

**PROSPECCIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA CARACTERES
ASOCIADOS AL RENDIMIENTO EN TRIGO PAN MEDIANTE LA
APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS DE GENÓMICA COMPARATIVA**

Ignacio Abel Ramirez

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar
al Título de

MAGISTER SCIENTIAE en Producción Vegetal

Área de Ciencias de las Plantas y Recursos Naturales

Programa de Posgrado en Ciencias Agrarias

Facultad De Ciencias Agrarias

Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP)

Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP –
Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA

Balcarce, Argentina

Mayo de 2014

**PROSPECCIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA CARACTERES
ASOCIADOS AL RENDIMIENTO EN TRIGO PAN MEDIANTE LA
APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS DE GENÓMICA COMPARATIVA**

Ignacio Abel Ramirez

.....

Directora de Tesis: Ing. Agr. Ana Clara Pontaroli (Dr.)

.....

Asesor de Tesis: Ing. Agr. Pablo Eduardo Abbate (*M.Sc.*, Dr.)

**PROSPECCIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA CARACTERES
ASOCIADOS AL RENDIMIENTO EN TRIGO PAN MEDIANTE LA
APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS DE GENÓMICA COMPARATIVA**

Ignacio Abel Ramirez

Aprobada por:

.....

Ing. Agr. Alberto Acevedo (Dr.)

.....

Ing. Agr. Pablo M. Corva (*M.Sc, Ph.D.*)

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres que me enseñaron que esforzarme es la manera de lograr las cosas y siempre me estimularon para hacer lo que me gusta.

A mis hermanos por acompañarme y apoyarme en todas las decisiones, y estar siempre presentes.

Y muy especialmente a Juli que ha hecho un sacrificio muy grande para acompañarme cada día, por apoyarme y confiar en mí, y darme a Martina, el regalo más importante de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a todas las personas con las que comparto mis días de trabajo, Grupo Trigo y vecinos, que hacen que disfrute de venir a trabajar y me han enseñado y ayudado mucho.

Quiero agradecer muy especialmente a mi directora, una excelente profesional y sobre todo una gran persona, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, ayudarme en mi formación como investigador e incentivarme a generar nuevas ideas y proyectos, promoviendo siempre un ambiente donde se puede discutir de forma abierta.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1. Selección de genes que controlan caracteres asociados al rendimiento en especies relacionadas al trigo.....	10
2.1.1. Búsqueda bibliográfica de genes asociados al rendimiento	10
2.1.2. Análisis preliminar de las secuencias peptídicas	11
2.1.3. Búsqueda por alineamientos locales.....	12
2.1.3.1. Búsqueda por BLASTp	12
2.1.3.2. Búsqueda por tBLASTn	12
2.1.4. Análisis de similitud	14
2.1.5. Análisis de dominios proteicos.....	14
2.1.6. Determinación de la colinealidad de marcadores flanqueantes a genes candidatos	14
2.2. Búsqueda bibliográfica de QTLs asociados al rendimiento en trigo pan	15
2.3. Amplificación de fragmentos de genes candidatos	16
2.3.1. Alineamiento global múltiple y diseño de iniciadores específicos.....	16
2.3.2. Extracción de ADN genómico.....	18
2.3.3. Amplificación por PCR.....	18
3. RESULTADOS.....	21
3.1. Selección de genes que controlan caracteres asociados al rendimiento en especies relacionadas al trigo.....	21
3.1.1. Búsqueda bibliográfica de genes asociados al rendimiento	21
3.1.2. Análisis preliminar de las secuencias peptídicas	22
3.1.3. Búsqueda por alineamientos locales.....	22
3.1.4. Análisis de similitud	23
3.1.5. Análisis de dominios proteicos.....	24

3.1.6. Determinación de la colinealidad de marcadores flanqueantes a genes candidatos	24
3.2. Búsqueda bibliográfica de QTLs asociados al rendimiento en trigo	26
3.3. Amplificación de fragmentos de genes candidatos	27
3.3.1. Alineamiento global múltiple y diseño de iniciadores específicos.....	27
3.3.2. Extracción de ADN genómico.....	29
3.3.3. Amplificación por PCR.....	30
4. DISCUSIÓN	33
5. CONCLUSIÓN.....	41
6. BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes que controlan caracteres asociados al rendimiento en especies emparentadas al trigo, selectos a partir de la búsqueda bibliográfica.	21
Tabla 2. Genes para los que se encontraron secuencias similares en trigo y cuya función no ha sido aún determinada en este cultivo.	23
Tabla 3. Porcentaje de similitud global entre las secuencias peptídicas de las especies modelo (arroz, cebada y <i>B. distachyon</i>) y las de trigo.....	23
Tabla 4. Dominios proteicos presentes en los genes selectos.....	24
Tabla 5. Marcadores moleculares que flanquean a 13 genes asociados con el rendimiento en especies modelo (arroz, cebada y/o <i>B. distachyon</i>), y la ubicación propuesta en el genoma de trigo a través de la información obtenida de los mapas comparativos y las secuencias disponibles del genoma.....	26
Tabla 6. Selección de QTLs de trigo a partir de la búsqueda bibliográfica.	27
Tabla 7. Secuencia de iniciadores utilizados para amplificar fragmentos de 13 genes en trigo.	28
Tabla 8. Producto de amplificación estimado <i>in silico</i> a partir de las secuencias de trigo, disponibles del International Wheat Genome Sequencing Consortium, y de <i>B. distachyon</i> , de la base de datos del NCBI.	29
Tabla 9. Estimación de la longitud de un fragmento de cada uno de 12 genes candidatos, mediante análisis (1) <i>in silico</i> y (2) <i>in vitro</i> (por comparación con un marcador de peso molecular).....	32
Tabla 10. Información sobre las especies analizadas, disponible en las bases de datos del NCBI (fuente: http://www.ncbi.nlm.nih.gov , con acceso en agosto de 2013).....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas entre algunos cereales. El tiempo de divergencia a partir del ancestro común se indica en los nodos en millones de años. Adaptada de Feuillet; Salse (2009).....	7
Figura 2. Alineamiento múltiple de citocininas oxidasas/deshidrogenasas 2 (exones 1 y 2) de cebada (<i>Hv</i>), trigo (<i>Ta</i>), <i>Brachypodium distachyon</i> (<i>Bd</i>), arroz, (<i>Os</i>), maíz (<i>Zm</i>) y moha (<i>Si</i>). Los puntos indican coincidencia con la secuencia consenso. Adaptado de Mameaux <i>et al.</i> (2012).....	8
Figura 3. Captura de pantalla donde se muestra la base de datos generada como punto de partida para la identificación de genes candidatos asociados al rendimiento en trigo..	11
Figura 4. Resultado del análisis de una secuencia peptídica consigo misma por “dot-plot” donde se muestran a) repeticiones en tándem y b) regiones de baja complejidad.....	11
Figura 5. Fragmento de una captura de pantalla obtenida como resultado de una búsqueda realizada por BLAST donde se observan los parámetros utilizados: Valor e (“E value”), longitud respecto a la secuencia proporcionada (“Query coverage”) y coincidencia (“Max identity”).	13
Figura 6. Captura de pantalla de la base de datos actualizada con la incorporación de las secuencias de trigo detectadas en los alineamientos locales.	14
Figura 7. Captura de pantalla donde se muestra la base de datos utilizada para la compilación de secuencias de genes candidatos asociados al rendimiento. En azul se observan los hipervínculos que permiten acceder a las secuencias almacenadas en formato FASTA.....	17
Figura 8. Captura de pantalla de un alineamiento global múltiple para el gen <i>DWARF4</i> utilizando el programa MEGA.	17
Figura 9. ADN genómico de diez cultivares de trigo: (1) BIOINTA 3005, (2) BSY 300, (3) INIA Torcaza, (4) KLEIN Chajá, (5) PROINTA Isla Verde, (6) SRM Nogal, (7) LE 2330, (8) BIOINTA 1005, (9) Baguette 18, (10) Klein Tigre.	29
Figura 10. Productos de PCR de los genes (1) <i>DWARF3</i> , (2) <i>TB1</i> , (3) <i>RCN1</i> , (4) <i>FC1</i> , (7) <i>CPD1</i> , (8) <i>HTD2</i> , (9) <i>HGW</i> , (10) <i>FLO2</i> , (11) <i>PGL1</i> y (12) <i>DWARF4</i> . 1-10: variedades de trigo; (-): control negativo; L: marcador de peso molecular. A la derecha de cada foto se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular en miles de pares de bases (Kb)..	30

RESUMEN

El trigo es uno de los cultivos de granos más importantes del mundo y las perspectivas del mercado mundial marcan un aumento sostenido de la demanda, por lo que debe continuar incrementándose el rendimiento por unidad de superficie. Sin embargo, el rendimiento de un cultivo es un carácter complejo, controlado por un elevado número de genes de fuerte interacción con el ambiente. Por lo tanto, para enfrentar el desafío de continuar mejorando sostenidamente el rendimiento es necesario identificar cómo están controlados los caracteres asociados al mismo.

En los últimos años se ha producido un dramático progreso en el conocimiento de las bases genéticas de caracteres asociados con el rendimiento en especies modelo; sin embargo, dicho progreso no se ha producido en igual magnitud en el cultivo de trigo. Esto se debe a que es un alohexaploide formado recientemente, lo que se traduce en que muchos de los genes homeólogos son aún funcionales. Además, el gran tamaño de su genoma y la poca cantidad de marcadores moleculares existentes con respecto a otros cultivos dificultan el clonado de genes. Sin embargo, estas mismas características, sumadas al modo de reproducción, convierten al trigo en una especie adecuada para la aplicación de mapeo de asociación. Éste puede combinarse con el empleo de marcadores diseñados a partir de genes asociados a los caracteres de interés provenientes de especies relacionadas gracias a que existe un alto grado de conservación entre las regiones génicas.

En este sentido, el objetivo del proyecto fue identificar genes candidatos que eventualmente puedan ser utilizados en el mapeo de caracteres relacionados con el rendimiento en trigo pan. Para ello se utilizaron dos enfoques de genómica comparativa. En el primero se seleccionaron 25 genes candidatos relacionados con caracteres que afectan el rendimiento en arroz, cebada y *Brachypodium distachyon*. Estos genes fueron comparados con EST/ADNc de trigo, y se seleccionaron 13 no caracterizados previamente en trigo, que cumplieron condiciones preestablecidas. En el segundo enfoque se seleccionaron 11 QTLs de rendimiento identificados en trigo y se determinó la colinealidad de marcadores flanqueantes en las especies mencionadas anteriormente con el objetivo de identificar genes candidatos. No fue posible seleccionar ningún gen por esta metodología.

Los genes identificados por el primer enfoque fueron alineados globalmente con secuencias homólogas pertenecientes a las tres especies modelo. Luego se identificaron regiones conservadas a partir de las que se diseñaron iniciadores específicos, y se predijo *in silico* el tamaño aproximado de los productos esperados. Para 12 de los 13 genes se obtuvieron productos de amplificación por PCR, y 11 tuvieron un tamaño cercano al esperado.

Los resultados obtenidos indican que es posible identificar genes candidatos a través de herramientas de genómica comparativa *in silico* y diseñar iniciadores específicos de forma rápida y sencilla. Aunque aún es necesario establecer si los genes seleccionados están asociados al rendimiento en trigo, este trabajo constituye un primer paso hacia la identificación de polimorfismos en dichos genes candidatos y su eventual asociación con el fenotipo de diferentes cultivares.

Palabras clave: caracteres asociados al rendimiento, genes candidatos, *in silico*.

ABSTRACT

PROSPECTION OF CANDIDATE GENES FOR YIELD-RELATED TRAITS IN BREAD WHEAT THROUGH THE APPLICATION OF COMPARATIVE GENOMICS TOOLS

Bread wheat is one of the world's most important crops. Current and future prospects indicate that its demand will continue to increase; hence, wheat production will have to increase as well, and raising yields per area unit appears to be the best strategy to tackle this challenge. Grain yield is a complex trait controlled by multiple genes and highly influenced by the environment. To overcome this situation, it is necessary to gain insight into the genetic and molecular basis of yield and related-yield traits.

Recently, a remarkable advance in the elucidation of the genetic and molecular basis underlying-yield related traits has occurred in model organisms, but such progress has not been yet fully evidenced in bread wheat. The reason is that bread wheat is a recently formed hexaploid species, in which most homeologous genes retain their functionality. Its extremely large genome and the limited number of molecular markers available, compared to other crops, hampers the map-based cloning of genes. However, these obstacles can be overcome by combining association mapping with molecular markers designed on the basis of information available from related species. This is possible because genic regions are highly conserved among grasses.

The aim of this study was to identify candidate genes that may be used for mapping yield-related traits in bread wheat. For this purpose, two approaches were systematized. In the first approach, 25 genes identified as controlling yield-related traits were selected from rice, barley and *Brachypodium distachyon*. These genes were aligned and compared with ESTs and cDNAs from wheat. As a result, 13 uncharacterized sequences were selected in wheat, which met a series of preestablished criteria. In the second approach, 11 QTLs for yield-related traits were selected from wheat, and colinearity of flanking markers was determined in the related species mentioned above, in order to identify candidate genes in colinear regions. It was not possible to select genes by this methodology.

Genes identified by the first approach were compared with homologous sequences from related species by global alignment. Conserved regions within each gene were identified and used for primer design. Expected length for the PCR products was predicted *in silico*. Twelve out of 13 genes yielded conspicuous PCR products and 11 of them were close to the expected size.

The results obtained in this study show that it is possible to identify candidate genes and design specific primers in a simple and rapid manner by using a comparative genomics approach. Although it is still necessary to establish whether the selected genes are associated with yield in wheat, this study constitutes a first step towards the identification of polymorphisms in these candidate genes and their possible association with the phenotype of different cultivars.

Keywords: yield related traits, candidate genes, *in silico*

1. INTRODUCCIÓN

El trigo pan (*Triticum aestivum*) es uno de los cultivos de granos más importantes del mundo; ocupa más del 15% de las tierras cultivadas y es el alimento básico para el 35% de la población mundial (Dixon *et al.*, 2009). En Argentina, según datos de los últimos diez años del Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca (MAGyP, 2013), la superficie sembrada anualmente es de alrededor de 5.400.000 ha, con un rendimiento promedio de 2600 kg/ha; esto se traduce en una producción anual de aproximadamente 14.000.000 tn de grano, lo que representa un valor cercano a los 1.300 millones de dólares. Las perspectivas del mercado mundial de trigo estiman, basados en los cambios de producción y stock, una demanda de 760 millones de tn para el año 2020. Esto se traduciría en la necesidad de un incremento de 1,6% anual en la producción (Dixon *et al.*, 2009). Sin embargo, parece poco factible que la respuesta a esta demanda se logre por un aumento en la superficie sembrada ya que el trigo compite con otros cultivos de gran valor económico. Por esta razón la estrategia más factible es continuar incrementando el rendimiento por unidad de superficie.

El incremento del rendimiento ha sido y es uno de los principales objetivos de los programas de mejoramiento genético de trigo en todo el mundo (Rajaram, 2005; Dixon *et al.*, 2009). A lo largo de los últimos 40 años se consiguió un aumento muy importante en el potencial de rendimiento del cultivo casi exclusivamente a través del mejoramiento genético convencional (Rajaram, 2005). Este progreso se ha logrado a una tasa de 2% anual en países en desarrollo durante las tres décadas previas a 1995. Sin embargo, actualmente es de 1,1% anual; es decir, es inferior al valor necesario para cubrir las demandas estimadas para el año 2020 (Dixon *et al.*, 2009). Esto ha llevado a varios investigadores a proponer, en los últimos años, la implementación de una estrategia interdisciplinaria que posibilite incorporar al mejoramiento una mejor y más eficiente evaluación y selección de caracteres a través del uso de las diversas herramientas de genómica, ecofisiología, biotecnología, estadística y bioinformática disponibles (Landjeva *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009; Reynolds; Eaton, 2009; Reynolds *et al.*, 2011) para enfrentar el desafío de continuar mejorando sostenidamente el rendimiento.

El rendimiento de un cultivo es el resultado del efecto directo y complejas interacciones de procesos de crecimiento y desarrollo controlados por un elevado

número de genes (*loci* de caracteres cuantitativos, o QTL) de fuerte interacción con el ambiente. En este sentido, si bien en los últimos años se han realizado numerosos trabajos sobre la identificación de QTLs de rendimiento y/o atributos relacionados a éste (Börner *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Suenaga; Khairallah, 2005; Marza *et al.*, 2006; Quarrie *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2007; ver McIntyre *et al.*, 2010 entre otros), existen pocas evidencias de que hayan sido transferidos con éxito a un fondo genético diferente a aquellos en los que fueron identificados, o bien que hayan sido efectivos en diversos ambientes (Slafer, 2005; Paux *et al.*, 2012). Por lo tanto, para superar este obstáculo deben realizarse estudios exhaustivos en los que se determinen una serie de caracteres ecofisiológicos involucrados en el control del rendimiento, en varios ambientes y utilizando materiales genéticos de origen diverso, que incluyan germoplasma adaptado a las condiciones de cultivo de nuestro país, junto con herramientas moleculares que permitan avanzar en el conocimiento de las bases genéticas de estos caracteres involucrados en la determinación del rendimiento.

Entre los atributos más estrechamente asociados con el progreso genético en el rendimiento de trigo a lo largo de los últimos 30-40 años se encuentra el incremento en el número de granos por m² (Fischer, 2007). Según un esquema propuesto por Fischer (1984), en ausencia de limitaciones hídricas o nutricionales el número de granos por m² puede considerarse como el producto de: (1) la duración del período de crecimiento de las espigas, previo al llenado de los granos, (2) la tasa de crecimiento del cultivo durante ese período, (3) la partición del peso seco a espigas durante ese período, y (4) el número de granos por unidad de peso de espiga producido (es decir, un factor de fertilidad de las espigas).

Se ha propuesto que el incremento en el número de granos debería complementarse con un aumento en el peso por grano (Foulkes *et al.*, 2007). Fischer (2011), entre otros autores, señala que estos caracteres están correlacionados negativamente a través de mecanismos compensatorios, en tanto que Calderini *et al.* (2013) observaron una asociación curvilínea entre ambos, lo que permite hipotetizar que es posible mejorar simultáneamente los dos caracteres. Para romper esta interacción, Ugarte *et al.* (2007) propone seleccionar a través de tamaño de grano, que se encuentra correlacionado de forma positiva con el peso del grano. Para esto se vuelve necesario avanzar en el conocimiento de las bases genéticas del peso y del tamaño de grano (Calderini *et al.*, 2013). Al respecto, si bien se han descrito

numerosos QTLs sólo se han identificado unos pocos genes asociados a estos caracteres, por lo que el conocimiento de las bases genéticas es aun fragmentario (Su *et al.*, 2011).

A partir de los años 60 el aumento de los rendimientos se produjo en gran medida a través del incremento de la partición del peso seco a espigas en detrimento de los tallos durante el período de crecimiento de las inflorescencias (Brooking; Kirby, 1981; Fischer; Stockman, 1986; Youssefian *et al.*, 1992; Foulkes *et al.*, 2011). Sin embargo, no ha habido un intento sistemático en incrementar el índice de cosecha desde 1990 (Abbate *et al.*, 1998; Foulkes *et al.*, 2012). En este sentido se ha propuesto aumentar la partición a espiga reduciendo la competencia por destinos alternativos, principalmente macollos estériles. Sin embargo, aún quedan por identificar las bases moleculares de los mecanismos, distintos de los genes de enanismo, que determinan la variación genética para la partición a espiga y desarrollar los marcadores que permitan utilizar dicha variabilidad en programas de mejoramiento (Foulkes *et al.*, 2012).

El peso seco de espigas alrededor de antesis ha sido considerado un buen indicador de la disponibilidad de fotosintatos destinados a la generación de órganos reproductivos, que determinaría la viabilidad de las flores diferenciadas y, en consecuencia, el número de granos por m² (Fischer, 1984; Abbate *et al.*, 1997). La manipulación de la duración del período de crecimiento de las espigas y de la tasa de crecimiento del cultivo durante dicho período con fines de mejoramiento genético también ha sido abordada por diversos grupos de investigación, con resultados variables (ver revisiones de Fischer, 2007; Fischer, 2011). Slafer *et al.* (2012) proponen que aumentos en la duración de esta etapa permitirían un mayor crecimiento de las espigas durante las etapas previas a antesis, aumentando el número de flores fértiles y en consecuencia el número de granos. Sin embargo, se han realizado pocos trabajos intentando determinar la variabilidad existente para esta etapa del desarrollo del cultivo (González *et al.*, 2011) y no se ha logrado aún la identificación de sus bases genéticas (ver Foulkes *et al.*, 2011).

La fertilidad de la espiga (FE) ha sido estudiada profusamente desde el punto de vista ecofisiológico (Abbate *et al.*, 1998, 2007; Miralles *et al.*, 1998; González *et al.*, 2005; Serrago *et al.*, 2008, entre otros) pero sólo recientemente ha comenzado a abordarse desde el punto de vista genético-molecular, como una vía para aumentar el rendimiento (Ghiglione *et al.*, 2008; Slafer *et al.*, 2009; Sylvester-Bradley *et al.*, 2009 en

Reynolds; Eaton, 2009; Mirabella *et al.*, 2010; Martino *et al.*, 2011, 2012; Deperi *et al.*, 2012; Abbate *et al.*, 2012). En este sentido, al analizar las diferencias de rendimiento entre cultivares argentinos, Abbate *et al.* (1998) encontraron que la fertilidad de la espiga 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 fertilidad de la espiga 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 fertilidad de la espiga. Más aún, Abbate *et al.* (2007, 2010, 2012) encontraron que las diferencias en la FE de un grupo de cultivares argentinos resultaron ser estables entre ambientes, inclusive aquellos sub-potenciales. Pontaroli *et al.* (2012) observaron que la FE parece ser un carácter de mediana heredabilidad, controlado por varios genes, pero hasta el momento no se conocen los mecanismos moleculares subyacentes.

Otros caracteres que guardan estrecha relación con la determinación del rendimiento en trigo y que están comenzando a ser estudiados desde el punto de vista molecular y/o genético son la capacidad fotosintética, conductancia estomática y fluorescencia de hoja (Reynolds; Eaton, 2009; Parry *et al.*, 2011). Parry *et al.* (2011) sugieren que el aumento en el rendimiento potencial a través del mejoramiento por la capacidad fotosintética podría ser de 50%, mientras que otros autores sostienen que el rendimiento potencial está asociado a la conductancia estomática (Fischer; Edmeades, 2010). La utilización de estos y otros caracteres fisiológicos en el mejoramiento de trigo fue impulsada por el CIMMYT a partir del estudio de Fischer *et al.* (1981), y esto ha dado como fruto un porcentaje significativo de líneas seleccionadas con esos criterios, además de su difusión a programas de mejoramiento de países como España y Australia. Poco se conoce, sin embargo, sobre las bases genéticas subyacentes y las posibilidades de manipular dichos atributos a nivel molecular (Furbank *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que la dinámica de acumulación de reservas de carbohidratos solubles en tallos en antesis puede tener influencia tanto en la determinación del número de granos como durante el período del llenado de los mismos (Fischer, 2007; Dreccer *et al.*, 2009). De hecho, Dreccer *et al.* (2013) observaron que podría explicar hasta en un 50% el rendimiento en condiciones de estrés severo. Se han publicado pocos trabajos sobre la identificación de QTLs asociados al carácter (Rebetzke *et al.*,

2007; Yang *et al.*, 2007; en McIntyre *et al.*, 2010), en tanto que Xue *et al.* (2008) realizaron un exhaustivo análisis de microarreglos y propusieron una serie de genes putativamente responsables del mismo; sin embargo, aún es necesario identificar bases genéticas que controlan este carácter (McIntyre *et al.*, 2012; Dreccer *et al.*, 2013).

La ocurrencia de vuelco afecta negativamente el rendimiento (Berry *et al.*, 2009 en Reynolds; Eaton, 2009), puede generar pérdidas superiores al 80% (Foulkes *et al.*, 2011). La tolerancia al vuelco está aparentemente definida por un conjunto de variables como la altura de planta, volumen y compacidad de la masa radicular, grosor de la pared del tallo y plasticidad del tallo, entre otras (Berry *et al.*, 2003). Se han realizado varios trabajos de mapeo de QTLs, particularmente de la firmeza del tallo (por ejemplo, Keller *et al.*, 1999; Börner *et al.*, 2002), pero aún resta conocer con mayor detalle las bases genéticas de la tolerancia al vuelco.

En los últimos años se ha producido un gran progreso en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares de caracteres asociados con el rendimiento en especies modelo como *Arabidopsis thaliana*, arroz, maíz y *Brachypodium distachyon*. Por el contrario, si bien se dispone de vasta información a nivel de mapas genéticos (Lehmsiek *et al.*, 2009), se ha realizado un considerable esfuerzo en la construcción de mapas físicos (<http://www.wheatgenome.org/Projects/IWGSC-Bread-Wheat-Projects/Physical-mapping>) y varios genes y QTLs de importancia agronómica ya han sido clonados (Laurie, 2009), dicho progreso no se ha producido en igual magnitud en trigo y especies de la tribu Triticeae, en especial para caracteres agronómicos complejos (Fischer, 2011; Paux *et al.*, 2012), debido principalmente al tamaño y la complejidad de sus genomas (Feuillet *et al.*, 2012).

El trigo pan es un alohexaploide ($2n=6x=42$) cuyo genoma nuclear está compuesto por tres juegos de cromosomas homeólogos (AABBDD). El hecho de que su constitución ocurrió hace tan sólo ~8000 años (Killian *et al.*, 2009) se traduce en que muchos de los genes homeólogos son aún funcionales y no han sufrido un proceso masivo de pseudogenización, a diferencia de los poliploides ancestrales como el maíz (Bennetzen, 2009; Paux *et al.*, 2012). Esto resulta en la existencia de relaciones complejas entre *loci* homeólogos. Además, el gran tamaño de su genoma (17 Gpb), el hecho de que más del 85% del mismo está compuesto por transposones, y la poca cantidad de marcadores moleculares existentes en comparación con otros cultivos

importantes, dificultan el clonado de genes en base a mapas y el clonado posicional (Feuillet *et al.*, 2012; Paux *et al.*, 2012). Al mismo tiempo, si bien se han generado diversas iniciativas de secuenciación del genoma completo de trigo, como el Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma de Trigo (<http://www.wheatgenome.org/>), el Consorcio de Trigo del Reino Unido (http://www.cerealsdb.uk.net/Index_Home.html), y el Proyecto Europeo *TriticeaeGenome* FP7 (<http://www.triticeaegenome.eu/index.php>) (Feuillet *et al.*, 2012), la ausencia de la secuencia del genoma de la especie en estudio dificulta el desarrollo de nuevos marcadores basados en la tecnología de PCR (Krattinger *et al.*, 2009).

La secuenciación de los ARN mensajeros surge como una posibilidad para acceder al menos a parte de la información genética (Paux *et al.*, 2012). Existen en bases de datos públicas como las del NCBI y GrainGenes más de 400.000 secuencias de ADNc y ARNm y más de un millón de “expressed sequence tags¹” (EST). Estas secuencias pueden ser alineadas y comparadas con secuencias de genes asociados a los caracteres de interés (Mayer *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2011) provenientes de otras gramíneas relacionadas con trigo de las que se cuenta con más información, como arroz, cebada y *Brachypodium distachyon* (Figura 1), gracias a que existe un alto grado de conservación entre las regiones génicas (Devos, 2005; Castillo *et al.*, 2010; Rustenholz *et al.*, 2010). De esta manera la identificación de secuencias con un alto grado de similitud (Figura 2) puede utilizarse para inferir homologías (Pearson, 1999; Imelfort, 2009, Feuillet *et al.*, 2011) y asignar así una función putativa a las secuencias.

¹ Expressed sequence tag: Secuencia de ADN de 200-800 nucleótidos de longitud, complementaria a un segmento de un ADNc obtenido por transcripción inversa de un ARNm.

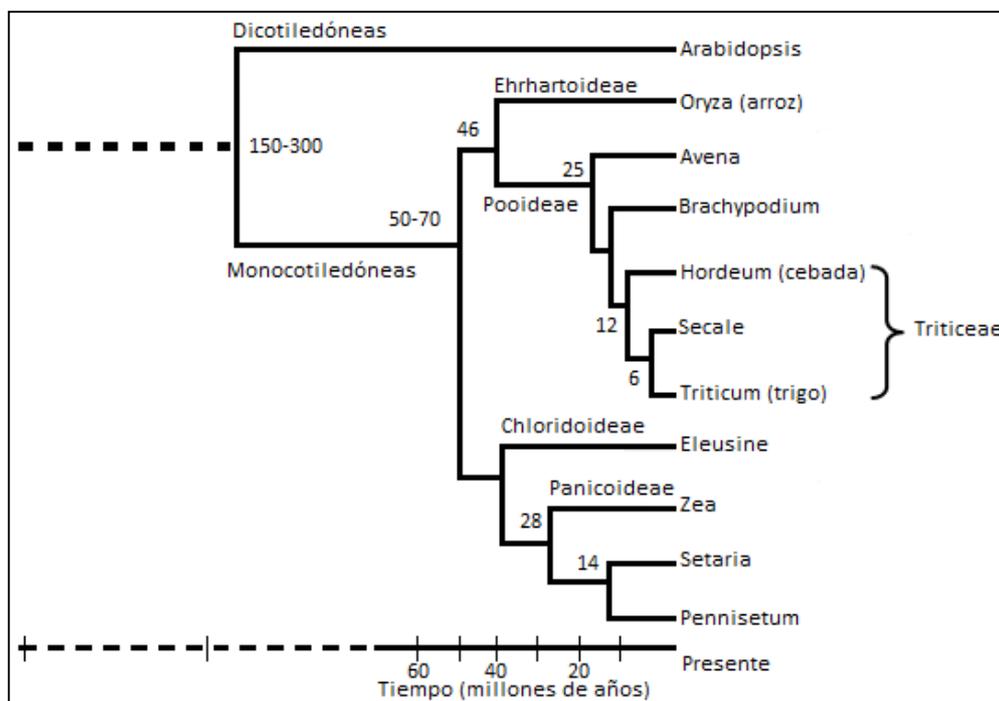


Figura 1. Relaciones filogenéticas entre algunos cereales. El tiempo de divergencia a partir del ancestro común se indica en los nodos en millones de años. Adaptada de Feuillet; Salse (2009).

A su vez, se dispone de mapas genéticos comparativos (ver <http://www.gramene.org>) con los que establecer relaciones entre QTLs ya mapeados en trigo y regiones ortólogas en especies relacionadas cuyo genoma se ha secuenciado. Así, si bien en trigo se han diseñado marcadores en base a secuencias consenso en regiones ortólogas (“COS markers”) que abarcan el genoma completo y, de esta manera, se han identificado genes asociados a caracteres como calidad panadera (Quraishi *et al.*, 2009), existe poca información sobre el grado de colinealidad o conservación de secuencias a través de especies para el caso particular de regiones involucradas en el control de caracteres relacionados con el rendimiento (Zeida *et al.*, 2010).

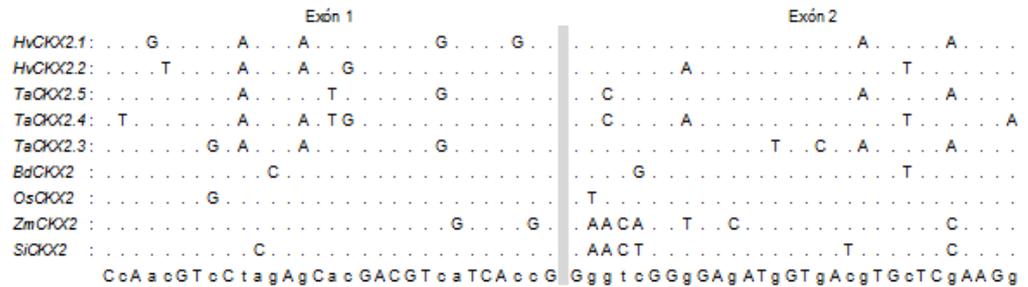


Figura 2. Alineamiento múltiple de citocininas oxidasas/deshidrogenasas 2 (exones 1 y 2) de cebada (*Hv*), trigo (*Ta*), *Brachypodium distachyon* (*Bd*), arroz, (*Os*), maíz (*Zm*) y moha (*Si*). Los puntos indican coincidencia con la secuencia consenso. Adaptado de Mameaux *et al.* (2012).

Este enfoque de genómica comparativa permitiría, a través de la utilización de herramientas bioinformáticas adecuadas, analizar la creciente cantidad de secuencias de trigo disponibles en forma pública cuya función es desconocida. De esta manera se podrían identificar genes candidatos asociados al rendimiento, conservados entre especies relacionadas. Una vez seleccionados dichos genes, las regiones conservadas de su secuencia pueden ser utilizadas para desarrollar iniciadores específicos y obtener así productos de PCR de diferentes individuos. Posteriormente estos productos pueden ser secuenciados para determinar la variación alélica y desarrollar marcadores funcionales para los mismos que pueden ser validados siguiendo una estrategia de mapeo por asociación. De esta manera se avanzaría en el conocimiento de las bases genéticas de caracteres asociados al rendimiento y se generarían marcadores moleculares que permitirían asistir a los programas de mejoramiento genético de trigo.

Hipótesis

1) Al menos un gen asociado al rendimiento en (i) *Oryza sativa* (arroz), (ii) *Hordeum vulgare* (cebada), (iii) *Brachypodium distachyon*, cumple con una o más de las siguientes condiciones:

- a) está conservado en otra/s de las especies mencionadas;
- b) tiene homología con EST/ADNc de trigo pan (*Triticum aestivum*);
- c) está flanqueado por marcadores que en trigo pan son colineales y están ligados a un QTL asociado con el rendimiento.

2) Al menos un QTL asociado con el rendimiento en trigo pan está ubicado en una región que exhibe colinealidad de marcadores con una región perteneciente a una o más de las especies mencionadas en (1), en la que se ha detectado un gen que afecta el rendimiento.

3) A partir de al menos un marcador diseñado a través de aquellos genes seleccionados en (1) y (2) se obtiene/n (un) producto/s de amplificación en trigo pan mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Objetivo general

Identificar, mediante la aplicación de herramientas de genómica comparativa, genes candidatos a utilizar eventualmente en el mapeo de caracteres relacionados con el rendimiento en trigo pan.

Objetivos particulares

- 1) Seleccionar genes que estén relacionados con caracteres que afectan el rendimiento en arroz, cebada y *Brachypodium distachyon*.
- 2) Determinar la homología entre dichos genes y EST/ADNc de trigo.
- 3) Identificar secuencias conservadas en otra/s de las especies mencionadas.
- 4) Determinar la colinealidad de marcadores moleculares que flanquean genes candidatos en dichas especies en comparación con mapas genéticos de trigo.
- 5) Seleccionar QTLs de rendimiento identificados en trigo.
- 6) Establecer si los marcadores moleculares ligados a QTLs de rendimiento identificados en trigo están presentes en las especies mencionadas y si se encuentran físicamente cerca de genes candidatos para el carácter.
- 7) Amplificar fragmentos de aquellos genes candidatos seleccionados en trigo, por PCR a partir de individuos de una población de mapeo de asociación.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de genes que controlan caracteres asociados al rendimiento en especies relacionadas al trigo

2.1.1. Búsqueda bibliográfica de genes asociados al rendimiento

Utilizando las especies arroz, cebada y *Brachypodium distachyon* como modelos, se realizó una exhaustiva búsqueda en la bibliografía y en las bases de datos de secuencias públicas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), JCVI (<http://www.jcvi.org>), RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu>), CerealsDB (<http://www.cerealsdb.uk.net>), GRAMENE (<http://www.gramene.org/>) y GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov>) con el fin de hallar genes asociados a caracteres que controlan el rendimiento, haciendo énfasis en los siguientes:

1) En antesis, a) fluorescencia de hoja, b) fotosíntesis neta de hoja, c) conductancia estomática, d) índice de verdor foliar, e) contenido de reservas de carbohidratos solubles en tallos, f) biomasa total;

2) En madurez, g) índice de vuelco, h) índice de cosecha, i) peso por grano, j) número de granos por unidad de superficie, k) fertilidad de la inflorescencia, l) biomasa total.

Utilizando el programa Microsoft Excel 2007 se generó una base de datos (Figura 3) que contenía para cada uno de los genes seleccionados la información sobre la especie en la que había sido identificado y el carácter al que había sido asociado. Además, se incluyeron hipervínculos para acceder a la publicación en la que había sido descrito el gen y a la secuencia nucleotídica y peptídica del mismo (almacenadas en formato FASTA). Esta información se utilizó como punto de partida para la identificación de genes candidatos asociados al rendimiento en trigo.

A	B	C	D	E	F
Gen	Especie	Paper	Sec. Nucleotídica	Sec. Peptídica	Carácter
<i>SD-1</i>	Arroz	Link	Link	Link	Altura
<i>PROG1</i>	Arroz	Link	Link	Link	Hábito de crecimiento
<i>DWARF4</i>	Arroz	Link	Link	Link	Hábito de crecimiento
<i>OsCPD1</i>	Arroz	Link	Link	Link	Hábito de crecimiento

Figura 3. Captura de pantalla donde se muestra la base de datos generada como punto de partida para la identificación de genes candidatos asociados al rendimiento en trigo.

2.1.2. Análisis preliminar de las secuencias peptídicas

Cada secuencia peptídica fue comparada consigo misma mediante un análisis “dot-plot” utilizando la herramienta DOTLET (<http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/dotlet>). Este análisis permite identificar repeticiones en tándem y/o regiones de baja complejidad² (Figura 4) que pueden dificultar las búsquedas por alineamientos locales en las bases de datos si no son tenidas en cuenta.

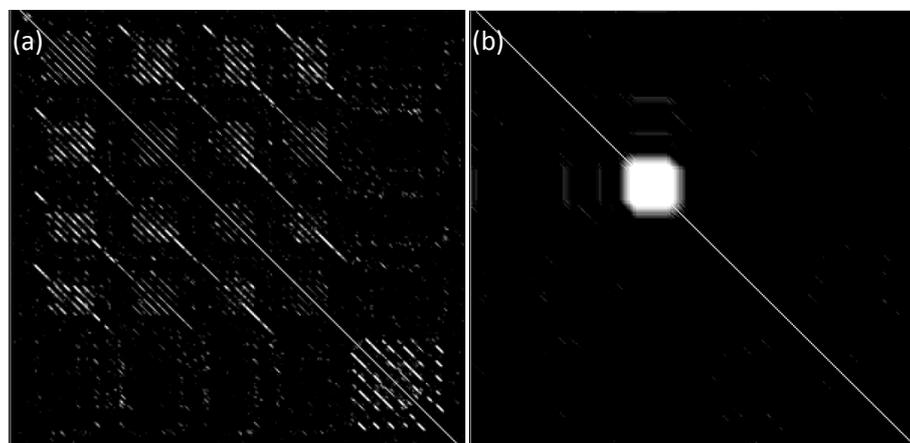


Figura 4. Resultado del análisis de una secuencia peptídica comparada consigo misma por “dot-plot” donde se muestran situaciones que dificultarían los análisis posteriores. a) repeticiones en tándem y b) regiones de baja complejidad.

² Región de baja complejidad: segmento de una secuencia peptídica que presenta un aminoácido o un motivo pequeño repetido varias veces.

2.1.3. Búsqueda por alineamientos locales

Las secuencias peptídicas incluidas en la base de datos se usaron para identificar secuencias similares en trigo que no hubieran sido caracterizadas previamente. Las búsquedas se realizaron usando dos variantes de alineamientos locales que permite realizar el algoritmo BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”; Altschul *et al.*, 1990) del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>):

2.1.3.1. Búsqueda por BLASTp

Este procedimiento permitió realizar una búsqueda en una base de datos de proteínas identificando aquellas secuencias que tuvieron regiones similares con respecto a la secuencia peptídica proporcionada (“query”). Como resultado de cada búsqueda se obtuvo una lista de secuencias (“hits”) ordenadas en forma decreciente por un puntaje que dependió de la longitud y de la calidad del alineamiento. Las búsquedas se realizaron utilizando parámetros estándar y la matriz de sustitución BLOSUM62 (Menlove *et al.*, 2009).

Cada secuencia peptídica fue utilizada como “query” para realizar una búsqueda en la base de datos de proteínas denominada “*Non-redundant protein sequences*” de trigo. Se agregó a la base de datos propia la secuencia peptídica (“hit”) de trigo de mayor puntaje (“score”) siempre que tuviera una probabilidad de ocurrencia (“expected value”³ o valor $e \leq 10^{-10}$), una longitud de al menos 2/3 de la secuencia proporcionada (Semple, 2007) y una coincidencia (“Max identity”⁴) superior al 50% (Claverie; Notredame, 2006) (Figura 5).

2.1.3.2. Búsqueda por tBLASTn

Este procedimiento permitió realizar una búsqueda en una base de datos de nucleótidos traduciendo una secuencia peptídica (“query”), en los seis marcos de

³ Expected value o valor e: Valor que estima la probabilidad de que el alineamiento suceda por azar. Valores más cercanos a cero indican que la probabilidad de que se haya producido ese alineamiento por azar es menor.

⁴ Max identity: Porcentaje de residuos o nucleótidos que coinciden entre dos secuencias que fueron alineadas.

lectura posibles. Como resultado de cada búsqueda se obtuvo una lista de secuencias (“hits”) ordenadas en forma decreciente por un puntaje que dependió de la longitud y de la calidad del alineamiento. Las búsquedas se realizaron utilizando parámetros estándar y la matriz de sustitución BLOSUM62 (Menlove *et al.*, 2009).

Aquellas secuencias (“queries”) cuyos “hits” no cumplieron con las condiciones establecidas en el punto anterior fueron comparadas utilizando tBLASTn y la base de datos de nucleótidos denominada “*Nucleotide collection (nr/nt)*” de trigo. Se seleccionó el mejor “hit” (ADNc o ARNm) utilizando las condiciones establecidas en la búsqueda por BLASTp (Figura 5).

Aquellas secuencias (“queries”) cuyos “hits” no cumplieron con las condiciones establecidas fueron comparadas nuevamente utilizando tBLASTn pero utilizando la base de datos de fragmentos de secuencias expresadas o “*Expressed sequence tags (est)*” de trigo. Se seleccionaron los “hits” (ESTs) que tuvieron un valor $e \leq 10^{-10}$ y una coincidencia superior al 50% (“Max identity”) (Claverie; Notredame, 2006) (Figura 5).

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
ADQ00387.1	ring E3 ubiquitin ligase [Triticum aestivum]	778	778	100%	0.0	88%	G
3IZ6_U	Chain U, Localization Of The Small Subunit Ribosomal Proteins Into A 5.5 A Cryo-Em Map Of Triticum Aestivum Translating 80s Ribosome	23.9	23.9	7%	0.29	34%	S

Figura 5. Fragmento de una captura de pantalla obtenida como resultado de una búsqueda realizada por BLAST donde se observan los parámetros utilizados: Valor e (“E value”), longitud respecto a la secuencia proporcionada (“Query coverage”) y coincidencia (“Max identity”).

Todas las secuencias seleccionadas a través de tBLASTn fueron analizadas con VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Esta herramienta permitió identificar y eliminar de las secuencias nucleotídicas los fragmentos pertenecientes a vectores de clonación. Posteriormente las secuencias provenientes de ESTs fueron ensambladas utilizando la herramienta CAP3 (Huang; Madan, 1999).

Todas las secuencias nucleotídicas (ADNc, ARNm y ESTs ensamblados o “contigs”) fueron traducidas en los marcos de lectura establecidos por tBLASTn utilizando la herramienta Translate (<http://web.expasy.org/translate/>) de ExPASy.

Se incorporaron a la base de datos original las secuencias nucleotídicas y peptídicas identificadas por BLASTp y tBLASTn en trigo (Figura 6).

A	B	C	D	E	F	G	H	I
Gen	Especie	Paper	Sec. Nucleotídica	Sec. Peptídica	Carácter	Especie	Sec. Nucleotídica	Sec. Peptídica
<i>PROG1</i>	Arroz	Link	Link	Link	Altura	Trigo	Link	Link
<i>DWARF4</i>	Arroz	Link	Link	Link	Hábito de crecimiento	Trigo	Link	Link
<i>OsCPD1</i>	Arroz	Link	Link	Link	Hábito de crecimiento	Trigo	Link	Link
<i>EP2</i>	Arroz	Link	Link	Link	Hábito de crecimiento	Trigo	Link	Link

Figura 6. Captura de pantalla de la base de datos actualizada con la incorporación de las secuencias de trigo detectadas en los alineamientos locales.

2.1.4. Análisis de similitud

Se realizó un alineamiento global entre las secuencias peptídicas de las especies utilizadas como modelo y las de trigo obtenidas por alineamientos locales, utilizando la herramienta LALIGN (Huang; Miller, 1991). Se utilizaron las condiciones por defecto del programa y la matriz de sustitución BLOSUM62. Se seleccionaron aquellas secuencias de trigo que presentaron un porcentaje de identidad superior al 60%.

En aquellos casos en los que se generaron “contigs”, estos debieron cumplir con la condición de comprender al menos 2/3 de la secuencia utilizada como “query”.

2.1.5. Análisis de dominios proteicos

Utilizando la base de datos de Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) se identificaron los dominios proteicos de cada “query” y su respectivo “hit” y se eliminaron aquellas secuencias que no estaban conservadas en estas regiones.

2.1.6. Determinación de la colinealidad de marcadores flanqueantes a genes candidatos

Utilizando la herramienta Genomes de GRAMENE (<http://www.gramene.org/>) se identificaron, en los mapas genéticos preexistentes de las especies modelo, los marcadores moleculares más cercanos que flanqueaban a ambos lados a cada uno de los genes selectos. A partir de la ubicación de dichos marcadores y utilizando la

herramienta Comparative Maps (CMap) de GRAMENE, se alinearon y compararon los mapas de las especies modelo con los mapas disponibles para trigo.

Se identificó como posible ubicación de los genes de trigo a aquellos cromosomas en los que coincidieron al menos dos de los marcadores con los de la región del gen en la especie modelo.

En aquellos casos en los que no hubo suficientes marcadores en común entre la especie modelo y trigo se utilizó una especie intermedia como puente.

Partiendo de las ubicaciones propuestas para los genes de trigo se buscaron QTLs descritos en dichas regiones y se compararon los caracteres a los que habían sido asociados con la función de los genes en las especies modelo.

A partir de mayo de 2012 se tuvo acceso a la secuencia genómica de trigo almacenada en la base de datos del “International Wheat Genome Sequencing Consortium” (IWGSC), y a las herramientas proporcionadas por la “Unité de Recherche Génomique Info” (URGI).

Utilizando las secuencias nucleotídicas de los genes de trigo se realizó una búsqueda por BLASTn en las secuencias disponibles del genoma. Las ubicaciones cromosómicas obtenidas por este método se compararon con las propuestas en el punto anterior.

2.2. Búsqueda bibliográfica de QTLs asociados al rendimiento en trigo pan

A través de una búsqueda bibliográfica se seleccionaron QTLs de trigo asociados a diferentes caracteres asociados al rendimiento y por medio de la base de datos UniSTS del NCBI se identificaron las regiones cromosómicas en las que se encontraban los marcadores moleculares flanqueantes.

Utilizando los mapas de la base de datos de GRAMENE y los marcadores moleculares de la región a los que pertenecía cada QTL se generaron mapas comparativos entre trigo y las especies modelo. Se seleccionaron las regiones de las especies modelo que tuvieron al menos dos marcadores en común con trigo y se identificaron los genes que se encontraban entre estos marcadores. Para cada uno de los genes se buscaron las funciones propuestas en las bases de datos de GRAMENE y NCBI y se seleccionaron aquellos cuya función coincidía con el carácter del QTL descrito en trigo.

2.3. Amplificación de fragmentos de genes candidatos

Con el fin de avanzar en el conocimiento de los genes selectos en trigo y validar una metodología para la identificación de genes candidatos *in silico* se propuso la amplificación de un fragmento de cada uno de los genes candidatos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para lograr este objetivo, por un lado se alinearon e identificaron las regiones conservadas entre las secuencias nucleotídicas de arroz, *Brachypodium distachyon*, cebada y trigo, y por el otro se identificaron las ubicaciones y longitudes de los intrones de los genes de *B. distachyon* y se asumieron similares para trigo.

2.3.1. Alineamiento global múltiple y diseño de iniciadores específicos

Para cada uno de los genes candidatos propuestos se generó una nueva base de datos utilizando el programa Microsoft Excel 2007. Ésta contenía la siguiente información:

- 1) Secuencias del gen y ARNm de arroz.
- 2) Secuencias del gen y ARNm de *B. distachyon*.
- 3) Secuencia del ARNm de cebada.
- 4) Secuencia (ARNm, ADNc o “contig de ESTs”) de trigo.

Las secuencias de la base de datos se identificaron utilizando la herramienta tBLASTn del NCBI, para las especies *B. distachyon* y cebada, y del Rice Genome Annotation Project (RGAP) para arroz. Las búsquedas se realizaron utilizando parámetros estándar y la matriz de sustitución BLOSUM62. Las bases de datos consultadas fueron *Nucleotide collection (nr/nt)*, *Reference genomic sequences (refseq_genomic)* del NCBI y *Genomic sequences* del RGAP.

	A	B	C	D	E	F	G
1		Arroz		<i>Brachypodium distachyon</i>		Cebada	Trigo
2	Gen	Sec. del gen	Sec. del ARNm	Sec. del gen	Sec. del ARNm	Sec. del ARNm	Sec. ADNc/ARNm/Contigs
3	<i>DWARF4</i>	Link	Link	Link	Link	Link	Link
4	<i>OsCPD1</i>	Link	Link	Link	Link	Link	Link
5	<i>RCN1</i>	Link	Link	Link	Link	Link	Link
6	<i>DWARF3</i>	Link	Link	Link	Link	Link	Link
7	<i>TB1</i>	Link	Link	Link	Link	Link	Link

Figura 7. Captura de pantalla donde se muestra la base de datos utilizada para la compilación de secuencias de genes candidatos asociados al rendimiento. En azul se observan los hipervínculos que permiten acceder a las secuencias almacenadas en formato FASTA.

Para cada uno de los genes se realizó un alineamiento global múltiple (Figura 8) utilizando la herramienta clustalW del programa MEGA (Tamura *et al.*, 2011). Cada alineamiento fue inspeccionado y corregido manualmente y se identificaron las zonas más conservadas entre las cuatro especies. Posteriormente, utilizando la secuencia del gen de *B. distachyon* como referencia se identificaron las regiones de cada gen donde se encontraba la mayor cantidad de intrones. Teniendo en cuenta estas características se seleccionaron los segmentos de las secuencias de trigo que luego se utilizaron para diseñar los iniciadores.

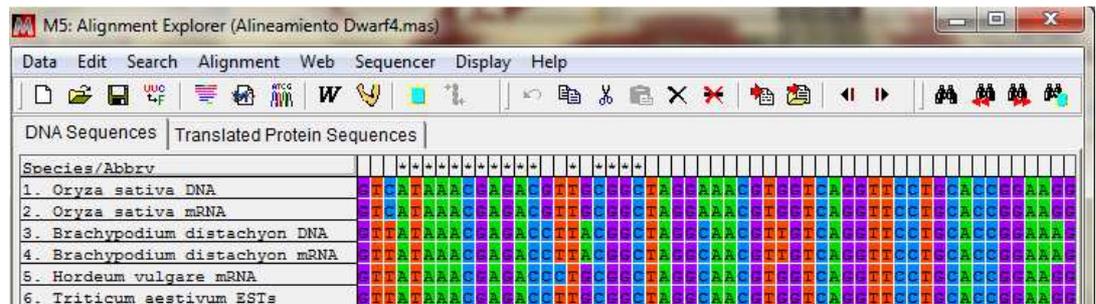


Figura 8. Captura de pantalla de un alineamiento global múltiple para el gen *DWARF4* utilizando el programa MEGA.

Los iniciadores se diseñaron con la herramienta PrimerBLAST del NCBI y se estableció que debían cumplir con las siguientes condiciones: 1) longitud entre 18 y 25 nucleótidos, 2) contenido de G-C entre 40 y 60%, 3) temperatura de fusión entre 55 y 65 °C, 4) terminaciones 3' no complementarias entre pares de iniciadores, 5) sin secuencias auto-complementarias. Las condiciones 4) y 5) fueron evaluadas con la

herramienta OligoAnalyzer3.1 del sitio Integrated DNA Technology (<http://www.idtdna.com/site>).

En cada caso se eligió el par de iniciadores que, además de cumplir las condiciones mencionadas previamente, amplificaba *in silico* en *B. distachyon* un fragmento de entre 500 y 1000 pb incluyendo la mayor cantidad de intrones posibles.

Los iniciadores fueron clasificados en dos grupos de acuerdo a la longitud del producto esperado: (1) fragmentos de longitud menor a 600 pb, y (2) fragmentos de longitud mayor a 600 pb.

Dado que a partir de mayo de 2012 fue posible acceder a la base de datos del IWGSC, los iniciadores diseñados se contrastaron con la misma utilizando la herramienta BLAST del URGI, y se detectaron *in silico* los posibles productos de amplificación. Se estimó nuevamente la longitud y el número de intrones que debían tener los productos de la amplificación y se compararon con los predichos a través de *B. distachyon*.

2.3.2. Extracción de ADN genómico

Se utilizaron diez cultivares de trigo (BIOINTA 3005, BSY 300, INIA Torcaza, KLEIN Chajá, PROINTA Isla Verde, SRM Nogal, LE 2330, BIOINTA 1005, Baguette 18, Klein Tigre) pertenecientes a una población de mapeo de asociación (Vanzetti *et al.*, 2013). Para la extracción de ADN se utilizaron aproximadamente 50 mg de tejido fresco de la región apical de las hojas jóvenes de tres plantas, siguiendo el protocolo de Haymes (1996). Se analizó la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7% y buffer TBE 1X (Tris-HCl 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM) durante 40 minutos a 80 V. Previamente a que solidificaran los geles se incluyó 0,01 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ de GelRed[®] (Biotium) para la tinción del ADN.

2.3.3. Amplificación por PCR

La solución utilizada para la reacción de PCR consistió en 14,6 μl de agua ultra pura, 2 μl de buffer de reacción 10X (Invitrogen), 0,6 μl de MgCl_2 (50 mM), 1 μl de dNTPs (25 mM de cada uno), 0,25 μl (100 $\text{pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) de los iniciadores "forward" y

“reverse”, 1,5 U (0,3 μ l) de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen), y 1 μ l de ADN (100 ng. μ l⁻¹). El volumen final por reacción fue de 20 μ l.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Veriti de Applied Biosystems®. En el caso de aquellos fragmentos de longitud esperada menor a 600 pb, las condiciones de reacción utilizadas fueron: desnaturalización inicial a 95 °C (3 min), 35 ciclos de: 95 °C (30 seg), 60 °C (30 seg) y 72 °C (1 min), y extensión final a 72 °C (5 min).

Aquellos fragmentos de longitud mayor a 600 pb fueron amplificados bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 95 °C (3 min), 35 ciclos de: 95 °C (30 seg), 58 °C (30 seg) y 72 °C (1 min), y extensión final a 72 °C (5 min).

Para los fragmentos de los que no se obtuvo producto de amplificación con los programas anteriores se utilizó un tercer programa. El mismo consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C (3 min), 35 ciclos de: 95 °C (30 seg), 50 °C (30 seg) y 72 °C (1 min), y extensión final a 72 °C (5 min).

Una vez finalizado el programa, en los tres casos las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta extraerlas del termociclador.

Los productos de la amplificación se revelaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1% en “buffer” TBE 1X teñidos con GelRed®. Se sembraron, para los 10 genotipos y el control negativo, 5 μ l del producto de PCR más 1 μ l de “buffer” de carga (azul de bromofenol – naranja G) junto a un marcador de peso molecular que contenía fragmentos de ADN de doble cadena de 500 pb a 10500 pb en incrementos de 1000 pb (MilMarker, 40 ng. μ l⁻¹, Biodynamics) utilizado como control positivo. La electroforesis se realizó a 80 V durante aproximadamente 40 minutos. La longitud de las bandas amplificadas se estimó por comparación con un marcador de peso molecular que contenía fragmentos de ADN de doble cadena de 100 pb a 1000 pb en incrementos de 100 pb (CienMarker, 50 ng. μ l⁻¹, Biodynamics). Para ello se realizó una nueva siembra, utilizando sólo cuatro genotipos, en geles de agarosa 2% en “buffer” TBE 1X teñidos con GelRed®. Las siembras y la electroforesis se realizaron utilizando las condiciones mencionadas anteriormente.

La visualización se realizó con luz UV en un transiluminador ImageQuant 400 (GE Healthcare®) y la imagen resultante se capturó con el programa ImageQuant Capture. Se controló que el tamaño de banda del producto de amplificación coincidiera

aproximadamente con el esperado para cada par de iniciadores y que el control negativo no amplificara.

3. RESULTADOS

3.1. Selección de genes que controlan caracteres asociados al rendimiento en especies relacionadas al trigo

3.1.1. Búsqueda bibliográfica de genes asociados al rendimiento

A partir de la búsqueda bibliográfica utilizando como especies modelo a arroz, cebada y *Brachypodium distachyon* se seleccionaron 25 genes asociados al rendimiento (Tabla 1), de los cuales dos fueron descritos en arroz y cebada, 22 sólo en arroz, uno sólo en cebada y ninguno en *B. distachyon*.

Tabla 1. Genes que controlan caracteres asociados al rendimiento en especies emparentadas al trigo, selectos a partir de la búsqueda bibliográfica.

Gen	Referencia	Especie	Carácter que controla
<i>SD-1</i>	Ashikari <i>et al.</i> , 2005	Arroz	Altura
<i>PROG1</i>	Tan <i>et al.</i> , 2008	Arroz	Hábito de crecimiento
<i>DWARF4</i>	Sakamoto <i>et al.</i> , 2006	Arroz	Hábito de crecimiento
<i>OsCPD1</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2010	Arroz	Hábito de crecimiento
<i>DWARF10</i>	Arite <i>et al.</i> , 2007	Arroz	Número de macollos
<i>HTD1</i>	Zou <i>et al.</i> , 2006	Arroz	Número de macollos
<i>MOC1</i>	Li <i>et al.</i> , 2003	Arroz	Número de macollos
<i>RCN1</i>	Yasuno <i>et al.</i> , 2007	Arroz	Número de macollos
<i>DWARF3</i>	Minakuchi <i>et al.</i> , 2010	Arroz	Número de macollos
<i>TB1</i>	Dreccer <i>et al.</i> , 2013	Arroz	Número de macollos
<i>HTD2</i>	Liu <i>et al.</i> , 2009	Arroz	Número de macollos
<i>EP2</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2010	Arroz	Arquitectura de la panoja
<i>FZP</i>	Yi <i>et al.</i> , 2005	Arroz	Número de espiguillas
<i>DEP1</i>	Huang <i>et al.</i> , 2009	Arroz	Número de granos/panoja
<i>Gn1a</i>	Ashikari <i>et al.</i> , 2005	Arroz	Número de granos/panoja
<i>VRS1</i>	Komatsuda, 2004	Cebada	Número de granos/espiga
<i>GIF1</i>	Wang <i>et al.</i> , 2008	Arroz/Cebada	Peso de granos
<i>GW2</i>	Liu <i>et al.</i> , 2010	Arroz/Cebada	Peso de granos
<i>HGW</i>	Li <i>et al.</i> , 2012	Arroz	Peso de granos
<i>FLO2</i>	She <i>et al.</i> , 2010	Arroz	Tamaño de granos
<i>PGL1</i>	Heang; Sassa, 2012	Arroz	Tamaño de granos
<i>GS5</i>	Li <i>et al.</i> , 2011	Arroz	Tamaño de granos
<i>GHD7</i>	Xue <i>et al.</i> , 2008	Arroz	Rendimiento potencial
<i>FC1</i>	Minakuchi <i>et al.</i> , 2010	Arroz	Tolerancia al vuelco
<i>SCM2</i>	Ookawa <i>et al.</i> , 2010	Arroz	Tolerancia al vuelco

3.1.2. Análisis preliminar de las secuencias peptídicas

Ninguna de las proteínas analizadas por “dot-plot” mostró repeticiones en tándem ni regiones de baja complejidad que pudieran dificultar la búsqueda por alineamientos locales.

3.1.3. Búsqueda por alineamientos locales

A través de la búsqueda por BLASTp se encontraron secuencias peptídicas similares en trigo (valor $e \leq 10^{-10}$, una longitud de al menos 2/3 respecto del “query” y una identidad superior al 50%) para seis de las 25 proteínas analizadas. Cuatro de estas secuencias fueron descartadas porque su implicancia en el rendimiento de trigo ya había sido descrita (*SD-1* y *GW2*) o hipotetizada (*Gn1a* y *DEP1*). De las dos secuencias restantes, sólo el “hit” de trigo encontrado para *DWARF3* (Tabla 2) fue incorporado a la base de datos. La secuencia restante, del gen *TB1*, fue utilizada nuevamente en la búsqueda por tBLASTn debido a que el porcentaje de identidad (55%) fue muy cercano a la condición establecida como límite.

Las 19 proteínas (“queries”) cuyos “hits” no cumplieron con las condiciones establecidas en el paso anterior fueron comparadas utilizando tBLASTn. Se agregó a la comparación a *TB1*. Utilizando la base de datos *Nucleotide collection (nr/nt)* se encontraron secuencias similares (valor $e \leq 10^{-10}$, una longitud de al menos 2/3 respecto del “query” y al menos 50% de identidad) para 11 de las 20 secuencias analizadas (Tabla 2) y se incorporó a la base de datos el mejor “hit” de cada una.

Las nueve secuencias (“queries”) cuyos “hits” no cumplieron con las condiciones de similitud fueron comparadas nuevamente utilizando la base de datos *Expressed sequence tags (est)*. Sólo para dos de los genes (*DWARF4* y *EP2*) se obtuvieron “hits” (ESTs) con valores $e < 10^{-10}$ y al menos 50% de identidad, que alineaban en secciones distintas del “query”. Luego de eliminar aquellos fragmentos de secuencia pertenecientes a vectores de clonación, los ESTs fueron ensamblados para formar fragmentos de mayor longitud (“Contigs”) y estos fueron incorporados a la base de datos.

Tabla 2. Genes para los que se encontraron secuencias similares en trigo y cuya función no ha sido aún determinada en este cultivo.

Gen	Valor e	% Cobertura	% Identidad	Base de datos NCBI
<i>DWARF3</i>	0	92	79	<i>nr</i> ⁽¹⁾
<i>TB1</i>	4.10^{-147}	90	72	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>RCN1</i>	0	85	59	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>FC1</i>	0	94	64	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>VRS1</i>	9.10^{-74}	98	56	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>GS5</i>	0	92	80	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>CPD1</i>	0	91	85	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>HTD2</i>	7.10^{-147}	78	84	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>GIF1</i>	0	96	76	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>HGW</i>	3.10^{-80}	88	60	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>FLO2</i>	0	96	83	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>PGL1</i>	2.10^{-47}	83	96	<i>nr/nt</i> ⁽²⁾
<i>EP2</i>	3.10^{-28}	nd	50	<i>est</i> ⁽²⁾
<i>DWARF4</i>	1.10^{-106}	nd	89	<i>est</i> ⁽²⁾

nd: no determinado. ⁽¹⁾ identificado por BLASTp. ⁽²⁾ identificado por tBLASTn.

3.1.4. Análisis de similitud

Todas las secuencias nucleotídicas (ADNc, ARNm y Contigs) fueron traducidas en sus marcos de lectura respectivos, e incorporadas a la base de datos. Luego de realizar alineamientos globales entre las secuencias peptídicas de cada gen, provenientes de trigo y especies emparentadas (Tabla 3), se descartaron los “contigs” correspondientes al gen *EP2* porque sólo cubrían el 50% de la secuencia “query” y la identidad era de 33,4% (es decir, inferior al umbral fijado en el presente trabajo).

Tabla 3. Porcentaje de similitud global entre las secuencias peptídicas de las especies modelo (arroz, cebada y *B. distachyon*) y las de trigo.

Secuencia peptídica	% Similitud	Secuencia peptídica	% Similitud
<i>DWARF3</i>	75,5	<i>HTD2</i>	86,2
<i>TB1</i>	67,4	<i>GIF1</i>	78,5
<i>RCN1</i>	61,3	<i>HGW</i>	74,8
<i>FC1</i>	68,2	<i>FLO2</i>	75,5
<i>VRS1</i>	77,3	<i>PGL1</i>	89,9
<i>GS5</i>	79,6	<i>DWARF4</i>	69,5
<i>CPD1</i>	84,2		

3.1.5. Análisis de dominios proteicos

En las 13 secuencias de trigo seleccionadas a partir de los análisis anteriores se detectaron los mismos dominios proteicos que en las secuencias “query” de las especies emparentadas (Tabla 4).

Tabla 4. Dominios proteicos presentes en los genes selectos.

Gen	Descripción del dominio
<i>DWARF3</i>	Citocromo P450
<i>TB1</i>	Factor de transcripción TCP
<i>RCN1</i>	Transportador ABC Transportador tipo ABC-2
<i>FC1</i>	Dominio tipo alcohol deshidrogenasa GroES Deshidrogenasa por unión con zinc
<i>VRS1</i>	Homeobox
<i>GS5</i>	Serincarboxipeptidasa
<i>CPD1</i>	Citocromo P450
<i>HTD2</i>	Hidrolasa Alfa/Beta
<i>GIF1</i>	Dominio N-terminal glicosil hidrolasa Dominio C-terminal glicosil hidrolasa
<i>HGW</i>	UBA/TS-N
<i>FLO2</i>	Factor de iniciación de la traducción eIF3 subunidad 135 Repetición tetratricopéptido Repetición tetratricopéptido
<i>PGL1</i>	Dominio de unión al ADN Hélice-bucle-hélice
<i>DWARF4</i>	Citocromo P450

3.1.6. Determinación de la colinealidad de marcadores flanqueantes a genes candidatos

Se identificaron marcadores moleculares flanqueantes a los 13 genes de las especies modelo (Tabla 5), y a partir de la ubicación de éstos se intentó generar mapas comparativos con los cromosomas de trigo. La poca cantidad de marcadores en común entre arroz y trigo y entre cebada y trigo dificultó la comparación, y sólo pudo realizarse para cinco genes (*CPD1*, *GIF1*, *HGW*, *FLO2* y *DWARF4*). Como resultado, en todos los casos se detectó colinealidad de marcadores. Para los ocho genes restantes se generaron mapas comparativos utilizando a *B. distachyon* como especie puente, con

excepción del gen *VRS1*, originalmente detectado en cebada, para el cual se utilizó a arroz como especie puente. De esta manera se identificaron posibles ubicaciones genómicas para cinco de estos ocho genes (*DWARF3*, *TB1*, *VRS1*, *GS5* y *HTD2*). La ausencia de marcadores imposibilitó la identificación probable para los genes *RCN1*, *FC1* y *PGL1*.

Como resultado final, en diez de los 13 casos se detectó colinealidad de marcadores entre el mapa genético de la especie modelo y el de trigo, lo que permitió hipotetizar sobre la localización cromosómica de los genes en el genoma de trigo (Tabla 5). No se halló información sobre la existencia de QTLs asociados al rendimiento en estas regiones del genoma de trigo.

A partir de mayo de 2012 los genes selectos pudieron ser comparados con la secuencia genómica de trigo disponible en la base de datos del IWGSC. De esta manera se identificó la ubicación hasta el nivel de brazo cromosómico de cada uno de los genes complementando los resultados obtenidos por la metodología de mapas genéticos comparativos (Tabla 5). Sólo para el gen *CPD1* se propuso, utilizando la colinealidad de marcadores flanqueantes, un cromosoma que no fue confirmado por la comparación con el genoma de trigo. En el resto de los casos las ubicaciones propuestas fueron confirmadas a través de las búsquedas en el genoma de trigo, aunque esta última proporcionó nuevas ubicaciones hipotéticas.

Tabla 5. Marcadores moleculares que flanquean a 13 genes asociados con el rendimiento en especies modelo (arroz, cebada y/o *B. distachyon*), y la ubicación propuesta en el genoma de trigo a través de la información obtenida de los mapas comparativos y las secuencias disponibles del genoma.

Gen	Marcadores moleculares		Ubicación genómica hipotetizada por:	
			Colinealidad de marcadores flanqueantes	Comparación con la secuencia genómica de trigo
<i>DWARF3</i>	RGNMS2141 ⁽¹⁾	RGNMS2175 ⁽¹⁾	4 ^a	4AL
<i>TB1</i>	RM15766 ⁽¹⁾	RM15767 ⁽¹⁾	4D	4DS - 4BS - 4AL
<i>RCN1</i>	RM14756 ⁽¹⁾	RM1256 ⁽¹⁾	Ni	1DS - 1BS - 1AS
<i>FC1</i>	RM17478 ⁽¹⁾	RM17479 ⁽¹⁾	Ni	7AL - 7DL
<i>VRS1</i>	MWG503 ⁽²⁾	MWG581 ⁽²⁾	2B - 2D - 2A	2BS - 2DS - 2AS
<i>GS5</i>	RM17944 ⁽¹⁾	RM17941 ⁽¹⁾	3 ^a	3DS - 3B - 3AS
<i>CPD1</i>	RM26051 ⁽¹⁾	RM26052 ⁽¹⁾	5A - 5B	5DL - 5BL
<i>HTD2</i>	RM14551 ⁽¹⁾	RM14552 ⁽¹⁾	4A - 7B	4AS
<i>GIF1</i>	RM16943 ⁽¹⁾	RM16944 ⁽¹⁾	2B	2BL
<i>HGW</i>	RM5009 ⁽¹⁾	RM19420 ⁽¹⁾	7D - 7A - 7B	7DS - 7AS - 7BS
<i>FLO2</i>	RM348 ⁽¹⁾	RM8217 ⁽¹⁾	2B - 2D	2BL - 2DL - 2AL
<i>PGL1</i>	RM5474 ⁽¹⁾	RM3392 ⁽¹⁾	Ni	4DL - 4AS - 4BL
<i>DWARF4</i>	RM14626 ⁽¹⁾	RM5925 ⁽¹⁾	4D - 4 ^a	4DL - 4AS - 3AL

ni: no identificado, ⁽¹⁾ Marcador microsatélite; ⁽²⁾ marcador RFLP.

3.2. Búsqueda bibliográfica de QTLs asociados al rendimiento en trigo

A partir de la búsqueda bibliográfica se seleccionaron 11 QTLs (Tabla 6) ligados a caracteres relacionados con el rendimiento en trigo. Se identificaron las regiones cromosómicas en trigo y los marcadores descritos para las mismas, y con esta información se generaron mapas comparativos con las especies modelo. Se obtuvieron dos mapas comparativos utilizando *B. distachyon* y uno solo utilizando a cebada. Sin embargo, no se encontraron genes caracterizados funcionalmente en las regiones ortólogas de las especies modelo.

Al realizar las comparaciones con los mapas de arroz se encontraron marcadores colineales para cinco de los QTLs analizados (*QTgw.ipk-4B-FC5*, *QTkw.sdau-6A*, *QGfrmax.nfcrl-2A*, *QSns.wa-1AS.e3* y *QSwscg.cgb-4A*) y se identificaron los genes descritos para cada región.

En las cinco regiones de arroz se identificaron genes asociados al rendimiento. Sin embargo, no pudo seleccionarse un gen putativamente responsable del carácter

debido a que: 1) había más de dos genes de posible asociación con el rendimiento, aunque no se disponía de información desde el punto de vista agronómico para ninguno de ellos, 2) las funciones descritas para los genes no coincidían con el carácter descrito para el QTL de trigo, y/o 3) había genes cuya función no estaba descrita.

Tabla 6. Selección de QTLs de trigo a partir de la búsqueda bibliográfica.

Carácter	Cromosoma de trigo	Denominación	Marcadores flanqueantes	
Carbohidratos solubles en tallos durante el período de llenado	4A	<i>QSwscg.cgb-4A</i> ⁽¹⁾	<i>Xgwm610</i>	<i>Xgwm397</i>
Número de espigas por planta	3DL	<i>QSnP.wa-3DL.e3</i>	<i>Xwmc631</i>	<i>Xwmc552</i>
Número de espigas por planta	4B	<i>QSn-sdau-4B</i>	<i>Xwmc657</i>	<i>Xgwm113</i>
Espiguillas por espiga	1AS	<i>QSns.wa-1AS.e3</i> ⁽¹⁾	<i>Xwmc24</i>	<i>Xwmc120</i>
Número de granos por espiga	4BL	<i>QGns.wa-4BL.e1</i>	<i>Xbarc20</i>	<i>Xwmc238</i>
Duración del período de llenado	3B	<i>QGfd.nfcri-3B</i>	<i>xbarc113</i>	<i>xgwm533</i>
Período de llenado de granos	3D	<i>QGfp.kpg-3D.1</i>	<i>Xhbg270</i>	<i>Xbarc71</i>
Tasa máxima de llenado	2A	<i>QGfrmax.nfcri-2A</i> ⁽¹⁾	<i>xwmc407</i>	<i>xgwm359</i>
Peso de mil granos	4BL	<i>QTgw.ipk-4B-FC5</i> ⁽¹⁾	<i>Xgwm0149</i>	<i>Xgwm1084</i>
Peso de mil granos	6A	<i>QTKw.sdau-6A</i> ⁽¹⁾	<i>Xswes332a</i>	<i>Xgwm617</i>
Peso de mil granos	7A	<i>QTgw.ipk-7A-FC5</i>	<i>Xgwm0900</i>	<i>Xgwm0276</i>

3.3. Amplificación de fragmentos de genes candidatos

3.3.1. Alineamiento global múltiple y diseño de iniciadores específicos

Una vez identificadas las regiones más conservadas dentro de cada una de las secuencias correspondientes a los genes candidatos selectos, se diseñaron cinco pares de iniciadores por gen y se seleccionó aquel par que cumplió de mejor forma las condiciones establecidas (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencia de iniciadores utilizados para amplificar fragmentos de 13 genes en trigo.

Gen	Iniciador "forward"	Tm (°C)	Iniciador "reverse"	Tm (°C)
<i>DWARF3</i>	GGTTCGTCAACATCTCCTTCGT	57	AATGGGAGGAGGAGACTCTGGTG	60
<i>TB1</i>	TGCAATGGCTCCTCGATACG	57,3	TCCGGTTCTTTCCCTCGTC	57
<i>RCN1</i>	GATCCTGGCGACCATCTTCC	57,8	GTCGCGGTTGATGAAGAAGC	56,7
<i>FC1</i>	CTGCGGGATCTGTCACTCTG	57,5	ATCTCCTGGGTGTCCCTCAT	57,6
<i>VRS1</i>	TCCTCCACAAATGCCACCTC	57,4	GTCGAGAAGGACGAGCTAGG	56,7
<i>GS5</i>	GCACAAACCTCTCCTGCTCT	57,3	TGCGGAAACCTCTTGAACCA	57
<i>CPD1</i>	GTGGGGTATTTAGGCGAGCA	57,2	GCCGAAGACCATTGTGAGGT	57,6
<i>HTD2</i>	TGCTGCAGATCCTGAACGTG	57,7	ACATCGCCTGGAACACCTG	57,7
<i>GIF1</i>	CGCAACATCAACAGCACCAA	56,7	CGCAACATCAACAGCACCAA	56,7
<i>HGW</i>	ACCCAGGAGATCCACTTGT	58	TAACCTTGTCGGGGTCGTTG	57,2
<i>FLO2</i>	TTGCGGAAGCCCATCATTCT	57,2	AGCAGTCAGCCGATGGTATG	57,2
<i>PGL1</i>	GAGGATCACTGACGAGCAA	54,6	CCTGCAGCACCTTGAAGAT	57,7
<i>DWARF4</i>	TATAACGAGACCTTGCGGC	55	TGCAATCCTATGGACCCTGA	55,7

Se determinó la longitud del fragmento y el número de intrones esperados para cada gen en *B. distachyon* (Tabla 8).

Para 12 de los 13 genes en estudio se estimó el tamaño probable del producto de amplificación por comparación con el genoma de trigo, y sólo para el gen *HGW* esto no fue posible (Tabla 8). Para los genes *HTD2* y *GIF1* se predijeron, además de los productos esperados, amplificaciones provenientes de cromosomas en los que no se habían identificado las secuencias completas de los genes. Para los genes *VRS1*, *GS5* y *PGL1* no se predijeron productos de amplificación de todos los loci en los que fueron detectados, mientras que para *FC1* y *PGL1* se predijeron dos productos de amplificación en un mismo cromosoma.

Al comparar el tamaño esperado de los productos de amplificación a partir de la secuencia genómica de *B. distachyon* con aquél predicho por PCR *in silico* utilizando la información genómica de trigo disponible hasta el momento, los resultados obtenidos fueron muy similares tanto en la longitud como en el número de intrones en la mayoría de los casos, excepto para el fragmento a amplificar a partir del gen *DWARF4* (Tabla 8).

Tabla 8. Producto de amplificación estimado *in silico* a partir de las secuencias de trigo generadas por el International Wheat Genome Sequencing Consortium, y de *B. distachyon*, de la base de datos del NCBI.

Gen	Producto de amplificación					
	Trigo			<i>B. distachyon</i>		
	Tamaño (pb) y ubicación ⁽¹⁾		Número de intrones	Tamaño (pb)	Número de intrones	
<i>DWARF3</i>	760 (4AL)		3	735	3	
<i>TB1</i>	309 (4DS)	309 (4BS)	309 (4AL)	0	318	0
<i>RCN1</i>	455 (1DS)	453 (1BS)	453 (1AS)	0	454	0
<i>FC1</i>	1012 (7AL)	1014 (7DL)	1019 (7DL)	2	1004	2
<i>VRS1</i>	283 (2DS)	282 (2BS)		1	271	1
<i>GS5</i>	680 (3AS)	677 (3DS)		2	895	3
<i>CPD1</i>	755 (5DL)	886* (5BL)	795* (5AL)	3	782	3
<i>HTD2</i>	533 (4AS)	553* (4DL)		1	538	1
<i>GIF1</i>	487 (2BL)	489* (2DL)	493* (2AL)	2	570	2
<i>HGW</i>	ND		ND		876	1
<i>FLO2</i>	601 (2BL)	599 (2DL)	599 (2AL)	3	591	3
<i>PGL1</i>	461 (4DL)	461 (4DL)	435 (4AS)	1	442	1
<i>DWARF4</i>	1506 (4DL)	1415 (4AS)	819 (3AL)	2	1061	2

(1) Productos de amplificación ordenados de izquierda a derecha de mayor a menor complementariedad de los iniciadores. Localización cromosómica indicada entre paréntesis. (*) Productos de amplificación de secuencias génicas incompletas.

3.3.2. Extracción de ADN genómico

Se obtuvo ADN de buena calidad a partir de diez variedades argentinas de trigo pan (Figura 9).

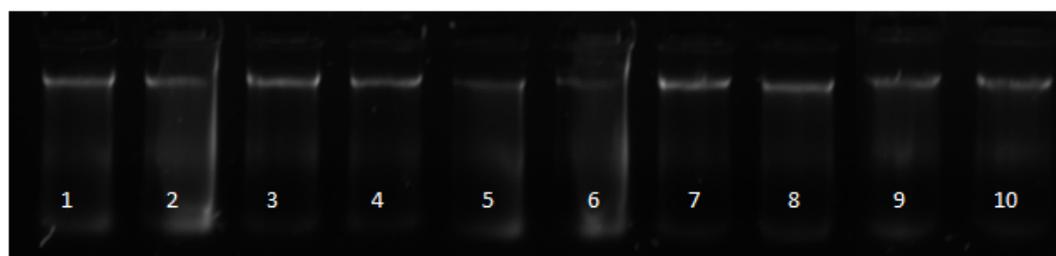


Figura 9. ADN genómico de diez cultivares de trigo: (1) BIOINTA 3005, (2) BSY 300, (3) INIA Torcaza, (4) KLEIN Chajá, (5) PROINTA Isla Verde, (6) SRM Nogal, (7) LE 2330, (8) BIOINTA 1005, (9) Baguette 18, (10) Klein Tigre.

3.3.3. Amplificación por PCR

Se obtuvieron productos de amplificación para 12 de los 13 genes analizados (Figura 10). En ocho se obtuvieron productos de amplificación a partir de todos los individuos, mientras que en los cuatro restantes se obtuvieron para al menos ocho de los diez individuos. El gen para el que no se obtuvo amplificación fue *GIF1*.

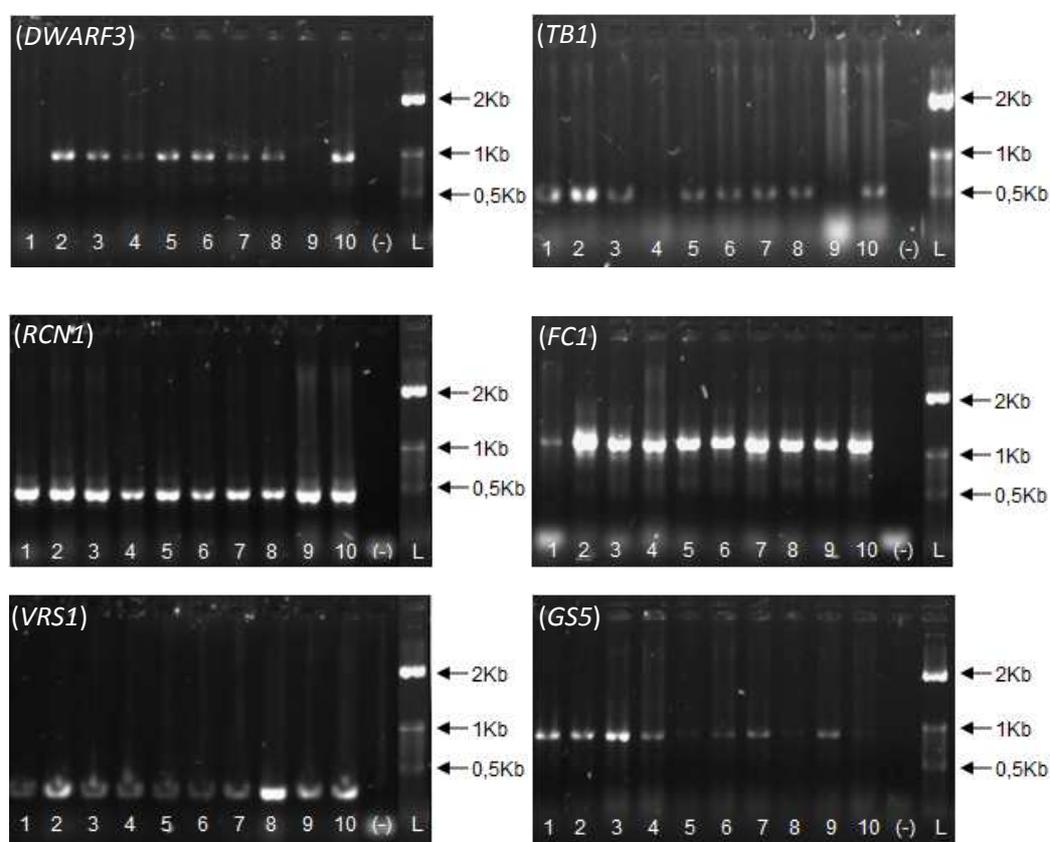


Figura 10. Productos de PCR de los genes. (1) BIOINTA 3005, (2) BSY 300, (3) INIA Torcaza, (4) KLEIN Chajá, (5) PROINTA Isla Verde, (6) SRM Nogal, (7) LE 2330, (8) BIOINTA 1005, (9) Baguette 18, (10) Klein Tigre; (-): control negativo; (L) marcador de peso molecular. A la derecha de cada foto se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular en miles de pares de bases (Kb). Continúa en la página siguiente.

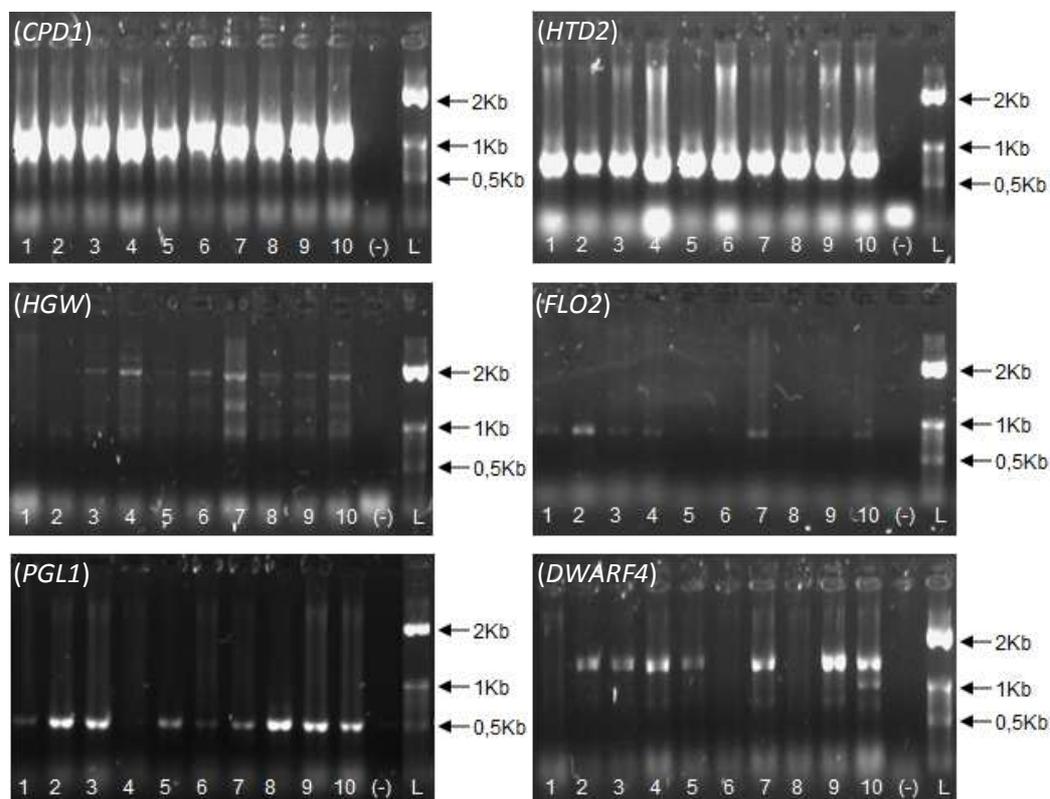


Figura 10. (continuación de la página anterior) Productos de PCR de los genes. (1) BIOINTA 3005, (2) BSY 300, (3) INIA Torcaza, (4) KLEIN Chajá, (5) PROINTA Isla Verde, (6) SRM Nogal, (7) LE 2330, (8) BIOINTA 1005, (9) Baguette 18, (10) Klein Tigre; (-): control negativo; (L) marcador de peso molecular. A la derecha de cada foto se indica el tamaño de las bandas del marcador de peso molecular en miles de pares de bases (Kb).

En la Tabla 9 se detalla el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos con cada par de iniciadores.

Tabla 9. Estimación de la longitud de un fragmento de cada uno de 12 genes candidatos, mediante análisis (1) *in silico* y (2) *in vitro* por PCR (por comparación con un marcador de peso molecular).

Gen	Estimación de la longitud del fragmento amplificado (pb)	
	<i>in silico</i>	<i>in vitro</i> (PCR)
<i>DWARF3</i>	760	800-900
<i>TB1</i>	309	300-350
<i>RCN1</i>	455	450-500
<i>FC1</i>	1012	1000-1100
<i>VRS1</i>	283	250-300
<i>GS5</i>	680	700-750
<i>CPD1</i>	755	800-900
<i>HTD2</i>	533	550-600
<i>HGW</i>	ND	700-800
<i>FLO2</i>	601	700-750
<i>PGL1</i>	461	450-500
<i>DWARF4</i>	1506	>1000

4. DISCUSIÓN

La necesidad de incrementar sostenidamente la producción de trigo hasta valores de 1,6% anual como mínimo (Dixon *et al.*, 2009) sin aumentar la superficie sembrada ha llevado a varios investigadores a proponer la implementación de una estrategia interdisciplinaria que posibilite incorporar al mejoramiento una mejor y más eficiente evaluación y selección. De esta manera se intenta afrontar las dificultades que plantea el mejoramiento genético clásico de trigo, a través del uso de herramientas de genómica, ecofisiología, biotecnología, estadística y bioinformática, entre otras (Landjeva *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2009; Reynolds; Eaton, 2009; Reynolds *et al.*, 2011). En este sentido, en el presente estudio se propuso avanzar en el conocimiento de las bases genéticas y moleculares del rendimiento de trigo a través de la identificación de genes candidatos para caracteres relacionados al mismo. Para ello se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica de genes y QTLs asociados con 12 de estos caracteres fenotípicos. Como resultado, se identificaron 25 genes y 11 QTLs asociados sólo a cuatro de dichos caracteres (contenido de carbohidratos solubles en tallos en anthesis, índice de vuelco, número de granos y peso de granos). Esto podría explicarse con el hecho de que si bien existen estudios ecofisiológicos y genéticos sobre los 12 caracteres mencionados, casi no hay trabajos que integren la información genético/molecular con aquella de carácter agronómico.

En este trabajo se utilizaron dos enfoques de aplicación de herramientas de genómica comparativa para la identificación de genes candidatos en trigo. El primero de ellos [denominado en adelante (1)] utilizó como punto de partida la búsqueda y selección de genes involucrados en la determinación del rendimiento en especies relacionadas filogenéticamente al trigo, y el posterior análisis de las secuencias homólogas de trigo. En tanto, el segundo enfoque [denominado (2)] partió de la búsqueda y selección de QTLs de trigo asociados al carácter y la posterior detección de genes candidatos en regiones colineales del genoma de especies relacionadas al trigo.

Los resultados obtenidos con dichos enfoques fueron muy diferentes. En el primer caso se analizaron 25 genes seleccionados a partir de especies relacionadas al trigo, y 13 de ellos cumplieron con las condiciones establecidas para ser considerados genes candidatos a utilizar eventualmente en el mapeo de caracteres relacionados con el

rendimiento en trigo. Contrariamente, en el segundo caso se analizaron 11 QTLs asociados con el rendimiento en trigo pero no fue posible identificar en forma fehaciente ningún gen candidato. En principio, esto hace suponer una ventaja del primer enfoque sobre el segundo, al menos bajo las condiciones establecidas en el presente estudio.

El enfoque (1) permitió, en forma rápida, identificar genes candidatos para diferentes caracteres asociados al rendimiento. Ello involucró la detección de secuencias similares entre especies y regiones conservadas dentro de cada secuencia, el diseño de iniciadores específicos y la posibilidad de predecir la longitud de los fragmentos de amplificación por PCR. De hecho, si se considera que se obtuvieron productos de PCR para 12 de los 13 genes candidatos (92,3%), y que de éstos 10 (84,6%) tuvieron un tamaño cercano al predicho *in silico*, se pone en evidencia la eficiencia y poder predictivo de esta metodología.

En la aplicación del enfoque (2) se observaron dos situaciones: para algunos de los QTLs de trigo analizados no se identificaron regiones sinténicas en las especies empleadas como modelo, en tanto que para otros QTLs esto sí fue posible.

El hecho de que en algunos casos no haya podido identificarse una región sinténica en las especies modelo radica principalmente en que si bien existen numerosos trabajos en los que se han mapeado QTLs asociados a caracteres que afectan el rendimiento en trigo (Börner *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2009; Gegas *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Rebetzke *et al.*, 2013; entre otros) en la mayoría de los casos la versión informática de los mapas genéticos no está disponible públicamente, lo que imposibilita la generación de mapas comparativos. En este sentido, al analizar dos de las bases de datos más citadas en la bibliografía para la búsqueda de QTLs, se observa que en GRAMENE sólo se encuentran descriptos nueve QTLs asociados al rendimiento en trigo (http://www.gramene.org/db/qlt/qlt_display?ps_species_inc=Triticum+aestivum&ps_linkage_group_inc=&ps_linkage_group_exc=&action=power_search&power_search=1&submit=Submit), mientras que en GrainGenes sólo está disponible el mapa generado por Narasimhamoorthy *et al.* (2006; <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=mapdata;name=Wheat,+TA4152-4+x+Karl92>). Se puede intentar superar la ausencia de las versiones informáticas de los mapas buscando los marcadores moleculares de los trabajos publicados en mapas consenso de trigo, pero en general éstos no coinciden entre

mapas. Otra alternativa consiste en buscar en los mapas genéticos incluidos en las bases de datos mencionadas aquellos marcadores cercanos a los descritos en las publicaciones y utilizar éstos para realizar las comparaciones con las especies modelo, aunque esto presenta dos desventajas principales. Por un lado, se pierde precisión en la identificación de las regiones de interés en trigo, con lo que se dificulta la detección de regiones sinténicas en especies relacionadas ya que se amplía la región a comparar (Guyot *et al.* 2004; Lagudah *et al.* 2006; Bossolini *et al.* 2007; Faris *et al.* 2008; en Krattinger *et al.*, 2009). Por otro lado, se aumenta considerablemente el tiempo de búsqueda y comparación. De esta manera, a pesar de que varios trabajos muestran un alto grado de conservación en el orden de los genes y marcadores entre trigo y diferentes especies de gramíneas (Devos; Gale 2000; Feuillet; Keller 2002; Salse; Feuillet 2007, en Feuillet; Salse 2009) aún es necesario que los mapas de ligamiento generados para la identificación de QTLs sean integrados en uno o unos pocos mapas consenso.

En aquellos casos en los que fue posible identificar regiones sinténicas en especies modelo a partir de QTLs de trigo no pudo seleccionarse con seguridad un gen candidato, debido a que éstas contenían genes (1) que no habían sido asociados a funciones específicas, (2) cuya función no tenía relación con los caracteres asociados a los QTLs de trigo, o (3) caracterizados solamente desde el punto de vista computacional por su posible asociación con el rendimiento, y no de manera biológica o agronómica.

A la luz de los resultados obtenidos en el presente estudio, el enfoque (2) no parece propicio para la identificación sistemática de genes candidatos asociados con el rendimiento en trigo. Probablemente este enfoque tenga mayor utilidad en aquellos casos en los que se desea trabajar en un QTL en particular y, consecuentemente, identificar el gen responsable del carácter. Este tipo de trabajos han sido realizados por Collins *et al.* (2003) y Griffiths *et al.* (2006), entre otros. De esta manera las dificultades mencionadas anteriormente podrían obviarse, ya que una vez identificada la región sinténica en la especie modelo podría realizarse una investigación más profunda con otras herramientas bioinformáticas, descartando así los genes con menor probabilidad de estar asociados al carácter de interés y desarrollando las investigaciones a nivel molecular con más de un gen candidato (Krattinger *et al.*, 2009).

En síntesis, el enfoque (1) es extremadamente rápido y presentaría mayor utilidad que el (2) en la búsqueda de genes que afectan a un carácter complejo cuyas bases genético-moleculares son desconocidas, y en el desarrollo de marcadores moleculares para asistir al mejoramiento genético convencional. En tanto, el segundo enfoque es considerablemente más lento y su empleo sería más apropiado en la dilucidación de la función de un gen en particular a partir de un QTL ya identificado.

Ambos enfoques presentan como principal limitante la necesidad de contar con al menos una especie relacionada filogenéticamente a la que es objeto de estudio, que pueda ser utilizada como modelo y cuyo genoma pueda servir como marco de referencia (Vogel; Bragg 2009). En el presente estudio se eligió al arroz, cebada y *Brachypodium distachyon* como especies modelo por dos razones principales: 1) su cercanía filogenética al trigo y 2) la gran cantidad de información genómica disponible en bases de datos públicas.

Varios estudios filogenéticos estiman que las subfamilias Ehrhartoideae, a la que pertenece el arroz, y Pooideae, a la que pertenece el trigo, divergieron hace aproximadamente 50 millones de años (Bolot *et al.*, 2009). En una posición intermedia se encuentra el género *Brachypodium*, que evolutivamente divergió de la tribu Triticeae hace menos de 35 millones de años (Bossolini *et al.*, 2007). En tanto, se estima que la divergencia de la cebada y el trigo ocurrió hace 10-14 millones de años. El tiempo de divergencia entre las especies indica, de acuerdo a lo propuesto por Huo *et al.* (2009), que la búsqueda de genes candidatos debería dar mejores resultados utilizando como especie modelo a la cebada en detrimento de *B. distachyon*, y de ésta con respecto al arroz. Esta hipótesis se ve apoyada por los trabajos realizados por Griffiths *et al.* (2006) y Spielmeyer *et al.* (2007; en Vogel; Bragg, 2009). Sin embargo, al analizar la contribución de cada una de las especies a los resultados obtenidos en el presente trabajo se observa que si se hubiera utilizado exclusivamente la información proveniente de cebada se habrían detectado sólo 3 de los 25 genes, en tanto que si solamente se hubiera usado la de arroz, habría podido identificarse casi la totalidad de dichos genes (96%). De manera similar, Foote *et al.* (2004; en Vogel; Bragg, 2009) identificaron 15 genes en una región genómica de trigo, de los que diez fueron detectados en la región sinténica de *B. sylvaticum* y nueve en la de arroz. Esto pone en evidencia que, al menos por el momento, la cantidad de información disponible en arroz, tanto a nivel genotípico como fenotípico (Tabla 10), en comparación con cebada

y *B. distachyon*, la vuelven la principal especie de referencia para los estudios en trigo. En este sentido, al inicio del presente trabajo se encontraban disponibles las secuencias de los genomas de arroz y *B. distachyon*, mientras que el primer mapa físico y genético del genoma de cebada se publicó recién en noviembre de 2012 (Mayer *et al.*, 2012).

En el caso de *B. distachyon*, a pesar de la gran cantidad de información disponible no se identificaron genes asociados al rendimiento. Esto podría explicarse por el hecho de que esta especie es utilizada en general como modelo biológico (Olsen *et al.*, 2006; Nardmann *et al.*, 2007) y sólo recientemente ha comenzado a ser utilizada en el estudio de caracteres de importancia agronómica, como la resistencia a enfermedades (Vogel: Bragg, 2009), en tanto que el conocimiento sobre caracteres asociados al rendimiento en esta especie es aún incipiente.

Tabla 10. Información sobre las especies analizadas, disponible en las bases de datos del NCBI (fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, con acceso en agosto de 2013).

	Arroz	<i>B. distachyon</i>	Cebada	Trigo
Tamaño del genoma	389 Mb	300 Mb	5,1 Gb	17,33 Gb
Proteínas	280886	25549	34856	11633
Genes	84179	26299	544	2211
Marcadores	1073	221	922	2268
Publicaciones	9024	548	4020	4210

A pesar de que no se identificaron genes asociados al rendimiento en *B. distachyon*, esta fue la especie más importante en el diseño de iniciadores específicos para la amplificación de fragmentos de genes candidatos en trigo. Su cercanía evolutiva con trigo permitió estimar *in silico* la longitud y el número de intrones de dichos fragmentos. La posterior amplificación por PCR confirmó la utilidad de esta especie, ya que en 10 de los 13 genes evaluados los productos amplificados tuvieron una longitud cercana a la esperada. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Huo *et al.* (2009), quienes proponen el empleo de esta especie para el desarrollo de marcadores para utilizar en trigo a partir de regiones conservadas.

Los resultados aquí presentados muestran que es ideal contar con información genómica de dos especies filogenéticamente cercanas a la especie de interés: un “modelo agronómico” que permita identificar los genes y QTLs asociados al carácter en

estudio, y un “modelo biológico” para el diseño de marcadores a partir de dichos genes, ya que en este caso la información genómica suele ser de mejor calidad como consecuencia de poseer un genoma pequeño (Vogel; Bragg, 2009).

La identificación de genes candidatos aquí presentada se realizó utilizando diferentes bases de datos y herramientas bioinformáticas para las que existe una gran cantidad de bibliografía que puede ser consultada. Sin embargo, es importante realizar algunas consideraciones de orden práctico surgidas del trabajo.

La etapa que insume mayor cantidad de tiempo es la búsqueda bibliográfica de genes y QTLs. Las bases de datos públicas disponibles en Internet utilizan diferentes formatos para ordenar la información y esto dificulta la integración de los datos complementarios y el desarrollo de un programa o herramienta para la automatización del análisis. En este trabajo, la base de datos más utilizada fue la del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ésta cuenta con una gran cantidad de información de muy fácil acceso sobre las especies seleccionadas, lo que permite, al utilizarla como punto de partida, nuclear los datos obtenidos a partir de otras bases de datos. Su principal limitante es que para la mayor parte de las secuencias no existe información de carácter agronómico. En el caso de GRAMENE (<http://www.gramene.org/>) la situación es inversa, ya que el cúmulo de información disponible no es tan vasto pero las secuencias almacenadas tienen en general información agronómica asociada. De esta manera, ambas muestran una gran complementariedad que, sumada a la accesibilidad que presentan, las vuelve muy útiles para este tipo de trabajos. Sólo para el caso de arroz la base de datos del NCBI es superada por la del RGAP (<http://rice.plantbiology.msu.edu>).

Con respecto a las variantes del algoritmo BLAST utilizadas, si bien todas resultaron ser de suma importancia para el trabajo, BLASTp mostró gran utilidad en la identificación de genes “novedosos”, ya que permite descartar rápidamente aquellas secuencias que ya han sido caracterizadas desde el punto de vista funcional en la especie de interés.

La herramienta Cmap de GRAMENE presentó como principal desventaja el tiempo que insume la realización de los mapas comparativos, que puede superar una semana. A diferencia de esto, es posible realizar todos los análisis restantes que se mencionan en el trabajo en un solo día. No obstante, la creciente disponibilidad de secuencias de trigo derivadas de los consorcios internacionales de secuenciación del genoma podría

reemplazar este análisis por la localización física de los genes. Sin embargo, se estaría desestimando la información de los QTLs identificados en trigo, que sí puede ser incorporada a través de los mapas comparativos.

Como ya se mencionó, el presente estudio permitió seleccionar *in silico* 13 genes candidatos en trigo. Además, para 12 (92,3%) de estos genes fue posible obtener productos de amplificación, lo que muestra una elevada eficiencia. Las secuencias de trigo mostraron valores de similitud con las de las especies modelo que superaron las condiciones mínimas establecidas en la bibliografía. Dardel y Képès (2007), proponen que un alineamiento con valores e entre 10^{-20} y 10^{-100} no presentaría dudas sobre la homología de las secuencias involucradas en el análisis, mientras que Claverie y Notredame (2007) proponen considerar que dos proteínas son homólogas si presentan 25% de coincidencia a nivel de aminoácidos o un 70% de coincidencia a nivel de nucleótidos. Esto, sumado al hecho de que se obtuvieron productos de longitud cercana a la predicha *in silico* permite considerar, en principio, a estos 12 genes como firmes candidatos. En el caso de *GIF1* sería posible intentar optimizar las condiciones de amplificación o diseñar nuevos iniciadores antes de descartarlo.

Es importante, sin embargo, poner de manifiesto los alcances y limitaciones que presenta la metodología desarrollada en este trabajo. Con los análisis realizados no es posible confirmar que los productos de amplificación obtenidos son fragmentos de genes ortólogos o parálogos a los de las especies modelo. Tampoco es posible determinar si dicho producto proviene de una única ubicación cromosómica, de cromosomas homeólogos o de regiones duplicadas dentro de un mismo cromosoma o en varios, ni detectar la existencia de polimorfismos de secuencia (al menos con el tipo de electroforesis empleado). Para dilucidar estas cuestiones se vuelve necesario secuenciar los fragmentos amplificados, lo que podrá realizarse en futuras investigaciones que continúen la línea de trabajo que aquí se propone.

Para ello deberían generarse bibliotecas de secuenciación a partir de cada uno de dichos fragmentos, dado que su secuenciación directa produciría resultados erróneos. Esto se debe a que (1) los iniciadores fueron diseñados por su homología con regiones altamente conservadas dentro de cada gen, por lo que cada banda observada en las corridas electroforéticas puede contener hasta tres secuencias distintas (es decir, cada una proveniente de uno de los tres genomas del trigo), o incluso más de tres si el gen hubiera aumentado su número de copias en el genoma por eventos de duplicación; (2)

si se considera que para cada gen candidato se seleccionaron iniciadores que permitieran amplificar fragmentos que contuvieran la mayor cantidad de intrones posible, el grado de polimorfismo esperado para cada secuencia aumenta considerablemente; (3) los análisis informáticos permitieron estimar diferencias de entre 2 y 20 pb entre secuencias provenientes de cromosomas homeólogos, lo que generaría errores de lectura.

A pesar de las limitaciones descritas anteriormente, el presente estudio constituye un primer paso hacia la identificación sistemática de genes candidatos para caracteres asociados al rendimiento en trigo. Aún resta amplificar la secuencia completa de cada gen, secuenciar los fragmentos obtenidos, discriminar dentro de éstos a aquellos pertenecientes a genes homeólogos y, al mismo tiempo, detectar polimorfismos para cada uno. Recién a partir de este punto, y tras la exhaustiva caracterización fenotípica de una población de mapeo, será posible poner a prueba la hipótesis sobre la implicancia de estos genes en el rendimiento y detectar aquellos alelos “favorables”.

De esta manera, además de los genes candidatos identificados para trigo, el trabajo ha dado como resultado la sistematización de una metodología rápida y económica para identificar genes candidatos asociados a un carácter complejo. Ésta podría constituir una valiosa herramienta en aquellos cultivos para los cuales la perspectiva de que su genoma sea secuenciado es desalentadora, ya sea por la complejidad del mismo o por tratarse de un cultivo de menor importancia económica. El único requisito que debe cumplirse es el de contar con una especie de referencia para realizar las comparaciones.

5. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos fue posible responder a las hipótesis inicialmente planteadas.

No hay evidencia para rechazar la hipótesis (1) en el caso de arroz y cebada, ya que en el presente trabajo se detectó al menos un gen asociado al rendimiento en estas especies que estaba a su vez conservado en especies relacionadas, tenía homología con EST/ADNc de trigo pan y/o estaba flanqueado por marcadores colineales con trigo pan y ligados a un QTL asociado con el rendimiento. En el caso de *Brachypodium distachyon*, sin embargo, esta hipótesis no pudo ponerse a prueba porque no se halló en la bibliografía información sobre ningún gen relacionado con el rendimiento en esta especie.

La hipótesis (2) fue rechazada, ya que si bien se detectaron QTLs asociados con el rendimiento en trigo pan, ubicados en regiones que exhibían colinealidad de marcadores en el genoma de arroz, cebada y *Brachypodium*, no fue posible identificar en forma fehaciente genes candidatos asociados con el rendimiento en dichas especies.

No hay evidencia para rechazar la tercera hipótesis, ya que fue posible obtener productos de amplificación por PCR a partir de 12 de los 13 genes seleccionados, en 10 variedades argentinas de trigo pan.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbate, P.E.; Lázaro, L., Andrade; F.H. 1997. ¿Es posible incrementar el número de granos por unidad de superficie en trigo?. Taller Internacional “Explorando Altos Rendimientos en Trigo”. INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay, octubre 1997. pp. 1-16.
- Abbate, P.E.; Andrade, F.H.; Lázaro, L.; Bariffi, J.H.; Berardocco, H.G.; Inza, V.H.; Marturano, M. 1998. Grain Yield Increase in Recent Argentine Wheat Cultivars. *Crop Science*. 38(5):1203-1209.
- 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. 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, septiembre, 2007. pp. 2-3.
- Abbate, P.E.; Pontaroli, A.; Lázaro, L.; Gutheim, F. 2010. A method of assessing spike fertility in wheat. 8^o International Wheat Conference. San Petersburgo, Rusia, junio 2010. 73 p.
- Abbate, P.E.; Pontaroli, A.C.; Lázaro, L.; Gutheim, F. 2012. A method of screening for spike fertility in wheat. *Journal of Agricultural Science*. 151:322-330.
- Acreche, M.M.; Briceño-Felix, G.; Martín-Sanchez, J.A.; Slafer, G.A. 2008. Physiological bases of genetic gains in Mediterranean bread wheat yield in Spain. *European Journal of Agronomy*. 28(3):162-170.
- Altschul, S.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.; Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215(3):403–410.
- Andrade, F.; Sala, R.; Pontaroli, A.; León, A. 2009. Integration of biotechnology, plant breeding and crop physiology. Dealing with complex interactions from a physiological perspective. En: Calderini, D.; Sadras, V. (eds.) *Crop Physiology: Applications for genetic improvement and agronomy*. Elsevier Science Ed. pp. 267-276.
- Arite, T.; Iwata, H.; Ohshima, K.; Maekawa, M.; Nakajima, M.; Kojima, M.; Sakakibara, H.; Kozuka, J. 2007. *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant Journal*. 51(6):1019–1029.
- Ashikari, M.; Sakakibara, H.; Lin, S.; Yamamoto, T.; Takashi, T.; Nishimura, A.; Angeles, E.R.; Qian, Q.; Kitano, H.; Matsuoka, M. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*. 309(5735):741–745.

- Bennetzen, J.L. 2009. Maize genome structure and evolution. En: Bennetzen, J.L. Hake, S. (eds.) Handbook of maize: genetics and genomics; Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York; pp.179-200.
- Berry, P.M.; Sterling, M.; Baker, C.J.; Spink, J.; Sparkes, D.L. 2003. A calibrated model of wheat lodging compared with field measurements. *Agricultural and Forest Meteorology*. 119:167-180.
- Bolot, S.; Abrouk, M.; Masood-Quraishi, U.; Stein, N.; Messing, J.; Feuillet, C.; Salse, J. 2009. The “inner circle” of the cereal genomes. *Current Opinion in Plant Biology*. 12(2):119–125.
- Börner, A.; Schumann, E.; Fürste, A.; Cöster, H.; Leithold, B.; Röder, S.; Weber, E. 2002. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105(6-7):921–936.
- Bossolini, E.; Wicker, T.; Knobel, P.A.; Keller, B. 2007. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *Plant Journal*. 49:704–717.
- Brooking, I.; Kirby, E. 1981. Interrelationships between stem and ear development in winter wheat: the effects of a Norin 10 dwarfing gene, *Gai/Rht2*. *The Journal of Agricultural Science*. 97(2):373–381.
- Calderini, D.; Quintero, A.; Hasan, A.; Wingen, L.; Griffiths, S.; Girousse, C.; Mouzeyar, S.; Le Gouis, J. 2013. Improving grain filling and potential grain size. En: Reynolds, M.; Braun, H. (eds.) Proceedings of the 3rd International Workshop of the Wheat Yield Consortium CENEB. CIMMYT, Cd. Obregón, Sonora, Mexico. pp. 39-44.
- Castillo, A.; Dorado, G.; Feuillet, C.; Sourdille, P.; Hernandez, P. 2010. Genetic structure and ecogeographical adaptation in wild barley (*Hordeum chilense* Roemer et Schultes) as revealed by microsatellite markers. *BMC Plant Biology* 10:266-279.
- Claverie, J.M.; Notredame, C. 2006. *Bioinformatics For Dummies*, 2nd ed. Wiley, Indiana, USA. 456 p.
- Collins, N.C.; Thordal-Christensen, H.; Lipka, V.; Bau, S.; Kombrink, E.; Qiu, J.L.; Huckelhoven, R.; Stein, M.; Freialdenhoven, A.; Somerville, S.C.; Schulze-Lefert, P. 2003. SNARE-protein mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*. 425:973–977.
- Dardel, F.; Képès, F. 2007. *Bioinformatics: Genomics and Post-Genomics*. John Wiley & Sons, Australia. pp. 252.
- 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. 15º Congreso Latinoamericano de Genética, 41º Congreso Argentino de Genética, 45º Congreso

- de la Sociedad de Genética de Chile, 2º Reunión Regional SAG-Litoral. Rosario, octubre 2012. 278 p.
- Devos, K.; Ma, J.; Pontaroli, A; Pratt, L.; Bennetzen, J. 2005. Analysis and mapping of randomly chosen bacterial artificial chromosome clones from hexaploid bread wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(52):19243-19248.
- Dixon, J.; Braun, H.; Kosina, P.; Crouch, J. 2009. Wheat facts and futures. CIMMYT, Mexico DF, Mexico. 95 p.
- Dreccer, M.; van Herwaarden, A.; Chapman, S. 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.; Chapman, S.C.; Rattey, A.R.; Neal, J.; Song, Y.; Christopher, J.T.; Reynolds, M. 2013. Developmental and growth controls of tillering and water-soluble carbohydrate accumulation in contrasting wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes: can we dissect?. *Journal of Experimental Botany*. 63(2):695–709.
- Feuillet, C., Salse, J. 2009. Comparative Genomics in the Triticeae. En: Feuillet, C.; Muehlbauer, G.J. (eds) *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York. pp. 451-477.
- Feuillet, C.; Leach, J.E.; Rogers, J.; Schnable, P.S.; Eversole, K. 2011. Crop genome sequencing: lessons and rationales. *Trends in Plant Science*, 16(2):77–88.
- Feuillet, C.; Stein, N.; Rossini, L.; Praud, S.; Mayer, K.; Schulman, A.; Eversole, K.; Appels, R. 2012. Integrating cereal genomics to support innovation in the Triticeae. *Functional & Integrative Genomics*. 12(4):573–583.
- Fischer, R.A. 1984. Growth and yield of wheat. En: Smith, W.H.; Banta, S.J. (eds.) *Potential productivity of field crops under different environments*. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. pp. 129-154.
- Fischer, R.A. 2007. Understanding the physiological basis of yield potential in wheat. *Journal of Agricultural Science*. 145(2):99–113.
- Fischer, R.A. 2011. Wheat physiology : a review of recent developments. *Crop & Pasture Science*. 62(2):95–114.
- Fischer, R.A.; Edmeades, G.O. 2010. Breeding and Cereal Yield Progress. *Crop Science*, 50 (Supplement 1):S85–S98.
- Fischer, R.A.; Stockman, Y. 1986. Increased kernel number in Norin 10-derived dwarf wheat: evaluation of the cause. *Australian Journal of Plant Physiology*. 13(6):767-784.
- Fischer, R.A.; Bidinger, F.; Syme, J.R.; Wall, P.C. 1981. Leaf photosynthesis, leaf permeability, crop growth and yield of short spring wheat genotypes under irrigation. *Crop Science*. 21:367–373.

- Foulkes, M.J.; Sylvester-Bradley R.; Weightman, R.; Snape, J. 2007. Identifying physiological traits associated with improved drought resistance in winter wheat. *Field Crops Research*. 103(1):11–24.
- Foulkes, M.J.; Slafer, G.A.; Davies, W.J.; Berry, P.M.; Sylvester-Bradley, R.; Martre, P.; Calderini, D.F.; Griffiths, S.; Reynolds, M.P. 2011. Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *Journal of Experimental Botany*. 62(2):469–486.
- Foulkes, M.J.; Rivera, C.; Trujillo, E.; Sylvester-Bradley, R.; Slafer, G.A.; Reynolds, M.P. 2012. Optimizing harvest index through increased partitioning to the spike and maximizing grain number. En: Reynolds, M.; Braun, H.; Quilligan, E. (eds) *Proceedings of the 2nd International Workshop of the Wheat Yield Consortium*. CENEB, CIMMYT, Cd. Obregón, Sonora, Mexico. pp. 15-17.
- Furbank, B.; López-Castañeda, C.; Condon, T.; Wilson, P.; Silva-Pérez, V.; von Caemmerer, S.; Evans, J.; Parry, M.; Salvucci, M.; Molero, G.; Reynolds, R. 2012. Phenotypic selection for photosynthetic capacity and efficiency. En: Reynolds, M.; Braun, H.; Quilligan, E. (eds) *Proceedings of the 2nd International Workshop of the Wheat Yield Consortium*. CENEB, CIMMYT, Cd. Obregón, Sonora, Mexico. pp. 1-2.
- Gegas, V.; Nazari, A.; Griffiths, S.; Simmonds, J.; Fish, L.; Orford, S.; Sayers, L.; Doonan, J.H.; Snape, J.W. 2010. A genetic framework for grain size and shape variation in wheat. *The Plant Cell Online*. 22(4):1046-1056.
- Ghiglione, H.; Gonzalez, F.; Serrago, R.; Maldonado, S.; Chilcott, C.; Curá, A.J.; Miralles, D.J.; Zhu, T.; Casal, J.J. 2008. Autophagy regulated by daylength determines the number of fertile florets in wheat. *Plant Journal*. 55(6):1010-1024.
- González, F.G.; Slafer, G.A.; Miralles, D.J. 2005. Preanthesis 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, F.G.; Terrile, I.I.; Falcon, M.O. 2011. Spike Fertility and Duration of Stem Elongation as Promising Traits to Improve Potential Grain Number (and Yield): Variation in Modern Argentinean Wheats. *Crop Science* 51(4):1693-1702.
- Griffiths, S.; Sharp, R.; Foote, T.N.; Bertin, I.; Wanous, M.; Reader, S.; Colas, I.; Moore, G. 2006. Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*. 439:749–752.
- Haymes, K. 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program. *Plant Molecular Biology Reporter*. 14(3):280–284.
- Heang, D.; Sassa, H. 2012. Antagonistic Actions of HLH/bHLH Proteins Are Involved in Grain Length and Weight in Rice. *PloS one*. 7(2): [en línea]

<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0031325>
> [consulta: 18 junio 2013].

- Huang, X.; Madan, A. 1999. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. *Genome Research*. 9(9):868–877.
- Huang, X.; Miller, W. 1991. A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics*, 12:337–357.
- Huang, X.; Qian, Q.; Liu, Z.; Sun, H.; He, S.; Luo, D.; Xia, G.; Chu, C.; Li, J.; Fu, X. 2009. Natural variation at the *DEP1* locus enhances grain yield in rice. *Nature Genetics*. 41(4):494–497.
- Huo, N.; Vogel, J.P.; Lazo, G.R.; You, F.M.; Ma, Y.; McMahon, S.; Dvorak, J.; Anderson, O.D.; Luo, M.-C.; Gu, Y.Q. 2009. Structural characterization of Brachypodium genome and its syntenic relationship with rice and wheat. *Plant Molecular Biology*. 70(1-2):47–61.
- Imelfort, M. 2009. Sequence Comparison Tools. En: Edwards, D.; Stajich, J.; Hansen, D (eds.) *Tools and Applications*. Springer, New York, USA. pp. 13-38.
- Keller, M.; Karutz, C.; Schmid, J.E.; Stamp P.; Winzeler, M.; Keller, B.; Messmer, M.M. 1999. Quantitative trait loci for lodging resistance in a segregating wheat × spelt population. *Theoretical and Applied Genetics*. 98(6-7):1171-1182.
- Killian, B.; Özkan, H.; Pozzi, C.; Salamini, F. 2009. Domestication of the Triticeae in the Fertile Crescent. En: Feuillet, C.; Muehlbauer, G.J. (eds) *Genetics and genomics of the Triticeae*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York. pp. 81-120.
- Komatsuda, T. (2004). Comparative high resolution map of the *sixrowed spike locus 1 (vrs1)* in several populations of barley, *Hordeum vulgare* L. *Hereditas*. 141(1):68–73.
- Krattinger, S.; Wicker, T.; Keller, B. 2009. Map-Based Cloning of Genes in Triticeae (Wheat and Barley). En: Feuillet, C.; Muehlbauer, G.J. (eds) *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York. pp. 337-358.
- Landjeva, S.; Korzun, V.; Börner, A. 2007. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica*, 156(3):271–296.
- Laurie, D.A. 2009. Developmental and reproductive traits in the Triticeae. En: Feuillet, C.; Muehlbauer, G.J. (eds) *Genetics and genomics of the Triticeae*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York. pp. 591-610.
- Lehmensiek, A.; Bovill, W.; Wenzl, P.; Langridge, P.; Appels, R. 2009. Genetic mapping in the Triticeae. En: Feuillet, C.; Muehlbauer, G.J. (eds) *Genetics and genomics of the Triticeae*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York; pp. 201-236.

- Li, J.; Chu, H.; Zhang, Y.; Mou, T.; Wu, C.; Zhang, Q.; Xu, J. 2012. The rice HGW gene encodes a ubiquitin-associated (UBA) domain protein that regulates heading date and grain weight. *PloS one*. 7(3): en línea <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0034231>> [consulta: 17 mayo 2013].
- Li, W.; Nelson, J.; Chu, C.; Shi, L.; Huang, S.; Liu, D. 2002. Chromosomal locations and genetic relationships of tiller and spike characters in wheat. *Euphytica*. 125:357–366.
- Li, X.; Qian, Q.; Fu, Z.; Wang, Y.; Xiong, G.; Zeng, D.; Wang, X.; Liu, X.; Teng, S.; Hiroshi, F.; Yuan, M.; Luok, D.; Han, B.; Li, J. 2003. Control of tillering in rice. *Nature*. 422(6932):618–621.
- Li, Y.; Fan, C.; Xing, Y.; Jiang, Y.; Luo, L.; Sun, L.; Shao, D.; Xu, C.; Li, X.; Xiao, J.; He, Y.; Zhang, Q. 2011. Natural variation in GS5 plays an important role in regulating grain size and yield in rice. *Nature Genetics*. 43(12):1266–1269.
- Liang, Y.; Zhang, K.; Zhao, L.; Liu, B.; Meng, Q.; Tian, J.; Zhao, S. 2009. Identification of chromosome regions conferring dry matter accumulation and photosynthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 171(1):145–156.
- Liu, T.; Shao, D.; Kovi, M.R.; Xing, Y. 2010. Mapping and validation of quantitative trait loci for spikelets per panicle and 1,000-grain weight in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 120(5):933–942.
- Liu, W.; Wu, C.; Fu, Y.; Hu, G.; Si, H.; Zhu, L.; Luan, W.; He, Z.; Sun, Z. 2009. Identification and characterization of *HTD2*: a novel gene negatively regulating tiller bud outgrowth in rice. *Planta*. 230(4):649–658.
- Ma, Z.; Zhao, D.; Zhang, C.; Zhang, Z.; Xue, S.; Lin, F.; Kong, Z.; Tian, D.; Luo, Q. 2007. Molecular genetic analysis of Wve spike-related traits in wheat using RIL and immortalized F₂ populations. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(1):31–42.
- MAGyP. 2012. Estadísticas agropecuarias. [en línea] <<http://old.siia.gov.ar/>> [consulta: 06 febrero 2013].
- Mameaux, S.; Cockram, J.; Thiel, T.; Steuernagel, B.; Stein, N.; Taudien, S.; Jack, P.; Werner, P.; Gray, J.C.; Greenland, A.J.; Powell, W. 2012. Molecular, phylogenetic and comparative genomic analysis of the cytokinin oxidase/dehydrogenase gene family in the Poaceae. *Plant Biotechnology Journal*. 10(1):67–82.
- Martino, D.L.; Cendoya, M.G.; Gutheim, F.; Panelo, J.; Castaño, M.; Arricar, Y.; Abbate, P.E.; Pontaroli, A.C. 2012. Heredabilidad de la fertilidad de la espiga en familias F_{2.3} de trigo pan. 15^o Congreso Latinoamericano de Genética, 41^o Congreso Argentino de Genética, 45^o Congreso de la Sociedad de Genética de Chile, 2^o Reunión Regional SAG-Litoral. Rosario, octubre 2012. 265 p.

- Marza, F.; Bai, G.H.; Carver, B.F.; Zhou, W.C. 2006. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 x Clark. *Theoretical and Applied Genetics*, 112(4):688–98.
- Mayer, K.F.X.; Martis, M.; Hedley, P.E.; Simkova, H.; Liu, H.; Morris, J.A.; Steuernagel, B.; Taudien, S.; Roessner, S.; Gundlach, H.; Kubalaková, M.; Suchanková, P.; Murat, F.; Felder, M.; Nussbaumer, T.; Graner, A.; Salse, J.; Endo, T.; Sakai, H.; Tanaka, T.; Itoh, T.; Sato, K.; Platzer, M.; Matsumoto, T.; Scholz, U.; Dolez, J.; Waugh, R.; Stein, N. 2011. Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *Plant Cell*. 23(4):1249-1263.
- Mayer, K.F.; Waugh, R.; Brown, J.W.; Schulman, A.; Langridge, P.; Platzer, M.; Fincher, G.B.; Muehlbauer, G.J.; Sato, K.; Close, T.J.; Wise, R.P.; Stein N 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. 491(7426):711–716.
- McIntyre, C.L.; Mathews, K.L.; Rattey, A.; Chapman, S.C.; Drenth, J.; Ghaderi, M.; Reynolds, M.; Shorter, R. 2010. Molecular detection of genomic regions associated with grain yield and yield-related components in an elite bread wheat cross evaluated under irrigated and rainfed conditions. *Theoretical and Applied Genetics*. 120(3):527–41.
- McIntyre, C.; Seung, D.; Casu, R.; Rebetzke, G.J.; Shorter, R.; Xue, G.-P. 2012. Genotypic variation in the accumulation of water soluble carbohydrates in wheat. *Functional Plant Biology*. 39:560–568.
- Menlove, K.J.; Clement, M.; Crandall, K.A. 2009. Similarity Searching Using BLAST. En: Posada, D. (eds.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis*. Humana Press, Vigo, España. pp. 1-22.
- Minakuchi, K.; Kameoka, H.; Yasuno, N.; Umehara, M.; Luo, L.; Kobayashi, K.; Hanada, A.; Ueno, K.; Asami, T.; Yamaguchi, S.; Kyojuka, J. 2010. *FINE CULM1 (FC1)* works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant & Cell Physiology*. 51(7):1127–1135.
- Mirabella, N.E.; Abbate, P.E.; Castaño, M.; Pontaroli, A.C. 2010. Herencia de la fertilidad de la espiga de trigo. 14^o Congreso Latinoamericano de Genética, 8^o Congreso de la Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis ambiental, 42^o Congreso de la Sociedad Genética de Chile, 39^o Congreso de la sociedad Argentina de Genética. Viña del Mar, Chile, octubre 2010. 242 p.
- 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.
- Narasimhamoorthy, B.; Gill, B.S.; Fritz, A.K.; Nelson, J.C.; Brown-Guedira, G.L. 2006. Advanced backcross QTL analysis of a hard winter wheat x synthetic wheat population. *Theoretical and Applied Genetics*. 112:787-796.

- Nardmann, J.; Zimmermann, R.; Durantini, D.; Kranz, E.; Werr, W. 2007. *WOX* gene phylogeny in poaceae: a comparative approach addressing leaf and embryo development. *Molecular Biology and Evolution*. 24:2474–2484.
- Olsen, P.; Lenk, I.; Jensen, C.S.; Petersen, K.; Andersen, C.H.; Didion, T.; Nielsen, K.K. 2006. Analysis of two heterologous flowering genes in *Brachypodium distachyon* demonstrates its potential as a grass model plant. *Plant Science*. 170:1020–1025.
- Ookawa, T.; Hobo, T.; Yano, M.; Murata, K.; Ando, T.; Miura, H.; Asano, K.; Ochiai, Y.; Ikeda, M.; Nishitani, R.; Ebitani, T.; Ozaki, H.; Angeles, E.R.; Hirasawa, T.; Matsuoka, M. 2010. New approach for rice improvement using a pleiotropic QTL gene for lodging resistance and yield. *Nature Communications*. 1(8):132-143.
- Parry, M.A.J.; Reynolds, M.; Salvucci, M.E.; Raines, C.; Andralojc, P.J.; Zhu, Xin-G.; Price, G.D.; Condon, A.G.; Furbank, R.T. 2011. Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62(2):453–67.
- 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.
- Pearson, W.R. 1999. Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. En: Misener, S.; Krawetz, S.A. (eds.). *Bioinformatics Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA. pp. 185-220.
- Pontaroli, A.C.; Abbate, P.E.; Lázaro, L.; Gutheim, F.; Martino, D.L.; Mirabella, N.E.; Deperi, S.I.; Alonso, M.P.; Ramírez, I.A. 2012. Wheat spike fertility: genetics and breeding applications of a key ecophysiological yield component. 6^{to} International Crop Science Congress. Rio Grande do Sul, Brasil, agosto 2012. 17 p.
- Quarrie, S.; Pekic Quarrie, S.; Radosevic, R.; Rancic, D.; Kaminska, A.; Barnes, J.D.; Leverington, M.; Ceoloni, 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):2627–37.
- Quraishi, U.; Abrouk, M.; Bolot, S.; Pont, C.; Throude, M.; Guilhot, N.; Confolent, C.; Bortolini, F.; Praud, S.; Murigneux, A.; Charmet, G.; Salse, J. 2009. Genomics in cereals: from genome-wide conserved orthologous set (COS) sequences to candidate genes for trait dissection. *Functional and Integrative Genomics*. 9:473-484.
- Rajaram, S. 2005. Role of conventional plant breeding and biotechnology in future wheat production. *Turkish Journal of Agriculture and Forage*. 29:105–111.
- Rebetzke, G.J.; Rattey, A.R.; Farquhar, G.D.; Richards, R.A.; Condon, A.G. 2013. Genomic regions for canopy temperature and their genetic association with stomatal conductance and grain yield in wheat. *Functional Plant Biology*. 40:14–33.

- Reynolds, M.P.; Eaton, D. 2009. Book of Abstracts. Complementary strategies to raise wheat yield potential. Workshop held at CIMMYT, El Batán, México. 33 p.
- Reynolds, M.P.; Bonnett, D.; Chapman, S.C.; Furbank, R.T.; Manès, Y.; Mather, D.E.; Parry, M.J. 2011. Raising yield potential of wheat. I. Overview of a consortium approach and breeding strategies. *Journal of Experimental Botany*. 62(2):439–52.
- Rustenholz, C.; Hedley, P.E.; Morris, J.; Choulet, F.; Feuillet, C.; Waugh, R.; Paux, E. 2010. Specific patterns of gene space organisation revealed in wheat by using the combination of barley and wheat genomic resources. *BMC Genomics*. 11:714-726.
- Sakamoto, T.; Morinaka, Y.; Ohnishi, T.; Sunohara, H.; Fujioka, S.; Ueguchi-Tanaka, M.; Mizutani, M.; Sakata, K.; Takatsuto, S.; Yoshida, S.; Tanaka, H.; Kitano, H.; Matsuoka, M. 2006. Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. *Nature Biotechnology*. 24(1):105–109.
- Semple, C.A.M. 2007. Assembling a view of the human genome. En: Barnes, M.R. (eds.) *Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data*, 2nd ed. Wiley, Essex, United Kingdom. pp. 59-84.
- Serrago, R.; 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.
- She, K.-C.; Kusano, H.; Koizumi, K.; Yamakawa, H.; Hakata, M.; Imamura, T.; Fukuda, M.; Naito, N.; Tsurumaki, Y.; Yaeshima, M.; Tsuge, T.; Matsumoto, K.; Kudoh, M.; Itoh, E.; Kikuchi, S.; Kishimoto, N.; Yazaki, J.; Ando, T.; Yano, M.; Aoyama, T.; Sasaki, T.; Satoh, H.; Shimada, H. 2010. A novel factor *FLOURY ENDOSPERM2* is involved in regulation of rice grain size and starch quality. *The Plant Cell*: 22(10):3280–3294.
- 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. 2005. Physiology of determination of major wheat yield components. En: Buck, H.T.; Nisi, J.E.; Salomón, N. (eds.) *Wheat production in stressed environments*. Springer, Mar del Plata, Argentina. pp. 557-565.
- 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. En: Sadras, V.O.; Calderini, D.F. (eds) *Crop physiology: applications for genetic improvement and agronomy*. Elsevier. pp. 277–308.
- Slafer, G.A.; Foulkes, M.J.; Miralles, D.J.; González, F.G.; González, O.; Griffiths, S. 2012. En: Reynolds, M.; Braun, H.; Quilligan, E. (eds) *Proceedings of the 2nd International Workshop of the Wheat Yield Consortium*. CENEB, CIMMYT, Cd. Obregón, Sonora, Mexico. pp. 18-19.

- Su, Z.; Hao, C.; Wang, L.; Dong, Y.; Zhang, X. 2011. Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 122: 211–223.
- Sylvester-Bradley, R.; Berry, P.; Riffkin, P. 2009. Modelling tradeoffs and synergies between yield-determining traits of wheat. En: Reynolds, M.; Eaton, D. (eds) *Book of Abstracts Complementary strategies to raise wheat yield potential*. CIMMYT, El Batán, Mexico. pp. 20-21.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28:2731-2739.
- Tan, L.; Li, X.; Liu, F.; Sun, X.; Li, C.; Zhu, Z.; Fu, Y; Cai, H.; Wang, X.; Xie, D.; Sun, C. 2008. Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication. *Nature Genetics*. 40(11):1360–1364.
- Ugarte, C.; Calderini, D.F.; Slafer, G.A. 2007. Grain weight and grain number responsiveness to pre-anthesis temperature in wheat, barley and triticale. *Field Crops Research*. 100(2-3):240–248.
- Vanzetti, L.S.; Yerkovich, N.; Chialvo, E.; Lombardo, L.; Vaschetto, L.; Helguera, H. 2013. Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm. *Genetics and Molecular Biology*. 36(3):391-399.
- Vogel, J.; Bragg, J. 2009. *Brachypodium distachyon*, a New Model for the Triticeae. In: Feuillet, C.; Muehlbauer, G.J. (eds) *Genetics and Genomics of the Triticeae*. Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York. pp. 427-449.
- Wang, E.; Wang, J.; Zhu, X.; Hao, W.; Wang, L.; Li, Q.; Zhang, Li.; He, W.; Lu, B.; Lin, H.; Ma, H.; Zhang, G.; He, Z. 2008. Control of rice grain-filling and yield by a gene with a potential signature of domestication. *Nature Genetics*. 40(11):1370–4.
- Wang, L.; Ge, H.; Hao, C.; Dong, Y.; Zhang, X. 2012. Identifying loci influencing 1,000-kernel weight in wheat by microsatellite screening for evidence of selection during breeding. *PloS one*, 7(2): [en linea] <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0029432>> [consulta: 25 febrero 2013].
- Wang, Z.; Wu, X.; Ren, Q.; Chang, X.; Li, R.; Jing, R. 2010. QTL mapping for developmental behavior of plant height in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 174(3):447–458.
- Xue, W.; Xing, Y.; Weng, X.; Zhao, Y.; Tang, W.; Wang, L.; Zhou, H.; Yu, S.; Xu, C.; Li, X.; Zhang, Q. 2008. Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature Genetics*. 40(6):761–767.

- Yasuno, N.; Yasui, Y.; Takamura, I.; Kato, K. 2007. Genetic interaction between 2 tillering genes, reduced *culm number 1 (rcn1)* and *tillering dwarf gene d3*, in rice. *The Journal of Heredity*. 98(2):169–172.
- Yi, G.; Choi, J.-H.; Jeong, E.-G.; Chon, N.-S.; Jena, K. K.; Ku, Y.-C.; Kim, D.-H.; Eun, M.-Y. Leon, J.-S.; Nam, M.-H. 2005. Morphological and molecular characterization of a new *frizzy panicle* mutant, “*fzp-9(t)*”, in rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditas*. 142(2005):92–97.
- Youssefian, S.; Kirby, E.J.M.; Gale M.D. 1992. Pleiotropic effects of the GA-insensitive *Rht* dwarfing genes in wheat. 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth. *Field Crops Research*. 28(3):191–210.
- Zeida, M.; Yua, J.K.; Goldowitz, I.; Denton, M.E.; Costichd, D.E.; Jayasuriya, C.T.; Saha, M.; Elshire, R.; Benscher, D.; Breseghello, F.; Munkvold, J.; Varshney, R.K.; Belay, G.; Sorrells, M.E. 2010. Cross-amplification of EST-derived markers among 16 grass species. *Field Crops Research* 118:28–35.
- Zhang, J.; Liu, W.; Yang, X.; Gao, A.; Li, X.; Wu, X.; Li, L. 2011. Isolation and characterization of two putative cytokinin oxidase genes related to grain number per spike phenotype in wheat. *Molecular Biology Reporter*. 38:2337–2347.
- Zhao, S.-Q; Hu, J.; Guo, L.-B.; Qian, Q.; Xue, H.-W. 2010. Rice leaf inclination2, a VIN3-like protein, regulates leaf angle through modulating cell division of the collar. *Cell Research*. 20(8):935–947.
- Zhu, K.; Tang, D.; Yan, C.; Chi, Z.; Yu, H.; Chen, J.; Liang, J.; Gu, M.; Cheng, Z. 2010. *Erect panicle2* encodes a novel protein that regulates panicle erectness in indica rice. *Genetics*. 184(2):343–350.
- Zou, J.; Zhang, S.; Zhang, W.; Li, G.; Chen, Z.; Zhai, W.; Zhao, X.; Pan, X.; Xie, Q.; Zhu, L. 2006. The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of Arabidopsis *MAX3* is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant Journal*. 48(5):687–698.