. No obstante, los resultados del presente trabajo constituyen un avance significativo en el establecimiento de las bases genético-moleculares de la fertilidad de la espiga, escasamente conocidos hasta el momento.

Palabras Clave: Trigo, Población biparental; Fertilidad de espiga; *Locí* de caracteres cuantitativos (QTL).

ABSTRACT

Bread wheat is one of the most important crops in the world. One of the main breeding goals in wheat is increasing grain yield. Yield is a complex trait, controlled by a high number of genes, with high environmental influence and genotype x environment interaction. Wheat is also an allohexaploid species of very recent origin (~8000 years), and for this reason, relationships among homeologous genes are complex. Therefore, the challenge of continuing to improve grain yield steadily requires the identification of easy-to-measure, yield-associated traits and an interdisciplinary focus that comprises ecophysiology, traditional breeding, molecular genetics, bioinformatics, and statistics, among others.

In this sense, the objective of this study was to identify genomic regions associated with spike fertility (SF), a trait easily measured at maturity, which is strongly associated with the number of grains per unit area, the main determinant of yield in bread wheat. For this, a population of 146 recombinant inbred lines (RIL) derived from the cross between Baguette 10 (high SF) and Klein Chajá (low SF) was used. Three field trials were conducted during 2013, 2014 and 2015 growing seasons, to determine the SF, yield and its components, for each line and their parents, as well as other traits of agronomic interest. The genetic correlation between the measured traits was analyzed and their variance components were estimated in order to calculate their narrow-sense heritability. A group of 126 RIL was genotyped using a commercial "chip" (Axiom® 35K SNP Wheat Breeder's Array, Affimetrix). A linkage map was constructed with 857 SNP markers in 80 RIL and, for the measured traits, QTL mapping was performed.

A bell-shaped distribution of SF was observed in the RIL population in all three years of phenotypic evaluation showing transgressive segregation towards both sides of the distribution. The narrow-sense heritability of SF was 0.84, with only 11% of total variance due to genotype x environment interaction. Spike fertility was positively

associated with the number of grains per unit area ($r = 0.48$) while it was negatively associated with thousand grain weight ($r = -0.49$). Grain yield was associated with the number of grains per unit area, while it was not associated with thousand grain weight.

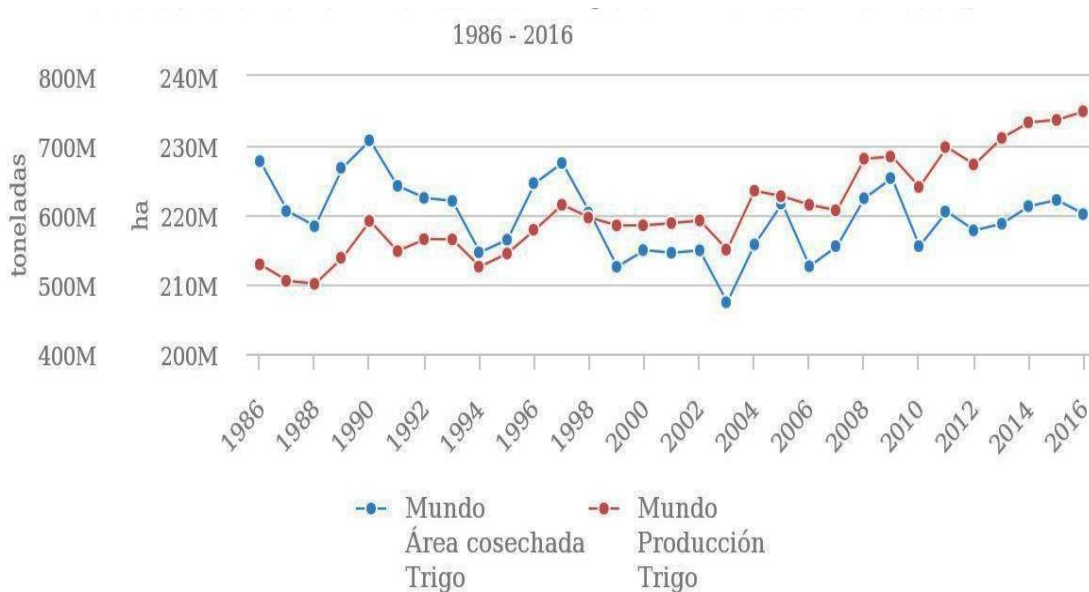
Four genomic regions (QTL) associated with SF were found on chromosomes 1B, 2D, 5B and 7A. In total, these regions explained 26% of the total variation in SF, there was no QTL per year (environment) interaction and there was no interaction between QTL ($p < 0.05$). Homeologous-specific and allele-specific markers were developed for each analyzed SNP included in the confidence interval of each QTL. Five of the six markers developed for the QTL of the 2D chromosome were tested in a group of individuals from the genotyped population, but it was not possible to amplify the corresponding polymorphism consistently. Due to the wide map range in the genomic regions associated with SF, it was not possible to advance in the search of candidate genes. Nevertheless, the results of this work constitute a significant advance in the establishment of the genetic-molecular bases of SF, scarcely known until now.

Key words: Wheat; Biparental population; Spike Fertility; Quantitative Trait *Loci* (QTL).

INTRODUCCIÓN

El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cultivos de mayor importancia, con una producción de 1127 millones de toneladas producidas en el 2016, con un total de 244 millones de ha sembradas en el mundo y con 5,3 millones de ha y una producción de 18 millones de toneladas en Argentina (FAOSTAT, 2017). Dado que se prevé un aumento en su demanda global para asegurar la alimentación y la nutrición de la humanidad, y bajo un escenario de cambio climático (CIMMYT, 2017), difícilmente pueda cubrirse ésta con un incremento en la superficie cultivada y se convierte en la alternativa más evidente para lograrlo el aumento en el rendimiento potencial. De hecho, este es uno de los objetivos centrales del mejoramiento genético de trigo a nivel mundial. En los últimos 40-50 años se ha alcanzado un progreso significativo en el potencial de rendimiento del cultivo a través del mejoramiento genético convencional (Rajaram 2005; Fischer, 2014). Sin embargo, dicho progreso se ha estancado en los últimos años (Reynolds y Eaton 2009; Reynolds *et al.* 2011; Fischer, 2014) (Fig. 1; FAOSTAT, 2017): la superficie utilizada para el cultivo de este cereal ha tenido fluctuaciones, pero se ha mantenido relativamente constante, mientras que el rendimiento ha ido en aumento a través de los años aunque con poco avance en relación a lo necesario para cubrir las necesidades de la población mundial. Esto puede atribuirse, por un lado, a que el rendimiento es un carácter complejo, gobernado por muchos genes y altamente influenciado por el ambiente. Por otro lado, la dilucidación del control genético del carácter se ve dificultada por el hecho de que el trigo es una especie alohexaploide ($2n=6x=42$) cuyo genoma nuclear, de gran tamaño (17 Gpb) está compuesto por tres genomas diploides ancestrales muy emparentados (genomas AABBDD) y es de origen muy reciente (Kilian *et al.* 2009). Esto hace que muchos de los genes homeólogos sean aún funcionales, y actualmente estén sufriendo un proceso de pseudogenización activo, por actividad de elementos transponibles, reparaciones de rupturas de la doble cadena de ADN (Wicker *et al.* 2011) o por modificaciones posteriores a la duplicación de genes (Bartos *et al.* 2012).

Por otro lado, se estima que alrededor del 85% del genoma está compuesto por elementos transponibles, algunos de los cuales están repetidos cientos de veces en el genoma (Paux *et al.* 2012). Esto hace que la dilucidación de la función génica y el desarrollo de marcadores moleculares sean sumamente complejos (Paux *et al.* 2012). Pese a estos obstáculos debe avanzarse, por un lado, en la identificación de criterios de selección eficientes y específicos, de fácil aplicación en el mejoramiento y, por otro, en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares de la determinación del rendimiento.



Source: FAOSTAT (dic. 22, 2017)

Figura 1 Superficie sembrada (en ha) y producción (en toneladas) de trigo mundial en el período 1986-2016. (Fuente: FAOSTAT).

El rendimiento de trigo está definido principalmente por el número de granos por unidad de superficie (NG) y, en menor medida, por el peso individual de los mismos (PG). Consecuentemente, las diferencias en rendimiento están mayormente explicadas por diferencias en el NG (Slafer *et al.* 1990, Borrás *et al.* 2004; Shearman *et al.* 2005; Elía *et al.* 2016, Ferrante *et al.* 2017, Lynch *et al.* 2017) y los esfuerzos del mejoramiento genético para aumentar el rendimiento están principalmente enfocados en este carácter (Austin, 1982; Slafer y Andrade, 1989; Slafer *et al.*, 1990). Sin

embargo, existe una gran limitación para este abordaje, principalmente en generaciones tempranas de un programa de mejoramiento, donde se cuenta con poca cantidad de semilla como para poder realizar una buena determinación de este carácter (al igual que cualquier carácter determinado por unidad de superficie). Además, el NG tiene baja heredabilidad y una alta interacción con el ambiente, sumado a que suele tener una relación negativa con el PG.

En ausencia de limitaciones hídricas o nutricionales, Fischer (1983) propuso que el NG, a su vez, deriva del producto entre (1) la tasa de crecimiento del cultivo durante el período de crecimiento activo de la espiga, (2) la duración de dicho período, (3) la partición de asimilados a la espiga durante dicho período, y (4) un factor de fertilidad de la espiga (FE; cociente entre el número de granos y el peso de la espiga sin granos). La FE ha sido estudiada profusamente desde el punto de vista ecofisiológico (Stapper y Fischer 1990; Abbate *et al.* 1998, 2007; Miralles *et al.* 1998; González *et al.* 2005, 2011, 2014; Serrago *et al.* 2008; Foulkes *et al.* 2015). En este sentido, al analizar las diferencias de rendimiento entre cultivares argentinos, Abbate *et al.* (1998) encontraron que la FE explicó la mayor parte de esas diferencias con un amplio rango de variación entre cultivares. Shearman *et al.* (2005) también observaron diferencias importantes en la FE entre cultivares del Reino Unido. Acreche *et al.* (2008), al estudiar las bases fisiológicas de la ganancia genética en el rendimiento de trigos del Mediterráneo en España, concluyeron que uno de los principales factores responsables fue el incremento de la FE, así como Ferrante *et al.* (2017) encontró, comparando cultivares mediterráneos tradicionales y modernos, que las diferencias en NG (y así del rendimiento) estaban asociadas principalmente a las diferencias en FE, predominantemente en condiciones de alto potencial de rendimiento. Foulkes *et al.* (2015) al analizar una población de trigos primaverales del CIMMYT, observaron una relación positiva entre la FE y el NG. Más aún, Abbate *et al.* (2007, 2013) y Mirabella *et al.* (2016) encontraron que las diferencias en la FE de un grupo de cultivares resultaron ser estables entre ambientes, inclusive aquellos sub-potenciales. A raíz de

estas evidencias comenzaron a abordarse estudios desde el punto de vista genético-molecular y del mejoramiento genético, considerando a la manipulación de la FE como una vía para aumentar el rendimiento (Ghiglione *et al.* 2008; Slafer *et al.* 2009, 2015; Foulkes 2009; Sylvester-Bradley *et al.* 2009 en Reynolds y Eaton 2009; Mirabella *et al.* 2010, 2016; Pontaroli *et al.* 2011; González *et al.* 2011, 2013; García *et al.* 2014; Martino *et al.* 2015, Terrile *et al.* 2017). Como se mencionó anteriormente, existe una relación negativa entre NG y PG, y por ende es esperable que exista una relación negativa entre la FE y el PG. Con respecto a esto, algunos autores han reportado dicha asociación (Ferrante *et al.* 2012, 2015, Gonzalez-Navarro *et al.* 2016, Joudi *et al.* 2016, Terrile *et al.* 2017), mientras que otros autores no la han observado (Fischer 2011, Ferrante *et al.* 2017, Gonzalez *et al.* 2014, Elía *et al.* 2016). Por otra parte, varios autores han encontrado también una relación negativa entre la FE y el peso seco de la espiga en floración (Dreccer *et al.* 2009, Ferrante *et al.* 2012, Terrile *et al.* 2017). Dado que en la literatura está ampliamente citada la relación positiva entre el peso seco de la espiga en floración y el NG (Slafer *et al.* 1990, González *et al.* 2011; Ferrante *et al.* 2013; Dreccer *et al.* 2014, Slafer *et al.* 2015), la antes mencionada relación negativa podría verse reflejada en una baja asociación de la FE con el NG.

Durante los últimos años, el Grupo Trigo de la Unidad Integrada Balcarce (UIB; FCA, UNMdP – EEA Balcarce, INTA) ha realizado trabajos de investigación con la intención de conocer las bases genéticas de la FE y su utilización como criterio de selección en el contexto de un programa de mejoramiento. Como resultado, se ha observado que la FE puede estimarse de manera sencilla desde generaciones tempranas, tanto en forma visual (Pontaroli *et al.* 2011) como a partir de una muestra pequeña de espigas tomadas en madurez (Abbate *et al.* 2013), y que el carácter está controlado por varios genes, con baja interacción genotipo x ambiente y moderada heredabilidad (Mirabella *et al.* 2010, 2016; Martino *et al.* 2015). Otros autores, sin embargo, han encontrado que la FE presenta moderada interacción genotipo x ambiente, asociada principalmente a estreses abióticos durante el período crítico

(Terrile *et al.* 2017). Asimismo, resultados preliminares indican que la selección por alta FE incrementa el NG en generaciones tempranas (Martino *et al.* 2015). Además, estudios de FE en poblaciones segregantes, tanto en Balcarce como en otras partes del mundo, han mostrado que el carácter presenta segregación transgresiva (García *et al.* 2014, Martino *et al.* 2015, Guo *et al.* 2016 [en trigo candeal], Mirabella *et al.* 2016); es decir, la ocurrencia de una fracción de individuos que presentan valores fenotípicos más extremos que los de sus parentales, tanto en dirección positiva como negativa (Rieseberg *et al.* 1999). Este es un punto relevante a tener en consideración para la utilización de este carácter, ya que la selección de los fenotipos extremos (en este caso, los positivos) puede llevar a un aumento en la FE y, por ende, en el rendimiento en grano (Slafer *et al.* 2015).

Si bien en principio parece factible aplicar selección por alta FE en el mejoramiento genético por rendimiento de grano en trigo, sería altamente deseable avanzar en el conocimiento de las bases moleculares del carácter. Esto permitiría desarrollar marcadores para facilitar la planificación de cruzamientos controlados y la selección de materiales genéticos con alta FE. En este sentido, el análisis/mapeo de Loci de Caracteres Quantitativos (QTL) permitiría identificar asociaciones estadísticas entre la variabilidad fenotípica y la variación encontrada por marcadores moleculares (Haley y Knott, 1992; Gutierrez *et al.* 2015) en una población dada. El Grupo Trigo de la UIB ha realizado estudios tendientes al desarrollo de dichos marcadores. Así, se analizaron marcadores microsatélites y gen-específicos distribuidos en todo el genoma para dos variedades con FE contrastante (Baguette 10 y Klein Chajá), y se encontraron alrededor de 100 marcadores polimórficos entre ellas, tanto microsatélites como marcadores funcionales (Röder *et al.* 1998; Ellis *et al.* 2002; Yan *et al.* 2004; Quarrie *et al.* 2005, 2006). Mediante el enfoque de análisis de segregantes en “bulk” (Michelmore *et al.* 1991) en familias F_3 derivadas del cruzamiento entre ambas variedades y evaluadas fenotípicamente en dos ambientes, se identificaron tres marcadores que co-segregan con el carácter de acuerdo a lo esperado (Deperi *et al.* 2012). Asimismo, a

partir de las plantas F_2 de las que derivaron dichas F_3 se obtuvieron 146 líneas endocriadas recombinantes (RIL) por el método de descendencia de una sola semilla (SSD). Con información fenotípica de dos años de ensayo en campo se encontraron cuatro marcadores, uno funcional (*Rht-D1*) y tres microsatélites (*Xwmc790*, *Xgwm293* y *Xgwm332*) que co-segregan con la FE (Alonso *et al.* 2014; Panelo *et al.*, 2015). Sin embargo, el porcentaje de la variación fenotípica explicada por estos marcadores es bajo. Por ello, por un lado es necesario avanzar en la fenotipificación y, por otro, incrementar el número de marcadores a analizar y la cobertura genómica. Esto podría abordarse a través del mapeo de QTL con marcadores de alta densidad (por ejemplo, aquellos originados por polimorfismos de un solo nucleótido – “Single Nucleotide Polymorphism” o SNP-), lo que permitiría aumentar la precisión en la localización de dichos QTL (Stange *et al.* 2013) y avanzar en la identificación de los genes involucrados en el control del carácter. Si bien los avances en el conocimiento del genoma de trigo pan han sido lentos debido a su complejidad, en los últimos años se han generado grandes cantidades de datos, mediante la utilización de diferentes técnicas de genética molecular, estadísticas, bioinformáticas y de genómica comparativa, entre otras. Esto ha permitido el desarrollo de plataformas de genotipificación a gran escala (por ejemplo decenas o cientos de miles de marcadores SNP, genotipificación por secuenciación –GBS-, etc.), a través de los cuales se ha podido en los últimos años identificar regiones genómicas asociadas a caracteres de rendimiento, sanidad y calidad (Boehm Jr. *et al.* 2017, Hussain *et al.* 2017, Sukumaran *et al.* 2015, 2017).

En base a la evidencia y los resultados preliminares del grupo presentados hasta aquí se hipotetiza que:

- 1) Es posible detectar al menos una región genómica asociada con la FE en una población biparental RIL de trigo pan
- 2) Dicha asociación es estable independientemente del año de evaluación fenotípica

Objetivo general

Para poder poner a prueba estas hipótesis, el objetivo general del presente trabajo es dilucidar las bases genéticas y moleculares de la FE de trigo pan, uno de los determinantes del rendimiento de grano, con vistas a profundizar el conocimiento existente sobre el carácter y al desarrollo de marcadores moleculares para realizar selección asistida en programas de mejoramiento.

Objetivos particulares

En particular, se propone:

- 1) Determinar la FE de una población segregante para el carácter (146 RIL), en condiciones experimentales de campo.
- 2) Determinar la asociación entre la FE y rendimiento y caracteres asociados al rendimiento.
- 3) Determinar el perfil de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) de cada una de las líneas de la población y sus padres.
- 4) Construir un mapa de ligamiento con los marcadores polimórficos entre los progenitores de la población.
- 4) Establecer la asociación entre los polimorfismos de marcadores y la FE.
- 5) Desarrollar marcadores ligados a la FE.
- 6) Validar en forma preliminar los marcadores desarrollados, empleando un grupo de RIL polimórficas para los mismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizó una población biparental formada por 146 RIL derivadas de un cruzamiento entre Baguette 10 (B10) y Klein Chajá (KCJ), variedades argentinas liberadas respectivamente en 2000 y 2002, contrastantes para la FE, ambas de ciclo intermedio en el sudeste bonaerense, sin requerimientos de frío. En los experimentos se incluyeron las RIL y los genotipos parentales.

Experimentos de campo

Los datos fenotípicos fueron obtenidos de experimentos de campo realizados durante tres ciclos agrícolas (2013, 2014 y 2015), en el campo experimental de la EEA INTA Balcarce (37°45' S, 55°18' O; 130 msnm). Los cultivares parentales (Baguette 10 y Klein Chajá) y las 146 RIL fueron sembrados bajo un diseño en bloques completos aleatorizados, con dos repeticiones. La unidad experimental consistió en parcelas de 5,5 m de largo y tres o siete surcos distanciados a 0,20 m entre sí (en 2013 se utilizaron parcelas de tres surcos y en 2014 y 2015, parcelas de siete surcos de ancho). Las fechas de siembra fueron 27 de junio; 24 de julio y 15 de julio para los años 2013, 2014 y 2015, respectivamente. Estas fechas estuvieron comprendidas dentro del período de siembra recomendado para los ciclos intermedios en el sudeste bonaerense, con el que normalmente se logra que el cultivo florezca alrededor de la primera semana de noviembre.

Los ensayos fueron realizados en un suelo Argiudol típico, bajo un manejo de labranza convencional, sin limitaciones de agua o nutrientes y con control químico de plagas y enfermedades fúngicas.

En 2016 se realizó un cuarto ensayo en el campo de la EEA INTA Balcarce en el contexto de una tesis doctoral realizada en el grupo Trigo, desarrollada por la Ing. Agr.

María Fiorella Franco. El ensayo incluyó 126 RIL (de las 146 RIL totales de la población) más los parentales, en dos fechas de siembra (20 de junio y 10 de julio). Se sembraron surcos de un metro de largo distanciados entre sí por 0,30 m. Este ensayo se condujo en secano, sin limitaciones nutricionales y con control químico de malezas y enfermedades fúngicas. Si bien este ensayo no se realizó en el contexto de la presente tesis se emplearon algunos datos provenientes del mismo para el análisis de QTL, como se describe más adelante.

Se registró la fenología del cultivo en cada unidad experimental: las fechas de espigazón, floración y madurez fisiológica fueron tomadas cuando el 50% de la parcela se encontraba en dicho estadio fenológico. La madurez fisiológica fue determinada como el momento en que se produjo la pérdida de color verde del pedúnculo.

Luego de la floración se midió la altura de planta realizando dos mediciones por parcela, desde la base de la planta hasta la punta de la espiguilla terminal; ambos datos se promediaron. En diferentes momentos de cada ciclo se registró la incidencia de enfermedades como fusariosis de la espiga, royas, manchas foliares y bacteriosis.

Para la evaluación de la ocurrencia de pérdidas de grano en pre- y post- cosecha se realizó una medición de la superficie de la parcela sin cobertura de plantas en forma previa a la cosecha, la cual fue descontada de la superficie total de la parcela para el cálculo del rendimiento en grano; además, se evaluó cualitativamente la ocurrencia de desgrane y pérdida producida por daño por pájaros. Una vez realizada la cosecha se contó la cantidad de granos en el suelo por unidad de superficie, realizando dos mediciones al azar de 20 x 20 cm en cada parcela; además se contó la cantidad de espigas enteras no cosechadas por parcela. Se tuvieron en cuenta estos datos para el cálculo de rendimiento por parcela. Todas las mediciones fueron realizadas sobre la superficie cosechable de cada parcela, es decir, sobre los tres surcos (2013) y sobre los cinco surcos centrales (2014 y 2015).

Para la medición de la fertilidad de espiga (FE) se siguió la metodología propuesta por Abbate *et al.* (2013). A partir de una muestra de 15 espigas por parcela tomadas al azar en madurez a partir de la superficie cosechable, se determinaron: i) peso seco de espigas con grano (total; PST; g); ii) número de granos y ii) peso seco de granos (PSG; g). Para ello, las espigas se pesaron y trillaron en conjunto en una trilladora mecánica para muestras pequeñas. Luego se pesaron los granos a fin de obtener el peso seco de espiga sin grano (PSE; g) por diferencia entre las variables i) y ii). Posteriormente se obtuvo el número de granos mediante el recuento de granos con un contador electrónico. A partir de las variables ii) y iii) se calculó la FE como: $FE = \text{número de granos} / PSE$.

El rendimiento en grano (kg ha^{-1}) se determinó por cosecha mecánica de los tres surcos (2013) o cinco surcos centrales (2014 y 2015) de la parcela, hacia finales de diciembre/principios de enero en cada uno de los ciclos agrícolas. Previo a la cosecha se midió con cinta métrica la longitud de la parcela para hacer la corrección de la superficie por parcela. A partir del grano cosechado se calculó el peso de mil granos (PMG) de una muestra seca y limpia de ~30 g utilizando un contador electrónico. A partir del rendimiento en grano y del PMG se calculó el número de granos por m^2 (NG). Con el grano cosechado, además, se determinó el peso hectolítrico (PH) utilizando un cilindro de Schopper. Este carácter es un importante factor de calidad comercial de trigo utilizado en todo mundo y está influenciado no sólo por la uniformidad, forma, densidad y tamaño del grano, sino además por el contenido de materias extrañas y granos quebrados que presente la muestra. Se define como el peso de un volumen de 100 litros de grano, expresado en kg hl^{-1} .

Los datos meteorológicos diarios (temperatura y radiación) fueron tomados por una estación meteorológica ubicada en la EEA. No se presentó ningún evento de helada luego de la floración en ninguno de los tres ciclos. Sólo hubo un evento de granizo hacia fines del ciclo agrícola 2014; si bien los daños fueron menores, el grano que fue

perdido por desgrane, natural y por granizo, se contó luego de la cosecha, como se explicó previamente.

Las variables rendimiento, PMG, NG, altura de planta y FE se analizaron con un modelo mixto con las repeticiones dentro de año (ambientes) como factor fijo y con genotipo y la interacción genotipo x año (ambiente) como factores aleatorios, para evaluar diferencias entre genotipos y entre años de evaluación (ambientes) y la interacción genotipo x ambiente, utilizando la función *lme* del paquete *nlme* (Pinheiro *et al.*, 2016) del programa R (R Core-Team 2016). Para el análisis de la FE se utilizaron los datos de cuatro ensayos a campo (los tres realizados en la presente tesis y el de la tesis de la Ing. Franco) en tanto que para los caracteres restantes se utilizaron los datos de los tres primeros ensayos solamente. Los componentes de varianza fueron estimados mediante el método de Máxima Verosimilitud Restringida (REML) (Milliken y Johnson, 1992). La heredabilidad en sentido estricto (h^2) se calculó de acuerdo con Hallauer y Miranda (1981) de la siguiente manera:

$$h^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + (\sigma_{ge}^2/e) + (\sigma_{res}^2/re)}$$

donde σ_g^2 es el componente de varianza de los genotipos (RIL), σ_{ge}^2 es el componente de varianza de la interacción genotipo x ambiente, σ_{res}^2 es el error; *e*, el número de ambientes, y *r*, el número de repeticiones dentro de cada año.

Se determinó la correlación genética entre los caracteres FE, altura de planta, PMG, NG y rendimiento, utilizando los mejores predictores lineales insesgados (*Best Linear Unbiased Predictors*; BLUP) obtenidos para la población a través del modelo mixto. Los BLUP son utilizados en modelos lineales mixtos como predictores de efectos aleatorios. En principio fueron utilizados en el mejoramiento genético animal para predecir el valor genético de los animales. Actualmente su uso se ha extendido al mejoramiento genético vegetal; una de sus ventajas reside en que permiten evaluar materiales genéticos en base a datos desbalanceados (Piepho *et al.* 2008). En

particular, en el presente estudio, los BLUP de la población RIL equivalen a los efectos aditivos (dada la estructura genética de la población, se asume que no hay efectos de dominancia ni epistasis).

Genotipificación y análisis de QTL

A partir de hojas de plántulas se extrajo ADN genómico de cada una de las RIL así como de ambos parentales, según el protocolo propuesto por Haymes (1996). Se corroboró la calidad de las muestras por medio de espectrofotometría utilizando un espectrofotómetro de bajo volumen, Epoch™ Spectrophotometer System (BioTek), como así también se corrieron geles de agarosa al 0,7% p/v (en *buffer* TBE), teñidos con GelRed® (Genbiotech) para evaluar la integridad del ADN.

Ciento veintiseis RIL y sus parentales fueron genotipificados con un “chip” comercial, Axiom® 35K SNP Wheat Breeder’s Array (Affimetrix), el cual cuenta con 35042 SNPs con cobertura de todo el genoma de trigo pan, ~16000 de los cuales ya están mapeados

(<http://www.cerealsdb.uk.net/cerealgenomics/CerealsDB/indexNEW.php>).

Con los marcadores que resultaron polimórficos en los parentales se construyó un mapa de ligamiento y, a partir de los datos genotípicos y fenotípicos (valores BLUP de FE, rendimiento, PMG, NG, altura de planta y número de días entre siembra y floración) se realizó un análisis de QTL para identificar regiones genómicas asociadas a la FE. Para ello se utilizó el paquete QTL (Broman *et al.* 2003, Arends *et al.* 2010) del programa R (R-Core Team 2016) y el programa WinQTLcart 2.5 (Wang *et al.* 2012). La detección de QTL se llevó a cabo mediante Mapeo por Intervalo Compuesto (CIM – “*Composite Interval Mapping*”). El valor de LOD (“*logarithm of the odds*”) de corte fue calculado para todos los caracteres con 500 permutaciones y un nivel de significación de 0,05. Se realizó un análisis de regresión lineal múltiple (*Forward-Backward Stepwise*), y aquellos cinco marcadores con los mayores valores F fueron incorporados como cofactores en el CIM. El tamaño de ventana utilizado fue

de 10 cM, mientras que la velocidad de caminata fue de 1 cM. La posición más probable del QTL fue estimada como el punto de mayor valor LOD. El intervalo de confianza para el QTL fue calculado como el intervalo del mapa que incluye hasta dos unidades menos que el valor LOD máximo hacia ambos lados del mapa. Cada QTL fue nombrado con tres letras asociadas al carácter, tres letras por la localidad (Balcarce – *bce*), seguido por el brazo cromosómico en donde fue localizado.

Para evaluar el efecto de cada QTL se tomó el marcador localizado en el punto de máximo valor LOD (Foulongne-Oriol *et al.* 2012). Se ajustó un modelo lineal con marcador y repeticiones anidadas en año como factores fijos. La proporción de la variación fenotípica explicada (R^2) y el efecto aditivo (a) fueron obtenidos a partir del modelo. Se calculó la proporción de la varianza aditiva explicada por el modelo como $P_g = \sigma_g^2 / R_{adj}$ (donde σ_g^2 es la varianza genética y R_{adj} es el R^2 ajustado del modelo lineal). La interacción QTL x ambiente (año) fue estimada a través de un modelo lineal con repeticiones anidadas en año y la interacción marcador x año como factores fijos. Las interacciones simples entre QTL del mismo carácter fueron probadas a partir de un modelo simple, con repeticiones anidadas dentro de años y el efecto de marcador1 x marcador2. Posteriormente se analizó un modelo lineal con todos los QTL, sin interacciones, para evaluar la proporción de la varianza explicada por los QTL encontrados (R^2_i) para cada uno de los caracteres.

Todos los modelos fueron corridos en el programa R.

Diseño y puesta a punto de marcadores moleculares asociados a la FE

A partir de aquellas regiones genómicas seleccionadas en el análisis de QTL por su asociación con la FE se diseñaron marcadores SNP alelo-específicos. Se tomaron los marcadores del mapa incluidos en el intervalo de confianza estimado para cada QTL para asegurar la presencia del gen en la región analizada. A partir de la secuencia flanqueante a cada marcador, proporcionada por el proveedor del “chip” (Axiom, Affimetrix) se realizó un alineamiento local empleando el algoritmo BLAST

(Aschtul *et al.* 1990) contra la secuencia de referencia (RefSeq V.1) del genoma de trigo pan (variedad *Chinese Spring*; <https://urgi.versailles.inra.fr/blast.iwgsc/blast.php>) para verificar la posición física de dicho marcador. Las secuencias de los cromosomas homeólogos, si existían, se buscaron en la base de datos de EnsemblPlants, utilizando el algoritmo BLAST (<http://plants.ensembl.org/Triticum.aestivum/Tools/Blast>). Éstas fueron alineadas y se diseñaron iniciadores específicos para la región homeóloga de interés, empleando la herramienta GSP (<https://probes.pw.usda.gov/GSP>). Como criterio para la selección de estos iniciadores se tuvo en cuenta la longitud del fragmento a amplificar (entre 300 y 550 pb) para poder resolverlos en geles de agarosa, y que el polimorfismo (SNP) dentro de la secuencia estuviera al menos a 25 pb de los extremos de la secuencia a amplificar. Utilizando el polimorfismo (SNP) se buscaron enzimas de restricción que realizaran cortes alelo-específicos, para así poder diferenciar ambos alelos, empleando la herramienta Nebcutter versión 2.0 (<http://www.labtools.us/nebcutter-v2-0/>). Para aquellos marcadores que no presentaron en el polimorfismo un sitio de restricción para ninguna enzima, se diseñó un iniciador alelo-específico con polimorfismo en 3' con la herramienta BatchPrimer3 (<http://batchprimer3.bioinformatics.ucdavis.edu/>) (You *et al.* 2008) con la función “*Allele-specific primers*”, siguiendo la metodología propuesta por Pachecoy *et al.* (2014).

Los marcadores seleccionados fueron amplificados mediante PCR, utilizando 100 ng de ADN como templado, 1X Buffer de la polimerasa (Promega, EEUU), 1 U de *Taq* ADN Polimerasa (Promega, Invitrogen™ Platinum *Taq*, EEUU), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada iniciador, 1,5 mM de Cl_2Mg en un termociclador Veriti (Life Technologies®, EEUU). El volumen final de reacción fue 15 μ l. Las condiciones de reacción (concentración de ADN y programa de ciclado para la amplificación por PCR) fueron ajustadas experimentalmente en cada caso en un grupo de diez genotipos de la población y en los parentales. Los amplicones se separaron en geles

de agarosa al 2% (p/v) en *buffer* TBE 1X teñidos con GelRed™ (Genbiotech) a 90 V durante 30 minutos. En todas las corridas electroforéticas se incluyó un marcador de peso molecular (CincuentaMarker, Biodynamics). Una vez obtenidos los amplicones, fueron empleados en una PCR anidada que incluyó un iniciador alelo-específico, diseñado como se describió previamente. Estos amplicones alelo-específicos también fueron separados en geles de agarosa al 2% (p/v) en *buffer* TBE 1X teñidos con GelRed™ (Genbiotech), a 60 V durante 1 hora.

RESULTADOS

Condiciones climáticas y fenología

La temperatura media y la radiación para cada ciclo agrícola se muestran en la Tabla 1, para las etapas de siembra a floración y de floración a madurez fisiológica. El año 2013 presentó temperaturas más bajas que el promedio histórico (calculado para el período 1983-2015 en Balcarce, Prov. de Bs. As) para ambos períodos. El año 2014 resultó ser el más cálido de los tres evaluados para el período de siembra a floración, mientras que el período de floración a madurez fisiológica resultó más fresco que el promedio histórico. Por otra parte, durante el 2015 se produjeron temperaturas cálidas a lo largo de todo el ciclo agrícola, superiores al promedio para el período de siembra a floración y cercanas al promedio hacia el final del ciclo agrícola. Este año fue el más cálido de los tres evaluados para el período de floración a madurez fisiológica. La radiación en el período de siembra a floración fue menor o igual al promedio histórico en los tres años de evaluación y menor al promedio para el período de floración a madurez fisiológica durante los tres años de evaluación.

Tabla 1. Promedios de temperatura media y radiación en los períodos “Siembra a floración” y “Floración a madurez fisiológica” para los tres años de evaluación fenotípica. Las medias históricas fueron calculadas para el período 1983/2015 para Balcarce.

		Siembra a floración	Floración a madurez fisiológica
Tmedia (°C)	2013	10,7	16,3
	2014	12,9	16,9
	2015	11,5	18,7
	media histórica	10,8	18,2
Radiación (MJ m ⁻²)	2013	10,8	14,8
	2014	12,1	15,6
	2015	12,0	20,9
	media histórica	12,0	22,2

Con respecto a la fenología del cultivo en los tres años evaluados, la floración de la población, los parentales y los cultivares comerciales estuvo concentrada en ~10 días a principios de noviembre (Fig. 2).

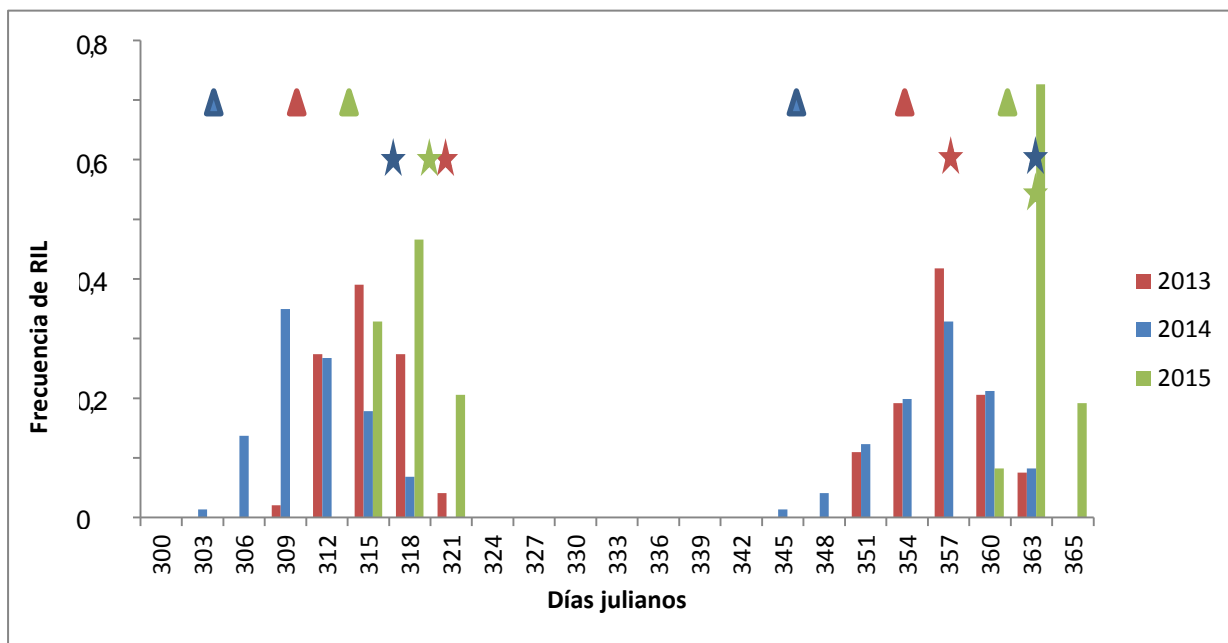


Figura 2. Distribución de frecuencia de fechas de floración y madurez fisiológica (barras a la izquierda y a la derecha de la figura, respectivamente), medidas en días julianos, de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo) para los ciclos agrícolas 2013 (rojo), 2014 (azul) y 2015 (verde).

En promedio, los días a floración (calculado como días desde la siembra hasta la fecha promedio de floración de las RIL para cada ciclo agrícola) fueron 137, 105 y 119 días para los ciclos agrícolas 2013, 2014 y 2015, respectivamente, lo cual coincide con las diferencias de temperatura media en el período de siembra a floración observadas entre los años (Tabla 1). En tanto, la duración del llenado de granos (entre floración y madurez fisiológica) fue entre 5 y 10 días más extensa durante el 2014 con respecto a los otros dos años, 2013 y 2015 (Fig. 3).

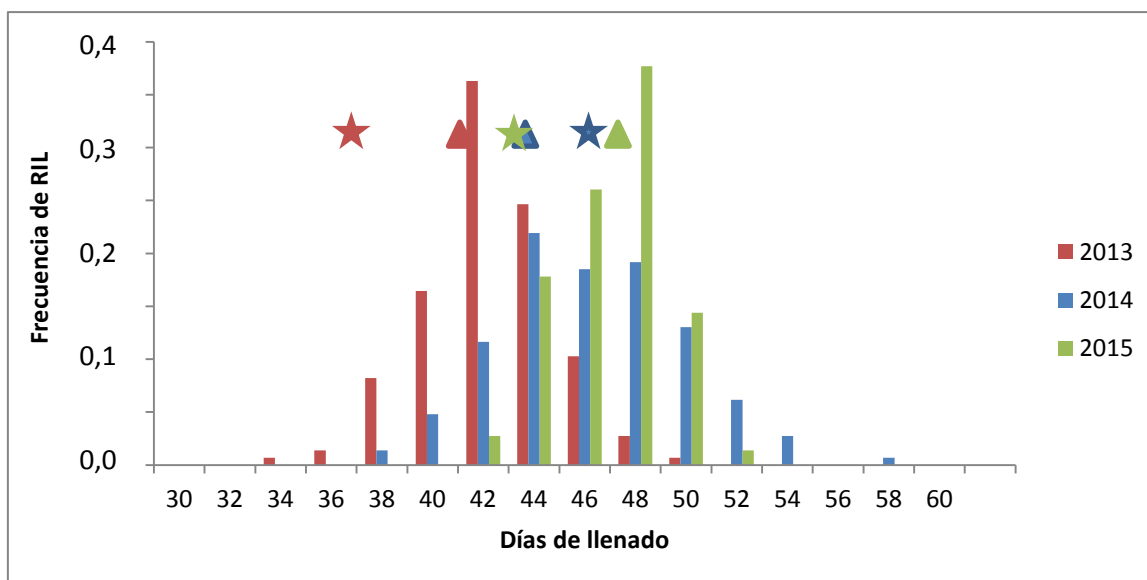


Figura 3. Distribución de frecuencia de días de llenado (calculados como días comprendidos entre floración y madurez fisiológica) de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo) para los ciclos agrícolas 2013 (rojo), 2014 (azul) y 2015 (verde).

Fertilidad de espiga, rendimiento y caracteres asociados

En la Tabla 2 se presentan las medianas, mínimos y máximos de las variables fenotípicas determinadas en la población y los promedios de dichas variables correspondientes a los cultivares parentales. La mediana de FE en la población fue 97,9, 92,1 y 89,1 granos g^{-1} para los años 2013, 2014 y 2015, respectivamente; se observó una amplia variación para el carácter en la población, reflejada en los valores mínimos y máximos observados a través de los tres años. En tanto, las medianas de NG/Esp y PSE (g) fueron, respectivamente, 45,0 y 0,5 para el ciclo 2013, 42,7 y 0,5 para el 2014 y 50,4 y 0,6 para el 2015 (Tabla 2). Es decir, los mayores valores de FE fueron observados en 2013 dada una más alta relación entre NG/Esp y PSE, siendo que en el 2015 la mediana para NG/Esp fue la más alta de los tres años, pero la mediana de PSE también fue la más elevada de los tres años.

En cuanto a la distribución de la FE en la población, además de la amplia variación mencionada, se observó una distribución acampanada y simétrica en los tres años de

evaluación, lo cual es esperable para el tipo de población y el modo de herencia del carácter (Fig. 4) (Falconer y Mackay, 1996). Los padres tuvieron un comportamiento contrastante en todos los años: para 2013, 2014 y 2015, la FE promedio de B10 fue 112,4, 115,3 y 96,0 granos g^{-1} y para KCJ 84,1, 72,8 y 77,1 granos g^{-1} , respectivamente (Tabla 2). Estos valores concuerdan con los observados por Martino *et al.* (2015) y Mirabella *et al.* (2016); es decir, B10 presentó valores significativamente más altos que KCJ en los tres años de evaluación.

En los tres años también se observó variación transgresiva; en 2013 y 2015 ocurrió hacia ambos extremos de las distribuciones de frecuencia, mientras que en 2014 sólo se detectó hacia el extremo de menor FE. Así, 3,4%, 3,4% y 8,2% de los individuos de la población tuvieron menor FE que KCJ en 2013, 2014 y 2015, respectivamente, en tanto que 5,5% y 21,2% de los individuos tuvieron mayor FE que B10 en 2013 y 2015, respectivamente.

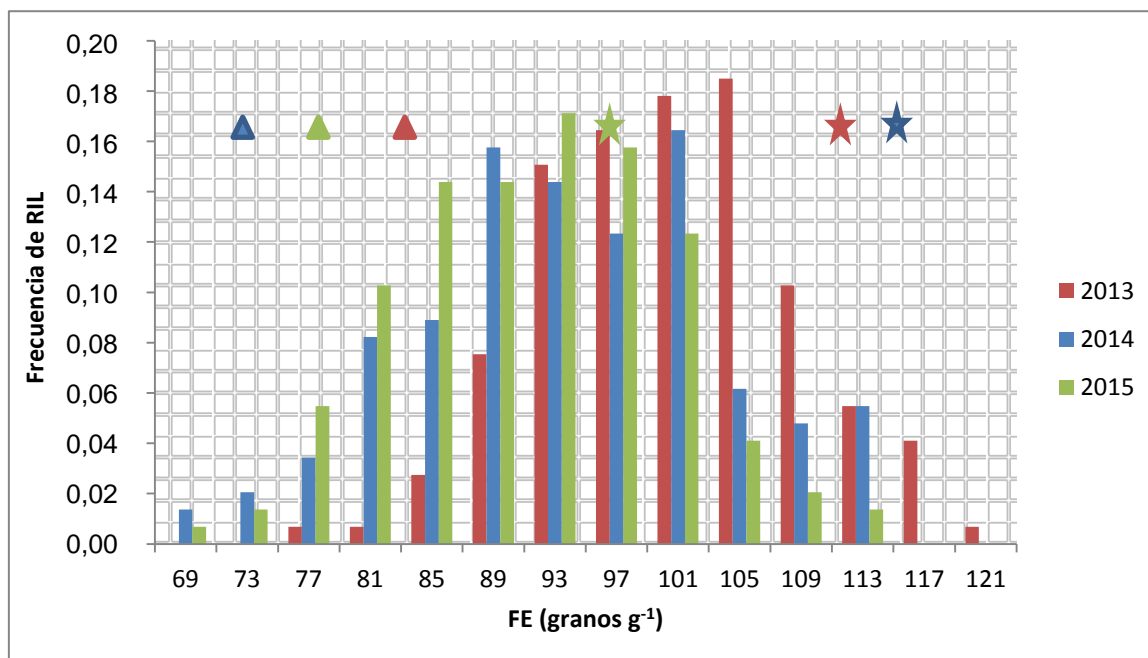


Figura 4. Distribución de frecuencia de la fertilidad de espiga (FE) de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo) para los ciclos agrícolas 2013 (rojo), 2014 (azul) y 2015 (verde).

En cuanto al rendimiento en grano, la mediana de la población fue más alta en 2015, intermedia en 2013 y menor en 2014. El NG, en cambio, fue mayor en 2013, intermedio en 2015 y menor en 2014 (mediana RIL=21,52, 17,82 y 9,96 x 10³ granos m⁻², respectivamente). Los parentales también mostraron este comportamiento en el NG promedio a través de los años. A su vez, en 2013 y 2015 B10 tuvo rendimientos significativamente más altos que KCJ, y significativamente más bajo que KCJ en 2014 (Tabla 2). Si bien el rendimiento está determinado principalmente por el NG y, en menor grado, por el PMG, hubo una diferencia en este último que conllevó a un mayor rendimiento en una condición de menor NG. Contemplando las condiciones ambientales y la fenología del cultivo (Tabla 1, Fig. 2), el año 2015 presentó las mejores condiciones de llenado (temperaturas similares al promedio histórico, con mayor cantidad de días de llenado en promedio), lo cual se vio reflejado en un mayor PMG en las RIL (mediana RIL=32,8, 37,5 y 42,6 g, para los ciclos 2013, 2014 y 2015, respectivamente) como así también en los parentales (Tabla 2). Con respecto al 2014, una de las principales razones para el bajo NG y rendimiento fue la baja cobertura alcanzada por el cultivo debido, probablemente, a la alta temperatura media registrada en el período de siembra a floración (Tabla 1). Así, se detectó un menor número de macollos y menor número de espigas m⁻² en 2014 que en los restantes años (mediana RIL: 230,8, 466,7 y 351,3 espigas m⁻² para 2014, 2013 y 2015, respectivamente).

La altura de plantas fue similar entre años para las RIL, tanto la mediana como los valores mínimo y máximo; en tanto, los parentales, los cuales presentaron diferencias entre años, difirieron entre ellos significativamente en altura en 2013 y 2015, donde KCJ fue más alto que B10 (Tabla 2).

Con respecto al PH, un carácter asociado a la calidad comercial del trigo, el año con mayores valores fue el 2015, debido a las buenas condiciones durante el llenado de granos, como fue explicado anteriormente. Si bien la mediana de las RIL en 2015

fue similar que la de 2013 (80,5 vs. 79,6 g hl⁻¹), el mínimo observado en 2015 fue significativamente mayor que el mínimo del 2013 (75,4 vs. 68,6 g hl⁻¹). Los máximos para ambos años fueron similares (83,6 y 83,2 g hl⁻¹ para los años 2015 y 2013, respectivamente). Durante el 2014, se observaron valores más bajos de PH para la mediana, el mínimo y máximo. Con respecto a los padres de la población, el 2014 fue también el año con los valores más bajos, mientras que no hubo diferencia entre 2013 y 2015 (Tabla 2).

Con respecto a las enfermedades fúngicas, se observó una muy baja incidencia de roya de la hoja y fusariosis de la espiga en los tres años de evaluación. Sólo durante 2014 hubo una epifitiasis de roya del tallo que no pudo controlarse eficientemente con la aplicación de funguicida realizada, lo que pudo haber afectado el rendimiento potencial de las líneas.

Tabla 2. Mediana, mínimo y máximo para las RIL y medias de los parentales Baguette 10 (B10) y Klein Chajá (KCJ) para los caracteres evaluados durante los ciclos agrícolas 2013, 2014 y 2015. PMG: peso de mil granos; NG: número de granos por m²; FE: fertilidad de espiga; PH: peso hectolítrico; NG/Esp: número de granos por espiga; PSE: peso seco de espiga sin grano. DE: desvío estándar.

	PMG (g)			NG (10 ³ granosm ²)			FE (nº granosg ⁻¹)			PH (gh ^l)			Rendimiento (gm ²)			Altura (cm)			NGEsp			PSE (gespiga ⁻¹)		
	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015	2013	2014	2015
Mediana	32,8	37,5	42,6	21,52	9,96	17,82	98,0	92,3	89,4	79,6	74,0	80,5	719,4	364,6	764,3	102	100	98	45,0	42,6	50,9	0,5	0,5	0,6
RIL Min	23,4	24,7	29,8	8,63	5,28	9,74	75,0	65,6	65,7	68,6	64,9	75,4	273,6	193,7	439,0	51	52	52	33,0	27,8	38,5	0,3	0,3	0,4
RIL Máx	41,7	50,4	53,0	36,41	17,83	25,31	117,6	112,4	111,3	83,2	77,7	83,6	1080,9	554,6	893,1	120	119	125	64,1	58,8	71,1	0,8	0,7	0,9
B10 Media	34,8	40,6	42,2	29,52	9,21	19,02	112,4	115,3	96,0	79,0	75,2	78,5	1025,5	372,6	790,2	97	96	84	41,2	37,7	42,4	0,4	0,3	0,4
B10 (±DE)	(1,5)	(1,5)	(4,6)	(3,6)	(1,4)	(5,1)	(2,0)	(2,1)	(4,7)	(0,6)	(0,2)	(0,2)	(80,9)	(43,4)	(128,6)	(0,7)	(0,7)	(7,8)	(3,1)	(2,2)	(2,7)	(0,03)	(0,02)	(0,05)
KCJ Media	34,5	43,4	44,0	23,10	10,62	15,30	84,0	72,8	77,1	81,3	75,8	81,4	760,0	459,5	672,1	104	97	93	47,0	40,5	56,1	0,6	0,6	0,7
KCJ (±DE)	(7,2)	(5,0)	(1,2)	(10,0)	(0,4)	(0,6)	(4,5)	(8,1)	(1,4)	(0,2)	(0,6)	(0,6)	(179,8)	(36,2)	(6,3)	(1,1)	(6,7)	(6,4)	(3,2)	(1,7)	(0,2)	(0,01)	(0,1)	(0,02)

Determinación de componentes de varianza y heredabilidad

El modelo mixto con genotipo y año como factores aleatorios permitió obtener los valores de BLUP de FE para cada una de las RIL como así también para los parentales. La distribución de frecuencia de BLUP de FE resultó acampanada y simétrica (Fig. 5), de manera similar a lo observado en cada uno de los años de evaluación. También se confirmó la ocurrencia de segregación transgresiva hacia ambos extremos de la distribución: 3,5% de los individuos de la población tuvieron BLUPs de FE mayores al de B10 (11,6) y 2,1% presentaron valores menores al de KCJ (-12,2).

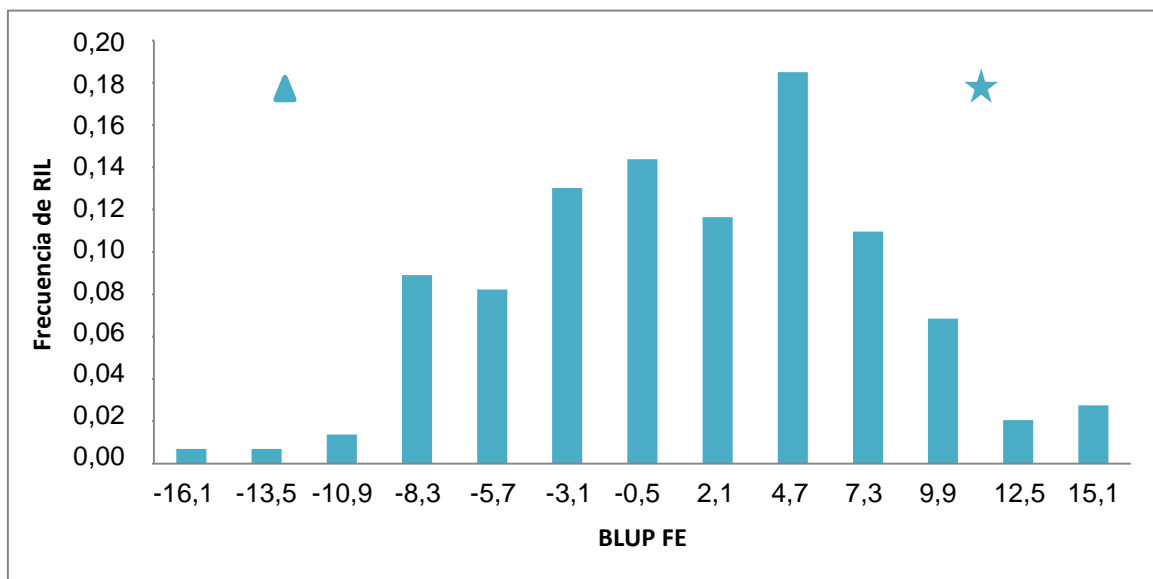


Figura 5. Distribución de frecuencia de los Mejores Predictores Lineales Insesgados ("Best Linear Unbiased Predictors" - BLUP) de fertilidad de espiga (FE) de las RIL y los parentales, Baguette 10 (estrella) y Klein Chajá (triángulo)

Para la FE, la h^2 fue de 0,84 (Tabla 3), más alta que la reportada por Martino *et al.* (2015) en generaciones tempranas. Además, la σ_{ge}^2 del carácter fue baja (Tabla 3), representando un 9% de la varianza total.

Con respecto a los otros caracteres evaluados, la estimación de componentes de varianza muestra la baja heredabilidad para el NG y rendimiento, de acuerdo a lo esperado ($h^2=0,35$ y $0,28$, respectivamente). Si bien se detectó efecto del genotipo ($\sigma_{ge}^2 = 2969077$ y 1891 , para NG y rendimiento, respectivamente) y el aporte de la varianza de la interacción a la total fue 7 y 12 % para NG y rendimiento, respectivamente, el efecto ambiental representó la mayor parte de la variación. De manera similar a lo hallado para la FE, el PMG tiene una alta h^2 ($0,75$) con baja interacción genotipo x ambiente, que representó el 15% de la varianza total. Por último, la altura fue el carácter que presentó mayor h^2 ($0,92$) con un efecto del 73% debido al genotipo y con efectos de interacción genotipo x ambiente y de ambiente muy bajos.

Tabla 3. Componentes de varianza de rendimiento, peso de mil granos (PMG), número de granos m^2 (NG), altura y fertilidad de espiga (FE). σ_g^2 : varianza genética; σ_{ge}^2 : varianza de la interacción genotipo x ambiente; σ_{res}^2 : varianza del error; h^2 : heredabilidad en sentido estricto.

	σ_g^2	σ_{ge}^2	σ_{res}^2	h^2
Rendimiento	1891	3351	22687	0,28
PMG	7,26	2,82	8,85	0,75
NG	2969077	2304291	28391729	0,35
Altura	129,9	17,6	29,1	0,92
FE	48	8,28	38,21	0,84

Correlaciones genéticas entre caracteres

La Tabla 4 muestra las correlaciones genéticas, obtenidas a partir de los BLUP, entre los caracteres FE, altura, PMG, NG, PH y rendimiento. Se observa que el rendimiento está determinado principalmente por el NG, con una alta correlación entre ambos caracteres ($r=0,85$; $p<0,000$), en tanto que está pobremente asociado al PMG ($r=-0,05$; ns), como está citado ampliamente en la bibliografía (Borrás *et al.* 2004; Shearman *et al.* 2005; Elía *et al.* 2016). Con respecto a la FE, este carácter

presentó una correlación mediana y positiva con el NG ($r=0,48$) y positiva y más baja con el rendimiento ($r=0,30$). El PMG, en tanto, se correlacionó mediana y negativamente tanto con el NG ($r=-0,55$) como con la FE ($r=-0,44$). Si bien se observó una correlación positiva entre el PMG y el PH, y a su vez, el PMG correlacionó negativamente con FE, se observa asociación negativa pero no significativa entre la FE y el PH ($r=-0,18$; ns).

*Tabla 4. Diagonal hacia abajo: correlaciones genéticas estimadas a partir de los BLUPs entre los caracteres FE (fertilidad de espiga), Altura de planta, PMG (peso de mil granos), NG (número de granos m^2), PH (peso hectolítrico) y Rendimiento. Diagonal hacia arriba: significación de las correlaciones: *:p-valor<0,05; ns: no significativo.*

	PMG	Altura	FE	NG	Rendimiento	PH
PMG		*	*	*	ns	*
Altura	0.52		*	*	*	*
FE	-0.49	-0.34		*	*	ns
NG	-0.55	-0.65	0.48		*	*
Rendimiento	-0.05	-0.46	0.30	0.85		ns
PH	0.60	0.58	-0.18	-0.38	-0.07	

Genotipificación y construcción del mapa de ligamiento.

Ciento veintiséis RIL y ambos parentales fueron genotipificados con el “chip” comercial. De éstas, se obtuvo buena calidad de marcadores para 80 líneas; estos datos genotípicos se emplearon para la construcción del mapa. A partir del análisis de los datos genotípicos, luego de descartar los marcadores monomórficos y aquellos con alto grado de heterocigosidad, se obtuvieron 857 marcadores polimórficos con segregación 1:1, distribuidos en 368 *loci* (Tabla 5). Estos últimos fueron utilizados para generar un mapa de ligamiento (Fig. 5) para esta población. La distribución de marcadores por cromosoma se muestra en la Tabla 5, como así también la distancia genética total de cada cromosoma, el espaciamento promedio entre *loci* y el espaciamento máximo. Del total de marcadores informativos, 43% correspondieron al genoma A, 42% al genoma B y solo el 14% correspondieron al genoma D.

Particularmente, el genoma D fue el que menor cobertura de marcadores tuvo para todos los cromosomas y para todos los grupos, el que mayor espaciamiento promedio entre *loci* presentó y, excepto para el grupo 4, también el que mayor espaciamiento máximo entre *loci* mostró (Tabla 5). Si bien la cobertura con marcadores en el genoma D está bien representada en el “*chip*” comercial, la calidad del mismo tanto en esta población, como en otra población de mapeo de 126 RIL, producto de la cruce de Pampeano x BioINTA 1005, genotipificada con el mismo “*chip*” (Gieco, L. comunicación personal), fue baja. Particularmente, los mapas de los cromosomas 4D y 7D fueron construidos sólo con cuatro *loci* cada uno, como se puede observar en la Fig. 6. Hubo seis marcadores SNPs que no fueron asignados a ningún cromosoma.

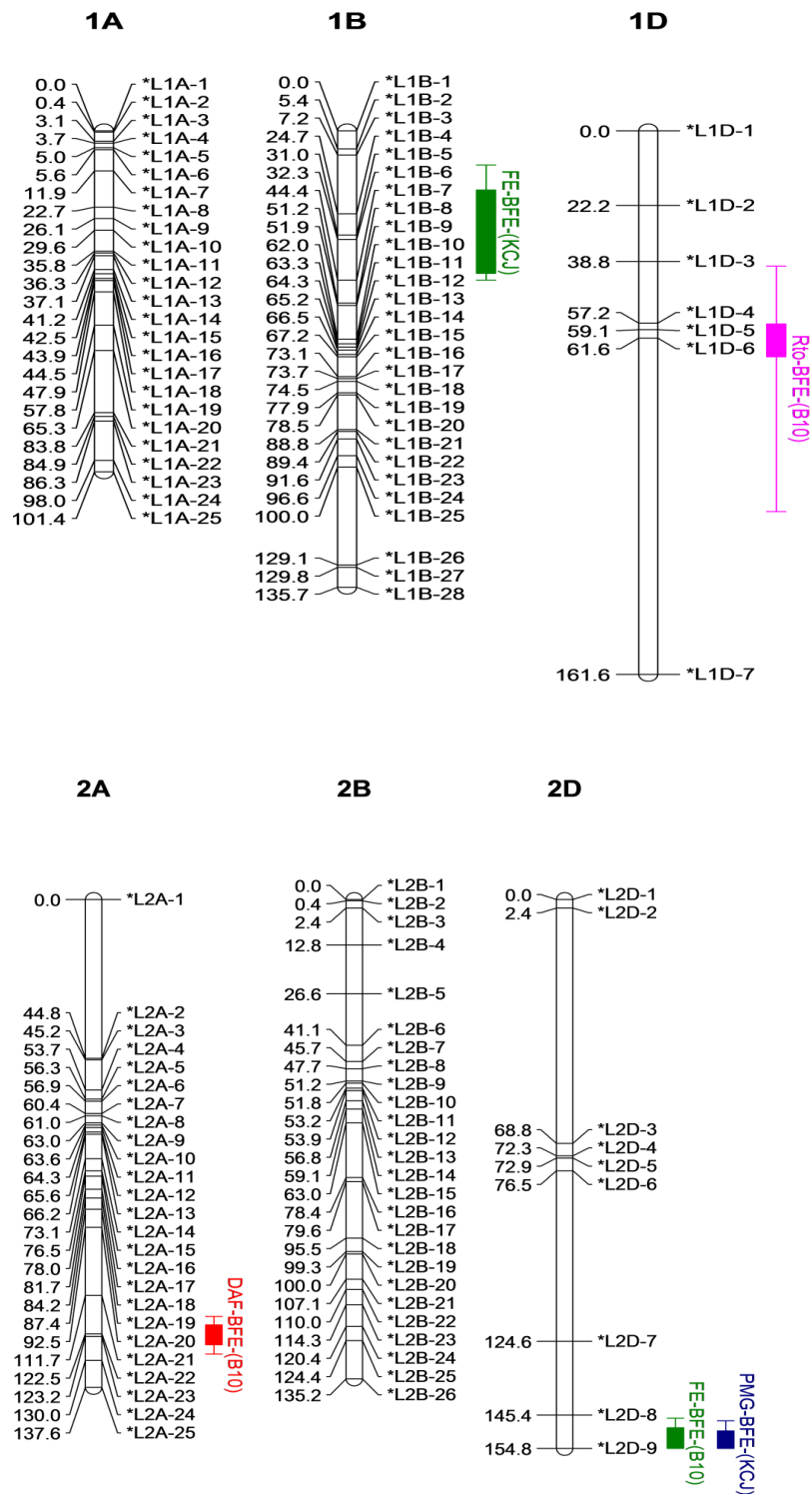


Figura 6. Mapa de ligamiento de la población construido a partir de los 857 marcadores SNPs. En barras a la derecha de cada cromosoma, QTL para los caracteres Fertilidad de Espiga (FE), Rendimiento (Rto), Peso de mil granos (PMG), Número de granos por m^2 (NG), Altura de planta, Días a floración (DAF). Las barras de error indican el intervalo de confianza del QTL hasta 2 unidades de LOD menos hacia ambos lados del pico con máximo LOD.

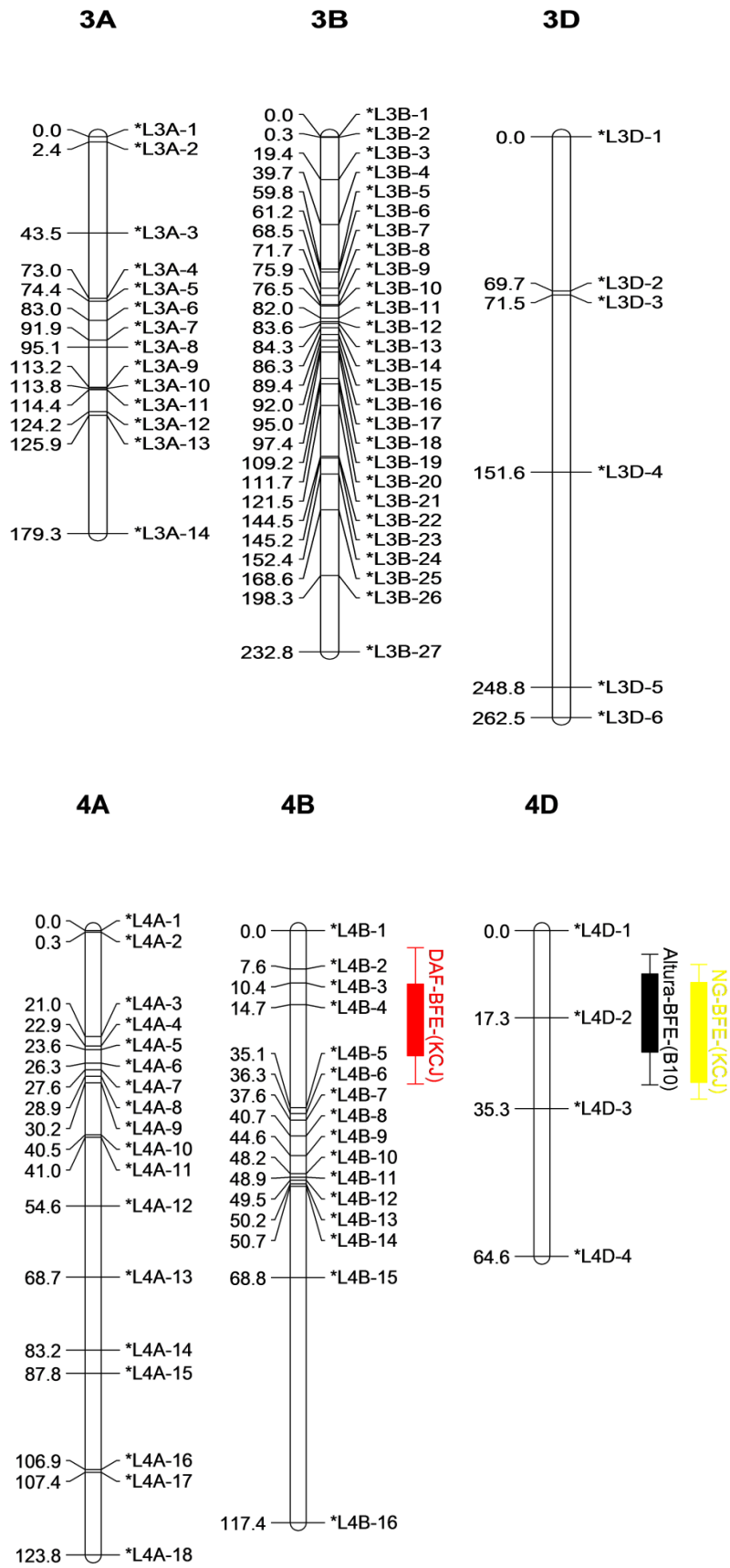


Fig. 6. (Continuación)

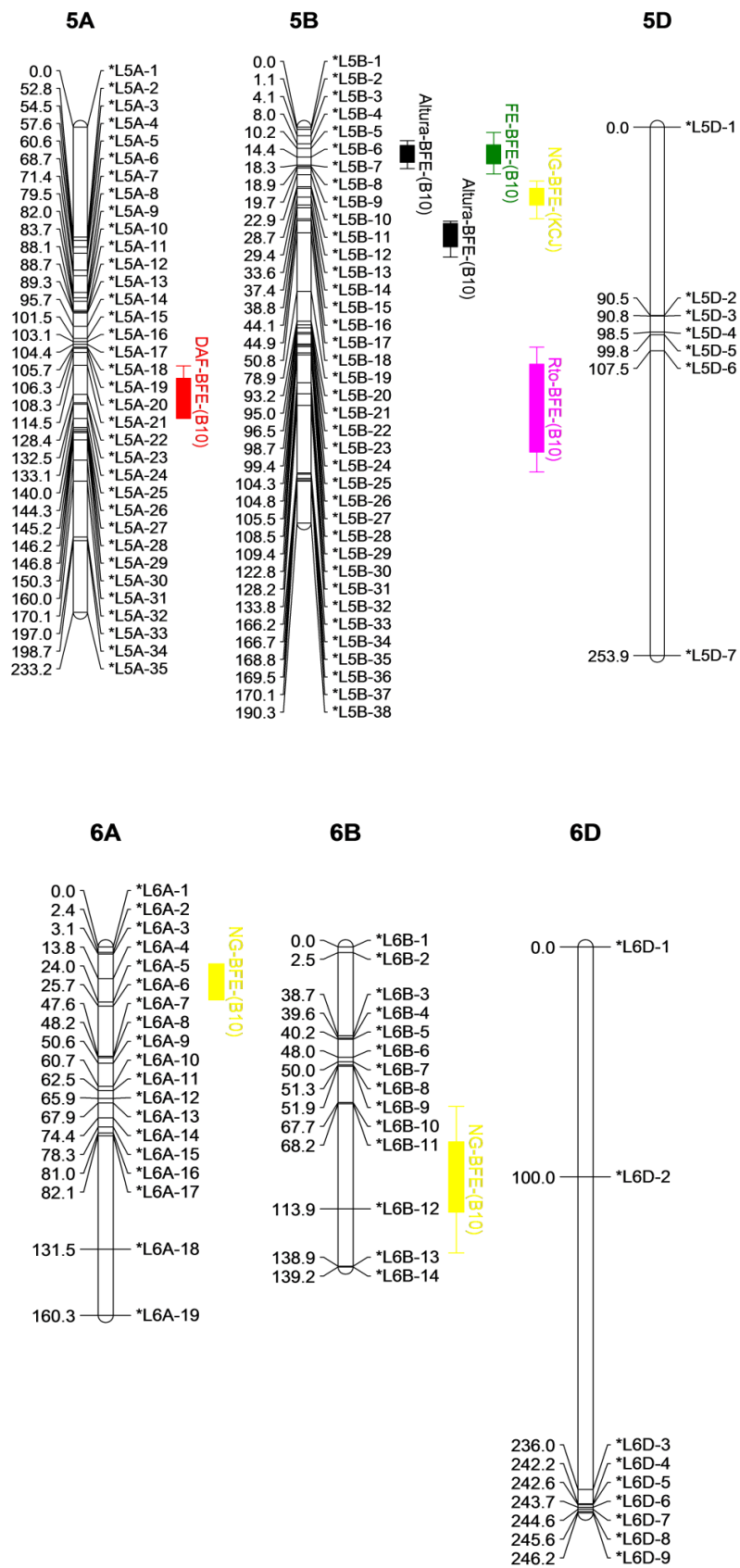


Fig. 6. (Continuación)

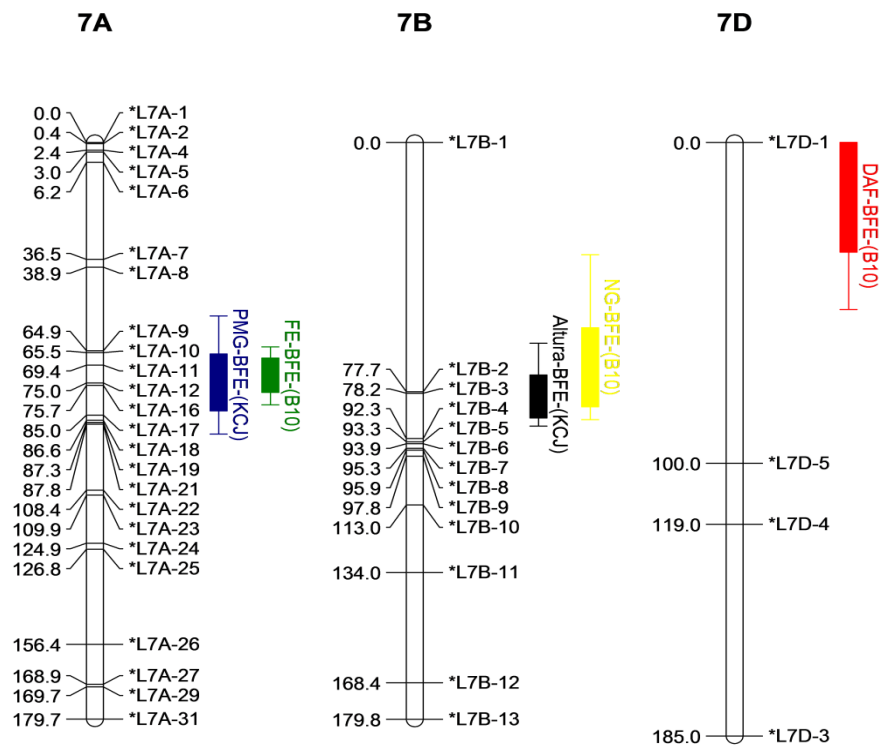


Fig. 6. (Continuación)

Tabla 5. Distribución de los 857 marcadores SNP utilizados para la construcción del mapa de ligamiento en los 21 cromosomas de trigo pan, número de loci asignados a cada cromosoma, longitud total, espaciamiento promedio y máximo en centiMorgan (cM).

Cromosoma	Nº Marcadores	Nº Loci	Longitud (cM)	Espaciamiento promedio (cM)	Espaciamiento máximo (cM)
1 ^a	64	25	101,4	4,2	18,5
1B	58	28	135,7	5,0	29,1
1D	29	7	161,6	26,9	100,0
2A	75	25	137,6	5,7	44,8
2B	61	26	135,2	5,4	15,9
2D	29	9	154,8	19,4	66,4
3A	33	14	179,3	13,8	53,4
3B	55	27	232,8	9,0	34,5
3D	19	6	262,5	52,5	97,2
4A	26	18	123,8	7,3	20,7
4B	26	16	117,4	7,8	48,6
4D	4	4	64,6	21,5	29,3
5A	66	35	233,2	6,9	52,8
5B	82	38	190,3	5,1	32,4
5D	19	7	253,9	42,3	146,4
6A	40	19	160,3	8,9	49,4
6B	51	14	139,2	10,7	45,7
6D	16	9	246,2	30,8	136,0
7A	68	24	179,7	7,8	30,3
7B	26	13	179,8	15,0	77,7
7D	4	4	185,0	61,7	100,0
No asignados	6				
Total	857	368	3674,3	10,5	146,4

Si bien la cantidad de marcadores SNP fue de 857, el número de *loci* que fueron detectados fue menor, siendo en total 368 (Tabla 5). Esto se debe a que varios de los marcadores, por encontrarse fuertemente ligados y por la baja cantidad de individuos genotipificados, no pudieron ser discriminados en *loci* independientes.

Análisis de QTL

Los marcadores asociados al QTL, el pico con máximo LOD del QTL, la posición en el mapa genético, el intervalo de confianza del QTL, el efecto aditivo del QTL, la proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL (R^2) como así también la

proporción de la varianza explicada para cada carácter por todos los QTL encontrados (R^2_i) se muestra en la Tabla 6.

Con el mapa de ligamiento generado con los 857 marcadores SNP y dos marcadores funcionales (*Rht-D1*, Alonso *et al.* 2014 y *Vrn-A1*) se realizó un análisis de QTL para los caracteres altura y días de siembra a floración (DAF). Esto permite detectar QTL previamente citados en la bibliografía para corroborar la correcta asignación de los marcadores en el mapa. Se encontraron cuatro QTL con efecto significativo para altura, ubicados uno en el cromosoma 4D (gen *Rht-D1*; Börner *et al.*, 1997), dos en el cromosoma 5B y uno en el 7B (Fig. 6, Tabla 6) y cuatro QTL para DAF en los cromosomas 2A, 4B, 5A (gen *Vrn-A1*; Galiba *et al.*, 1995, Dubkovsky *et al.*, 1998) y 7D (Fig. 6, Tabla 6). Esto indica que los dos marcadores funcionales utilizados en este trabajo fueron correctamente asignados al mapa genético. Con respecto a los QTL de altura, en sólo uno de ellos, aquél ubicado en el cromosoma 7B, el donante fue KCJ; en los restantes tres, el donante fue B10. La variación fenotípica total explicada por los cuatro QTL fue $R^2_i=0,47$ (Tabla 6). El $QTL_{alt.bce.4DS}$, el cual está asociado al gen *Rht-D1*, tuvo un $R^2=0,25$, valor que ya había sido reportado para este gen en esta población (Alonso *et al.* 2014), confirmando no sólo la asignación correcta de los marcadores en el mapa sino también el efecto del QTL por dos metodologías. Al analizar las interacciones entre QTL, sólo se observó interacción significativa para los QTL $QTL_{alt.bce.4DS}$ y $QTL_{alt.bce.5BL}$ ($p<0,001$). Para los QTL de DAF, KCJ fue el donante de uno de ellos y B10 el de los tres restantes, con un 97% de la variación fenotípica total (R^2_i) explicada por los 4 QTL; hubo interacción significativa entre los QTL $QTL_{daf.bce.4BS}$ y $QTL_{daf.bce.7DS}$ ($p=0,01$) y entre $QTL_{daf.bce.5AL}$ y $QTL_{daf.bce.7DS}$ ($p= 0,03$). Con respecto a la interacción QTL x año, sólo fue significativa para el $QTL_{daf.bce.2AL}$ ($p=0,02$) (Tabla 6).

Tabla 6. QTL para altura de planta, días a floración (DAF), fertilidad de espiga (FE), peso de mil granos (PMG), número de granos por m² (NG) y rendimiento (Rto) detectados en la población B10xKCJ. ^a Marcador más cercano al pico con máximo LOD del QTL; ^b Posición genética del marcador; ^c LOD de pico; ^d Intervalo de confianza del QTL: intervalo de mapa que incluye hasta -2 unidades de LOD hacia ambos lados del pico de LOD; ^e Alelo parental que contribuye a incrementar el valor del carácter: Baguette 10 (B10) o Klein Chajá (KCJ); ^f Efecto aditivo: Altura de planta en cm; DAF en días; FE en número de granos/peso seco de espiga sin granos; PMG en g; NG en número de granos por m²; Rto en g m⁻²; ^g Proporción de la varianza aditiva explicada por el modelo; ^h Proporción de la varianza fenotípica total explicada por todos los QTL para cada carácter.

Carácter	Cromosoma	Marcador ^a	cM ^b	LOD ^c	IC ^d	Donante ^e	Efecto Aditivo ^f	R ²	P _g ^g	Interacción Qtl x año	R ² _t ^h
Altura	4D	L4D.1	18,1	8,58	4,7 ; 30,6	B10	13,95	0,25	0,23	ns	0,39
Altura	5B	L5B.5	12,7	2,66	6,5 ; 19,9	B10	3,54	0,04	0,04	ns	
Altura	5B	L5B.18	50,8	3,77	45,2 ; 62,5	B10	4,89	0,04	0,04	ns	
Altura	7B	L7B.3	79,7	4,45	62,6 ; 88,4	KCJ	3,48	0,03	0,03	ns	
DAF	2A	L2A.22	122,5	6,06	117,6 ; 128,2	B10	2,47	0,96		0,023	0,97
DAF	4B	L4B.4	15,4	3,25	3,4 ; 30,4	KCJ	1,38	0,96		ns	
DAF	5A	L5A.23	130,6	2,78	114,7 ; 140	B10	1	0,96		ns	
DAF	7D	L7D.1	13,6	3,53	; 52,1	B10	1,78	0,96		ns	
FE	1B	L1B.6	36,4	3,28	10,2 ; 44,4	KCJ	4,12	0,13	0,11	ns	0,26
FE	2D	L2D.9	154,8	5,08	146,3 ;	B10	7,08	0,19	0,16	ns	
FE	5B	L5B.5	10,2	3,15	2,6 ; 22,5	KCJ	3,11	0,12	0,10	ns	
FE	7A	L7A.10	69,9	5,82	63,7 ; 81,8	B10	1,76	0,11	0,09	ns	
PMG	2D	L2D.9	154,8	3,71	147 ;	KCJ	1,17	0,45	0,34	ns	
PMG	7A	L7A.10	69,9	4,02	54,1 ; 90,9	KCJ	1,23	0,45	0,34	0,036	
NG	4D	L4D.2	20,7	5,39	6,7 ; 33,4	KCJ	Ns				
NG	5B	L5B.13	34,1	4,16	25,9 ; 44	KCJ	2206,8	0,61	0,21	ns	0,65
NG	6A	L6A.4	16,7	2,79	7,5 ; 22,9	B10	1088,1	0,59	0,21	ns	
NG	6D	L6D.2	100,3	3,25	69,4 ; 133,1	B10	1472,2	0,59	0,21	ns	
NG	7B	L7B.2	78,2	3,13	35 ; 86,4	B10	1168	0,59	0,21	ns	
Rto	1D	L1D.5	59,1	4,07	40,2 ; 113,2	B10	42,52	0,65	0,18		0,65
Rto	5B	L5B.31	129,3	2,81	105,7 ; 165,7	B10	Ns				

Con respecto a la FE, se encontraron cuatro QTL en los cromosomas 1B, 2D, 5B y 7A (Fig. 6, Tabla 6). Ninguno de ellos ha sido reportado en la bibliografía hasta el momento. Se puede observar que dos de ellos son aportados por B10, mientras que los restantes son aportados por KCJ. Esto es importante en el contexto de la existencia de variación transgresiva, como se mencionó previamente. Si bien el efecto de los dos QTL aportados por el padre KCJ es bajo, en ambos casos es significativo y es necesario para poder encontrar genotipos con valores de FE más altos que el del padre de alta FE (B10).

Cuando se evaluó el efecto de las interacciones marcador x marcador, ninguna fue significativa. La proporción de la variación fenotípica total (R^2_{t}) explicada por el modelo que incluyó a los cuatro QTL fue 0,26 (Tabla 6). Además de no observarse interacciones simples entre QTL, no se observó interacción entre ninguno de los QTL y el año (ambiente) de evaluación fenotípica (Tabla 6).

Si bien los cuatro QTL fueron significativos y explican una gran proporción de la variación total, el hecho de que el tamaño de la población de mapeo sea relativamente pequeño hace que no puedan detectarse efectos menores adicionales que probablemente existan; por otra parte, la cantidad de marcadores SNP disponible por cromosoma, particularmente en algunos casos, no permite restringir los QTL a distancias de mapa menores. En este sentido, la distancia en el mapa genético de los intervalos de confianza de los QTL fueron variables, entre 8,5 y 34,1 cM para los QTL $QTL_{ife.bce.2DL}$ y $QTL_{ife.bce.1BS}$, respectivamente. Para los $QTL_{ife.bce.5BS}$ y $QTL_{ife.bce.7AS}$, los intervalos de confianza fueron de 19,9 y 18,1 cM, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Distancia en el mapa genético en cM (centimorgan) y distancia física del intervalo de confianza (intervalo de mapa que incluye hasta -2 unidades de LOD hacia ambos lados del pico con máximo LOD) en Mpb (mega pares de bases) y distancia física del pico con máximo LOD del QTL para los cuatro QTL de FE.

QTL	Distancia en el Mapa Genético(cM)	Distancia Física Total (Mb)	Distancia Física Pico QTL (Mb)
$QTL_{ife.bce.1BS}$	34,1	400,1	139,8
$QTL_{ife.bce.2DL}$	8,5	31,3	9
$QTL_{ife.bce.5BS}$	19,9	482,5	7,3
$QTL_{ife.bce.7AS}$	18,1	459,5	7,2

Con respecto a las distancias físicas obtenidas utilizando la herramienta BLAST para cada uno de los marcadores SNP que quedaron circunscriptos al intervalo de confianza del QTL (Tabla I, Apéndice) con la base de datos de URGI (<https://urgi.versailles.inra.fr/>) se calculó para cada QTL la posición del pico y la amplitud física de su intervalo de confianza (Tabla 7). Dado que el marcador más cercano al pico de máximo LOD del QTL estaba constituido por más de un marcador SNP (como se explicó anteriormente) en todos los casos, se calculó también la distancia física del pico con máximo LOD del QTL. Para el $QTL_{ife.bce.1BS}$ este intervalo de mapa fue 139,8 Mpb, mientras que para los otros QTL esta amplitud del pico fue considerablemente menor: para $QTL_{ife.bce.2DL}$ fue de 9 Mpb, para el $QTL_{ife.bce.5BS}$ fue de 7,3 Mpb y para el $QTL_{ife.bce.7AS}$ la distancia física fue de 7,2 Mpb. Con respecto a los otros caracteres, se encontraron dos QTL con efecto significativo para el PMG en los cromosomas 2D y 7A ($QTL_{pmg.bce.2DL}$ y $QTL_{pmg.bce.7AS}$) sin interacción entre ellos, pero sí el segundo con interacción QTL x año ($p=0,036$) (Tabla 6); cinco QTL para el NG en los cromosomas 4D, 5B, 6A, 6D y 7B, el primero de los cuales no fue significativo ($p>0,05$). De los cuatro QTL restantes, ninguno presentó interacción QTL x año ni tampoco hubo interacción entre ellos. En tanto, se detectaron dos QTL para rendimiento en los cromosomas 1D y 5B, pero sólo el $QTL_{rto.bce.1DS}$ mostró efecto significativo ($p<0,05$), sin interacción QTL x año.

Dos de los QTL encontrados en este estudio para FE, $QTL_{ife.bce.2DL}$ y $QTL_{ife.bce.7AS}$ co-localizaron con los dos QTL encontrados para PMG. Para ambos QTL de FE, el padre donante del alelo fue B10, mientras que el donante para las mismas regiones para el carácter PMG fue KCJ.

Diseño de marcadores

Se desarrollaron marcadores de PCR alelo-específicos para todos los marcadores incluidos en el intervalo de confianza de cada uno de los QTL de FE (Tabla I, Apéndice). En total se desarrollaron 34 de estos marcadores (Tabla 8): cinco para el $QTL_{ife.bce.1BS}$, seis para el $QTL_{ife.bce.2DL}$, nueve para el $QTL_{ife.bce.5BS}$ y 14 para el $QTL_{ife.bce.7AS}$. No fue posible para todos ellos encontrar alguna enzima de restricción que hiciera un corte SNP-específico, por lo que varios de los marcadores desarrollados incluyeron un tercer iniciador anidado específico, en 3', para una de las dos variantes alélicas. Se muestra en la Fig. 7, con un ejemplo, el esquema del desarrollo de los marcadores con iniciador anidado.

Figura 7. Ejemplo de desarrollo de iniciadores para el marcador 2D.4. La secuencia utilizada para el desarrollo fue obtenida de la base de datos de EnsemblPlants. Sombreado en verde: sitio de localización de los iniciadores forward y reverse; sombreado en gris: sitio de localización del primer anidado con el polimorfismo en 3'; en rojo: sitio del SNP.

>scaffold:TGACv1:TGACv1_scaffold_160351_2DL:3156:3826:1

```

3156 CACCGGGCTCGTTATTGGGTGGACGGGCCTGGCTATGGATGGATCTGGCCCAACAGGTGC 3215
3216 CATCACCTCCCGACCCAGCGCCGTCTCTCTCTTTTCGGGGGAGGAAAGGGCGAGAGGTGCA 3275
3276 GGGGCGGGCGGCGACGACAGCGTCGACCGGTGGCGGAGGGCGGCCGACACCTCAACCCC 3335
3336 CCGTGACCAGAGGTACTTGACGCGTCTCTCCCTCTCCTTATCCCCCATCATCTCTCTCC 3395
3396 CTAGG TCTCATACTCTGTCAAACAGCC GCCCATCAATCCGCCATAGCTTTTCGGGGGAA 3455
3456 CGTGGTGAGGTGATCTGACCGGCGGTGATCTGTT Y TGGAGGCGGCCGTCCCCAGCCCAA 3515
3516 GCTCGTCTGCCTAAGGTACCTTACCTGCATTTTCGAGTTCCACCCCTCCCTGTATCCTCTC 3575
3576 TCTCTCAACAGCCCTTCATCAATCCGCATCTCAAATTTGGTTAGGTCGACGGGAAGACGG 3635
3636 GGCTGAGGCTGCATCTGCGGGTTATATCTGTTGAGGACGCTGCCTTTCTTCCAACGAAAG 3695
3696 CTTTCTCGGATGGCCCCCA AGGAGCAAAGACTTCAGCC TGATCTGTTCAAGGTGACCCAC 3755
3756 CAGAAGGTGGTTGATGCCATCAGGGCAAACATAACTAATCAGACCTCATATGATGTAAGA 3815
3816 TGTAATTGTAT 3826

```

Tabla 8. Marcadores alelo-específicos desarrollados para cada uno de los marcadores SNP de los intervalos de confianza de los cuatro QTL de fertilidad de espiga. En negrita, marcadores SNP del pico de LOD. ^a identificación del iniciador “forward”; ^b identificación del iniciador “reverse”; ^c identificación del iniciador anidado, indicando con letras F/R (“forward/reverse”) y polimorfismo al cual es específico (C/T/G/A); ^d Sitio de reconocimiento y corte de la enzima de restricción.

	Marcador	ID.Pr.F ^a	Iniciador F	ID.Pr.R ^b	Iniciador R	ID.Pr.A ^c	Iniciador A	Enzima Restricción (SR ^d)
QTL_{ife.bce.1BS}	AX-95211457	1B.1.F	TGACATTAGTGCTCTTTCCCTTG	1B.1.R	CACCGAGGCAGGCTAAAA	1B.1.IRC	GAGGAAGATAGTGATGATGATAAGGG	
	AX-94518238	1B.2.F	AGACGAAAGCCGCACAAA	1B.2.R	CCAGCAAGCTGGTTATGG	1B.2.IFT	GCCTTCTCGCAGCTGGTT	
	AX-94450773	1B.3.F	AGAGGATACGCCTCGGCA	1B.3.R	CAGGTATATAGAGGAGCGTCAAG	1B.3.IFC	TCTCTTAACATTTTGCCCGC	
	AX-94383420	1B.4.F	ATGAGATTATCAACTCCCTCCTC	1B.4.R	AGAAGTGATAGCATGTGAAGTCG	1B.4.IFG	TGAAAAATGGGGTTTGCG	
	AX-94592974	1B.5.F	TCAGATGTGTTATTTGTTCCAGGG	1B.5.R	GATGAGCAAATTAGCGGCGAG			<i>HhaI</i> (GCGC)
QTL_{ife.bce.2DL}	AX-94501170	2D.1.F	CAAGTGCGGAGATGAGGAT	2D.1.R	AACCAAGGTCGACGAGGTG			<i>HpyCH4III</i> (ACNGT)
	AX-94772717	2D.2.F	CTGTGATCCTCCAGATACTCAAG	2D.2.R	TTGCTCCCTCATTGCTTAAAAT	2D.2.IFC	TTTGGATAGGAACTACCAGAACATC	<i>HpyCH4III</i> (ACNGT)
	AX-95232269	2D.3.F	CGACTATTAGCAGATGCAGTGT	2D.3.R	TGTTATCAATTGGGTAAAGCTGG	2D.3.IRG	CCACTAAGGATGTGATTGATTGC	
	AX-94496067	2D.4.F	TCTCATATCTGTCAAACAGCC	2D.4.R	GCGTGAAGTCTTTGCTCCT	2D.4.IFC	CCGGCGGTGATCTGTTC	
	AX-94470389	2D.5.F	CAAACCTTCTTGTGTTTCGTAA	2D.5.R	TCTTGAACCTTTGACACACACG	2D.5.IFC	GTCCAGAAATCCGAACCTCCTC	
QTL_{ife.bce.5BS}	AX-94816080	2D.6.F	ATCTGTATTCCACCAGTCCCTCC	2D.6.R	GCTTATCAACGTCTATAGGCAGA	2D.6.IFC	AGATTGTGTAATGGATACTGTTGTC	<i>HhaI</i> (GCGC)
	AX-94406039	5B.1.F	CCCGCTGACTCTGTTTGTGTTGT	5B.1.R	TGTGTGGGAGCTTCTATGCACT			<i>MnII</i> (CCTC)
	AX-94414150	5B.2.F	ATCGCAGGTATCATCGCA	5B.2.R	AAACGCAACGCAAGCAGAG	5B.2.IRC	TAACAGGGCGCAACCG	
	AX-95210238	5B.3.F	CTAATGGGCCTGAAATCCTTC	5B.3.R	ACCGTGTGTTGACGTCTCCG			<i>MnII</i> (CCTC)
	AX-94813848	5B.4.F	TAGCCTGGTCATTCCGCA	5B.4.R	ATATGACTAGGAGATGGGTCACA	5B.4.IFG	AATTTGGTTGGTGGAGCG	
QTL_{ife.bce.7AS}	AX-95684164	5B.5.F	AGAGGTGGGACAACAGTAAACG	5B.5.R	CCATCAGCACACAACTTAAAC	5B.5.IFA	GACAAGGGATGGCGCA	
	AX-94899338	5B.6.F	GGACCTCCTTCTCACCGC	5B.6.R	GCCATTCTACTCCCACGA	5B.6.IFG	CTCCGCGTCACCCAAG	
	AX-94919062	5B.7.F	ATATTCAATTAGGTTGGAGGGAG	5B.7.R	TGGGGCTCCATACGATTC	5B.7.IFC	TCGTGATATCGTTTTTCGCC	
	AX-95684694	5B.8.F	GTGTGGTTGCTCAAGGTGTG	5B.8.R	ACACCTGACTGCAGAACAACAAG			<i>HpyCH4III</i> (ACNGT)
	AX-94527140	5B.9.F	TGACATGACACCATCCGTG	5B.9.R	GAGCACCGGTGTTTCTCAC	5B.9.IRG	CACTTCGAAGGAGATGGACC	
QTL_{ife.bce.7AS}	AX-94419768	7A.1.F	CGCAAAGTGCCCAGGTAT	7A.1.R	CATGATTGCACGTGGTTCC	7A.1.IFC	CCATCTCATGTTCTCTCTCTTTAC	
	AX-94523932	7A.2.F	CAATGTTACCTCTAACATCAGG	7A.2.R	TACAAGTGGCCATGGTGAGAC			<i>Sau3AI</i> (GATC)
	AX-94523322	7A.3.F	TGCTACGTCCTGCACATTTGAT	7A.3.R	TTCTTGACAATGAATCAAAAT	7A.3.IRC	CATGAGCTGCTTTTCATTTTCG	
	AX-95217657	7A.4.F	CTAGTGATAGGGGCGGACG	7A.4.R	CCTAGGATGACACAAACGACACT	7A.4.IFG	GACCATCTAAGAGGTGGAGGAG	
	AX-94698211	7A.5.F	GATTTACAGGACGCAACA	7A.5.R	GCCCACTCCTCTGTCTGGA			<i>DpnI</i> (GATC)
AX-94396597	7A.6.F	ATTGGTCGAGCTATTTCCCG	7A.6.R	TCATGTTCTCCACGTGCC	7A.6.IRC	GGATTTACAGTGGTCTTGATGG		
AX-94757082	7A.7.F	TCAAGTCTGCTTTTGGTATTGGT	7A.7.R	TCGGTACATGATACAGCCAATG	7A.7.IRG	CATCGAATCAACAACATCCAAC		

Marcador	ID.Pr.F ^a	Iniciador F	ID.Pr.R ^b	Iniciador R	ID.Pr.A ^c	Iniciador A	Enzima Restricción (SR ^d)
AX-95630068	7A.8.F	TGATGTGCTAACAAACAACGTAT	7A.8.R	CGGTTCTATAACTCACAACTCA	7A.8.IFG	ACCAGGAACTTCATCGTATCG	
AX-94498468	7A.9.F	GTTGGTGGATGTTCTCTCTCTCT	7A.9.R	AAGGATTACATCGTCACAAGGTT	7A.9.IFC	GCTTTCGCTGTCACACTTCC	
AX-94754662	7A.10.F	GTTGGTGGATGTTCTCTCTCTCT	7A.10.R	GATAAACTCTGAGCACATGGTCC			<i>Hpy</i> CH4III (ACNGT)
AX-94430527	7A.11.F	CAATGGAATACTCATTGGTCCTC	7A.11.R	ATCATACAAACTGGAATGACACA	7A.11.IFG	GCATAGTTGCGTGACCCG	
AX-95177409	7A.12.F	ATCGTGATGGCGGTGACA	7A.12.R	TCGATGGCTGAAAAGCAATTT			<i>Dde</i> I (CTNAG)
AX-94430036	7A.13.F	TCCTCTCTGGTCATCTCACCTCT	7A.13.R	CCAATTGATGACACCTTCGTTG	7A.13.IFC	CGAACCGGAGCTTGTACC	
AX-95221536	7A.14.F	GCTTTACTCTGGATTCCGTCCT	7A.14.R	CTGCCTTGACAGCTCGTACTTG	7A.14.IRC	AGTGGATCAACACACAAGTAACG	

Puesta a punto de marcadores desarrollados

La puesta a punto fue realizada para uno de los QTL, el $QTL_{ife.bce.2DL}$. Se seleccionó este QTL debido a su efecto sobre el carácter (presentó el mayor efecto de los cuatro QTL encontrados en esta población) y la significación del mismo. Seis marcadores fueron amplificados en los parentales y en un grupo de líneas (cinco portadoras del alelo materno y cinco portadoras del alelo paterno), los cuales son mostrados en la Tabla 9.

Para cada par de iniciadores se determinó una temperatura óptima de *annealing*, (Tabla 9). Para este paso se realizó una PCR en gradiente, con temperaturas que fueron desde los 49°C hasta los 61°C sobre ambos parentales. En general, los programas de ciclado de cada par de iniciadores fueron iguales, con modificaciones en la temperatura de *annealing*: 1) cinco minutos de desnaturalización inicial a 94 °C; 2) 40 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 49-61°C (ver Tabla 9) y un minuto a 72 °C; 3) extensión final de siete minutos a 72 °C. Los tamaños de fragmentos esperados se muestran en la Tabla 10. Se obtuvo producto de amplificación del tamaño esperado en todas las líneas, aunque presentaron diferente cantidad de producto de amplificación entre ellas para todos los marcadores.

Una vez amplificado el fragmento en el grupo de líneas seleccionadas, una segunda PCR fue llevada a cabo con el iniciador anidado y uno de los dos iniciadores utilizados en el primer ciclo de amplificación (el *reverse* o el *forward*), dependiendo de si el iniciador anidado era *forward* o *reverse*, respectivamente. Nuevamente, se determinó la correcta temperatura de *annealing* para cada par de iniciadores, buscando favorecer la amplificación de la variante alélica específica. Por esto, las temperaturas de *annealing* de este segundo ciclo de amplificación fueron considerablemente más elevadas que las del primer ciclo. El programa de ciclado utilizado para todos los marcadores en este paso fue: 1) cinco minutos de desnaturalización inicial a 94 °C; 2) 10 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 12 segundos a

67°C, disminuyendo 0,5°C en cada ciclo y 30 segundos a 72 °C; 2) 30 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 12 segundos a 61°C y 30 segundos a 72 °C; y 4) extensión final de 5 minutos a 72 °C. Los tamaños de los fragmentos amplificados se muestran en la Tabla 10. Como resultado, se obtuvo producto de amplificación del tamaño a partir de aquellos individuos que tuvieron el alelo específico para cada uno de los marcadores desarrollados (Tabla 9). Sin embargo, en aquellos individuos que no debían mostrar dicho producto por no poseer ese alelo los resultados no fueron consistentes, dado que al repetir la reacción varias veces se observó amplificación en algunos casos. Es decir, no pudo lograrse, incluso utilizando un programa de ciclado con temperaturas restrictivas, la especificidad esperada con el iniciador alelo-específico anidado.

Tabla 9. Temperatura de annealing determinada para cada marcador del QTL_{ife.bce.2DL} y tamaño de fragmentos del amplicón homeólogo-específico y del fragmento del amplicón alelo-específico. Ambos tamaños se basan en la secuencia de la base de datos de EnsemblPlants (Ref.Seq V.1; variedad Chinese Spring). Alelo específico de uno de los dos progenitores, Baguette 10 (B10) o Klein Chajá (KCJ). N/A: no aplica. TD: touchdown

Marcador	T ^o annealing	Tamaño Amplicón	T ^o annealing Anidado	Tamaño Fragmento	Alelo
2D.1	58	311	N/A	N/A	B10
2D.2	55	221	TD (67°-61°)	110	B10
2D.3	55	408	TD (67°-61°)	290	B10
2D.4	58	333	TD (67°-61°)	249	B10
2D.5	52	303	TD (67°-61°)	240	B10
2D.6	55	371	TD (67°-61°)	260	B10

DISCUSIÓN

El avance en el conocimiento de las bases moleculares y genéticas de caracteres asociados al rendimiento en trigo pan es de gran importancia, no sólo para el entendimiento de los procesos que suceden en el desarrollo de la planta y que determinan su rendimiento, sino para el desarrollo de tecnologías que permitan acelerar el proceso de selección de materiales de más alto rendimiento (y mejor calidad y sanidad). Para este fin, el trabajo interdisciplinario se vuelve fundamental para poder abordar tal complejidad. En este estudio se generó información fenotípica y genotípica de una población biparental segregante para la FE cuyo análisis permitió avanzar en el conocimiento del modo de herencia del carácter y su asociación con el rendimiento y otros caracteres asociados a éste, además de identificar regiones genómicas asociadas al carácter, de potencial interés para futuros estudios. Si bien el control molecular de la determinación del carácter continúa siendo incierto, este estudio da los primeros pasos para poder encontrar los genes involucrados. Recientemente, un estudio realizado por el grupo Trigo Balcarce en una población de mapeo por asociación desarrollada por el Dr. Leonardo S. Vanzetti en la EEA INTA Marcos Juárez (Córdoba, Argentina), mostró que los alelos insensibles de los genes *Ppd-B1* y *Ppd-D1* están asociados a un incremento en la FE (Ramirez *et al.* en prensa). Dado que los parentales de la población utilizada en este trabajo son monomórficos para ambos genes (alelo *i* para el *Ppd-D1* y alelo *s* para el *Ppd-B1*, Vanzetti *et al.* 2013), no se pudo ver el efecto de los mismos en las RIL.

Para la generación de los datos fenotípicos se realizaron tres ensayos a campo y se obtuvieron datos de un cuarto ensayo. Las condiciones climáticas de los tres años evaluados generaron ambientes diferentes para el desarrollo del cultivo durante cada año, generando una amplia variabilidad en la capacidad de los destinos (potencial de rendimiento del cultivo) y diferentes relaciones fuente/destino. Si bien estos “ambientes” afectaron en diferente manera el comportamiento en relación a la

fenología de la población e incidieron en menor o mayor medida sobre todos los caracteres evaluados, el período crítico del cultivo (período comprendido aproximadamente entre los 20 días previos a la antesis y los diez posteriores; Abbate *et al.* 2007) se concentró en la primera semana de noviembre, momento que se considera óptimo para el sudeste bonaerense en función del riesgo de ocurrencia de heladas tardías. Además, esta concentración de floración para toda la población resulta de gran importancia para poder realizar comparaciones entre genotipos dentro del mismo año, siendo que las condiciones ambientales similares durante el período de floración (período crítico) permiten poder hacer una evaluación apropiada de las diferencias debidas al genotipo. En este sentido, en un estudio reciente, Terrile *et al.* (2017) encontraron, al analizar los efectos de la interacción entre cultivares y fechas de siembra, que sólo podían ser comparables los valores de FE cuando las fechas de antesis eran similares dentro de un mismo ciclo agrícola.

La distribución de frecuencia acampanada para el carácter FE que mostró la población de RIL fue la esperada para caracteres cuantitativos en poblaciones biparentales (Falconer y Macklay 1996). Además, se observó en los tres años la presencia de individuos con valores más extremos que los parentales, es decir, existe segregación transgresiva para el carácter (Rieseberg *et al.* 1999). La ocurrencia de individuos con mayor FE que B10 sugiere el aporte de alelos “favorables” para la FE por parte del progenitor de baja FE (KCJ). De hecho, existen otros cultivares con más baja FE que KCJ (Mirabella *et al.* 2016), lo que también puede implicar que KCJ porta alelos con efecto positivo para la FE. Esto es de gran importancia en el contexto del mejoramiento genético, dado que la presencia de individuos con comportamiento más extremo que el de los parentales es una evidencia de la posibilidad de aumentar los valores promedio de caracteres asociados al rendimiento a través del diseño estratégico de cruzamientos y selección de individuos transgresivos.

Con respecto al rendimiento y los restantes caracteres evaluados en la población, los resultados obtenidos muestran relaciones interesantes. En principio, el rendimiento en grano estuvo determinado principalmente por el NG (Slafer *et al* 1990, Borrás *et al.* 2004; Shearman *et al.* 2005; Elía *et al.* 2016, Ferrante *et al.* 2017, Lynch *et al.* 2017) y en menor medida por el PMG. En el caso particular del año 2015, las condiciones de llenado fueron más favorables, y por ende, el cultivo alcanzó, en promedio un mayor PMG, lo que conllevó a un mayor rendimiento promedio, incluso en una condición de menor NG. Sin embargo, cuando se analizaron las correlaciones genéticas entre caracteres, la asociación entre PMG y rendimiento en grano fue no significativa. Por otra parte, durante el 2014 las condiciones climáticas en el inicio del ciclo agrícola que afectaron el establecimiento del cultivo, luego las altas temperaturas previas a la floración que generaron un número bajo de macollos por m^{-2} , y la ocurrencia de una epifitía de roya del tallo. Con respecto a la asociación con la FE, los antecedentes indican que existe una asociación entre ambos; particularmente, se ha observado que la FE explica la mayor proporción de las diferencias en rendimiento entre materiales argentinos (Abbate *et al.*, 1998; Abbate y Lázaro, 2012), ingleses (Shearman *et al.*, 2005) y del Mediterráneo (Acreche *et al.*, 2008), entre otros. Sin embargo, estos y otros antecedentes muestran que la FE está particularmente asociada NG, el principal componente de rendimiento. Los resultados obtenidos muestran que la asociación entre FE y NG ($r=0,48$) es más fuerte que entre FE y rendimiento ($r=0,30$).

Es importante también destacar la correlación que presenta la altura de planta con el resto de los caracteres evaluados, principalmente con el rendimiento ($r=-0,46$; Tabla 5). A partir de la “Revolución Verde” en la década de 1960, con la introgresión de alelos de enanismo en el germoplasma cultivado, no sólo se logró una reducción de la altura, sino un aumento en el rendimiento potencial. Esto se debió, en gran medida, a un aumento en la partición de asimilados hacia la espiga en detrimento del tallo, que conllevó un aumento en el índice de cosecha (Fischer y Stockman, 1986).

Si bien en los últimos años la altura promedio de cultivares comerciales de trigo se ha mantenido relativamente constante mientras que el rendimiento potencial ha ido aumentando (Mirabella, 2016), en el caso del presente trabajo es esperable la existencia de una estrecha relación entre la altura y el rendimiento y sus componentes, dada la constitución genética de la población y el hecho de que no ha sufrido selección alguna.

Otro de los resultados con respecto al modo de herencia de la FE, es la heredabilidad del mismo. La alta proporción de la variación explicada por la varianza genética (51% de la varianza total) (en este caso, sólo efectos aditivos) y su baja varianza de interacción genotipo x ambiente (9%), hacen que el valor de h^2 sea muy alto (0,84). Por esta misma razón, si bien no fue calculada la repetibilidad del carácter en la población, la utilización de dos repeticiones en el campo resulta satisfactoria para poder hacer una correcta estimación del error experimental y obtener resultados robustos. La alta heredabilidad del carácter y la existencia de segregación transgresiva, suma evidencia en favor de la utilización del carácter como criterio de selección en programas de mejoramiento genético, tal como ha sido sugerido por otros autores (Slafer *et al.* 2015; Terrile *et al.* 2017; Fischer y Rebetzke, en prensa, entre otros) y no sólo en generaciones tempranas (Martino *et al.*, 2015; Mirabella *et al.*, 2016) sino en materiales avanzados.

Con respecto al mapa genético generado en el presente trabajo, al considerar la distribución de marcadores en los cromosomas se observó una baja cobertura en general en el genoma D, siendo los cromosomas 4D y 7D los de menor cobertura, con sólo 4 *loci* cada uno. De todas maneras, esto no impide que se logre localizar un QTL con alta confianza. El efecto del bajo número de marcadores genera un intervalo de confianza para el QTL más amplio, es decir, una región cromosómica más grande, lo cual hace más difícil encontrar un gen candidato para ese carácter en esa región. Por otra parte, debido al bajo número de individuos con el que fue realizado el mapeo de

QTL, los QTL de bajo efecto no se pueden detectar (Foulongne-Oriol *et al.* 2012). Se detectaron dos QTL de bajo efecto, uno para rendimiento y el otro para NG, que si bien presentaron valores LOD superiores al LOD de corte, los mismos no fueron significativos cuando se analizó la significación del marcador. Una de las posibles explicaciones es la pérdida de información de algunos individuos que no contaban con el dato genotípico para alguno de los QTL, y por ello, ese individuo fue eliminado para el análisis posterior que incluía todos los QTL de cada uno de los caracteres. Por otra parte, es importante considerar que el análisis de QTL fue llevado a cabo con el dato del BLUP de cada uno de los individuos, para cada uno de los caracteres, mientras que para los análisis posteriores se utilizaron los valores observados para cada uno de los individuos en cada uno de los ensayos. De esta manera, los efectos de interacción descartados en el análisis utilizando los BLUP pueden afectar los resultados posteriores. Para esto, el modelo corrido (con los valores observados) se utilizó para validar el efecto de los marcadores y así poder definir el efecto del marcador y su posible interacción con el ambiente.

En este trabajo se encontraron 19 QTL con efecto significativo para seis caracteres utilizando los valores de BLUP de las variables con cuatro años (FE) y tres años (altura de planta, días entre siembra y floración, PMG, NG, rendimiento en grano) de datos fenotípicos generados a campo. Si bien anteriormente fueron reportados QTL para caracteres asociados al rendimiento (Wang *et al.* 2008, entre otros), tamaño y morfología de grano (Rayma *et al.* 2009), altura de planta y resistencia a fusariosis de la espiga (Buerstmayr *et al.* 2009; Herter *et al.* 2018), entre otros, para la FE no existe ningún QTL detectado hasta el momento, por lo que los resultados obtenidos en el presente trabajo, sumados a los obtenidos por Ramirez *et al.* (en prensa), constituyen los primeros aportes al conocimiento de las bases moleculares de la FE.

Uno de los puntos a destacar en particular es la detección de dos QTL de FE que co-localizan con QTL de PMG, en los cuales B10 y KCJ son los aportantes del alelo

que confiere un aumento en la FE y en el PMG, respectivamente. Esta es una relación interesante entre dos caracteres que están asociados negativamente. Dado que la cobertura de marcadores es baja, no es posible determinar, con esta resolución, si se trata de dos *loci* diferentes ligados o del mismo *locus* con efecto pleiotrópico. Se podría hipotetizar que aquellas líneas con alto número de granos por espiga y alta FE, al tener más destinos para llenar, dividen los recursos para llenar a todos y generan un menor peso por grano. De todos modos, el análisis de correlación genética entre ambos caracteres mostró una relación negativa pero moderada, lo que permite suponer que es posible detectar individuos que posean, simultáneamente, alta FE y alto PMG. Sería interesante avanzar sobre el conocimiento de los genes (y sus funciones) que se encuentran en la región del QTL a través de la utilización de distintos enfoques.

Con respecto al diseño de marcadores alelo-específicos realizado en el presente trabajo, es necesario continuar optimizando las reacciones de PCR para aquellos evaluados y realizar dicha optimización para los restantes. No obstante, si bien los marcadores fueron diseñados de manera de amplificar regiones homeólogo-específicas, la secuencia de referencia empleada fue la disponible públicamente producto del proyecto de secuenciación del genoma del cultivar Chinese Spring. La existencia de polimorfismos entre Chinese Spring y los cultivares parentales de la población en estudio podría haber causado que los iniciadores amplificaran inespecíficamente otros homeólogos. Por ello, sería deseable poder trabajar con líneas nulisómicas, y de esta manera determinar que la región amplificada es la correspondiente al genoma homeólogo de interés. Otra alternativa a emplear eventualmente para la validación de los QTL hallados en el presente trabajo es la secuenciación masiva de amplicones de los 34 marcadores aquí desarrollados en toda la población.

CONCLUSIÓN Y CONSIDERACIONES FINALES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, y considerando las hipótesis presentadas, las cuales proponen que es posible detectar al menos una región genómica asociada con la FE en una población biparental RIL de trigo pan y que dicha asociación es estable independientemente del año de evaluación fenotípica, se concluye que:

- existen al menos 4 regiones genómicas (QTL) asociadas a la FE en una población biparental RIL de trigo pan, derivada del cruzamiento entre Baguette 10 y Klein Chajá, que explican el 26% de la variación fenotípica total, y
- las mencionadas regiones genómicas no presentan interacción entre sí o con el año de evaluación fenotípica.

En síntesis, los resultados de este trabajo permiten confirmar que en una población biparental RIL de trigo pan, derivada del cruzamiento entre Baguette 10 y Klein Chajá, la fertilidad de espiga es un carácter con fuerte asociación positiva con NG y negativa con PMG, con alta heredabilidad (0,84), con baja interacción genotipo x ambiente y con presencia de segregación transgresiva, lo cual, convierte a la FE en un carácter promisorio para ser utilizado como criterio de selección en programas de mejoramiento genético. Adicionalmente, los resultados del presente trabajo constituyen un avance significativo en el establecimiento de las bases genético-moleculares de la fertilidad de la espiga, escasamente conocidos hasta el momento.

BIBLIOGRAFÍA

- ABBATE, P. E.; ANDRADE, F. H.; LAZARO, L.; BARIFFI, J. H.; BERARDOCCO, H. G.; INZA, V. H.; MARTURANO, F. 1998. Grain yield increase in recent Argentine wheat cultivars. *Crop Science*, 38(5): 1203-1209.
- ABBATE, P.E.; LÁZARO L.; MONTENEGRO, A.A.; BARIFFI, J.H.; GUTHEIM, F. 2005. Potential yield of Argentine vs. foreign wheat cultivars. [poster] 7th. International Wheat Conference. Mar del Plata, Bs. As., Argentina; Oct 28-Nov 2, 2005.
- ABBATE, P. E.; LÓPEZ, J. R.; BRACH, A. M.; GUTHEIM, F.; GONZALEZ, F. 2007. Estabilidad en la fertilidad de las espigas de trigo entre ambientes. [poster] Actas del Workshop Internacional Ecofisiología Aplicada al Estudio de la Determinación del Rendimiento y la Calidad de los cultivos de Granos. Mar del Plata, Buenos Aires, 6-7 de septiembre.
- ABBATE, P. E.; PONTAROLI, A. C.; LÁZARO, L.; GUTHEIM, F. 2013. A method of screening for spike fertility in wheat. *The Journal of Agricultural Science*, 151(03): 322-330.
- ACRECHE, M. M.; BRICEÑO-FÉLIX, G.; SÁNCHEZ, J. A. M.; SLAFER, G. A. 2008. Physiological bases of genetic gains in Mediterranean bread wheat yield in Spain. *European Journal of Agronomy*, 28(3): 162-170.
- ALONSO, M. P.; PANELO, J. S.; ABBATE, P. E.; PONTAROLI, A. C. 2014. Asociación entre la variación alélica para genes de enanismo y la fertilidad de la espiga en una población biparental de trigo pan. 43° Congreso Argentino de Genética. Octubre 2014. Bariloche, Argentina, pp. 193
- ALONSO, M. P.; ABBATE, P. E.; MIRABELLA, N. E.; MERLOS, F. A.; PANELO, J. S.; PONTAROLI, A. C. 2018. Analysis of sink/source relations in bread wheat recombinant inbred lines and commercial cultivars under a high yield potential environment. *European Journal of Agronomy*, 93: 82-87.

- ARENDS, D.; PRINS, P.; JANSEN, R.C.; BROMAN, K.W. 2010. R/qtl: High-throughput multiple QTL mapping. *Bioinformatics*, 26: 2990-2992
- AUSTIN, R.B.1982. Crop characteristics and the potential yield of wheat. *Journal of Agriculture Sciences*, 98(2): 447-453. doi:10.1017/S002185960004199X
- BARTOŠ, J.; VLČEK, Č.; CHOULET, F.; DŽUNKOVÁ, M.; CVIKOVÁ, K.; ŠAFÁŘ, J.; ... DOLEŽEL, J. 2012. Intraspecific sequence comparisons reveal similar rates of non-collinear gene insertion in the B and D genomes of bread wheat. *BMC Plant Biology*, 12(1): 155.
- BOEHM, J. D.; IBBA, M. I.; KISZONAS, A. M.; SEE, D. R.; SKINNER, D. Z.; MORRIS, C. F. 2017. Identification of genotyping-by-sequencing sequence tags associated with milling performance and end-use quality traits in hard red spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 77: 73-83.
- BÖRNER, A.; RÖDER, M.; KORZUN, V. 1997. Comparative molecular mapping of GA insensitive *Rht loci* on chromosomes 4B and 4D of common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 95:1133–1137.
- BORRÁS, L.; SLAFER, G.A.; OTEGUI, M.E. 2004. Seed dry weight response to source–sink manipulations in wheat, maize and soybean: a quantitative reappraisal. *Field Crops Research*, 86: 131–146. doi:10.1016/j.fcr.2003.08.002
- BROMAN, K. W.; WU, H.; SEN, Ś.; CHURCHILL, G.A. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19: 889-890.
- BUERSTMAYR, H.; BAN, T.; ANDERSON, J. A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding*, 128(1): 1-26.
- CIMMyT. 2017. Climate Change [en línea] www.cimmyt.org/ [consulta: 20 de diciembre de 2017]

- DEPERI, S. I.; ALONSO, M. P.; WOYANN, L. G.; PONTAROLI, A. C. 2012. Detección de marcadores moleculares asociados a la fertilidad de la espiga de Trigo pan. 15° Congreso Latinoamericano de Genética- 41° Congreso Argentino de Genética. 28 al 31 de Octubre. Rosario, Argentina.
- DRECCER, M. F.; VAN HERWAARDEN, A. F; CHAPMAN, S. C. 2009. Grain number and grain weight in wheat lines contrasting for stem water soluble carbohydrate concentration. *Field Crops Research*, 112(1): 43-54.
- DRECCER, M. F.; WOCKNER, K. B.; PALTA, J. A.; MCINTYRE, C. L.; BORGOGNONE, M. G.; BOURGAULT, M.; REYNOLDS, M.; MIRALLES, D. J. 2014. More fertile florets and grains per spike can be achieved at higher temperature in wheat lines with high spike biomass and sugar content at booting. *Functional Plant Biology*, 41(5): 482-495.
- DUBCOVSKY, J.; LIJAVETZKY, D.; APPENDINO, L.; TRANQUILLI, G. 1998. Comparative RFLP mapping of *Triticum monococcum* genes controlling vernalization requirement. *Theoretical and Applied Genetics*, 97:968–975.
- ELÍA, M.; SAVIN, R.; SLAFER, G.A. 2016. Fruiting efficiency in wheat: Physiological aspects and genetic variation among modern cultivars. *Field Crops Research*, 191: 83–90. doi:10.1016/j.fcr.2016.02.019
- ELLIS, M.; SPIELMEYER, W.; GALE, K.; REBETZKE, G.; RICHARDS, R. 2002. "Perfect" markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6): 1038-1042.
- FAOSTAT.2016 [en línea] <http://www.fao.org/statistics> FAO [consulta: 20 de diciembre de 2017]
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C.1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Prentice Hall. GB. 464 p.
- FERRANTE, A.; SAVIN, R.;SLAFER, G.A. 2012. Differences in yield physiology between modern, well adapted durum wheat cultivars grown under contrasting conditions. *Field Crops Research*, 136: 52–64. doi:10.1016/j.fcr.2012.07.015

- FERRANTE, A.; SAVIN, R.; SLAFER, G.A. 2015. Relationship between fruiting efficiency and grain weight in durum wheat. *Field Crops Research*, 177: 109–116. doi:10.1016/j.fcr.2015.03.009
- FERRANTE, A.; CARTELLE, J.; SAVIN, R.; SLAFER, G.A. 2017. Yield determination, interplay between major components and yield stability in a traditional and a contemporary wheat across a wide range of environments. *Field Crops Research*, 203:114-127.
- FISCHER, R.A. 1984. "Wheat", In: Smith, W.H.; Banks, S.J. (eds.) 'Proceedings of symposium on potential productivity of field crops under different environments', IRRI, Los Baños, Philippines: pp.129–154
- FISCHER, R. A.; STOCKMAN, Y. M. 1986. Increased kernel number in Norin 10-derived dwarf wheat: evaluation of the cause. *Functional Plant Biology*, 13(6): 767-784.
- FISCHER, R.A. 2011. Wheat physiology: A review of recent developments. *Crop Pasture Science*, 62: 95–114. doi:10.1071/CP10344
- FOULKES, J.; RIVERA, C.; TRUJILLO, E.; SYLVESTER-BRADLEY, R.; REYNOLDS, M. 2015. Achieving a step-change in harvest index in high biomass wheat cultivars In: Proceedings of the International TRIGO (Wheat) Yield Potential CENEB, CIMMYT, Obregón, Sonora, Mexico (24-26th March, 2015), pp.31-35.
- FOULONGNE-ORIOU, M.; RODIER, A.; ROUSSEAU, T.; SAVOIE, J. M. 2012. QTL mapping of yield-related components and oligogenic control of the cap colour in the button mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78 (7): 2422-2434
- GALIBA, G.; QUARRIE, S.A.; SUTKA, J.; MORGOUNOV, A. 1995. RFLP mapping of the vernalization (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 90:1174–1179

- GARCÍA, G. A.; SERRAGO, R. A.; GONZÁLEZ, F. G.; SLAFER, G. A.; REYNOLDS, M. P.; MIRALLES, D. J. 2014. Wheat grain number: identification of favourable physiological traits in an elite doubled-haploid population. *Field Crops Research*, 168: 126-134.
- GHIGLIONE, H. O.; GONZALEZ, F. G.; SERRAGO, R.; MALDONADO, S. B.; CHILCOTT, C.; CURÁ, J. A.; MIRALLES, D. J.; ZHU, T.; CASAL, J. J. 2008. Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat. *The Plant Journal*, 55(6): 1010-1024.
- GONZÁLEZ, F. G.; ALDABE, M. L.; TERRILE, I. I.; RONDANINI, D. P. 2014. Grain weight response to different postflowering source: sink ratios in modern high-yielding Argentinean wheats differing in spike fruiting efficiency. *Crop Science*, 54(1): 297-309.
- GONZÁLEZ, F. G.; MIRALLES, D. J.; SLAFER, G. A. 2011. Wheat floret survival as related to pre-anthesis spike growth. *Journal of Experimental Botany*, 62(14): 4889-4901.
- GONZÁLEZ, F. G.; SLAFER, G. A.; MIRALLES, D. J. 2005. Pre-anthesis development and number of fertile florets in wheat as affected by photoperiod sensitivity genes Ppd-D1 and Ppd-B1. *Euphytica*, 146(3): 253-269.
- GONZÁLEZ-NAVARRO, O.E.; GRIFFITHS, S.; MOLERO, G.; REYNOLDS, M.P.; SLAFER, G.A. 2016. Variation in developmental patterns among elite wheat lines and relationship with spike fertility. *Field Crops Research*, 196: 294–304. doi:10.1016/j.fcr.2016.07.019
- GUO, Z.; SLAFER, G.A.; SCHNURBUSCH, T. 2016. Genotypic variation in spike fertility traits and ovary size as determinants of floret and grain survival rate in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 67: 4221–4230. doi:10.1093/jxb/erw200

- GUTIERREZ, L.; MALOSETTI, M.; BOER, M.; VAN EEUWIJK, F. 2015. Mixed-model QTL detection by linkage and linkage disequilibrium analysis. Marker Assisted Plant Breeding Course. Universidad de la República, Uruguay, Febrero 2015.
- HALEY, C. S.; KNOTT, S. A. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, 69(4): 315-324.
- HALLAUER, A.R.; MIRANDA, J.B. 1981. Quantitative Genetic Maize Breeding. Iowa State University Press, Ames 59p..
- HAYMES, K. M. 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14(3): 280-284.
- HERTER, C. P., EBMEYER, E., KOLLERS, S., KORZUN, V., LEISER, W. L., WÜRSCHUM, T., MIEDANER, T. 2018. Rht24 reduces height in the winter wheat population 'Solitär× Bussard' without adverse effects on Fusarium head blight infection. *Theoretical and Applied Genetics*, <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3076-8>
- HUSSAIN, W.; BAENZIGER, P. S.; BELAMKAR, V.; GUTTIERI, M. J.; VENEGAS, J. P.; EASTERLY, A.; SALLAM, A.; POLAND, J. 2017. Genotyping-by-sequencing derived high-density linkage map and its application to QTL mapping of flag leaf traits in bread wheat. *Scientific Reports*, 7(1): 16394.
- JOUDI, M.; SHIRI, M.; KAMRANI, M. 2016. Fruiting efficiency in iranian wheat cultivars: Genetic changes over time and associations with agronomic traits. *Journal of Agronomy*. 15: 19–25. doi:10.3923/ja.2016.19.25
- KILLIAN, B.; ÖZKAN, H.; POZZI, C.; SALAMINI, F. 2009. Domestication of the *Triticeae* in the fertile crescent. En: Feulliet, C., Muelhbauser, G. (eds.) *Genetics and genomics of the Triticeae*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York; pp. 81-120.

- LYNCH, J.P.; DOYLE, D.; MCAULEY, S.; MCHARDY, F.; DANNEELS, Q.; BLACK, L.C.; WHITE, E.M.; SPINK, J. 2017. The impact of variation in grain number and individual grain weight on winter wheat yield in the high yield potential environment of Ireland. *European Journal of Agronomy*, 87: 40-49.
- MARTINO, D.; ABBATE, P. E.; CENDOYA, M. G.; GUTHEIM, F.; MIRABELLA, N. E.; PONTAROLI, A. C. 2015. Wheat spike fertility: inheritance and relationship with spike yield components in early generations. *Plant Breeding*. 134: 264–270.
- MICHELMORE, R. W.; PARAN, I.; KESSELI, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21): 9828-9832.
- MILLIKEN, G.; JOHNSON, D. 1992. *Analysis of Messy Data*. Van Nostrand Reinhold, New York. 473 p.
- MIRABELLA, N. E.; ABBATE, P. E.; CASTAÑO, M.; PONTAROLI, A. C. 2010. Herencia de la fertilidad de la espiga de trigo. 14° Congreso Latinoamericano de Genética, 8° Congreso de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, 42° Congreso de la Sociedad Genética de Chile y 39° Congreso de la Sociedad Argentina de Genética (Viña del Mar, Chile, 1-4 de octubre) pp.242
- MIRABELLA, N. E.; ABBATE, P. E.; RAMIREZ, I. A.; PONTAROLI, A. C. 2015. Genetic variation for wheat spike fertility in cultivars and early breeding materials. *Journal of Agricultural Science*, 154(1): 13-22.
- MIRALLES, D. J.; KATZ, S. D.; COLLOCA, A.; SLAFER, G. A. 1998. Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height. *Field Crops Research*, 59(1): 21-30.

- PACHECOY, M. I.; RAMIREZ, I. A.; MARÍN, A.; PONTAROLI, A. C. 2014. Assessment of cold tolerance at early developmental stages and allelic variation at candidate genes in South American rice germplasm. *Euphytica*, 197(3): 423-434.
- PANELO, J. S.; ALONSO, M. P.; ABBATE, P. E.; BERNARDO, A. M.; PONTAROLI, A. C. 2015. Identificación de marcadores moleculares asociados con la fertilidad de la espiga en trigo pan. Congreso Argentino de Genética. (Mar del Plata sep. 13 -16) pp. 186
- PAUX, E.; SOURDILLE, P.; MACKAY, I.; FEUILLET, C. 2012. Sequence-based marker development in wheat: advances and applications to breeding. *Biotechnology Advances*, 30(5):1071–88.
- PIEPHO, H. P.; MÖHRING, J.; MELCHINGER, A. E.; BÜCHSE, A. 2008. BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica*, 161(1-2): 209-228.
- PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. 2016. R Core Team. *nlme*: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package Version 3.1–125 [en línea] <http://CRAN.R-project.org/package=nlme>. [consulta: abril 2017]
- PONTAROLI, A. C.; MARTINO, D.; MIRABELLA, N. E.; ABBATE, P. E. 2011. 40° Congreso Argentino de Genética. 3° Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución. 1° Jornadas Regionales SAG-NEA. (Corrientes, sep. 18-21) pp.215
- QUARRIE, S. A.; STEED, A.; CALESTANI, C.; SEMIKHODSKII, A.; LEBRETON, C.; ...DODIG, D. 2005. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring× SQ1 and its use to compare QTL for grain yield across a range of environments. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(5): 865-880.

- QUARRIE, S. A., PEKIC QUARRIE, S.; RADOSEVIC, R.; RANCIC, D.; KAMINSKA, A.; BARNES, J.; LEVERINGTON, D.M.; CEOLON C.; DODIG, D. 2006. Dissecting a wheat QTL for yield present in a range of environments: from the QTL to candidate genes. *Journal of Experimental Botany*, 57(11): 2627-2637.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2016 R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [en línea] <http://www.R-project.org/> [consulta: abril 2017]
- RAMIREZ, I.A.; ABBATE, P.E.; REDI, I.W.; PONTAROLI, A.C. Effects of photoperiod sensitivity genes Ppd-B1 and Ppd-D1 on spike fertility and related traits in bread wheat. *Plant Breeding* (en prensa),
- RAJARAM, S. 2005. Role of conventional plant breeding and biotechnology in future wheat production. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 29: 105-111.
- RAMYA, P.; CHAUBAL, A.; KULKARNI, K.; GUPTA, .; KADDOO, N.; DHALIWAL, H. S.; GUPT, V. 2010. QTL mapping of 1000-kernel weight, kernel length, and kernel width in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Applied Genetics*, 51(4): 421-429.
- REYNOLDS, M. P.; EATON, D. 2009. Complementary strategies to raise wheat yield potential; Workshop held at CIMMYT, (El Batan, Mexico; 10-13 November) CIMMYT, México DF. 33p.
- REYNOLDS, M.; BONNETT, D.; CHAPMAN, S. C.; FURBANK, R. T.; MANÈS, Y.; MATHER, D. E.; PARRY, M. A. 2011. Raising yield potential of wheat. I. Overview of a consortium approach and breeding strategies. *Journal of Experimental Botany*, 62(2): 439-452.
- RIESEBERG, L.H.; ARCHER, M.A.; WAYNE, R.K. 1999. Transgressive segregation, adaptation and speciation. *Heredity*, 83(4): 363-372. doi: 10.1046/j.1365-2540.1999.00617.x

- RÖDER, M. S.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M. H.; LEROY, P.; GANAL, M. W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4): 2007-2023.
- SERRAGO, R. A.; MIRALLES, D. J.; SLAFER, G. A. 2008. Floret fertility in wheat as affected by photoperiod during stem elongation and removal of spikelets at booting. *European Journal of Agronomy*, 28(3): 301-308.
- SHEARMAN, V. J.; SYLVESTER-BRADLEY, R.; SCOTT, R. K.; FOULKES, M. J. 2005. Physiological processes associated with wheat yield progress in the UK. *Crop Science*, 45(1): 175-185.
- SLAFER, G.A.; ANDRADE, F.H. 1989. Genetic improvement in bread wheat (*Triticum aestivum*) yield in Argentina. *Field Crops Research*, 21(3): 289-296. doi: 10.1016/0378-4290(89)90010-5
- SLAFER, G.A.; ANDRADE, F.H.; SATORRE, E.H. 1990. Genetic-improvement effects on pre-anthesis physiological attributes related to wheat grain-yield. *Field Crops Research*, 23: 255–263. doi:10.1016/0378-4290(90)90058-J
- SLAFER, G. A.; KANTOLIC, A. G.; APPENDINO, M. L.; MIRALLES, D. J.; SAVIN, R. 2009. Crop development: genetic control, environmental modulation and relevance for genetic improvement of crop yield. *Crop physiology: Applications for Genetic Improvement and Agronomy*, 19: 277-308.
- SLAFER, G. A.; ELIA, M.; SAVIN, R.; GARCÍA, G. A.; TERRILE, I. I.; FERRANTE, A.; MIRALLES, D. J.; GONZÁLEZ, F. G. 2015. Fruiting efficiency: an alternative trait to further rise wheat yield. *Food and Energy Security*. doi: 10.1002/fes3.59
- STANGE, M.; UTZ, H. F.; SCHRAG, T. A.; MELCHINGER, A. E.; WÜRSCHUM, T. 2013. High-density genotyping: an overkill for QTL mapping? Lessons learned from a case study in maize and simulations. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(10): 2563-2574.

- STAPPER, M.; FISCHER, R. A. 1990. Genotype, sowing date and plant spacing influence on high-yielding irrigated wheat in southern New South Wales. III. Potential yields and optimum flowering dates. *Crop and Pasture Science*, 41(6): 1043-1056.
- SUKUMARAN, S.; DREISIGACKER, S.; LOPES, M.; CHAVEZ, P.; REYNOLDS, M. P. 2015. Genome-wide association study for grain yield and related traits in an elite spring wheat population grown in temperate irrigated environments. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(2): 353-363.
- SUKUMARAN, S.; LOPES, M.; DREISIGACKER, S.; REYNOLDS, M. 2017. Genetic analysis of multi-environmental spring wheat trials identifies genomic regions for locus-specific trade-offs for grain weight and grain number. *Theoretical and Applied Genetics* (<https://doi.org/10.1007/s00122-017-3037-7>)
- TERRILE, I.I.; MIRALLES, D.J.; ONZÁLEZ, F.G.; 2017. Fruiting efficiency in wheat (*Triticum aestivum* L): Trait response to different growing conditions and its relation to spike dry weight at anthesis and grain weight at harvest. *Field Crops Research*, 201: 86-96.
- VANZETTI, L. S.; YERKOVICH, N.; CHIALVO, E.; LOMBARDO, L.; VASCHETTO, L.; HELGUERA, M. 2013. Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3): 391-399.
- WANG, R. X.; HAI, L.; ZHANG, X. Y.; YOU, G. X.; YAN, C. S.; XIAO, S. H. 2009. QTL mapping for grain filling rate and yield-related traits in RIL of the Chinese winter wheat population Heshangmaix Yu8679. *Theoretical and Applied Genetics*, 118(2): 313-325.
- WANG, S.; BASTEN, C. J.; ZENG, Z.B. 2012. Windows QTL Cartographer 2.5. [en línea] Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm> [consulta: Agosto 2017]

- WICKER, T.; MAYER, K.F.; GUNDLACH, H.; MARTIS, M.; STEUERNAGEL, B.; SCHOLZ, U.;... PLATZER, M. 2011. Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. *Plant Cell* 23(5):1706-1718.
- YAN, L.; HELGUERA, M.; KATO, K.; FUKUYAMA, S.; SHERMAN, J.; DUBCOVSKY, J. 2004. Allelic variation at the VRN-1 promoter region in polyploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(8): 1677-1686.
- YOU, F. M.; HUO, N.; GU, Y. Q.; LUO, M. C.; MA, Y.;... ANDERSON, O. D. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9(1): 253.

Apéndice

Tabla 1. Lista de marcadores (Breeders' 35K Axiom® array) comprendidos en los QTL encontrados para la FE. En negrita, denominación (ID) de marcadores asociados al pico de máximo LOD del QTL. La posición física, en Mpb, fue obtenida de la base de datos de URGI. Entre corchetes, polimorfismo detectado por el "chip". Para el QTL_{ife.bce.2DL}: en rojo, alelo de Baguette 10 para los marcadores desarrollados.

QTL	Marcadores	Posición Física (Mb)	Secuencia [polimorfismo]
QTL _{ife.bce.1BS}	AX-95190390	48,6	GCTCATTCTCTACTTTCGAGAGCATCCTCAACACCA[A/G]ACGCAGGAAGAATTCAACCTCATGTCTGGGTTG
	AX-95211457	94,8	CTGACCCCGAACCGTCCTCATCAGACTCCGGATCC[A/C]CCTTATCATCATCACTATCTTCCTCATCGCTATCA
	AX-95022601	106,8	GCATGGTGGTCGGTTGCAAATGTTTGGGGAAATGC[A/G]GGCTAGGCCCAAATGTGCGGCTTCGGAGTGAGGGC
	AX-94861978	120,4	CAACTTCTGAAAAGGCCTAGAGTGCTGGATGAGGA[C/T]TATGAGTATTGTGTGAAGGTGATACGGTGGCTGGA
	AX-94588315	125,9	CACGATTCTCGGTTTCTGCTTCCTCACTTTCAACT[A/C]CGGCATGGCCATCTACCGCTCCAACGGCGACGCGG
	AX-94572866	148,4	TCAGAGTTGGCACTTGATGGTTGGCATAGTATTGC[C/T]CTGGAATATTCCGTCGATTGGCCACTACAACCTTT
	AX-94518238	161,2	CAGATGTGACCAACGATGCCTTCTCGCAGCTGAT[G/T]AACACTGAAGGGAGGTGAACTGGACTGCATTGTTT
	AX-94450773	164,7	GTGCTCATCTCACCAGTCTCTTAACATTTTGC CGG[C/G]ATGCAAGGAACAGTAACCCCATGTTTTCCGAAAAG
	AX-94580006	181,2	GTGGCGATGGCGAAAAGGATTGGAGCATGGTGATA[A/G]GGAAATTTGAAAGTTGGGAACAAATTGGGCTTGGA
	AX-94897165	196,5	TCATCGCTTGCAGTTTGGCCTGAACCGGTTTAAT[C/G]AGATGGAGGTAGCGGACGACGCCTACGTCCCAACA
	AX-94533843	217,8	AGCATCGTCTAGAGAATAACGGTGCTCTGATAAGT[C/T]GTGGAAGCTGATGAAGAATTAGGCAGTAAAGAAGA
	AX-94526379	282,1	TAGTCACATTCTAATTCATCATCCAAAATCTTAAC[A/G]AAAAGCATGGTCCATAATGTTTACAAGGTCTTCAT
	AX-94545824	282,4	TTGGATTTGTTTGGGTAATATTGTAGGTGACAATG[A/G]CAAGTTGTACGTACCATTATAACTGCGTGCTTGTC
AX-94383420	288,2	CCTCCTCGACTTAAGGCCTGAAAAATGGGTTTGC[C/G]ACCCTTCAATGATTGGATTGAAGGTACCTTACCAA	
AX-94592974	448,7	CCTGTCTATTATCATCAGCGGATATCTTGGGGTTG[C/T]GCTTGCTGAATTCATGGGAGTATCTGGAGATGATT	
QTL _{ife.bc e.2DL}	AX-94823670	617,4	TTCCTGAGTGC GTTGATCATCATTGTTTGAACCTT[A/G]CCAGGTATCTCACGGCCCTTTCCACGATGCCATC
	AX-94501170	639,7	TCAGCGACTCCATGGCAGAGCTTTTATTGGCGGG[A/G]CTGTTGGTTTTCCAGGGTCCCTAACTGGACGAGGC
	AX-94772717	641,2	GGCATGCATGATTTGGATAGGAACTACCAGAACAG[C/T]GAGCAGATGCTTATAAATCAGATAGCCGATGAGCA
	AX-95232269	644,1	AGGCAGAGGCAGCATCATACAGGCATAGGTAGCAA[G/T]CAATCACATCCTTAGTGGAAGCCTGTCCCTGAACC

QTL	Marcadores	Posición Física (Mb)	Secuencia [polimorfismo]
	AX-94496067	645,7	CGTGGTGAGGTCGATCTGACCGGCGGTGATCTGTT[C/T]TGGAGGCGGCCGTCCCCAGCCCAAGCTCGTCTGCC
	AX-94470389	645,9	CGGGATGACAACGATGTCCAGAAATCCGAACAT[C/T]GCCGGAGAAGAAGTTCTTGTCTCCAAGTGCCCCCT
	AX-94816080	648,2	GAAGATGATCAAGATTGTGTAATGGATACTGTTGG[C/T]GCTGTATGTGTTGATGGATATGGAAATGTAGCATC
	AX-94850234	648,4	GCTGGGAAGGGTTGTTCTTCTGTGTCAAGCCATGT[C/T]GCCGACCGTTCTCAGCAACATTCTTCAGCAGGTTG
	AX-94517735	648,7	CACTCTTTGAGATGTTAGCCGGTAGGGAAATAGAT[C/T]GAGATCCTCTGGTTTTGCCTGGAGATGTTATGTTA
	AX-94406039	6,7	GCCTTTGCAGTTTATAGAGTAGCTGCACTGTTGAG[A/G]TGCTTTAACTCGCCTTTTCGATTCCATTACTAGAAA
	AX-94414150	18,0	GAAAACGCCAGCTGATGTATATTCAC TTGTAGACG[C/T]GTTTGCGCCCTGTTAAAAGGAGGGCTTCATGTCSA
	AX-94897804	20,2	ACCCGGCGGTAAGTGACCCGGACTCGGTACACAAG[C/G]AGGGTTGGCAGGGTGCAAAGCGCTACTTCTGGGCG
	AX-95210238	27,5	TAACGGGCAGAAGGACGGCGCAGCCAAGAACGATG[A/G]GGAAAGAAGGGACCAGTTAGGCCAAACAGTAAAAA
	AX-94813848	36,9	TGTGAGGAGTTTGTAGAAAATTTGGTTAGTGGATC[A/G]CTGGGTTAACTGACTGATATAGGAGTTCCAGATAC
	AX-95684164	63,4	GTCCTTCACCATCTATCTTCGACAAGGGATGGCAC[A/C]GCGTTATGAGACTTGTAATGGTAGGATGGAGACG
	AX-94941430	63,6	CCGCAGAATGAATTAACACCTACGGGTTTGACA[C/T]TAAACTGACAGATGCATAACATTAGAAAACTGAC
	AX-94899338	67,5	AATCTCTCTGGCCTGAATGCCTCCGCGTCACCCA[A/G]TACATGTGGTCCCTCCCATCGCCACACGTTTAC
	AX-94541587	68,8	TACTGTTGTTGTAAATAATTTGAACTTGCTAATA[G/T]TGTGAACACTGCAGTTAAGTTCCCTGGGCCGCTAG
	AX-94605952	70,4	TTATAGTTTCTCCTGCCAATCATCTTACTTTTCAT[C/T]GATGGCCCGTGATGGTTTTGATTTAATATGTGCA
	AX-94919062	73,3	AGGCATGAATGATGATTCGTGATATCGTTTTCTC[C/T]GTATATGTAATATATCGTTTTATTGAAGCAATATG
	AX-94489976	77,8	TTGTGCCGTGGATATGATGGAGTTAGCAATCGGCA[A/G]CACAGCTCCGGCAGCACGAAGCACATCTTTTTCGG
	AX-95120604	285,0	TCATGTTTTGGTGTGGGGTTTGTGAATCAAAAAC[C/T]GAAAGCAAATGTGACAATCATCTATAGCTCAACTG
	AX-94721904	353,0	CCAAGTTTCTGACTCGTTTCACTTCCCCATTAG[C/T]CCCTCCTCTCCCTTCGTTTCGACCGCGACCTCCTC
	AX-95684694	354,3	CATATCTTATGTAAGTTTACCTGGGGCTCT[A/G]CTGTTTCGATTGCCTCTCGGTCCTGGGGATTAATA
	AX-94527140	489,2	GGATAGCCTTCAATAGCTCCTTGGTGACGGCACGC[C/T]GGCCATCTCCTCCGAAGCGCCATGAGAAACTGG
	AX-94419768	115,8	AGCATATTTACCATCTCATGTTCTCTCCTTCA[A/C]ACCTTAAACATTCTCAGATTTGATAGCAAAAATA
	AX-95090243	116,1	TGGCCAGCACTCCGACAAGAAGCTGCGTACGAGGT[C/T]GAGGTCTAGGTCCAAATCACGACCAATTGAAGAGG
	AX-94523932	117,3	TGCCCATATTCATAATTTAACTGAACCAATAAGA[C/G]ATCCACAACCAATGTTTGGTTCTCAGTTGAACACA
	AX-95133592	118,1	TGGCACTCTAGGAACAACTGAAGCATGAGGAGGG[A/G]GGATCCGATCCGACTAAGTGCATGCGCATGACCAG
	AX-94523322	118,3	CAAGGAAC TAAGCATCAAAGGTCAGGCCTATAACT[C/T]GCAAATGAAAGCAGCTCATGAGAAAGCTAGAGAAG

QTL_{ife.bce.5BS}QTL_{ife.bce.7A}
S (f)

QTL	Marcadores	Posición Física (Mb)	Secuencia [polimorfismo]
QTL_{ife.bce.7AS} (ii)	AX-94911832	125,3	TGCATGAGGAAGTTGCAGAAATGGTGCCTGTCTTC[A/G]GTCTTCGACGAGTACCAGCGCTTCGCCGCTGCGAA
	AX-95217657	129,0	AAGTTGTTGTTGCTGACCATCTAAGAGGTGGAGTA[A/G]CTGATTAGAGAGTGTTTTGTTGGCTAGCCCAATG
	AX-94698211	129,3	ACGCGTCGCAACGAATTCACAATTGTTCTCATGAT[C/G]AGGCGGCATTTGCTGTTGAAGCAGTTTGGGTACCT
	AX-94420810	247,7	GTAACAGCGTCATGACCTTCTCGACTGGTAACAC[C/T]CGGAGGTCCGCAACCACATACTGTTCCACCAAAGGA
	AX-94957365	254,9	ATCGATCGTGTCTGAATGGAGCACCATGTATTTA[C/T]CAGTTGTGGCAGGATAAGGTCCTGGACGTGTGTAA
	AX-94824478	257,9	TGACCATTAAGTGGTCTAACAATGAACATTAAGC[G/T]ATGACTACCAATGTTGGGCCAACAGCAACCATGAA
	AX-94706782	273,0	TGCATCTCTTTCAATCCTATCACCAGAATTTACAC[C/T]TCCGGCCAGGCCTTCTAATGCATCAGATTGGACC
	AX-95073209	285,0	CAGCATTACTGTGGCATCTCTGCCCTGCTATTTCA[C/T]CAGTCCTTCCTTGACATATACTCTCCTCCTGGTGG
	AX-94975294	295,2	AGAGAGCTGGTGGATGTTAGATTAAGTCTCTTGG[C/T]GATGCTGCTCGTGGTAACAAGACATTTCTGGATGA
	AX-94396597	317,1	CTGAAAATACTGAAGCTACTGTAGATGGCCCATCC[C/G]CATCAAGACCACTGTAAATCCCGCCTGTATTGCTG
	AX-94921637	329,8	ACTGGGCGATGAGCGAACACCTTGACTATATGAAC[C/T]TGGACACACACGGCAGCTGCCTGGTTGCACCCCTC
	AX-95113499	336,0	GCAGAGTACGTCGGGGGGCCAATAAGCTAACGTC[C/T]TGTTGTGTACAAGGGAAAGTTGAGGCCCATCTATCC
	AX-94586213	339,5	ACATCTGTTCCATCAGTTTTTGTGAAGAGGATGA[C/T]GATGATAATAAGGATAAACGGATAAGACCTTTAGT
	AX-94439510	378,0	GCGTTCTTTGCCTTGACGGGTACAATTGGATTCTA[C/T]GCCTGTTAATGTTCACTAGGCTGATTTACTCGTC
	AX-94391718	409,9	TACAGGTCTTCTCTTAATATGTCATCCACCTTCTC[C/T]AACATGCTCGTTCCACGTTGTTATCAAACCCAC
	AX-95160658	410,7	CCACATGTGAGAGCACCAAGGAAGAGGGGAGGCTT[C/T]GCAGCACGCATGATCTTGCCAGTTCTGTGCGGTGGC
	AX-94757082	436,1	AGAAGTTGGGGTGAATGAGCTTATAATGTTGTAAG[C/G]TAGGATGTTGTTGATTTCGATGATTTGCCGGATGTT
	AX-94495982	437,1	CGTAGGGTAGAATGATTTGTTTCGTAAGCGACCTAA[C/T]CCTGGGTATTTGTCAGTACAAAGATGTTCAAC
	AX-94416431	437,4	ATAGGAAGAGCAGTGGCATAAACTGAATGGACATC[C/T]ACATCACCTTAACATATAATCCTGTTGCATCTTC
	AX-95630068	511,9	GCCACTCTAGTCTGACCAGGAACCTCATCGTAGCA[A/G]CAGAACTCACACAAAACCATTGCTTTGGCCAGCT
AX-94498468	512,3	TGTTTTGGTCGTTGGAGCTTTCGCTGTCACACTGC[C/T]GTGCCATTATCTTACTCTTATCCAGCGGTTGGTCC	
AX-94754662	512,3	ACATTGTGCTGTGATTTTGGTTGTCTTTCCAAGT[C/T]TTTGGTCGTTGGAGCTTTCGCTGTCACACTGCCGT	
AX-94430527	512,8	TGATTGTGTGGTGTCTAGCATAGTTGCGTGACAC[A/G]ACTGAGGGTGTAATATCACTAAATGTGTATGGTGT	
AX-95013142	520,9	CGATAACCAGCTGGCGACCTCTGTTCTTAATGTAA[C/T]TGTAAGCAGGAGGATGCTTTGTTGCTTCTTGGTTA	
AX-95177409	537,1	ACCTGGTGAACCTGTTAATTTTTGTGCTATGCTAA[G/T]AGTTTTTGGGTACCTGGTCTTGCAGTCTGTTGTTCC	
AX-94430036	575,3	CCAATCTGACGACGACATCGAACCGGAGCTTGTC[C/T]ATGCTCGGATGAGGACGAGATAGTCCTCTGACTCG	

QTL	Marcadores	Posición Física (Mb)	Secuencia [polimorfismo]
	AX-95221536	575,3	GCTGTGGATGCTCCCTAGTCCCTAGTCGGTACTGT[C/T]GGTACTTGTGTGTTGATCCACTGTGTGTCCTAGTC