

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**ANÁLISIS GENÓMICO DE LINEAS ALTAMENTE ENDOCRIADAS DE TRIGO
OBTENIDAS POR ANDROGÉNESIS IN VITRO Y AVANCE RÁPIDO DE
GENERACIONES**

por

María Magdalena MASTROPIERRO MORALES

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título
de *Magister* en Ciencias Agrarias
opción Ciencias Vegetal

Montevideo

URUGUAY

Diciembre 2019

Tesis aprobada por el tribunal integrado por: Ing. Agr. (PhD) Clara Pritsch, Ing. Agr. (PhD) Guillermo Galván, e Ing. Agr. (PhD) Rafael Vidal, el 17 de diciembre de 2019.
Autora: Ing. Agr. María Magdalena Mastropierro Morales. Director: Ing. Agr. (PhD) Martín Quincke, Co-directora: Ing. Agr. (Dra) Alicia Castillo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores de tesis Martín Quincke y Alicia Castillo por haberme guiado en este camino, donde adquirí conocimientos tanto a nivel profesional como personal.

Al profesor Patricio Esteves por su gran apoyo y guía profesional durante toda la maestría y, especialmente por su compañerismo y palabras de aliento en cada etapa del proceso.

Al profesor Francois Belzile por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo en su laboratorio de la Universidad Laval, y por su orientación muy apreciada durante la pasantía. A todo su equipo: Martine, Suzanne, Martin, Amina, Thomas, Manel, Marc Andre, Chiheb, Waldiodio, Honore, quienes hicieron de la pasantía una etapa increíble de mi trabajo en Canadá.

A mis compañeros de trabajo en INIA Las Brujas (Belén, Mary, Daniela, Laura) e INIA La Estanzuela (Leo, Marcelo, Wilmar, Fernando) quienes me ayudaron a llevar adelante la tesis.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) por haberme dado la posibilidad de realizar mi tesis.

Al gobierno de Canadá (ELAP scholarship) por financiar la pasantía en la Universidad Laval, Canadá.

Y finalmente a mi familia quienes me apoyaron en esta nueva etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

	página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTO.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1. EL TRIGO EN URUGUAY.....	2
1.2. TECNOLOGÍAS PARA EL DESARROLLO DE POBLACIONES DE ALTO NIVEL DE HOMOCIGOSIS: RILS (F6) y DH.....	4
<u>1.2.1. Producción de líneas recombinantes endocriadas</u>	4
<u>1.2.2. Producción de líneas DHs</u>	6
1.3. MARCADORES MOLECULARES.....	9
1.4. GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN (GBS).....	10
1.5. MAPA GENÉTICO.....	12
1.6. DISTORSIÓN DE SEGREGACIÓN.....	13
1.7. OBJETIVOS.....	14
<u>1.7.1. Objetivo general</u>	14
<u>1.7.2. Objetivos específicos</u>	14
1.8. HIPÓTESIS.....	14
2. <u>ANÁLISIS GENÓMICO DE LINEAS ALTAMENTE ENDOCRIADAS DE TRIGO OBTENIDAS POR ANDROGÉNESIS IN VITRO Y AVANCE RÁPIDO DE GENERACIONES</u>	15
2.1. ABSTRACT.....	15
2.2. RESUMEN.....	16
2.3. INTRODUCCIÓN.....	16
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.4.1. <u>Material vegetal</u>	19

2.4.1.1. Obtención de las poblaciones de plantas DHs.....	19
2.4.1.2. Obtención de las poblaciones de líneas F6.....	19
2.4.2. <u>Extracción de ADN</u>	20
2.4.3. <u>Secuenciación y obtención de SNPs</u>	21
2.4.4. <u>Utilización del Software QTL IciMapping</u>	21
2.5. RESULTADOS.....	22
2.5.1. <u>Marcadores moleculares</u>	22
2.5.2. <u>Mapas genéticos</u>	23
2.5.3. <u>Heterocigosis residual</u>	24
2.5.4. <u>Distorsión en la segregación</u>	25
2.6. DISCUSIÓN.....	27
2.6.1. <u>Marcadores moleculares: comparación entre poblaciones DHs y F6</u>	27
2.6.2. <u>Mapas genéticos</u>	29
2.6.3. <u>Heterocigosis residual</u>	30
2.6.4. <u>Distorsión en la segregación</u>	31
2.6.5. <u>Comparación de dos tecnologías: AIV vs. ARG+CE+DSU</u>	32
2.7. CONCLUSIONES.....	35
2.8. AGRADECIMIENTOS.....	35
2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
3. <u>DISCUSIÓN GENERAL</u>	43
3.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DE LAS VARIEDADES EN ESTUDIO..	43
3.2. LÍNEAS DHs y F6 DE CADA CRUZAMIENTO.....	44
3.3. DESCRIPCIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DHs Y F6.....	45
3.4. APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES A UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO.....	47
3.4.1. <u>Mapas genéticos</u>	47

<u>3.4.2. Estudio de la heterocigosis residual</u>	
<u>en poblaciones DHs y F6.....</u>	48
<u>3.4.3. Estudio de la distorsión en la segregación en</u>	
<u>poblaciones DHs y F6.....</u>	49
3.5. TECNOLOGÍAS ARG+CE+DSU vs CA/CMA.....	56
4. <u>CONCLUSIONES</u>.....	59
5. <u>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</u>.....	60
6. <u>ANEXOS</u>.....	72

RESUMEN

El avance rápido de generaciones (ARG) combinado con el cultivo in vitro de embriones (CE) inmaduros y el método de descendencia de semilla única (DSU o "Single-Seed-Descent", SSD) o "ARG+CE+DSU" son herramientas tecnológicas que permiten reducir significativamente el plazo de obtención de un nuevo cultivar de trigo avanzando cinco generaciones de autofecundación en un año. A su vez, con las técnicas de androgénesis in vitro (AIV) como cultivo de anteras (CA) y cultivo de microsporas aisladas (CMA) se obtienen líneas dobles haploides (DHs) 100% homocigotas en menos de un año. Se planteó la hipótesis de que las poblaciones DHs y F6 presentarían diferencias en su estructura genética. El objetivo fue desarrollar cuatro poblaciones de líneas altamente endocriadas (LAEs), obtenidas por ARG+CE+DSU y por AIV correspondiente a dos genotipos distintos, y caracterizarlas utilizando marcadores moleculares del tipo de los polimorfismos de un sólo nucleótido ("Single-Nucleotide-Polymorphisms", o SNPs) detectados a través de la técnica genotipado por secuenciación (GBS). Los materiales de estudio consistieron en dos poblaciones de la cruz INIA466: 91 líneas DHs y 55 líneas F6; y dos poblaciones de la cruz INIA553: 92 DHs y 47 F6 (compartiendo un padre en común). El número de SNPs de las cuatro poblaciones fue similar, pero el número de BIN-SNPs (marcadores informativos, no-redundantes) fue dos veces mayor para las poblaciones F6 en relación con las poblaciones de DHs. Se realizó el mapa genético para cada población obteniendo similar tamaño del genoma (2800 cM) con una mayor cobertura en las poblaciones F6. Asimismo, se detectó mayor nivel de heterocigosis residual (HR) y mayor número de loci en distorsión de segregación en poblaciones F6 que en las DHs ($p < 0,05$). El método de ARG+CE+DSU se presentó más apropiado que el de AIV para su aplicación en programas de mejoramiento de trigo.

Palabras claves: trigo, avance rápido de generaciones, cultivo de embriones, descendencia de semilla única, dobles haploides, genotipado por secuenciación, SNPs.

**GENOMIC ANALYSIS OF RECOMBINANT INBRED LINES OF WHEAT OBTAINED
FROM ANDROGENESIS AND RAPID GENERATION ADVANCEMENT**

SUMMARY

Technics like the rapid generation advancement (RGA) and the production of doubled haploid plants (DHs), allow breeders to reduce the time to develop a new wheat cultivar. The combination of RGA, in vitro embryo culture (EC) and single seed descent (SSD) called “RGA+EC+SSD” made possible to get five generations of wheat in one year, from F1 to F6. On the other hand, with in vitro androgenesis it was possible to get DHs in less than one year. The hypothesis for this research proposed that DHs and F6 populations have different genetics characteristics. The objective was to develop DHs and F6 populations and characterize them genotypically with SNPs detected by GBS. The studied populations consisted of 91 DHs and 55 F6 of genotype INIA466, and 92 DHs and 47 F6 of genotype INIA553. The number of SNPs was similar between populations but the number of BIN-SNPs (informative markers, no redundant) was twice as big for F6 than DH populations. The genetic map was similar between populations (2800 cM) with a better coverage in F6. In the study, residual heterozygosity and segregation distortion were calculated, resulting in higher percentage of residual heterozygosity and loci in segregation distortion in the F6 populations than the DH ($p < 0,05$). The RGA+EC+SSD method was found more appropriated than in vitro androgenesis for wheat breeding programmes.

Key words: wheat, rapid generation advancement, double haploid, GBS, SNPs.

1. INTRODUCCIÓN

Debido al cambio climático, la agricultura a nivel mundial se enfrenta a grandes desafíos en los próximos años, como son, la aparición de nuevas enfermedades y plagas. Además, el incremento de la población mundial se estima que ascenderá a 9 billones de habitantes para el 2050 (Hickey *et al.*, 2017). El desarrollo de nuevos cultivares con gran adaptabilidad a sistemas en constante cambio será la clave para el éxito en atender la creciente demanda de alimentos (De la Fuente *et al.*, 2013).

El trigo, cereal del género *Triticum*, es uno de los cultivos más extensamente sembrado en el mundo. Su gran adaptabilidad a diferentes ambientes a lo largo de la historia (Feldman y Levy, 2012) y la gran variedad de productos que se obtienen a partir de su grano han llevado a su gran expansión (Shewry, 2009). La producción mundial de trigo para el período 2017/2018 fue de 760 millones de toneladas (FAO, 2019).

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es una especie autógama y hexaploide con 42 cromosomas ($2n = 6x = 42$, genomas A, B y D). La evolución natural de plantas nativas diploides a plantas hexaploides dio origen a un cultivo con una amplia plasticidad para adaptarse a diversos ambientes (Feldman y Levy, 2012). Primeramente, se dio lugar a la hibridación de las especies *T. urartu* (AA) y *Ae. speltoides* (BB) originando descendientes tetraploides (*T. turgidum* AABB) y posteriormente, con la fusión de éstas con *T. tauschii* (DD) se originó la especie hexaploide *T. aestivum* (AABBDD) (Shewry, 2009; Sramková *et al.*, 2009).

El método de mejoramiento genético predominante en trigo es el método convencional de selección por pedigree. Desarrollar nuevos cultivares e introducirlos en el mercado puede llevar al menos de 12 a 14 años, lo que determina una de las mayores limitantes y desafíos en un programa de mejoramiento genético. Se

requieren de 4 a 6 generaciones de poblaciones segregantes para obtener líneas avanzadas estables genéticamente antes de poder evaluarlas según características agronómicas y de rendimiento (De la Fuente *et al.*, 2013; Forster *et al.*, 2014; Watson *et al.*, 2018). Además, ciertas características del trigo dificultan el avance genético como, su poliploidía, su gran tamaño de su genoma (16Gb), el alto número de regiones repetidas y la presencia de genes duplicados en su genoma. Debido a esto, la realización de mapas genéticos y el estudio de caracteres de herencia compleja se ven afectados (Lado, 2012).

1.1 EL TRIGO EN URUGUAY

El mejoramiento genético de trigo en Uruguay se inicia con la llegada del Dr. Alberto Boerger en 1912 y se consolida con la fundación del “Instituto Fitotécnico y Semillero Nacional La Estanzuela” (IFSNLE) en Colonia en 1914 (Luizzi *et al.*, 2018).

Los primeros trabajos realizados fueron recolectar y caracterizar las poblaciones criollas utilizadas en ese momento en el país, liberándose en 1918 las primeras variedades de trigo nacional. Desde sus inicios el objetivo principal del programa de mejoramiento genético de trigo de INIA (PMGT) ha sido desarrollar el germoplasma local. Mejorar las variedades en cuanto a su resistencia a enfermedades y a su calidad de grano, logrando así un impactante crecimiento en el rendimiento por hectárea (Luizzi *et al.*, 2018).

El PMGT siempre fomentó y mantuvo un activo intercambio de materiales genéticos tanto con países de la región como del resto del mundo, con el objetivo de mejorar la producción nacional incorporando germoplasma extranjero con resistencia a las distintas enfermedades que afectan la producción del cultivo a nivel nacional (Luizzi *et al.*, 2018).

En la historia del PMGT en La Estanzuela se han liberado más de 65 variedades de trigo con una prolongada utilización a nivel nacional. El desarrollo de variedades se ha enfocado en la adaptabilidad a las condiciones de producción de Uruguay con una buena producción de semilla, calidad industrial, sanidad e incremento del rendimiento. El rendimiento promedio nacional de trigo se incrementó de 500 kg/ha a principios del siglo pasado a 3667 kg/ha para el período 2016/2017 (DIEA, 2019). Este aumento en el rendimiento fue resultado de la combinación de buenas prácticas de manejo con genética superior desarrollada durante estos años (Quincke *et al.*, 2018).

El PMGT durante los últimos 100 años ha estado sujeto a continuos desafíos que lo han llevado a estar en una permanente transformación. Uno de los puntos más importante del programa es la selección de variedades por su resistencia genética a enfermedades. Este objetivo se ha mantenido durante todo este período, incluso, en los sistemas que utilizan fungicidas como práctica habitual para el control de enfermedades (Luizzi *et al.*, 2018; Quincke *et al.*, 2018).

A futuro deberán enfrentarse nuevos desafíos en rendimiento y calidad, y será necesario la implementación de tecnologías innovadoras como: herramientas moleculares, fenotipado de precisión y a gran escala, incorporación de selección genómica, exploración de híbridos y transgénicos (Luizzi *et al.*, 2018; Quincke *et al.*, 2018). A su vez, hay que destacar la existencia de tecnologías que permiten acelerar el proceso de obtención de nuevas líneas con alto nivel de homocigosis, como son el avance rápido de generaciones (ARG) utilizando la descendencia de semilla única (DSU) y la producción de plantas dobles haploides (DHs) (Snape y Simpson, 1983). Todas las técnicas y métodos que permitan reducir el plazo hasta obtener los resultados buscados conllevan un impacto en la reducción de costos, y a su vez pueden llevar a un aumento de la ganancia genética (Esteves *et al.*, 2017).

1.2. TECNOLOGÍAS PARA EL DESARROLLO DE POBLACIONES DE ALTO NIVEL DE HOMOCIGOSIS: RILS (F6) y DH

1.2.1. Producción de líneas recombinantes endocriadas

En los programas de mejoramiento de autógamias es esencial obtener líneas puras homocigotas o RILs (recombinant inbred lines), proceso que consta de autofecundaciones sucesivas por varias generaciones y, en un programa convencional puede llevar de 10 a 15 años (Zheng *et al.*, 2013). Goulden (1939) y más tarde Brim (1966), citados por Forster *et al.* (2014) desarrollaron la técnica DSU con la cual, en cada una de estas generaciones se cosecha una sola semilla por planta a partir de la F2 y esto se repite, hasta una generación con elevado porcentaje de homocigosis (por ejemplo, F6). La cosecha de una sola semilla por planta permite la siembra de las poblaciones de trigo a altas densidades y en lugares reducidos, como son los invernáculos y las cámaras de crecimiento, incrementando así, el n poblacional de un programa de mejoramiento genético de trigo (Zheng *et al.*, 2013; Forster *et al.*, 2014).

Más recientemente, se han desarrollado tecnologías de crecimiento del cultivo que permiten la reducción del intervalo generacional de los cultivos, o sea, la duración entre semilla y semilla, al provocar un adelanto dramático en la fecha de floración. El ARG o “speed breeding” es un método que permite reducir el tiempo de obtención de líneas avanzadas mediante el control de los factores ambientales (temperatura, fotoperíodo, fertilización, riego y humedad) acelerando así la obtención de nuevas variedades (Watson *et al.*, 2018). Es un método aplicable a cualquier programa de mejoramiento genético, aunque en el caso del trigo, se presentan algunas dificultades como la dormancia, la cual retrasa la cosecha de la semilla (Czarnecki, 1988).

Mukade (1974), llegó a producir de cuatro a cinco generaciones de trigo en un año, acelerando el crecimiento de las plantas y adelantando la fecha de floración

en condiciones controladas e induciendo a las semillas a una germinación temprana. Posteriormente De Pauw y Clarke (1976), continuaron la investigación con el objetivo de levantar la dormancia en semillas de trigo. La dormancia es un mecanismo de autoprotección de las semillas para evitar que éstas germinen en un momento del año desfavorable para el desarrollo de la planta, retrasando seriamente el proceso de obtención de la próxima generación de trigo.

La técnica de cultivo de embriones (CE) consiste en la extracción del embrión inmaduro de trigo con dos semanas de desarrollo para, posteriormente, sembrarse en un medio de cultivo bajo condiciones *in vitro*. Esta técnica puede emplearse para levantar la dormancia en trigo y acelerar así, la obtención de líneas altamente endocriadas (Zheng *et al.*, 2013).

Zheng *et al.* (2013), publicaron un método de ARG donde controlaron el riego, la intensidad y duración de la luz, la temperatura y los nutrientes y, adicionalmente aplicaron el CE, permitiendo la producción de hasta ocho generaciones de trigo al año. El trigo se comporta como una planta de día largo (PDL) y es sensible a la temperatura en su desarrollo. Con la combinación de los factores iluminación, temperatura, densidad y nutrición se logra acelerar el crecimiento de las plantas, permitiendo llegar a antesis a las 4 semanas y a madurez a las 8 semanas (Hickey *et al.*, 2009; Sysoeva *et al.*, 2010).

Hickey *et al.* (2017), han empleado el método de “speed breeding” como una herramienta para acelerar el proceso de apilado de genes en los programas de mejoramiento y la detección de genes de resistencia a múltiples enfermedades en cebada. El avance rápido de las generaciones segregantes permite realizar entrecruzamientos entre distintos materiales con el fin de agregar o pilar genes. A su vez, el “speed breeding” puede combinarse con herramientas como la selección genómica (SG) mediante la cual se pueden realizar predicciones fenotípicas en base

al genotipo de los individuos, y con la selección asistida por marcadores (SAM), disminuyendo el tiempo requerido para la generación de una nueva variedad. En la SAM se identifican marcadores asociados a genes de interés pudiendo identificar cultivares en base a características genéticas (Lado, 2012).

1.2.2. Producción de líneas DHs

La población de plantas DHs puede generarse mediante una gran variedad de técnicas, en particular, las más utilizadas son las derivadas de la androgénesis in vitro (AIV). La androgénesis es el proceso celular en el cual las células gametofíticas o granos inmaduros de polen (microsporas) se convierten en células esporofíticas formando pseudoembriones (“ELS” por su sigla en inglés: “Embryo Like Structure”) bajo determinadas condiciones. Al manipular el entorno de las células gaméticas, es posible desviar el desarrollo para producir estos ELS en lugar de granos de polen maduros. La embriogénesis de microsporas tiene el potencial de generar varios cientos de plantas haploides a partir de una sola antera en el caso del cultivo de anteras (CA). La duplicación cromosómica inducida o espontánea de células embriogénicas haploides produce plantas dobles haploides (DHs). Estas son plantas completamente homocigotas, reproductores verdaderos y, por consiguiente, de gran importancia en genética y fitomejoramiento (Zheng, 2003; Cistué y Kasha, 2005; Guzy-Wróbelska *et al.*, 2007; Forster y Thomas, 2010; Lantos *et al.*, 2016; Patial *et al.*, 2017).

La producción de DH depende de diversos factores: el genotipo de las plantas donantes y sus condiciones de crecimiento (luz, fotoperiodo, temperatura y condiciones de nutrición), el desarrollo de las microsporas, los pretratamientos, la composición del medio de cultivo y los factores físicos durante la etapa de cultivo in vitro (Cistué y Kasha, 2005; Murovec y Bohanec, 2012). El punto crítico en la producción de DHs es el momento de la cosecha de las espigas. El mismo debe realizarse en el estado uninucleado tardío del crecimiento de las microsporas. La

aplicación de estrés o pretratamiento previo a la cosecha es determinante en el cambio de la vía de crecimiento de la célula de gametofítica a esporofítica (Zheng, 2003).

Algunos genotipos responden mejor que otros frente a los cambios en las condiciones de crecimiento (pretratamiento o estrés). Debido a esto, es muy importante generar un ambiente adecuado para el desarrollo de las microsporas a posteriori. Existen dos problemas en la producción de DHs: los genotipos recalcitrantes con problemas de embriogénesis, que generan un muy bajo número de plantas, y el albinismo, que genera plantas albinas debido a la ausencia de cloroplastos viables. La obtención de plantas albinas se debe tanto a factores genéticos como a factores ambientales (Liu *et al.*, 2002), pero principalmente se debe a las condiciones ambientales inadecuadas del crecimiento de las microsporas (Esteves *et al.*, 2014). Es posible que estos genotipos se vean fuertemente influenciados por la etapa de estrés y no sean eficientes en la asimilación de los nutrientes durante el desarrollo de las microsporas (Liu *et al.*, 2002).

El CA y el CMA (cultivo de microsporas aisladas) son técnicas de androgénesis *in vitro* (AIV) que permiten generar plantas DHs en menos de un año. En el CA se siembran las anteras en medios de cultivo a diferencia de la técnica de CMA, en la cual se siembran las microsporas directamente (Ferrie y Caswell, 2011). En los años 1970s se obtuvieron las primeras plantas DHs de trigo por CA (Zheng, 2003) y en 1993 por CMA (Due Tuveesson y Ohlund, 1993). Ambas técnicas han sido utilizadas en las últimas décadas masivamente en muchos programas de mejoramiento (Courtois, 1993) aunque todavía están limitadas a determinadas especies. Los protocolos de producción de DHs varían en la respuesta que se obtiene entre especies e incluso entre genotipos de la misma especie (Murovec y Bohanec, 2012).

El CA es el método de obtención de DHs más difundido en trigo, aunque existen dos puntos que destacan al CMA en relación con el CA. Estos dos aspectos son la mayor eficiencia en el tiempo empleado de cara a los resultados y la accesibilidad de las microsporas para obtener los nutrientes para su correcto desarrollo. Sin embargo, para aplicar la técnica CMA se requieren mayores conocimientos vinculados al desarrollo de las microsporas, así como también mayores habilidades técnicas que en el CA (Ferrie y Caswell, 2011).

La variación genética y las diferentes respuestas a los tratamientos de estrés, así como también la condición recalcitrante de algunos genotipos a la producción de DHs, hacen de la técnica una limitante para su utilización masiva en todos los programas de mejoramiento (Zheng, 2003). Por otro lado, la producción de DHs tiene la ventaja sobre los métodos convencionales de producción de líneas avanzadas endocriadas, de obtener plantas 100% homocigotas en una sola generación ahorrando tiempo sustancial en un programa de mejora. Incluso en las especies con incompatibilidad de autofecundación son la única técnica disponible para alcanzar la homocigosis (Murovec y Bohanec, 2012). Otras ventajas incluyen, el desarrollo de un gran número de líneas homocigotas, la posibilidad de obtener semillas para fines de producción en un período muy breve de tiempo, un análisis genético eficiente y el desarrollo de marcadores para características de selección (Forster y Thomas, 2010).

La obtención de plantas homocigotas en menos de un año ha resultado de gran utilidad en los distintos programas de mejoramiento de cultivos. Su incorporación no solo ha reducido los tiempos de obtención de nuevas generaciones sino también se han incluido en diversas áreas de investigación como la realización de mapas genéticos, descubrimiento de QTL y análisis de genes (Zheng, 2003; Cistué y Kasha, 2005; Guzy-Wróbelska *et al.*, 2007; Lantos *et al.*, 2016; Patial *et al.*, 2017).

1.3. MARCADORES MOLECULARES

La genómica se define como el estudio del genoma de un organismo y es el nuevo campo de análisis para mejorar el uso de los recursos genéticos de los cultivos, se aplica a la identificación de genes y marcadores moleculares (Dhanapal, 2012). El estudio de los marcadores moleculares se basa en el análisis de la variación genética entre los individuos y las poblaciones, detectando los polimorfismos en la secuencia de ADN (Scheben *et al.*, 2017, Uauy, 2017).

Desde el descubrimiento de los marcadores moleculares en 1980, se han desarrollado una amplia variedad de estos. Se utilizan para el desarrollo de mapas moleculares, genéticos y físicos con el fin de identificar los genes y/o los rasgos de control de caracteres cuantitativos (QTL) de importancia económica (Dhanapal, 2012). La selección indirecta de QTL a través de los marcadores moleculares es utilizada ampliamente debido a que los marcadores moleculares no se influyen por el medio ambiente y se pueden calificar en todas las etapas del crecimiento de la planta (Gupta *et al.*, 1999).

Con la aparición de nuevas técnicas moleculares denominadas próxima generación de secuenciación (NGS por su sigla en inglés: "Next Generation Sequencing") se ha revolucionado la genómica. El desarrollo de estas nuevas tecnologías ha permitido la secuenciación masiva de ADN a un costo accesible, dando origen a diversos análisis entre el genotipo y el fenotipo contribuyendo así a la caracterización genética de las plantas (Barabaschi *et al.*, 2016).

Existen varios enfoques dentro de las NGS que permiten descubrir, secuenciar y validar miles de marcadores moleculares en cualquier genotipo de interés (Davey *et al.*, 2011). Previo a la aparición de estas nuevas técnicas los marcadores moleculares ya brindaban un gran aporte a los programas de mejora. Actualmente se

pueden obtener miles de marcadores en forma más rápida y a un menor costo (Barabaschi *et al.*, 2016).

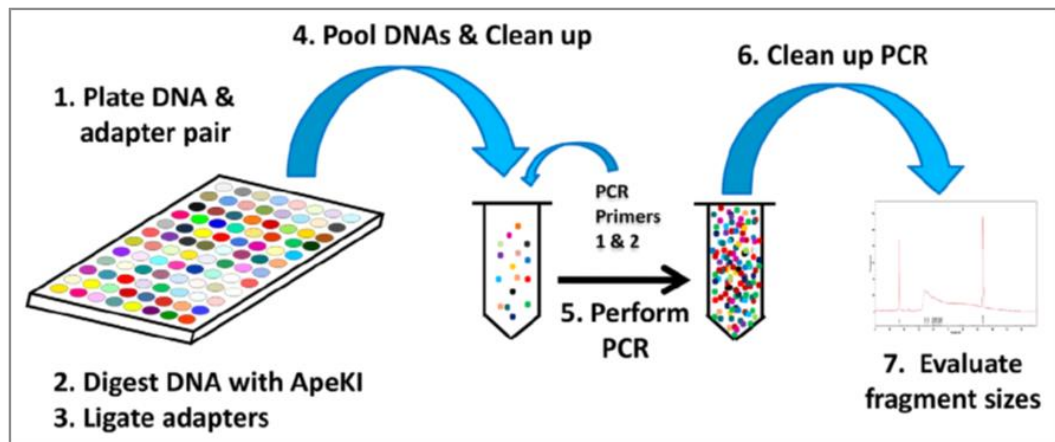
Actualmente el tipo de marcador más utilizado son los SNPs (“Single-Nucleotide-Polymorphisms”), debido a que, son bialélicos adquiriendo dos formas posibles, su evaluación es sencilla, su abundancia en los genomas y a la mayor resolución de los mapas creados en comparación con otros tipos de marcadores (Mammadov *et al.*, 2012). Son polimorfismos de una base en la secuencia de ADN, siendo una de sus grandes ventajas la detección de los “marcadores perfectos” los cuales están ubicados en el gen de interés. Los SNPs son utilizados, entre otras aplicaciones, para mapeo de ligamiento, el análisis de rasgos cuantitativos (QTL), el estudio de asociación (GWAS), la selección asistida por marcadores (MAS) y la selección genómica (GS) en los diferentes cultivos (Scheben *et al.*, 2017).

1.4. GENOTIPADO POR SECUENCIACIÓN (GBS)

El GBS fue diseñado como un método simple y económico para detectar SNPs. Identifica un amplio número de marcadores en una población siendo aplicable a diferentes cultivos (Poland *et al.*, 2012; Alipour *et al.*, 2017). Además, se destaca por su simplicidad en la preparación de las librerías y por requerir una baja concentración de ADN de las muestras (Torkamaneh *et al.*, 2017).

El método consiste en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción específicas que permiten eliminar los segmentos repetitivos del genoma y destacar aquellos de baja frecuencia de repetición reduciendo la complejidad del genoma. Posteriormente, ocurre la ligación de los segmentos a los adaptadores, su amplificación por PCR y la secuenciación del ADN (Figura 1) (Elshire *et al.*, 2011; Poland *et al.*, 2012; Sonah *et al.*, 2013; Scheben *et al.*, 2017).

Figura 1: Pasos en la construcción de las librerías GBS



Fuente: Elshire *et al.*, 2011

Las nuevas herramientas de NGS, como el GBS, proporcionan una enorme cantidad de información genética. En la actualidad el análisis de esta cantidad de información es uno de los cuellos de botella en la genética molecular. Para esto, se han desarrollado algoritmos computacionales que permiten identificar a los verdaderos SNPs, diferenciando entre la verdadera variación biológica y los errores computacionales (Lai *et al.*, 2012; Mammadov *et al.*, 2012).

Estos programas informáticos llamados pipelines permiten analizar las secuencias de ADN y están constituidas por distintos programas informáticos que analizan la información en fases secuenciales. Primero, se realiza el ingreso de las secuencias en bruto, luego la organización de las lecturas, la detección de secuencias de baja calidad, el ensamblaje o alineamiento de reads, identificación de loci polimórficos y finalmente, se detectan los marcadores verdaderos para cada loci. Una de las pipelines utilizadas para la organización y comprensión de la información genética brindada por GBS es la FastGBS pipeline. Esta hace uso de un grupo de programas informáticos (Sabre, Cutadapt, BWA, SAMtools y Platypus) que dan origen a los diferentes archivos en cadena analizando la información mediante el uso de un genoma de referencia (Torkamaneh *et al.*, 2017).

El GBS además de ser una herramienta de genotipado brinda la información descriptiva de las distintas líneas que integran una población de estudio como, por ejemplo, su nivel de heterocigosis. Con el número de SNPs verdaderos para cada una de ellas se pueden realizar diversos estudios como, la construcción de mapas genéticos (distancia entre marcadores según frecuencia de recombinación, marcadores con distorsión de segregación).

1.5. MAPA GENÉTICO

Los mapas genéticos permiten comprender la estructura y organización de los genomas, a partir de los cuales se pueden deducir los patrones de evolución y las relaciones sintéticas entre las especies. Estos, proporcionan un marco para el mapeo de genes de interés, brindan la información para determinar asociaciones genotipo-fenotipo y, son la base para la manipulación de genes, tecnología destacada para la producción de los mejores recombinantes (Forster y Thomas, 2010).

El estudio de los mapas genéticos, que se basa, en el concepto de la recombinación genética durante la meiosis y requiere del análisis del mapa de ligamiento, es una herramienta indispensable para cualquier programa de mejoramiento genético (Mammadov *et al.*, 2012). La distancia entre SNPs en centimorgan (cM) es una medida de la frecuencia de recombinación genética observada entre dos marcadores genéticos de un cromosoma, cuanto mayor es la distancia entre dos marcadores hay mayor frecuencia de recombinación (Wingen *et al.*, 2017).

La creación de un mapa genético es de gran utilidad para el estudio del potencial genético de las plantas. En muchas especies se han creado mapas genéticos y han sido utilizados en análisis de QTLs, identificación de genes, organización del genoma y estudios evolutivos. El desarrollo de un mapa genético es el primer paso

para identificar los factores que controlan la expresión de las características económicamente importantes en el cultivo de trigo (Blanco *et al.*, 1998).

1.6. DISTORSIÓN DE SEGREGACIÓN

La distorsión de segregación (DS) se define como la desviación de la segregación mendeliana esperada para un gen o marcador, donde uno de los alelos se hereda con mayor frecuencia que el otro. Las frecuencias alélicas de cada marcador en una población de estudio generadas mediante la técnica de GBS, permite estudiar el fenómeno de DS (Bélanger *et al.*, 2016). Este fenómeno y sus causas aún no se han comprendido por completo, un solo mecanismo o una combinación de éstos puede ser responsable de la DS (Baloch *et al.*, 2016).

La DS se ha reportado en diferentes especies, tanto en poblaciones naturales como en poblaciones obtenidas por: haploides duplicados (Adamski *et al.*, 2014), DSU o por el método convencional (Wingen *et al.*, 2017). Se observa con mayor frecuencia en especies poliploides como poblaciones de trigo tetraploide y hexaploide (Baloch *et al.*, 2016). Las poblaciones de RIL tienen el mayor potencial de presentar DS como consecuencia de las fuerzas de selección durante muchas generaciones (Singh *et al.*, 2007).

La DS puede ocasionar la pérdida de genes de interés o la modificación de las características agronómicas deseadas. Además, cuando los marcadores con DS se incluyen en los análisis pueden generar errores en la creación de los mapas de QTLs. En consecuencia, en un programa de mejoramiento genético, es un punto importante para analizar (Adamski *et al.*, 2014). En la construcción de los mapas este fenómeno afecta la estimación de las frecuencias de recombinación y la formación de los grupos de ligamiento (Baloch *et al.*, 2016). Los loci en DS se identifican como LDS y éstos, tienden a agruparse en segmentos de DS (SDS) en el genoma (Wingen *et al.*, 2017).

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. Objetivo general

Caracterizar genéticamente mediante GBS 6 poblaciones de trigo del programa de mejoramiento genético de INIA, derivadas de tres cruzamientos y dos tecnologías: I) ARG+CE+DSU y II) AIV mediante CA/CMA.

1.7.2. Objetivos específicos

- Adecuar y protocolizar el método ARG para producir al menos 5 generaciones de endocría en 1 año generando las poblaciones F6 (derivadas de F1s biparentales).
- Obtener las poblaciones de trigo DHs por CA/CMA (derivadas de F1s) en un plazo menor a 1 año.
- Caracterizar las poblaciones DHs y F6 en base a los marcadores moleculares (SNPs) obtenidos por GBS.
- Comparar ambos métodos ARG+CE+DSU y AIV en base a las características genéticas heterocigosis residual, mapa genético y distorsión de segregación, de los productos obtenidos con cada uno de ellos.

1.8. HIPÓTESIS

Los métodos ARG+CE+DSU y CA/CMA, aplicados para asistir a los programas de mejoramiento de trigo, presentan diferencias en la estructura genética de los productos obtenidos, poblaciones F6 y poblaciones de plantas DHs.

2. ANÁLISIS GENÓMICO DE LINEAS ALTAMENTE ENDOCRIADAS DE TRIGO OBTENIDAS POR ANDROGÉNESIS IN VITRO Y AVANCE RÁPIDO DE GENERACIONES

GENOMIC ANALYSIS OF RECOMBINANT INBRED LINES OF WHEAT OBTAINED BY ANDROGENESIS AND RAPID GENERATION ADVANCEMENT

Mastropiero MM.¹, Quincke M.^{3*}, Castillo A.¹, Dalla Rizza M.¹, Esteves P.², Hernández L.³, Belzile F.²

¹Estación Experimental INIA-Las Brujas, Ruta 48 Km 10. Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay

²Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, 2425 rue de l'Agriculture, Québec, Canada

³Estación Experimental INIA-La Estanzuela, Ruta 50, Km 11 Colonia, Uruguay

2.1. ABSTRACT

A conventional breeding program of wheat needs many years to develop a new cultivar. Tools like rapid generation advancement (RGA) and doubled haploid plants (DHs) production allow a considerable reduction of the time required. The RGA combined with in vitro embryo culture (CE) and single seed descent (SSD) allowed to get five generations of wheat in one year, from F1 to F6. On the other hand, using in vitro androgenesis, it was possible to get DHs in less than one year. The hypothesis of this research proposed that DHs and F6 populations have different genetics characteristics. The objective was to characterize RILs populations (DHs and F6) SNPs detected by GBS. The number of SNPs was similar between populations but the number of BIN-SNPs (informative markers, no redundant) was twice as big for the F6 population. The genetic map was similar between populations (2800 cM) with a better coverage in the F6. In addition, residual heterozygosis and segregation distortion presented a larger percentage for F6 than DH with $p < 0,05$.

Key words: wheat, rapid generation advancement, double haploid, GBS, SNPs.

2.2. RESUMEN

En un programa de mejoramiento genético convencional de trigo desarrollar nuevos cultivares puede llevar muchos años. Las herramientas tecnológicas como el avance rápido de generaciones (ARG) y la producción de plantas dobles haploides (DHs) permiten reducir notoriamente estos tiempos. En esta investigación se combinó el ARG con el cultivo in vitro de embriones (CE) inmaduros y el método de descendencia de semilla única (DSU o “Single-Seed-Descent”, SSD) logrando avanzar 5 generaciones de trigo en 1 año, de F1 a F6. Por otro lado, mediante técnicas de androgénesis in vitro (AIV) en menos de 1 año se obtuvieron líneas DHs. Se planteó la hipótesis de que las poblaciones DHs y F6 presentarían diferencias en su caracterización genética. El objetivo fue desarrollar y caracterizar líneas altamente endocriadas (LAEs), obtenidas por ARG y por AIV, utilizando marcadores moleculares SNPs detectados a través de genotipado por secuenciación (GBS). El número de SNPs que se obtuvo en poblaciones F6 y DHs fue similar, pero, el número de BIN-SNPs (marcadores informativos, no-redundantes) fue dos veces mayor para las primeras. El mapa genético fue similar en cuanto a largo de genoma (2800 cM), sin embargo, las F6 tuvieron mayor cobertura. Asimismo, se midió mayor porcentaje de heterocigosis residual y loci en distorsión de segregación en las poblaciones F6 que en las poblaciones DHs ($p < 0,05$).

Palabras claves: trigo, avance rápido de generaciones, dobles haploides, GBS, SNPs.

2.3. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cultivos más extensamente sembrado en el mundo. Su gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes y la gran variedad de productos que se obtienen a partir de su grano han llevado a su gran expansión (Shewry, 2009).

En los programas de mejoramiento genético de trigo la producción de líneas homocigotas mediante el método convencional es la etapa más extensa. Esta etapa

que lleva a la estabilización y homogeneización de los genes recombinados y que se realiza mediante autofecundaciones sucesivas lleva de 5 a 6 generaciones. Reducir el tiempo para desarrollar nuevos cultivares es uno de los temas que preocupan a nivel de mejoramiento genético (Forster *et al.*, 2014). Las herramientas tecnológicas como el avance rápido de generaciones (ARG) combinado con el cultivo de embriones (CE) y la descendencia de semilla única (DSU) denominado ARG+CE+DSU, y la producción de plantas dobles haploides (DHs) permiten acortar el plazo para obtener líneas altamente endocriadas (LAEs) (Esteves *et al.*, 2017).

El ARG es una herramienta tecnológica que permite acortar los tiempos de desarrollo de un nuevo cultivar, sometiendo a las plantas a condiciones de crecimiento controladas bajo fotoperiodos extendidos y regímenes de alta temperatura, en cámaras de crecimiento o invernáculos (Li *et al.*, 2018). Acelerando el crecimiento de las plantas se logran hasta 8 generaciones en trigo y 9 generaciones en cebada (Zheng *et al.*, 2013) en lugar de 2 a 3 generaciones en invernáculo en un año. El ARG se puede complementar con la descendencia de semilla única (DSU) cosechando una semilla por planta y, con la técnica cultivo de embriones (CE) cosechando el grano inmaduro (Mastropierro *et al.*, 2018), aumentando así la eficiencia del método. Con la DSU en cada generación de trigo se cosecha una sola semilla por planta a partir de la F2 y hasta lograr una generación con elevado porcentaje de homocigosis (por ejemplo, F6) (Forster *et al.*, 2014).

Esta tecnología se puede complementar con otras herramientas tales como la selección por marcadores moleculares, la selección genómica o la edición genómica. A su vez, su implementación en el método convencional permite acelerar la obtención de nuevos cultivares (Watson *et al.*, 2018).

La producción de DHs permite obtener una línea estable genéticamente en menos de un año (Patial *et al.*, 2017). Las técnicas como el cultivo de anteras (CA) y

el cultivo de microsporas aisladas (CMA) permiten desarrollar poblaciones de plantas DHs o líneas recombinantes 100% homocigotas en un período de 8 a 9 meses (Lantos *et al.*, 2016).

La genética moderna se basa en el estudio de los marcadores moleculares. El análisis de la variación genética entre individuos y poblaciones permite identificar genotipos y conectarlos a fenotipos. Actualmente el tipo de marcador más utilizado son los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) debido a su abundancia en los genomas y a la mayor resolución de los mapas creados en comparación con otros tipos de marcadores (Mammadov *et al.*, 2012). Los SNPs son polimorfismos de una base en la secuencia de ADN, siendo una de sus grandes ventajas la detección de los “marcadores perfectos” los cuales están ubicados en el gen de interés. Los SNPs son utilizados, entre otras aplicaciones, para mapeo de ligamiento, el análisis de rasgos cuantitativos (QTL), el estudio de asociación (GWAS), la selección asistida por marcadores (MAS) y la selección genómica (GS) en los diferentes cultivos (Scheben *et al.*, 2017).

El GBS (Genotipado por Secuenciación) es una herramienta de NGS (“NGS” por su sigla en inglés: “Next Generation Sequencing”) que resulta muy atractiva debido a su simplicidad, eficiencia y bajo costo (Torkamaneh *et al.*, 2017) e identifica un amplio número de marcadores SNPs en una población, siendo aplicable a diferentes cultivos (Poland *et al.*, 2012; Alipour *et al.*, 2017). La información genética que se obtiene a través de las nuevas herramientas de secuenciación NGS han permitido investigar aún más la organización y evolución de los genomas en las distintas especies (Barabaschi *et al.*, 2016).

El GBS consiste en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción específicas, que permiten eliminar segmentos repetitivos del genoma y destacar aquellos de baja frecuencia, reduciendo así la complejidad del genoma.

Posteriormente, se realiza la ligación de los segmentos a adaptadores, su amplificación por PCR y finalmente la secuenciación del ADN (Elshire *et al.*, 2011; Scheben *et al.*, 2017).

El objetivo de esta investigación fue desarrollar, caracterizar y comparar poblaciones DHs y F6 del programa de mejoramiento genético de trigo de INIA (PMGT) obtenidas por dos herramientas (CA/CMA y ARG, respectivamente) que permiten la rápida obtención de líneas altamente endocriadas en base a marcadores moleculares (SNPs) generados por GBS.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material vegetal

2.4.1.1. Obtención de las poblaciones de plantas DHs

Las poblaciones de trigo utilizadas en la investigación fueron parte del Programa de Mejoramiento genético de trigo (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA, Uruguay). Se eligieron tres cruzamientos resultantes de líneas puras elite del programa: INIA466 (LE2430xGénesis2375), INIA501(LE2433xFuste) e INIA553 (LE2438xKlein Nutria).

Se sembraron 5 semillas F1 correspondiente a cada uno de los cruzamientos y se crearon las poblaciones DHs por CA y CMA según el protocolo de Marchand *et al.* (2008). La producción de DHs se realizó en la Universidad Laval de Quebec, Canadá.

2.4.1.2. Obtención de las poblaciones de líneas F6

Para la obtención de las poblaciones F6 por ARG+CE+DSU se utilizaron los mismos cruzamientos que en las DHs (INIA466, INIA501 e INIA553). Se cultivaron 5 semillas F1 correspondiente a cada cruzamiento en cámara de cultivo con una intensidad lumínica de 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$. La temperatura fue de 28 °C durante el día

y 20°C en la noche y la dosis de fertilizante fue de 1 gramo por litro de agua de triple 20 (20:20:20 NPK) aplicado junto al riego 3 veces por semana. Una vez en el estado óptimo de cosecha, se aplicó la técnica de cosecha masal por cada cruzamiento.

Posteriormente, se sembraron 150 plantas F2 para cada cruzamiento en almacigueras de 72 plantas cada una, usando sustrato promix, bajo condiciones controladas en invernáculo y cámara de cultivo. La temperatura osciló entre 20 y 28 grados °C (noche-día) con un fotoperiodo de 24 horas luz (tubos fluorescentes “Cool white” (430 nm) y bulbos incandescentes con filamentos de tungsteno (670 nm)) y una humedad del 80%. La dosis de fertilizante fue de 1 gramo por litro de triple 20 (20:20:20 NPK) aplicado 3 veces por semana desde la siembra a post-floración.

A partir de la generación F2 se cosechó un grano de cada planta en estado lechoso – pastoso de acuerdo con la técnica DSU, y se realizó el CE en condiciones in vitro. Los embriones fueron sembrados en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) y se mantuvieron en cámaras a 24°C e iluminación provista por tubos fluorescentes “Cool White” a una intensidad de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{seg}$. En estas condiciones, luego de 7 a 8 días los embriones dieron origen a plántulas que estaban aptas para trasplantarse en almacigueras. Para cada una de las generaciones desde F2 a F6 se realizó el mismo procedimiento.

2.4.2. Extracción de ADN

Primeramente, se obtuvieron 20 mg de peso verde de muestra de hoja de cada planta albina y verde DH y de las plantas F6. Posteriormente, se realizó la extracción de ADN utilizando DNeasy Plant Kit (Qiagen Sciences, Germantown, MD).

Una vez, finalizadas las extracciones se realizaron los correspondientes análisis de calidad del ADN mediante electroforesis, y se midió la concentración mediante absorbancia utilizando la herramienta “Spark” de Teacan Group. Una

concentración de 20 ng/μl por muestra fue usado para preparar los platos de GBS (96 muestras/plato).

2.4.3. Secuenciación y obtención de SNPs

Se realizó la secuenciación de las muestras de ADN mediante la técnica GBS utilizando el genoma de referencia del trigo de la variedad “Chinese Spring” en la plataforma de análisis genómico (IBIS, Universidad Laval), las librerías fueron creadas según Elshire *et al.* (2011). Posteriormente, el grupo de marcadores que se obtuvo, se filtró y se analizó en la FastGBS pipeline (Torkamaneh *et al.*, 2017). Se eliminaron aquellos SNPs con información faltante mayor al 80%, y un MAF (frecuencia del alelo menor) < 0,05, creando así, un grupo de SNPs representativos de cada población DHS y F6.

Una vez filtrados los datos en la pipeline se estimaron las frecuencias alélicas para cada marcador en la población y se determinó su significancia estadística por prueba de chi-cuadrado. Se analizaron aquellos grupos de SNPs que diferían de la segregación mendeliana 1:1. Los marcadores con frecuencias alélicas para ambos alelos mayores a 0,60 y menores a 0,40 ($p < 0,05$), se reportaron como loci en distorsión de segregación (LDS). A los LDS que se agruparon formando la denominada “burbuja” en la gráfica de distribución de sus frecuencias alélicas en el cromosoma se les llamó segmentos en distorsión de segregación (SDS).

2.4.4. Utilización del Software QTL IciMapping

Se utilizó el software QTL IciMapping (Meng *et al.*, 2015) para aplicar la función BIN con la finalidad de eliminar los marcadores redundantes y la función MAP para la realización de los mapas genéticos de las distintas poblaciones.

Los marcadores redundantes están fuertemente ligados segregando juntos en una población genética (región del cromosoma llamada BIN) y consecuentemente,

no aportan información relevante en un estudio genético. En un análisis de ligamiento la frecuencia de recombinación entre ellos es cero. Mediante la función BIN se detectaron estas regiones a lo largo del genoma (BIN) para integrar el mapa genético.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Marcadores moleculares

Los tres genotipos de la investigación (INIA466, INIA501, INIA553) se crearon a partir del cruzamiento entre dos líneas puras diferentes, resultando en plantas F1 para el inicio del estudio. Si bien, en la investigación se analizan genotipos diferentes, a los objetivos de este trabajo la información de pedigree no es relevante.

El cruzamiento INIA466 quedó constituido por 91 líneas DHs (33 plantas verdes y 58 plantas albinas) y 55 líneas F6; y el cruzamiento INIA553 por 92 líneas DHs (37 plantas verdes y 55 albinas) y 47 líneas F6. El tercer cruzamiento (INIA501) en cambio, se presentó como recalcitrante a la embriogénesis in vitro y dio lugar a un muy bajo número de líneas DHs. Consecuentemente, este cruzamiento se eliminó de la investigación.

Cada una de las poblaciones se caracterizó mediante el estudio de los grupos de SNPs generados a partir de la FastGBS pipeline. Para el cruzamiento INIA466 el número de marcadores fue de 15949 y 16580 para las poblaciones DHs y F6, respectivamente. En este cruzamiento, DHs y F6 compartieron los mismos parentales recibiendo así la misma información genética, del total de SNPs casi el 100% (15246) resultó común a ambas poblaciones. En el cruzamiento INIA553, se obtuvieron 13702 y 12192 SNPs para las poblaciones DHs y F6, respectivamente. A diferencia del cruzamiento anterior las DHs y F6 presentaban un parental en común, por lo tanto, solo 5429 SNPs (casi el 50% de SNPs) resultaron comunes para ambas poblaciones.

Se detectó un número de BIN diferente en las poblaciones DHs que las poblaciones F6 para ambos genotipos. En el cruzamiento INIA466 el número de marcadores BIN fue 2 veces mayor para la población F6 (DHs: 1089 y F6: 2383), ocurriendo una tendencia similar en el cruzamiento INIA553 (DHs: 1009 y F6: 2110).

2.5.2. Mapas genéticos

Para cada población se crearon los respectivos mapas genéticos en base a sus marcadores BIN. En el cruzamiento INIA 466, en la población DHs se creó el mapa genético en base a 1089 BIN y, para la población F6, en base a 2383 BINs. En el cruzamiento INIA553, se creó el mapa genético de la población DHs en base a 1009 BIN y para la población F6 en base a 2110 BINs. Tanto en el cruzamiento INIA466 como el INIA553 el número de líneas F6 fue 50% menor que el número de líneas DHs.

En el cruzamiento INIA466 el largo del mapa fue similar para ambas poblaciones (DHs: 2862 cM y F6: 2876 cM), destacándose en el genoma A y B mayor largo que en el genoma D. En el cruzamiento INIA553 ocurrió la misma tendencia que en el cruzamiento INIA466. El largo del mapa genético fue similar para ambas poblaciones (DHs: 2431 cM y F6: 2525 cM), destacándose en el genoma A y B mayor largo que en el genoma D (Cuadro 1).

Cuadro 1: Largo del mapa genético en cM según población

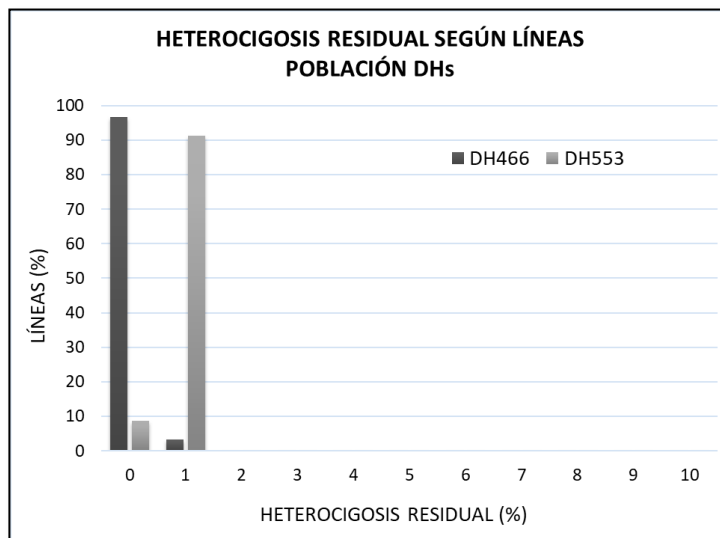
POBLACIÓN	DH466			ARG466			DH553			ARG553		
GENOMA (cM)	2862			2876			2431			2525		
	A 1258	B 1066	D 538	A 1262	B 1122	D 492	A 1077	B 1020	D 334	A 1091	B 1134	D 299

En las poblaciones F6 de ambos cruzamientos la cobertura promedio o densidad de marcadores/cM fue de un locus cada 1 cM, mientras que para las DHs fue de un locus cada 3 cM. Los grupos de ligamiento promedio por cromosoma fueron mayores en las poblaciones F6 que en las DHs para ambos cruzamientos (DHs: 2, F6: 3) (anexo 1).

2.5.3. Heterocigosis residual

Los porcentajes de heterocigosis residual en cada individuo de las poblaciones F6 variaron desde 1 a 9%, por el contrario, en las DHs los valores registrados fueron de 0 y 1%. Esta diferencia se confirmó en ambos cruzamientos. En la figura 2 se observan los resultados obtenidos.

a)



b)

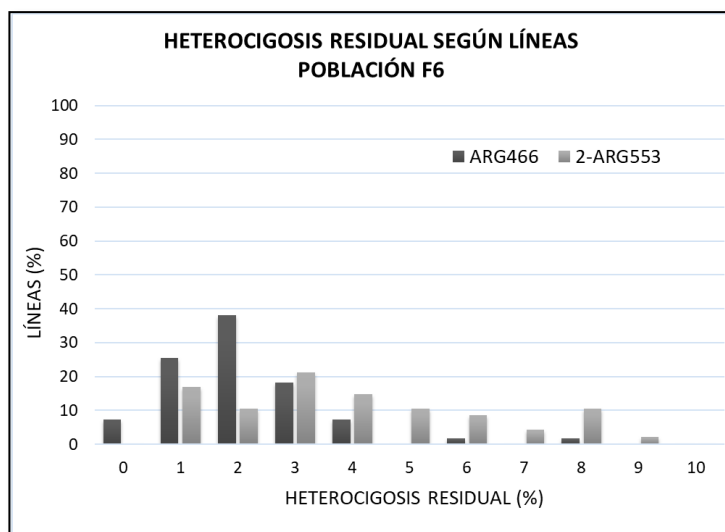


Figura 2: Heterocigosis residual según el porcentaje de líneas por población (a) dobles haploides (DH) y (b) líneas F6

2.5.4. Distorsión en la segregación

Se observó un mayor porcentaje de LDS en las poblaciones F6 en comparación con las DHs del mismo cruzamiento. En el cruzamiento INIA466 los valores de LDS para las poblaciones F6 y DH fue de 14% y 11% respectivamente; y en el INIA553 fue de 8% para las poblaciones F6 y de 6% para las poblaciones DH con un $p < 0,05$. A su vez, se describió un mayor número de SDS para las poblaciones F6 que las poblaciones DHs para ambos cruzamientos.

En los cuadros 2 y 3, se presentan los resultados de los SDS encontrados para ambos cruzamientos, describiendo el largo de cada segmento en cM, su ubicación en el genoma y el alelo heredado en mayor frecuencia.

Cuadro 2: Segmentos en distorsión de segregación en las poblaciones DH y ARG INIA466.

CROMOSOMA	POBLACIÓN DH 466		POBLACIÓN ARG 466	
	Posición (cM)	Parental Predominante	Posición (cM)	Parental Predominante
1B	0-90	G2375	0-54	G2375
2A			35-110	LE2430
2B			70-108	G2375
2D	113-177	G2375	0-20	G2375
3B	12-59/82-131	LE2430	10-25/70-95	G2375
3D			. 0-15	G2375
4A			5-28/170-220	G2375/LE2430
4B			75-108	LE2430
6B			0-28	G2375
7B	10-74/106-138	G2375/LE2430	0-22/135-165	LE2430

Cuadro 3: Segmentos en distorsión de segregación en las poblaciones DH y ARG INIA553

CROMOSOMA	POBLACIÓN DH 553		POBLACIÓN ARG 553	
	Posición (cM)	Parental predominante	Posición (cM)	Parental predominante
1B	0-90	Nutria		
1D			0-13	LE2438
2A	20-64	LE2438		
2B			20-30/45-50	LE2438
2D			0-22	LE2438
4A	92-105	Nutria		
4B			115-125	Nn
5A			75-130 / 185-215	Nn/LE2438
6A			55-75/192-230	LE2438/Nn
6B			0-40	LE2438
7A	70-110	LE2438		

En ambos cuadros se describen los distintos SDS reportados en cada cromosoma para cada población, coincidiendo en algunos casos el mismo segmento en poblaciones DHs y F6. Aunque, si analizamos la ubicación de estos segmentos en el genoma y el alelo heredado en mayor frecuencia, no se encontró un patrón que diferencie las poblaciones DHs de las F6.

2.6. DISCUSIÓN

2.6.1. Marcadores moleculares: comparación entre poblaciones DHs y F6

Las poblaciones de líneas altamente endocriadas (DHs, F6, F8) de trigo y de cebada obtenidas por CA, DSU o pedigree, se han comparado en distintas investigaciones mediante características productivas como rendimiento, demostrando la utilidad de estas poblaciones en los programas de mejoramiento genético (Park *et al.*, 1976; Baenziger *et al.*, 1989). Actualmente, con la genética

moderna basada en el estudio de marcadores moleculares como los SNPs identificados por GBS se puede estudiar, además del fenotipo de un cultivar su genotipo (Scheben *et al.*, 2017). Los SNPs son la unidad más pequeña de variación genética y la base de la mayoría de las modificaciones genéticas entre individuos, resultando de gran interés para los programas de mejoramiento genético (Ganal y Roder, 2007).

En esta investigación se reportaron valores de 15949, 16580, 13702 y 12192 SNPs para las poblaciones DH466, ARG466, DH553 y ARG553, respectivamente, dato que concuerda con otras investigaciones. Riaz *et al.* (2016), describieron un número similar de SNPs detectados por GBS, en una colección de 295 líneas de trigo de distintos orígenes. A su vez, Alipour *et al.* (2017) en una colección de 369 genotipos de trigo hexaploides iraníes reportaron 16506 SNPs. En la investigación de Allen *et al.* (2017), se crearon mapas genéticos para cinco poblaciones de trigo hexaploide en base a 9000 SNPs detectados para cada una de ellas, y un mapa consenso con 22001 SNPs.

El número de SNPs de las poblaciones DHs y F6 del cruzamiento INIA466 fue similar, compartiendo casi el 100% de sus marcadores moleculares, como consecuencia de la idéntica información genética heredada. Por el contrario, las poblaciones DHs y F6 se diferenciaron en el número de marcadores con información relevante (BIN), donde las F6 presentaron el doble de éstos. En el método ARG para obtener LAEs (F6) con alto porcentaje de homocigosis se dan 5 meiosis desde la generación F1 a la F6. Al comparar las poblaciones F6 con las DHs, se dieron cinco eventos de recombinación genética en relación a una sola meiosis en las DHs. Eso explica la diferencia por la cual se generó un mayor número de marcadores moleculares informativos en las poblaciones F6 que en las DHs.

En el cruzamiento INIA 553 el número de SNPs fue similar para poblaciones DHs y F6. A diferencia del cruzamiento anterior, ambas poblaciones compartieron el 45% de sus SNPs ya que poseen un solo parental en común. En este cruzamiento también se reportó un número dos veces mayor de BINs en las poblaciones F6 que en las DHs.

2.6.2. Mapas genéticos

Los mapas genéticos son una representación de las distancias relativas entre marcadores moleculares a lo largo del cromosoma determinado por su frecuencia de recombinación (Scheben *et al.*, 2017). Para poder entender la evolución del genoma de trigo y sus distintos ensamblajes la realización de un mapa genético es una herramienta muy valiosa. El trigo se caracteriza por tener el genoma más grande (16GB) y complejo dentro del grupo de los cereales, siendo muy dificultoso su análisis genético. Está constituido por tres genomas (AABBDD), 21 grupos de ligamientos y un alto porcentaje de su genoma consta de regiones repetidas (Lai *et al.*, 2012). La creación de mapas de ligamiento densamente cubierto por marcadores moleculares brinda la posibilidad de caracterizar los genes asociados a marcadores (William *et al.*, 2007).

Los mapas genéticos de las cuatro poblaciones presentaron un largo de mapa similar. Para INIA466 los mapas tuvieron una extensión total de 2862 cM y 2874 cM, para DHs y F6 respectivamente, y para INIA553 se encontró una extensión de 2431 cM y 2525 cM, para DHs y F6 respectivamente. Estos valores coincidieron con otros trabajos, como, por ejemplo: Somers *et al.* (2004), que en su estudio con microsatélites (SSRs) obtuvieron un tamaño de mapa para RILs (F6) de trigo de 2332 cM, y para distintas poblaciones DHs valores algo menores (2211 cM, 2166 cM y 1836 cM). Allen *et al* (2011) en una población de líneas DHs de trigo describieron un tamaño de 2999 cM en base a marcadores SNPs.

Al comparar los tres genomas A, B y D se determinó un mayor tamaño y número de marcadores en los genomas A y B para todas las poblaciones en estudio. El menor número de marcadores en el genoma D se explica por su menor diversidad genética, resultado de su menor tiempo desde hibridación en relación con los genomas A y B (Chao *et al.*, 2009; Allen *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 2014; Riaz *et al.*, 2016).

Las poblaciones DHs y F6 de ambos cruzamientos se diferenciaron en la cobertura del genoma. Al comparar las relaciones de tamaño de mapa/número de marcadores para DHs vs F6, éstas últimas, tuvieron mayor cobertura (1 locus cada 1 cM) que las primeras (1 locus cada 3 cM). Para poblaciones DHs, Allen *et al.* (2011) reportaron una cobertura de 2,8 cM por locus con un tamaño de mapa de 2.999 cM.

2.6.3. Heterocigosis residual

En la literatura, las plantas DHs se describen como 100% homocigotas, uniformes y se pueden obtener en menos de 1 año. Por el contrario, las líneas F6 o F7 generadas por métodos convencionales presentan aún algo de heterocigosis residual y demandan de mayor tiempo para llegar al 100% de homocigosis (Cistué y Kasha, 2005; Patial *et al.*, 2017). Con el ARG se puede avanzar a líneas F6 o F7 en un plazo de menos de un año al controlar los regímenes de agua, intensidad y duración de la luz, temperatura y calidad del sustrato (Zheng *et al.*, 2013).

Los resultados de heterocigosis residual obtenidos en poblaciones DHs y F6 en ambos cruzamientos concuerdan con los datos de la bibliografía, valores del 0% para las DHs y de 1 a 9% para las F6. En el cruzamiento INIA 553 un alto porcentaje de las líneas DHs presentó un 1% de heterocigosis residual, esto está explicado por la utilización de la técnica GBS. En los cultivos poliploides como el trigo, a menudo se encuentran loci que son polimórficos dentro de un solo genotipo debido a la presencia de regiones duplicadas del genoma (Mammadov *et al.*, 2012). La estructura

genética del trigo con sus tres genomas y genes repetidos con alelos diferentes, pueden dar lugar a porcentajes de heterocigosis residual de hasta un 1% mediante esta tecnología de secuenciación.

2.6.4. Distorsión en la segregación

Los SDS pueden estudiarse mediante la DS de marcadores moleculares (Li *et al.*, 2015). Las poblaciones DHs y F6 de ambos cruzamientos presentaron SDS en diferentes cromosomas de sus genomas A, B y D. El mayor % LDS y número de SDS se registró en las poblaciones F6.

Li *et al.* (2015), utilizaron 2 poblaciones de RILs de trigo (127 F8 y 146 F6) obtenidas por DSU para estudiar la DS y crear mapas genéticos. Estos autores reportaron un 18% y 10,4% de LDS para sus poblaciones F8 y F6, respectivamente, agrupados en segmentos a lo largo de todo el genoma y similar a lo descrito en este trabajo. La diferencia entre poblaciones F8 y F6 indica una posible asociación entre el incremento en los ciclos de autofecundación y el % de LDS, dos ciclos más de autofecundación podrían influir en el incremento del %LDS.

Los resultados obtenidos en este trabajo describen SDS en la mayoría de los cromosomas coincidiendo con lo reportado por Li *et al.* (2015) y Nachit *et al.* (2001). Los investigadores Nachit *et al.* (2001) en el estudio de 110 RILs de *Triticum turgidum* L. var. *durum* obtenidas por DSU describieron un 12,1% de LDS y segmentos en la mayoría de sus cromosomas.

En las poblaciones DHs también se han reportado SDS como, por ejemplo: en cebada (Devaux y Zivy, 1994; Wang *et al.*, 1995; Bélanger *et al.*, 2016) y trigo (Guzy-Wróbelska y Szarejko, 2003). En estudios de trigo donde se compararon poblaciones DHs y RILs como, por ejemplo, en Adamski *et al.* (2014), las poblaciones DHs presentaron mayor distorsión que las poblaciones de DSU. En la investigación de

Guzy-Wróbelska y Szarejko (2003) se analizó la DS en poblaciones DHs (obtenidas por CA y polinización de maíz) y F2 (obtenidas por DSU) mediante marcadores moleculares RAPD y AFLP, reportando valores de LDS de 22,2% y 14,3% para las poblaciones DHs y del 10% para las F2. En este estudio se comparó una población DH con una población F2, y según lo mencionado anteriormente por Li *et al.* (2015), podría existir una asociación entre el incremento del porcentaje de LDS y más ciclos de autofecundación (F6), la comparación entre una F2 y una F6 podría dar lugar a una variación en el %LDS.

A su vez, en el estudio de Adamski *et al.* (2014), donde se comparó la DS en poblaciones DHs (obtenidas por CA y polinización de maíz) y poblaciones F6 (obtenidas por DSU), se describió un mayor porcentaje para las primeras. Este resultado pudo estar condicionado al procedimiento de obtención de las DHs donde, a partir de un callo se seleccionaron más de una planta, generando así, una distorsión en la segregación.

2.6.5. Comparación de dos tecnologías: AIV vs. ARG+CE+DSU

El AIV y el ARG+CE+DSU son herramientas muy valiosas para los programas de mejoramiento genético y ambas pueden generar un impacto en los mismos. Su implementación permite obtener líneas avanzadas en un período de tiempo menor al método convencional, reduciendo los ciclos generacionales. En consecuencia, se podría lograr un aumento de la ganancia genética, que es uno de los principales objetivos de los programas de mejoramiento. Reducir este plazo a su vez podría llevar a un impacto destacable en la reducción de los costos (Esteves *et al.*, 2017). De acuerdo con las características del programa será más conveniente la implementación del ARG+CE+DSU o del AIV. En el cuadro 4 se comparan ambas tecnologías.

Cuadro 4: Análisis comparativo de las tecnologías ARG+CE+DSU y AIV

CARACTERÍSTICAS	ARG+CE+DSU	AIV
POBLACIÓN	F6	DHs
EQUIPAMIENTO	MENOR	MAYOR
COSTOS	MENOR	MAYOR
GENOTIPO	TODOS	NO TODOS
MEIOSIS	5	1
RECOMBINACIONES	MAYOR	MENOR
DISTORSIÓN EN LA SEGREGACIÓN	MAYOR	MENOR
SELECCIÓN FENOTÍPICA	POSIBLE	NO
SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES	POSIBLE	NO
INTROGRESIÓN DE GENES	POSIBLE	NO
HOMOCIGOSIS	>95%	100%

Las poblaciones DHs son líneas estables genéticamente producidas en menos de un año (Courtois, 1993; Lantos *et al.*, 2016; Patial *et al.*, 2017), permitiendo incorporar nuevas características rápidamente. Por otro lado, es una técnica que requiere de mucho equipamiento y de personal especializado elevando los costos de su utilización a diferencia de la tecnología ARG+CE+DSU que requiere de menor equipamiento.

La obtención de plantas albinas por AIV es un problema común en distintos genotipos a diferencia de los problemas de embriogénesis que solo ocurre en algunos genotipos. La obtención de plantas albinas se debe tanto a factores genéticos como a factores ambientales, las condiciones inadecuadas para el crecimiento de las

microsporas favorecen el albinismo (Liu *et al.*, 2002). Esteves *et al.* (2014) desarrollaron un protocolo para la obtención de DHs mediante CMA en algunos genotipos de cebada recalcitrantes de Canadá, reduciendo notablemente el porcentaje de plantas albinas y destacando la importancia de los factores ambientales como determinantes del albinismo.

En esta investigación se presentaron las dos grandes desventajas de la producción de DHs. Por un lado, el cruzamiento INIA501 tuvo problemas de baja respuesta a la embriogénesis obteniéndose un número de plantas muy reducido para el estudio de la población. Por otro lado, los cruzamientos INIA466 e INIA553 generaron un alto número de plantas albinas. Si bien para el análisis de sus características genéticas es posible la utilización de plantas albinas, las mismas no son útiles para su caracterización fenotípica a posteriori.

Las técnicas CA y CMA tienen limitaciones biológicas y genéticas, pero la obtención de plantas 100% homocigotas en una sola generación y en menos de un año es una gran ventaja para los programas de mejoramiento. En la presente investigación, el número de plantas que se obtuvo por el método CA fue mayor al que se obtuvo por CMA (un 90% por CA), confirmando lo citado en la bibliografía anteriormente acerca de la mayor complejidad del método CMA.

Por otro lado, la técnica ARG+CE+DSU requiere de mayor tiempo para obtener líneas avanzadas, pero es aplicable a todo tipo de genotipo y de especies sin limitaciones biológicas. Esta técnica se destacó frente al AIV como herramienta tecnológica de asistencia a los programas de mejora de Uruguay principalmente por ser un método que requiere de menor equipamiento y personal especializado, de fácil implementación, es genotipo – independiente y genera líneas con mayores eventos de recombinación que las líneas DHs. Además, en el proceso de creación de

líneas F6 el ARG+CE+DSU admite la selección asistida mediante la utilización de marcadores moleculares.

2.7. CONCLUSIONES

Nuestra investigación dejó en evidencia la diferencia en la estructura genética de las poblaciones DHs y F6 analizada desde el punto de vista de la heterocigosis residual, el mapa genético y la distorsión en la segregación. Además, se pudo desarrollar una técnica sumamente interesante y 100% aplicable al PMGT de Uruguay, el ARG+CE+DSU.

Ambas técnicas (ARG+CE+DSU y AIV) mostraron sus ventajas, pero el ARG+CE+DSU se destacó como herramienta tecnológica de asistencia al PMGT porque es más económica, requiere de menor equipamiento, es de fácil implementación y es aplicable a todos los genotipos. El ARG+CE+DSU combinado con la selección asistida mediante la utilización de marcadores moleculares puede ser de gran utilidad en la selección de nuevos cultivares, reducir el tiempo generacional y lograr un aumento de la ganancia genética en los programas de mejoramiento genético.

2.8. AGRADECIMIENTOS

A todo el equipo de INIA Las Brujas, INIA La Estanzuela y al profesor Patricio Esteves por su apoyo y asistencia técnica durante la maestría. Al profesor F. Belzile por recibirme en su equipo de trabajo en la Universidad Laval y al gobierno de Canadá (ELAP scholarship) por financiar la pasantía en la misma.

2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamski T, Krystkowiak K, Kuczyńska A, Mikołajczak K, Ogrodowicz P, Ponitka A, Surma M, Ślusarkiewicz-Jarzina A. 2014. Segregation distortion in homozygous lines obtained via anther culture and maize doubled haploid methods in comparison to

single seed descent in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Electronic Journal of Biotechnology* 17: 6-13.

Alipour H, Bihamta MR, Mohammadi V, Peyghambari SA, Bai G, Zhang G. 2017. Genotyping-by-Sequencing (GBS) Revealed Molecular Genetic Diversity of Iranian Wheat Landraces and Cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8 (1293). DOI: 10.3389/fpls.2017.01293

Allen AM, Winfield MO, BurrIDGE AJ, Downie RC, Benbow HR, Barker GLA, Wilkinson PA, Coghill J, Waterfall C, Davassi A, Scopes G, Pirani A, Webster T, Brew F, Bloor C, Griffiths S, Bentley AR, Alda M, Jack P, Phillips AL, Edwards KJ. 2017. Characterization of a Wheat Breeders' Array suitable for high-throughput SNP genotyping of global accessions of hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Biotechnology Journal*, 15: 390-401.

Allen AM, Barker GLA, Berry ST, Coghill JA, Gwilliam R, Kirby S, Robinson P, Brenchley RC, D'Amore R, McKenzie N, Waite D, Hall A, Bevan M, Hall N, Edwards KJ. 2011. Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 9: pp. 1086-1099.

Baenziger PS, Wesenberg DM, Smail VM, Alexander WL, Shaeffer GW. 1989. Agronomic Performance of Wheat Doubled-Haploid Lines Derived from Cultivars by Anther Culture. *Plant Breeding* 103, 101-109.

Barabaschi D, Tondelli A, Desiderio F, Volante A, Vaccino P, Valè G, Cattivelli L. 2016. Next generation breeding. *Plant Science*, 242: 3–13.

Barker GLA, Edwards KJ. 2009. A genome-wide analysis of single nucleotide polymorphism diversity in the world's major cereal crops. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 318-325. Doi: 10.1111/j.1467-7652.2009.00412.x.

Bélanger S, Esteves P, Clermont I, Jean M, Belzile F. 2016. Genotyping-by-Sequencing on Pooled Samples and its Use in Measuring Segregation Bias during the Course of Androgenesis in Barley. *Plant Genome*, 9 (1). doi: 10.3835/plantgenome2014.10.0073

Chao S, Zhang W, Akhunov E, Sherman J, Ma Y, Luo MC, Dubcovsky, J. 2009. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding*, 23:23-33. Doi 10.1007/s11032-008-9210-6.

Cistué L, Kasha KJ. 2005. Gametic Embryogenesis in *Triticum*: A Study of Some Critical Factors in Haploid (Microspore) Embryogenesis. *Plant Cell Monographs* (2). Doi 10.1007/7089_031.

Courtois B. 1993. Comparison of single seed descent and anther culture-derived lines of three single crosses of rice. *Theoretical Applied Genetics*, 85:625-631.

Devaux P, Zivy M. 1994. Protein markers for anther culturability in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 88:701-706.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS). Approach for High Diversity Species. *Plos ONE*, 6 (5): e19379.

Esteves P, Mastropiero M, Castillo A, Hernández L, Rodríguez M, De León W, Pereira F, Quincke M. 2017. Herramientas biotecnológicas para asistir al mejoramiento genético de trigo y otros cultivos. *Revista INIA*, 48: 62-66.

Esteves P, Clermont I, Marchand S, Belzile F. 2014. Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. *Plant Cell Reports*, 33(6): 871. DOI 10.1007/s00299-014-1563-1.

Forster BP, Till BJ, Ghanim AMA, Huynh HOA, Burstmayr H, Caligari PDS. 2014. Accelerated plant breeding. *CAB Reviews*, 9, No. 043.

Ganal MW, Roder MS. 2007. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. EN: Varshney, R.K. and Tuberosa, R. (Eds.). *Genomics Assisted Crop Improvement: Vol. 2: Genomics Applications in Crops*, 1–24.

Guzy-Wróbelska J, Szarejko I. 2003. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods. *Plant Breeding*, 122:305–13.

Lai K, Duran C, Berkman PJ, Lorenc MT, Stiller J, Manoli S, Hayden MJ, Forrest KL, Fleury D, Baumann U, Zander M, Mason AS, Batley J, Edwards D. 2012. Single nucleotide polymorphism discovery from wheat next-generation sequence data. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 743–749.

Lantos C, Jenes B, Bóna B, Cserhádi M, Pauk J. 2016. High frequency of doubled haploid plant production in spelt wheat. *Acta biologica Cracoviensia, serie botanica* 58(2): 107-112. DOI: 10.1515/abcsb-2016-0014.

Li C, Bai G, Chao S, Wang Z. 2015. A High-Density SNP and SSR Consensus Map Reveals Segregation Distortion Regions in Wheat. *BioMed Research International*. Article ID 830618. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/830618>.

Li H, Rasheed A, Hickey LT, He Z. 2018. Fast-Forwarding Genetic Gain. *Trends in Plant Science*, 23(3).

Liu W, Zheng MY, Konzak CF. 2002. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, Vol. 20 (9), 821–824. DOI: 10.1007/s00299-001-0408-x.

Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, Kumpatla S. 2012. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. *International Journal of Plant Genomics* (ID 728398). DOI:10.1155/2012/728398.

Marchand S, Fonquerne G, Clermont I, Laroche L, Huynh TT, Belzile FJ. 2008. Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. *Plant Cell Reports*, 27:443-451.

Mastropierro MM, Quincke M, Castillo A, Dalla Rizza M, Esteves P, Hernández L, Belzile F. 2018. Análisis genómico de líneas recombinantes de trigo obtenidas por andrgénesis in vitro y avance rápido de generaciones. Póster congreso Cymmit-INIA, octubre 2018.

Meng L, Li H, Zhang L, Wang J. 2015. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The crop journal*, 3: 269-283.

Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.

Nachit MM, Elouafi I, Pagnotta MA, El Saleh A, Iacono E, Labhilili M, Asbati A, Azrak M, Hazzam H, Benscher D, Khairallah M, Ribaut JM, Tanzarella OA, Porceddu E, Sorrells ME. 2001. Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Theoretical Applied Genetics*, 102:177–186

Nielsen NH, Backes G, Stougaard J, Andersen SU, Jahoor A. 2014. Genetic Diversity and Population Structure Analysis of European Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties. *PLoS ONE* 9(4): e94000. DOI: 10.1371/journal.pone.0094000.

Park SJ, Walsh EJ, Reinbergs E, Song LSP, Kasha KJ. 1976. Field performance of doubled haploid barley lines in comparison with lines developed by the pedigree and single seed descent methods. *Canadian Journal Plant Science*, 56: 467-474.

Patial M, Pal D, Thakur A, Bana RS, Patial S. 2017. Doubled Haploidy Techniques in Wheat (*Triticum aestivum* L.): An Overview. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*. DOI 10.1007/s40011-017-0870-z.

Poland J, Endelman J, Dawson J, Rutkoski J, Wu S, Manes Y, Dreisigacker S, Crossa J, Sánchez-Villeda H, Sorrells M, Jannink JL. 2012. Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. *The Plant Genome* 5:103–113. Doi: 10.3835/plantgenome2012.06.0006

Riaz A, Hathorn A, Dinglasan E, Ziemis L, Richard C, Singh D, Mitrofanova O, Afanasenko O, Aitken E, Godwin I, Hickey L. 2016. Into the vault of the Vavilov wheats:

old diversity for new alleles. *Genetic Resource Crop Evolution*. DOI 10.1007/s10722-016-0380-5.

Scheben A, Batley J, Edwards D. 2017. Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 149-161.

Shewry PR. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1537-1553.

Somers DJ, Isaac P, Edwards K. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical Applied Genetics*, 109: 1105-1114. DOI 10.1007/s00122-004-1740-7.

Torkamaneh D, Laroche J, Bastien M, Abed A, Belzile F. 2017. Fast-GBS: a new pipeline for the efficient and highly accurate calling of SNPs from genotyping-by-sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 18:5. DOI 10.1186/s12859-016-1431-9.

Wang G, Hyne V, Chao S, Henry Y, De Buyser J, Gale MD, Snape JW. 1995. A comparison of male and female recombination frequency in wheat using RFLP maps of homoeologous group 6 and 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 744-746.

Watson A, Ghosh S, Williams MJ, Cuddy WS, Simmonds J, Rey MD, Hatta MAM, Hinchliffe A, Steed A, Reynolds D, Adamski N, Breakspear A, Korolev A, Rayner T, Dixon LE, Riaz A, Martin W, Ryan M, Edwards D, Batley J, Raman H, Rogers C, Domoney C, Moore G, Harwood W, Nicholson P, Dieters MJ, DeLacy IH, Zhou J, Uauy C, Boden SA, Park RF, Wulff BBH, Hickey LT. 2018. Speed breeding: a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nature Plant*, 4: 23-29.

William HM, Trethowan R, Crosby-Galvan EM. 2007. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica*, 157: 307-319.

Zheng Z, Wang HB, Chen GD, Yan GH, Liu CJ. 2013. A procedure allowing up to eight generations of wheat and nine generations of barley per annum. *Euphytica*, 191: 311-316.

3. DISCUSIÓN GENERAL

3.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DE LAS VARIEDADES EN ESTUDIO

El programa de mejoramiento genético de trigo de INIA Uruguay se inició con la llegada del Dr. Alberto Boerger y con la creación del Instituto Fitotécnico y Semillero Nacional La Estanzuela en 1914. A su llegada el Dr. Boerger realizó la recolección y caracterización de los trigos locales, dando prioridad en el programa de mejoramiento al desarrollo del germoplasma local. Las primeras variedades de trigo se liberaron en 1918 y se registraron un total de 65 variedades al 2018, destacando una trayectoria reconocida y destacada a lo largo de todos estos años (Luizzi *et al.*, 2018).

Los materiales utilizados para desarrollar las poblaciones DHs y F6 son parte del PMGT de INIA. El cruzamiento INIA466 tiene como parentales a LE2430 y G2375. La línea LE2430 es una línea avanzada que se caracteriza por su buena sanidad, potencial de rendimiento y calidad panadera. Por otro lado, la línea G2375 (cultivar comercial) presenta buenos niveles de resistencia a las principales enfermedades de hoja y espiga, y muy buen potencial de rendimiento. El cruzamiento INIA553 tiene como parentales a LE2438 y a Klein Nutria, combinando una línea materna precomercial de INIA de destacada calidad panadera y buen rendimiento, con un material comercial argentino.

Uno de los objetivos del PMGT de INIA es mejorar la producción nacional de trigo y para esto incorpora germoplasma extranjero con características agronómicas superiores (Luizzi *et al.*, 2018), como es el ejemplo del cruzamiento INIA553. Además, el PMGT centra sus mayores esfuerzos de selección en identificar cultivares que combinen alto potencial de rendimiento, buena calidad molinera y panadera y, resistencia a enfermedades. En Uruguay existe una alta incidencia de enfermedades favorecidas por el clima, por lo tanto, la selección por resistencia a enfermedades es uno de los objetivos más importantes del programa (Silva, 2014).

El incremento de rendimiento de los cultivares en un programa convencional es un proceso que se realiza a largo plazo. El desarrollo acelerado de cultivares con altos rendimientos podría reducir notablemente los costos. Técnicas como el ARG y la producción de DHs permiten acelerar estos procesos de selección (Fischer y Rebetzke, 2018). Por ejemplo, con el ARG+CE+DSU se puede reducir el tiempo de obtención de líneas avanzadas F6 a un año y con el CA y CMA se pueden obtener DHs 100% homocigotas en un tiempo menor.

3.2. LÍNEAS DHs y F6 DE CADA CRUZAMIENTO

En la figura 3 se detalla el número de líneas DHs y F6 que se obtuvo mediante ARG+CE+DSU y CA/CMA, respectivamente. El número de líneas DHs para ambos cruzamientos duplicó el número de líneas F6, sin embargo, en éstas el número de plantas albinas superó al de plantas verdes limitando futuros estudios fenotípicos. En la técnica ARG+CE+DSU el número de líneas F6 resultantes disminuyó, en relación con el número de semillas sembradas en la F2 (150 semillas) consecuencia del ajuste de protocolo de la técnica.

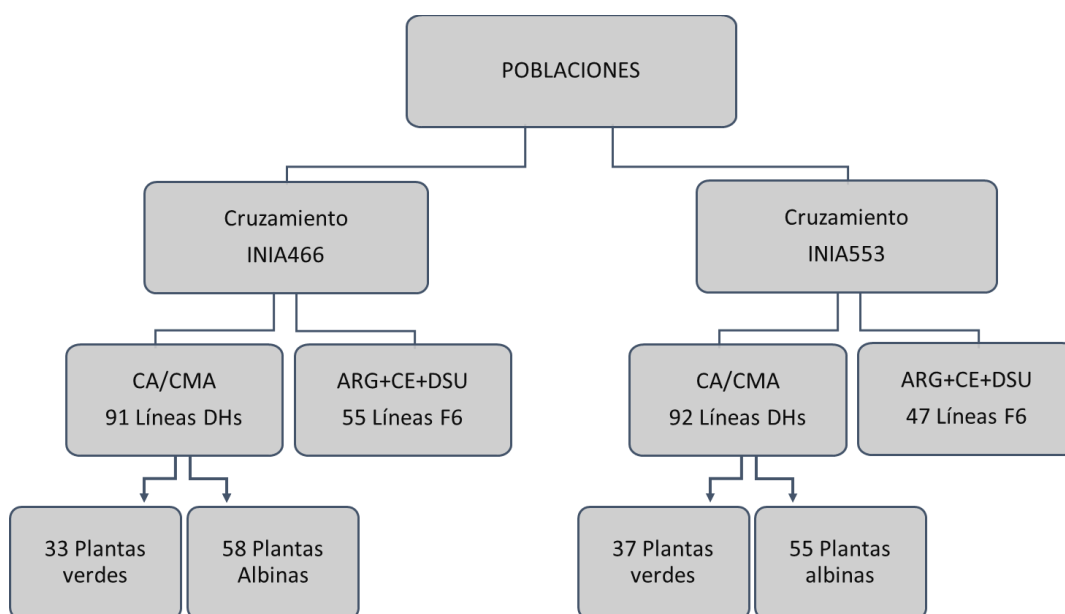


Figura 3: Número de líneas según población para cada cruzamiento

En la actualidad la biotecnología permite por cultivo in vitro de granos de polen inmaduros o microsporas generar embriones (embriogénesis gamética). Cada microspora puede generar una sola planta DH, 100% homocigota y fértil si ocurrió la duplicación espontánea durante la embriogénesis gamética (Esteves *et al.*, 2017). Sin embargo, esta técnica puede originar plantas albinas o carentes de clorofila e inútiles para su caracterización fenotípica y reproducción. La obtención de plantas albinas se debe tanto a factores genéticos como a factores ambientales, condiciones inadecuadas para el crecimiento de las microsporas favorecen el albinismo (Liu *et al.*, 2002).

3.3. DESCRIPCIÓN MOLECULAR DE LAS POBLACIONES DHs Y F6

En el cruzamiento INIA466 se identificaron 15949 y 16580 SNPs para las poblaciones DHs y F6, respectivamente. Estas poblaciones además de tener un número similar de marcadores compartieron el 95% de ellos, como consecuencia de tener los mismos parentales. Por el contrario, en el cruzamiento INIA553 las poblaciones DHs y F6 (13702 y 12192 SNPs, respectivamente) compartieron un solo parental, lo cual se vio reflejado en el número de SNPs en común (45%) (Cuadro 5).

Cuadro 5: Número de SNP por población

MARCADORES	DH466	ARG466	DH553	ARG553
Número de SNP	15949	16580	13702	12192
Número de SNP en común	15246		5429	
%SNP en común	97	93	40	45

Las poblaciones DHs y F6 si bien presentaron un número similar de SNPs, se diferenciaron en el número de BIN o marcadores no redundantes. La utilización de la función BIN del software Ici QTLMapping permitió agrupar los marcadores

redundantes y preparar el archivo para crear los mapas genéticos (Meng *et al.*, 2015). En el cuadro 6 se detallan los valores para cada población.

Cuadro 6: Número de marcadores según población

MARCADORES	DH466	ARG466	DH553	ARG553
SNPs	15949	16580	13702	12192
BINs	1089	2383	1009	2110
Número de SNPs x BIN	15	7	14	6

El número de BIN de las poblaciones F6 resultó ser dos veces mayor que el de las DHs en ambos cruzamientos, agrupándose en promedio entre 7 y 15 SNPs por BIN, respectivamente, para INIA 466; 6 y 14 SNPs por BIN en las F6 y DHs, respectivamente, para INIA553. Las poblaciones F6 son el resultado de 5 meiosis o 5 posibilidades de recombinación genética durante la etapa de autofecundación, generando un mayor número de SNPs con información genética relevante.

Al cruzar dos parentales con diferente información genética la combinación de genes resultante para cada línea descendente es única. En cada episodio de meiosis ocurre el intercambio de información cromosómica o *cross-over*, cuanto más lejanos estén ubicados los genes en el cromosoma mayor será la posibilidad de recombinación originando un nuevo recombinante (Yang *et al.*, 2015). Con la técnica de DSU aplicada en varias generaciones existen mayores posibilidades de recombinación (cinco o más meiosis) que la técnica de DHs (una meiosis), donde ocurre un solo evento de meiosis producido a partir de una F1 (Forster y Thomas, 2005).

En este trabajo se identificó un número de SNPs similar a lo reportado en otras investigaciones de trigo. Por ejemplo, en el estudio de poblaciones DHs de trigo de Poland *et al.* (2012) se trabajó con 20000 SNPs; y en la investigación de Allen *et al.* (2017) en trigo, se reportó 8498 y 6997 SNPs en poblaciones DHs, 9978 SNPs en poblaciones F6, 11720 SNPs en poblaciones F7 y 6772 SNPs en poblaciones F5 (DSU).

La frecuencia de SNPs por pares de bases identificados en el genoma de trigo se estima en 1 SNP cada 540 pb. Esta frecuencia es muy baja al compararla con otros cultivos como por ejemplo el maíz, donde el número de SNPs por pares de bases es cinco veces más alto que en trigo (Ganal y Roder, 2007). Esta baja frecuencia se podría atribuir a la reciente generación del trigo hexaploide (10000 años), además de, la estrecha base genética en el origen de la especie.

La diversidad genética dentro de una especie puede ser estudiada mediante el uso de marcadores genéticos. Éstos se basan en la variación que ocurre en el genoma y brindan la posibilidad de crear mapas genéticos (Lai *et al.*, 2012). La técnica de GBS permite identificar miles de marcadores moleculares en diferentes poblaciones como por ejemplo DHs y F6. En base al análisis y procesamiento de dicha información se pueden realizar estudios comparativos entre diferentes tipos de poblaciones.

3.4. APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES A UN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO

3.4.1. Mapas genéticos

En poblaciones biparentales la creación de los mapas genéticos se basa en el concepto de recombinación genética durante la meiosis (Mammadov *et al.*, 2012). En el presente trabajo se estudió la frecuencia de recombinación entre BINs y se creó el mapa genético de cada una de las poblaciones.

El tamaño del mapa genético de las cuatro poblaciones fue similar. En el cruzamiento INIA466, alcanzaron 2862 cM y 2874 cM, DHs y F6 respectivamente, y en el cruzamiento INIA553: 2431 cM y 2525cM, DHs y F6 respectivamente. Además, se describió un mayor tamaño del genoma A y B que el genoma D, y un mayor número de marcadores en el genoma B, seguido por el A y por último en el D.

En las poblaciones F6 los marcadores se agruparon en promedio en tres grupos de ligamiento por cromosoma a diferencia de las poblaciones DHs donde el promedio fue de dos grupos por cromosoma. Las poblaciones DHs y F6 también se diferenciaron en la distribución de sus marcadores en el genoma, en las primeras la densidad de marcadores en el mapa fue de 1 locus cada 3 cM, y en las segundas se identificó 1 locus cada 1 cM. La distribución de estos marcadores en el genoma brinda información acerca de la mayor cobertura de las poblaciones F6 en comparación con las DHs.

En otras investigaciones también se ha reportado la misma tendencia de un mayor número de marcadores en el genoma B, posteriormente en el A y por último en el D tanto en poblaciones DHs como RILs (Chao *et al.*, 2009; Allen *et al.*, 2011; Lado, 2012; Nielsen *et al.*, 2014; Riaz *et al.* 2016). Aunque, en algunos estudios el número de marcadores en el genoma A se incrementa levemente sobre el número de marcadores en el B, el genoma D siempre contiene el menor número de estos (Shavrukov *et al.*, 2014). El menor número de SNPs en el genoma D es un indicativo de una frecuencia de recombinación menor debido a su menor diversidad genética (Chao *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2014).

3.4.2. Estudio de la heterocigosis residual en poblaciones DHs y F6

Se estudió la heterocigosis residual (HR) para ver si existen diferencias entre las poblaciones DHs y F6 y sus implicancias en un programa de mejoramiento. Las poblaciones F6 presentaron porcentajes de HR desde 1 a 9% diferenciándose de las

DHs con valores entre 0 y 1%. En poblaciones DHs de trigo genotipadas por GBS es posible detectar niveles de HR de hasta el 1%.

La utilización de una enorme cantidad de datos es una de las ventajas de la técnica de GBS, pero, esto puede generar problemas al momento de detectar correctamente la diferencia entre la verdadera variación biológica y los errores computacionales (Lai *et al.*, 2012). En los cultivos poliploides como el trigo, a menudo se encuentran loci no-alélicos que son polimórficos dentro de un solo genotipo debido a la presencia de loci con diferentes alelos en regiones duplicadas del genoma (Mammadov *et al.*, 2012). La estructura genética del trigo con sus tres genomas y genes repetidos no-alélicos pueden dar lugar a porcentajes de heterocigosis residual de hasta 1% mediante esta tecnología de secuenciación (Patricio Esteves, comunicación personal 15 de noviembre 2018).

Los DHs son líneas uniformes y 100% homocigotas que se obtienen en un solo paso en un período menor a un año, resultando una herramienta muy valiosa para los mejoradores (Cistué y Kasha, 2005; Esteves y Belzile, 2018), a diferencia del método convencional donde pueden transcurrir 6 años para alcanzar líneas F6 (Forster y Thomas, 2005). Sin embargo, con el desarrollo del ARG o “speed breeding” extendiendo los regímenes de fotoperíodo y temperatura se aceleran los tiempos para obtener estas líneas 100% homocigotas (Li *et al.*, 2018). Con esta herramienta, se puede reducir el ciclo a floración a 45-60 días avanzando desde F1 a F6 en un año, logrando así, poblaciones con valores de HR menores a 10%.

3.4.3. Estudio de la distorsión en la segregación en poblaciones DHs y F6

El análisis de GBS permitió estudiar las frecuencias alélicas de los SNPs y determinar los segmentos en distorsión de segregación (SDS). Aquellos grupos de marcadores que incumplieron con la ley de segregación mendeliana 1:1 ($p < 0,05$) se definieron como SDS.

En esta investigación al igual que la realizada por Allen *et al.* (2017), con la alta densidad de marcadores que integran los mapas, se detectaron regiones con distribución de su segregación en distorsión y distribuidas de manera desigual en todo el genoma. Los SDS se caracterizaron en algunos casos por estar integrados por un número importante de SNPs y en otros, por un número relativamente pequeño de éstos, pero con un alto nivel de significancia. En las figuras 4 a 7 se describen los SDS encontrados para cada población.

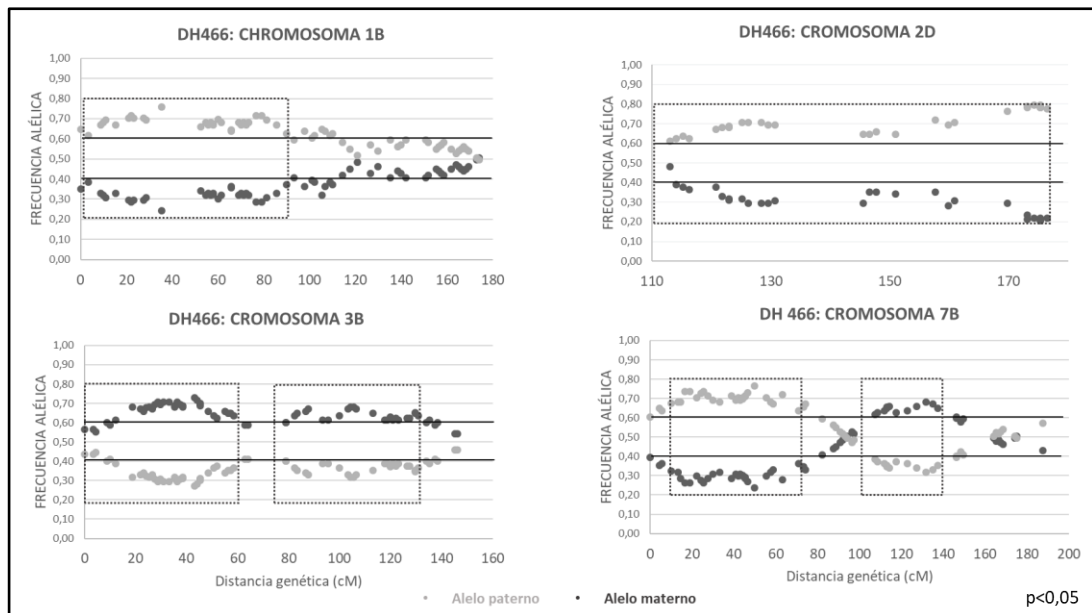


Figura 4: Frecuencias alélicas de los segmentos cromosómicos en DS de la población DH466

En la población DH466 se reporta un SDS en el cromosoma 1B y uno en el cromosoma 2D; y dos segmentos tanto en el cromosoma 3B y como en el cromosoma 7B (Figura 4). En el cromosoma 1B el parental predominante del SDS fue el paterno (G2375) al igual que en el segmento del cromosoma 2D. Por el contrario, en el cromosoma 3B en ambos SDS correspondió al parental materno LE2430. En el cromosoma 7B se dieron dos SDS donde el primero correspondió al parental G2375

y el segundo al parental LE2430. El porcentaje de loci en distorsión para la población DH466 fue de un 11%.

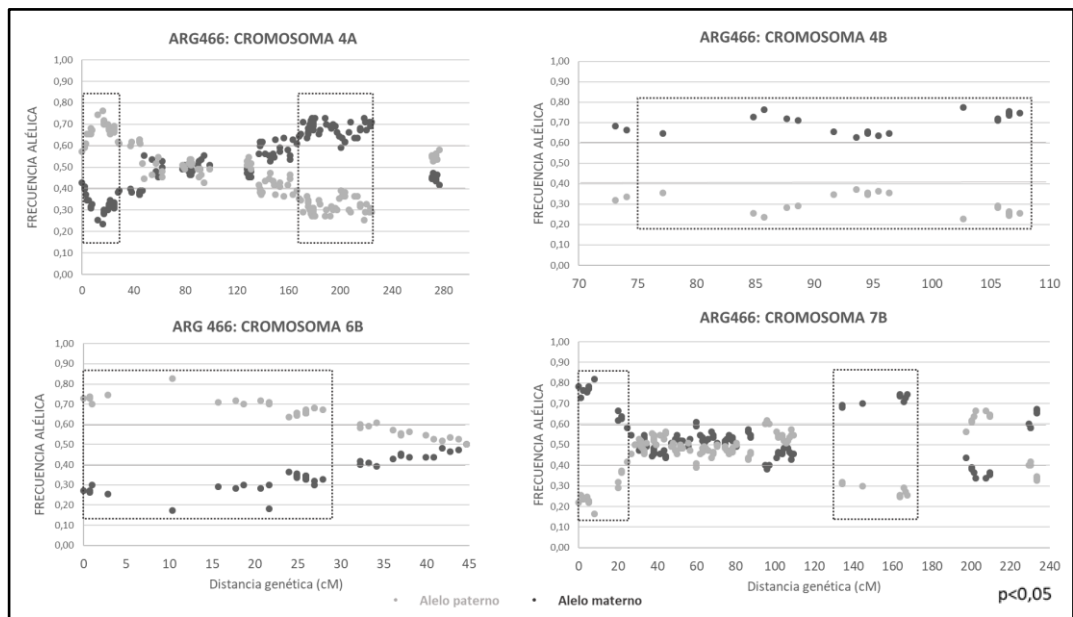
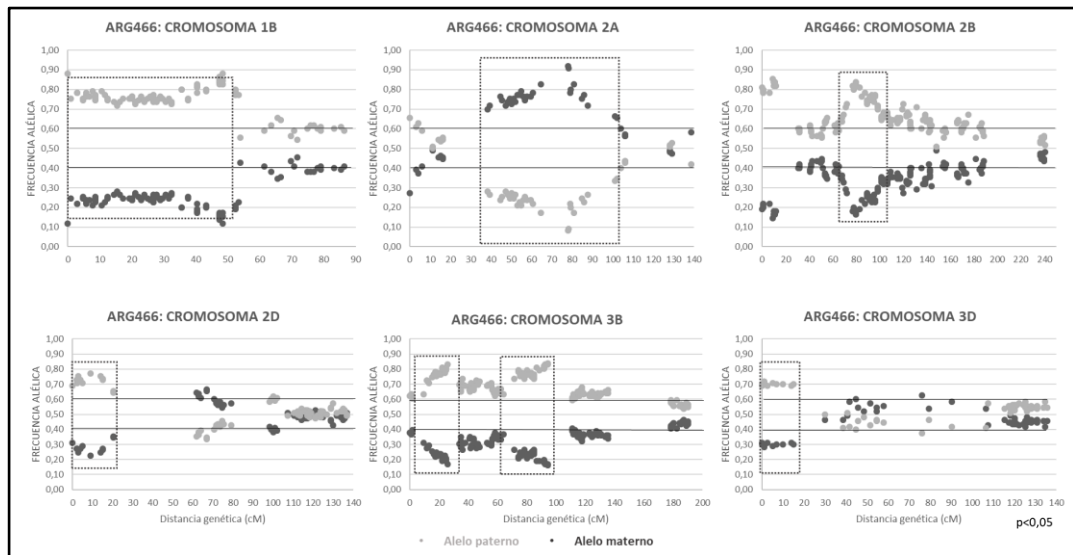


Figura 5: Frecuencias alélicas de los segmentos cromosómicos en DS de la población ARG466.

En la población ARG466 se reportan 13 SDS en los siguientes cromosomas: 1B, 2A, 2B, 2D, 3B, 3D, 4A, 4B, 6B y 7B (Figura 5). En los segmentos con distorsión de la segregación encontrados en los cromosomas 1B, 2B, 2D, 3D, 6B, los alelos heredados en mayor frecuencia correspondieron al parental paterno G2375. Por el contrario, en los segmentos con distorsión observados en los cromosomas 2A y 4B el alelo en mayor frecuencia correspondió al parental materno LE2430. En el cromosoma 3B se dieron dos segmentos de DS con el alelo parental heredado en mayor frecuencia en ambos, por el contrario, en el cromosoma 7B para ambos segmentos DS el alelo correspondió al materno. En el cromosoma 4A el primer alelo correspondió al paterno y el segundo al alelo materno heredado en mayor frecuencia. El porcentaje de loci en distorsión para la población ARG466 fue de un 14%.

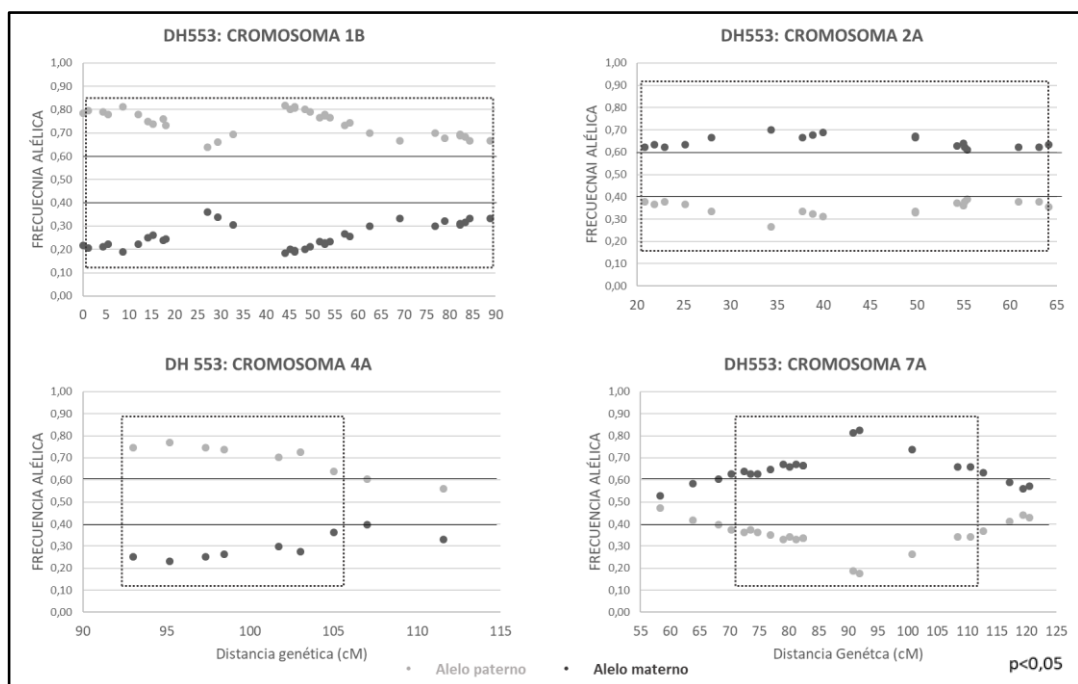


Figura 6: Frecuencias alélicas de los segmentos cromosómicos en DS de la población DH553

En la población DH553 se reportan cuatro SDS en los siguientes cromosomas: 1B, 2A, 4A y 7A (Figura 6). Para los cromosomas 1B y 4A el alelo heredado en mayor

frecuencia correspondió al parental paterno G2375. Por el contrario, en el cromosoma 2A y 7A el alelo en mayor frecuencia correspondió al materno LE2430. El porcentaje de loci en distorsión para la población DH553 fue de un 6%.

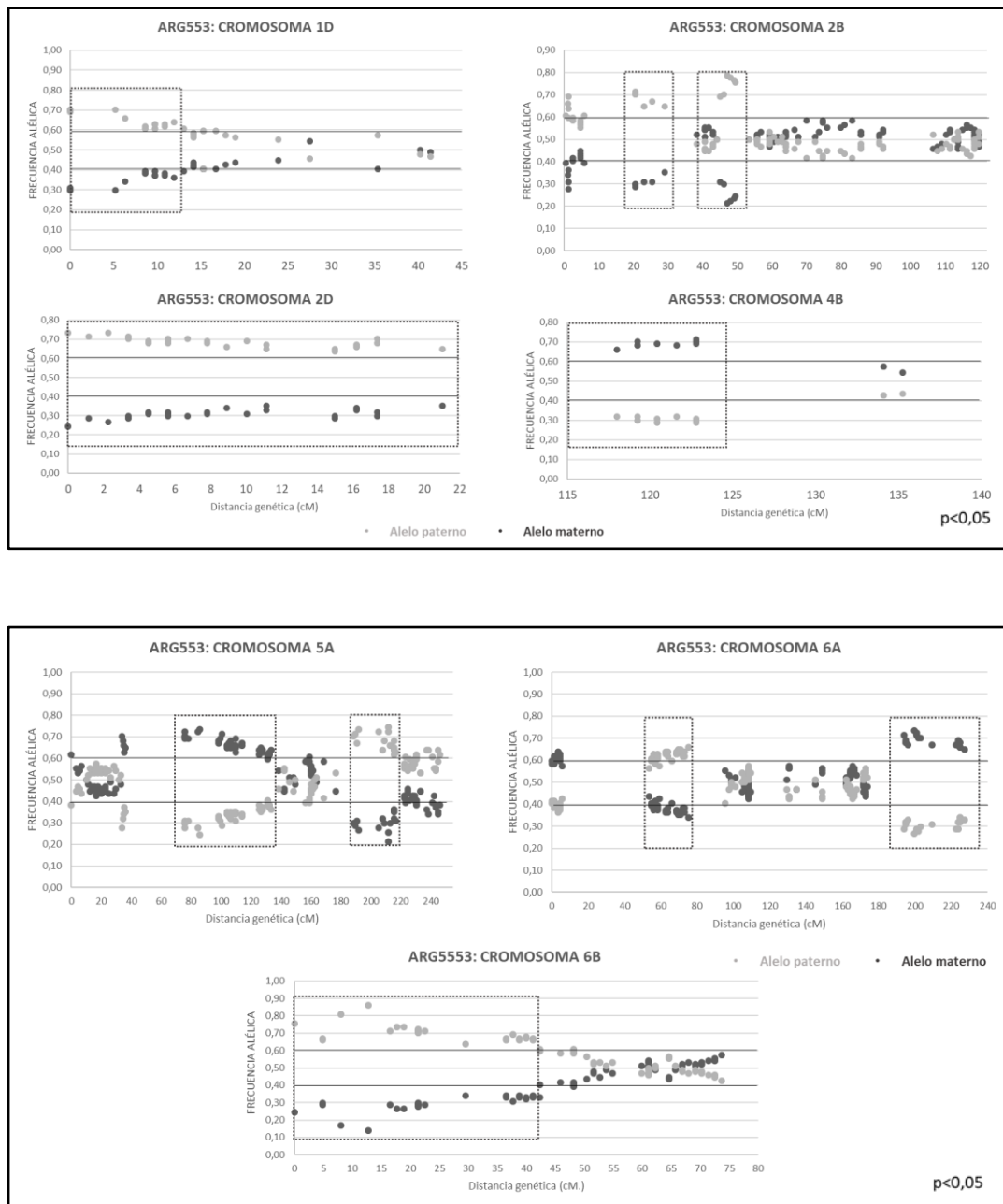


Figura 7: Frecuencias alélicas de los segmentos cromosómicos en DS de la población ARG553

En la población ARG553 se reportan diez SDS en los cromosomas: 1D, 2B, 2D, 4B, 5A, 6A, 6B. Los alelos heredados en mayor frecuencia fueron los correspondientes al parental femenino LE2438, excepto en el cromosoma 4B, para el cual los alelos en mayor frecuencia correspondieron al parental paterno. En el cromosoma 2B se dieron dos segmentos de DS con los alelos maternos heredados en mayor frecuencia en ambos. En el cromosoma 5A el primer alelo correspondió al paterno y el segundo al alelo materno heredado en mayor frecuencia. Por el contrario, en el cromosoma 6A en el primer segmento el alelo corresponde al materno y en el segundo el paterno. El porcentaje de loci en distorsión para la población ARG 553 fue de un 8%.

Se ha reportado en distintos trabajos distorsión en la segregación en poblaciones DHs, como, por ejemplo: en cebada (Devaux y Zivy, 1994; Wang *et al.*, 1995; Bélanger *et al.*, 2016) y trigo (Guzy-Wróbelska y Szarejko, 2003). En la presente investigación al comparar los SDS de poblaciones DHs y F6 no se observó ninguna correlación entre los segmentos, pudiendo encontrarse en los mismos cromosomas o no. Por el contrario, sí se reportó un mayor número de SDS y mayor porcentaje de LDS para las poblaciones F6 que en las poblaciones DHs, tanto en el cruzamiento INIA466 como INIA553. La DS es un fenómeno común en poblaciones DHs, F2, RILs pero, aumentan las probabilidades de distorsión a medida que se incrementan los ciclos de autofecundación por 5 o 6 generaciones (Singh *et al.*, 2007).

Singh *et al.* (2007), en el estudio de 93 RILs (F6) de trigo utilizando marcadores SSR y RFLP describieron valores del 30,6% de DS, porcentajes mayores a los descritos en este trabajo. Por otro lado, Guzy-Wróbelska y Szarejko (2003) encontraron 22% en poblaciones DHs, mientras que Wang *et al.* (1995), reportaron 18,8% en poblaciones DHs de trigo, en ambos casos obtenidas por CA. A su vez, Wingen *et al.* (2017) en su investigación de poblaciones RILs (F4, F5 y F6) de trigo reportaron % LDS

promedio para la población de 2,9%, con algunos valores de hasta 14% para determinadas líneas.

En trabajos donde se compararon poblaciones DHs y DSU se reportó mayor distorsión en las poblaciones DHs (Guzy-Wróbelska y Szarejko, 2003), resultado opuesto a lo reportado en esta investigación. Sin embargo, la población que se utilizó en aquel estudio para la comparación con la población DHs fue una F2. A medida que se incrementan los ciclos de autofecundación podrían incrementarse los %LDS. En la investigación de los autores Li *et al.* (2015), se compararon 2 poblaciones de RILs de trigo (127 F8 y 146 F6) obtenidas por DSU para estudiar la DS. Éstos reportaron un mayor %LDS para la población F8; la diferencia entre poblaciones F8 y F6 indica una posible asociación entre el incremento en la selección y el % de LDS, dos ciclos más de autofecundación podrían influir en el incremento del %LDS.

Los alelos que segregaron en mayor frecuencia en cada uno de los segmentos a veces correspondieron al alelo paterno y en otros casos al alelo materno, ocurriendo la misma tendencia en las cuatro poblaciones de estudio. Por el contrario, en previos trabajos de poblaciones DHs obtenidas por CA se reportó el alelo paterno como el heredado en mayor frecuencia (Wang *et al.*, 1995; Guzy-Wróbelska y Szarejko, 2003).

Diferentes hipótesis se han planteado acerca del surgimiento de los SDS atribuyéndoseles tanto a factores genéticos como ambientales, además del tipo de población en estudio (Cai *et al.*, 2011). Wingen *et al.* (2017) al estudiar la DS en siete poblaciones de trigo invernales reportaron un porcentaje promedio ligeramente más alto (3.69%) que en las poblaciones de trigo primaveral (2.95%). Si bien no fue una diferencia significativa, los dos cromosomas con más diferencia en DS fueron el 5B y 5D, cromosomas donde se ubican los genes de vernalización Vrn-D1 y Vrn-B1. Una

selección hacia el hábito de crecimiento primaveral podría haber incrementado la frecuencia de ciertos alelos aumentando la DS.

En la presente investigación el cromosoma 4B de las poblaciones F6 de ambos cruzamientos presentó SDS a diferencia de las poblaciones DHs. Al estudiar los genes reportados en dicho cromosoma, entre otros, se describen los genes de enanismo (*Rht*) (GrainGene database). Los genes *Rht* han sido una gran herramienta en los programas de mejora para reducir la altura de las variedades de trigo y así incrementar sus rendimientos (Thomas, 2017). En esta investigación se reportaron SDS en poblaciones F6 en zonas del cromosoma 4B donde se encuentran dichos genes, planteando una hipótesis para futuras investigaciones por la cual existe un favorecimiento de ciertos alelos en la segregación de genes *Rht* al aplicar la técnica de ARG.

3.5. TECNOLOGÍAS ARG+CE+DSU vs CA/CMA

El ARG y AIV son herramientas de gran impacto en los programas de mejoramiento genético y ambas pueden generar un cambio importante. Estas técnicas complementan al método convencional acortando el tiempo de generación de un nuevo cultivar, pero no sustituyen al método convencional (Forster y Thomas, 2005).

En los últimos años, la utilización de técnicas como DSU y DH se han incrementado en todos los programas de mejoramiento debido a su gran utilidad en la selección asistida por marcadores. Sin embargo, con estas técnicas no se pueden realizar selecciones fenotípicas durante el proceso, a diferencia de la técnica de ARG donde sí se podrían implementar este tipo de herramientas de selección en algunas características cualitativas (Fischer y Rebetzke, 2018; Watson *et al.*, 2018).

La implementación de estas tecnologías en el PMGT de INIA permitió obtener líneas altamente endocriadas en un período de tiempo menor al método convencional, reduciendo los ciclos generacionales. En consecuencia, es posible lograr un aumento de la ganancia genética, uno de los principales objetivos de un programa de mejora. Reducir este plazo a su vez puede llevar a un impacto destacable en la reducción de costos (Esteves *et al.*, 2017).

En el cuadro 7 se compararon las tecnologías ARG y AIV según las principales características de un PMGT.

Cuadro 7: Análisis comparativo de las tecnologías ARG+CE+DSU y AIV

CARACTERÍSTICAS	ARG+CE+DSU	AIV
POBLACIÓN	F6	DHs
EQUIPAMIENTO	MENOR	MAYOR
COSTOS	MENOR	MAYOR
GENOTIPO	TODOS	NO TODOS
MEIOSIS	5	1
RECOMBINACIONES	MAYOR	MENOR
DISTORSIÓN EN LA SEGREGACIÓN	MAYOR	MENOR
SELECCIÓN FENOTÍPICA	POSIBLE	NO
SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES	POSIBLE	NO
INTROGRESIÓN DE GENES	POSIBLE	NO
HOMOCIGOSIS	>95%	100%

La técnica AIV requiere de mucho equipamiento y personal especializado elevando los costos de su utilización a diferencia de la tecnología ARG que requiere de menor equipamiento. En la investigación se presentaron las dos grandes desventajas de la producción de DHs. Por un lado, el cruzamiento INIA501 tuvo problemas de embriogénesis generando un número de plantas muy reducido para el estudio de la población. Por otro lado, los cruzamientos INIA466 e INIA553 generaron un alto número de plantas albinas, una de las principales limitantes en AIV. Si bien para el estudio de sus características genéticas es posible la utilización de plantas albinas, estas plantas no son útiles para su caracterización fenotípica a posteriori.

En trigo, la obtención de plantas albinas vía AIV es un problema común en los diferentes genotipos a diferencia de los problemas de embriogénesis, los cuales ocurren en algunos genotipos únicamente. La obtención de plantas albinas se debe tanto a factores genéticos como a factores ambientales, condiciones inadecuadas para el crecimiento de las microsporas favorecen el albinismo (Liu *et al.*, 2002). Esteves *et al.* (2014) desarrollaron un protocolo para la obtención de DHs mediante CMA en algunos genotipos de cebada recalcitrantes de Canadá, reduciendo notablemente el porcentaje de plantas albinas y destacando la importancia de los factores ambientales como determinantes del albinismo.

La producción de DH es muy costosa requiriendo de un gran equipamiento (crecimiento de plantas madre, pretratamientos) además de personas calificadas para desempeñar la tarea. Además, en muchos casos puede llegar a ser muy riesgosa la inversión como consecuencia de un bajo resultado de plantas viables debido a la existencia de genotipos recalcitrantes (Forster y Thomas, 2005). Si bien la obtención de plantas 100% homocigotas en una sola generación y en menos de un año es una ventaja, las técnicas CA/CMA tienen limitaciones biológicas y genéticas. Por el contrario, el ARG es aplicable a todo tipo de genotipo y especie sin limitaciones biológicas.

4. CONCLUSIONES

El análisis genómico de las poblaciones DHs y F6 de ambos cruzamientos presentó diferencias en su estructura genética; estudiado en función de la heterocigosis residual, el mapa genético y la distorsión en la segregación, comprobando la hipótesis planteada en la investigación.

Se desarrollaron dos técnicas sumamente interesantes y aplicables al PMGT de INIA, Uruguay. Si bien ambas técnicas tienen sus ventajas, el ARG+CE+DSU se destacó como herramienta tecnológica de asistencia a los programas de mejora de Uruguay. Es un método que requiere de menor equipamiento y personal especializado, de fácil implementación, es genotipo – independiente y genera líneas con mayores eventos de recombinación que las líneas DHs. Combinado con la selección asistida mediante la utilización de marcadores moleculares puede ser una herramienta de gran utilidad para todo programa de mejoramiento de trigo, reduciendo el tiempo de formación de líneas endocriadas y logrando un aumento de la ganancia genética.

5. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Adamski T, Krystkowiak K, Kuczyńska A, Mikołajczak K, Ogrodowicz P, Ponitka A, Surma M, Ślusarkiewicz-Jarzina A. 2014. Segregation distortion in homozygous lines obtained via anther culture and maize doubled haploid methods in comparison to single seed descent in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Electronic Journal of Biotechnology*, 17: 6–13.
- Alipour H, Bihamta MR, Mohammadi V, Peyghambari SA, Bai G, Zhang G. 2017. Genotyping-by-Sequencing (GBS) Revealed Molecular Genetic Diversity of Iranian Wheat Landraces and Cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 8 (1293).
- Allen AM, Winfield MO, BurrIDGE AJ, Downie RC, Benbow HR, Barker GLA, Wilkinson PA, Coghill J, Waterfall C, Davassi A, Scopes G, Pirani A, Webster T, Brew F, Bloor C, Griffiths S, Bentley AR, Alda M, Jack P, Phillips AL, Edwards KJ. 2017. Characterization of a Wheat Breeders' Array suitable for high-throughput SNP genotyping of global accessions of hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Biotechnology Journal*, 15: 390-401.
- Allen AM, Barker GLA, Berry ST, Coghill JA, Gwilliam R, Kirby S, Robinson P, Brenchley RC, D'Amore R, McKenzie N, Waite D, Hall A, Bevan M, Hall N, Edwards K.J. 2011. Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnology Journal*, 9: 1086–1099.
- Baenziger PS, Wesenberg DM, Smail VM, Alexander WL, Shaeffer GW. 1989. Agronomic Performance of Wheat Doubled-Haploid Lines Derived from Cultivars by Anther Culture. *Plant Breeding* 103, 101-109.

- Baloch FS, Alsaleh A, Andeden EE, Hatipoglu R, Nachit M, Özkan H. 2016. High levels of segregation distortion in the molecular linkage map of bread wheat representing the West Asia and North Africa region. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40: 352-364.
- Barabaschi D, Tondelli A, Desiderio F, Volante A, Vaccino P, Valè G, Cattivelli L. 2016. Next generation breeding. *Plant Science*, 242: 3–13.
- Barker GLA, Edwards KJ. 2009. A genome-wide analysis of single nucleotide polymorphism diversity in the world's major cereal crops. *Plant Biotechnology Journal*, 7: 318-325.
- Bélanger S, Esteves P, Clermont I, Jean M, Belzile F. 2016. Genotyping-by-Sequencing on Pooled Samples and its Use in Measuring Segregation Bias during the Course of Androgenesis in Barley. *Plant Genome*, 9 (1).
- Blanco A, Bellomo MP, Cenci A, De Giovanni C, D'Ovidio R, Iacono E, Laddomada B, Pagnotta MA, Porceddu E, Sciancalepore A, Simeone R, Tanzarella OA. 1998. A genetic linkage map of durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 721-728.
- Cai J, Zhang X, Wang B, Yan M, Qi Y, Kong L. 2011. A genetic analysis of segregation distortion revealed by molecular markers in *Lophopyrum ponticum* chromosome 7E. *Journal of Genetics*, Volume 90 (2).
- Chao S, Zhang W, Akhunov E, Sherman J, Ma Y, Luo MC, Dubcovsky J. 2009. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding*, 23: 23-33.

- Cistué L, Kasha KJ. 2005. Gametic Embryogenesis in *Triticum*: a Study of Some Critical Factors in Haploid (Microspore) Embryogenesis. *Plant Cell Monogr*, 2.
- Courtois B. 1993. Comparison of single seed descent and anther culture-derived lines of three single crosses of rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 625-631.
- Czarnecki E. 1988. A method of germinating immature spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 68: 797-799.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews*, 12: 499.
- De La Fuente GN, Frei UKF, Lubberstedt T. 2013. Accelerating plant breeding. *Trends in Plant Science*, 1360-1385.
- De Pauw RM, Clarke JM. 1976. Acceleration of generation advancement in spring wheat. *Euphytica* 25: 415-418
- Devaux P, Zivy M. 1994. Protein markers for anther culturability in barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 88:701-706.
- Dhanapal AP. 2012. Genomics of crop plant genetic resources. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3: 378-385.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2019. Encuesta Agrícola "Primavera 2018". Montevideo. MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Serie encuestas N° 354.

- Due Tuveesson IK, Ohlund RCV. 1993. Plant regeneration through culture of isolated microspores of *Triticum aestivum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34: 163-167.
- Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS). Approach for High Diversity Species. *Plos one*, 6 (5): e19379.
- Esteves P, Belzile FJ. 2018. Isolated Microspore Culture in Barley. En: Wendy A. Harwood (ed.). *Barley: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1900.
- Esteves P, Mastropiero M, Castillo A, Hernández L, Rodríguez M, De León W, Pereira F, Quincke M. 2017. Herramientas biotecnológicas para asistir al mejoramiento genético de trigo y otros cultivos. Montevideo. *Revista INIA*, 48: 62-66.
- Esteves P, Clermont I, Marchand S, Belzile F. 2014. Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II-exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. *Plant Cell Reports*, DOI 10.1007/s00299-014-1563-1.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) (2019). Situación alimentaria mundial. Recuperado el 23 de octubre de 2019, de <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/es/>
- Feldman M, Levy AA. 2012. Genome Evolution Due to Allopolyploidization in Wheat. *Genetics*, 192: 763–774.

- Ferrie MR, Caswell KL. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104: 301–309.
- Fischer RA, Rebetzke GH. 2018. Indirect selection for potential yield in early-generation, spaced plantings of wheat and other small-grain cereals: a review. *Crop & Pasture Science*, 69: 439–459.
- Forster BP, Till BJ, Ghanim AMA, Huynh HOA, Burstmayr H, Caligari PDS. 2014. Accelerated Plant Breeding. *CAB Reviews*, 9 (043).
- Forster BP, Thomas WTB. 2010. Doubled haploids in genetics and plant breeding. In: J. Janick, editor, *Plant Breeding Reviews*, vol. 25. John Wiley & Sons, Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470650301.ch3
- Forster BP, Thomas WTB. 2005. Doubled haploids in genetics and plant breeding. *Plant Breeding Review*, 25: 57–88.
- Ganal MW, Roder MS. 2007. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. EN: Varshney, R.K. and Tuberosa, R. (Eds.). *Genomics Assisted Crop Improvement: Vol. 2: Genomics Applications in Crops*, 1–24.
- Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramesh B. 1999. Review. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118: 369-390.
- Guzy-Wróbelska J, Labocha-Pawlowska A, Kwasniewski M, Szarejko I. 2007. Different recombination frequencies in wheat doubled haploid populations obtained through maize pollination and anther culture. *Euphytica*, 156: 173-183.

- Guzy-Wróbelska J, Szarejko I. 2003. Molecular and agronomic evaluation of wheat doubled haploid lines obtained through maize pollination and anther culture methods. *Plant Breeding*, 122:305–13.
- Hickey LT, Germán SE, Pereyra SA, Diaz JE, Ziems LA, Fowler RA, Platz GJ, Franckowiak JD, Dieters M.J. 2017. Speed breeding for multiple disease resistance in barley. *Euphytica*, 213:64.
- Hickey LT, Dieters MJ, DeLacy, IH, Kravchuk OY, Mares DJ, Banks PM. 2009. Grain dormancy in fixed lines of white-grained wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under controlled environmental conditions. *Euphytica*, 168: 303-310.
- Lado B. 2012. Identificación de SNPs mediante Genotipado por secuenciación para el mejoramiento genético de trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis de maestría, Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias.
- Lai K, Duran C, Berkman PJ, Lorenc MT, Stiller J, Manoli S, Hayden MJ, Forrest KL, Fleury D, Baumann U, Zander M, Mason AS, Batley J, Edwards D. 2012. Single nucleotide polymorphism discovery from wheat next-generation sequence data. *Plant Biotechnology Journal*, 10: 743–749.
- Lantos C, Jenes B, Bona B, Cserhati M, Pauk J. 2016. High frequency of doubled haploid plant production in spelt wheat. *Acta Biológica Cracoviensis, series Botanica*, 58 (2): 107–112.
- Li C, Bai G, Chao S, Wang Z. 2015. A High-Density SNP and SSR Consensus Map Reveals Segregation Distortion Regions in Wheat. *BioMed Research International*. Article ID 830618. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/830618>.

Li H, Rasheed A, Hickey LT, He Z. 2018. Fast-Forwarding Genetic Gain. Trends in Plant Science, 23 (3).

Liu W, Zheng MY, Konzak CF. 2002. Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports, Vol. 20 (9), 821–824.

Luizzi D, Pereyra S, Abadie T, Gatti I, Quincke M, Condón F, Vázquez D, Díaz M, Germán S. 2018. Objetivos del mejoramiento genético de trigo. EN: German, S. y Luizzi, D. (Eds.). 100 años de mejoramiento de trigo en INIA la Estanzuela. Montevideo: Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA. 119.

Mammadov J, Aggarwal R, Buyyarapu R, Kumpatla S. 2012. SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. International Journal of Plant Genomics (ID 728398). DOI:10.1155/2012/728398.

Marchand S, Fonquerne G, Clermont I, Laroche L, Huynh TT, Belzile FJ. 2008. Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance. Plant Cell Reports, 27: 443–451.

Mastropierro, M.M.; Quincke, M.; Castillo, A; Dalla Rizza, M; Esteves, P.; Hernández, L.; Belzile, F. 2018. Análisis genómico de líneas recombinantes de trigo obtenidas por androgénesis in vitro y avance rápido de generaciones. En: Congreso Cymmit-INIA. Jornadas 2018 de la Plataforma de fenotipado para enfermedades de trigo en INIA La Estanzuela Colonia.

- Meng L, Li H, Zhang L, Wang J. 2015. QTL IciMapping: Integrated software for genetic linkage map construction and quantitative trait locus mapping in biparental populations. *The Crop Journal*, 3: 269-283.
- Mukade K. 1974. New Procedures for Accelerating Generation Advancement in Wheat Breeding. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 8 (1).
- Murashige T, Skoog F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.
- Murovec J, Bohanec B. 2012. Haploids and Doubled Haploids in Plant Breeding. In: Abdurakhmonov I (ed) *Plant breeding*. Tech Europe, Croatia, pp 87–106
- Nachit MM, Elouafi I, Pagnotta MA, El Saleh A, Iacono E, Labhilili M, Asbati A, Azrak M, Hazzam H, Benscher D, Khairallah M, Ribaut JM, Tanzarella OA, Porceddu E, Sorrells ME. 2001. Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Theoretical Applied Genetics*, 102:177–186
- Nielsen NH, Backes G, Stougaard J, Andersen SU, Jahoor A. 2014. Genetic Diversity and Population Structure Analysis of European Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties. *Plos One* 9(4): e94000.
- Park SJ, Walsh EJ, Reinbergs E, Song LSP, Kasha KJ. 1976. Field performance of doubled haploid barley lines in comparison with lines developed by the pedigree and single seed descent methods. *Canadian Journal Plant Science*, 56: 467-474.

- Patial M, Pal D, Thakur A, Bana RS, Patial S. 2017. Doubled Haploidy Techniques in Wheat (*Triticum aestivum* L.): An Overview. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B. DOI 10.1007/s40011-017-0870-z
- Poland J, Endelman J, Dawson J, Rutkoski J, Wu S, Manes Y, Dreisigacker S, Crossa J, Sánchez-Villeda H, Sorrells M, Jannink JL. 2012. Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing. *The Plant Genome* 5:103–113.
- Quincke M, Pereyra S, Vázquez D, Silva P, Germán S. 2018. Hitos y perspectivas del mejoramiento genético de trigo en Uruguay. EN: German, S. y Luizzi, D. (Eds.). 100 años de mejoramiento de trigo en INIA la Estanzuela. Montevideo: Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología de INIA. 119.
- Riaz A, Hathorn A, Dinglasan E, Ziemis L, Richard C, Singh D, Mitrofanova O, Afanasenko O, Aitken E, Godwin I, Hickey L. 2016. Into the vault of the Vavilov wheats: old diversity for new alleles. *Genetic Resource Crop Evolution*. DOI 10.1007/s10722-016-0380-5.
- Scheben A, Batley J, Edwards D. 2017. Review. Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 149–161.
- Shavrukov Y, Suchecki R, Eliby S, Abugalieva A, Kenebayev S, Langridge P. 2014. Application of next-generation sequencing technology to study genetic diversity and identify unique SNP markers in bread wheat from Kazakhstan. *BMC Plant Biology*, 14: 258.
- Shewry PR. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1537–1553.

- Silva P. 2014. Base genética de la resistencia a roya de la hoja de trigo en germoplasma regional. Tesis de maestría, Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 96 p.
- Singh K, Ghai M, Garg M, Chhuneja P, Kaur P, Schnurbusch T, Keller B, Dhaliwal HS. 2007. An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* x *T. monococcum* RIL population. *Theoretical and Applied Genetics*, 115 (3), 301–312.
- Snape JW, Simpson E. 1983. Early generation selection and rapid generation advancement methods in autogamous crops. EN: Lange, W., Zeven, A.C. and Hogenboom, N.G. (Eds). *Efficiency in Plant Breeding*. Wageningen, the Netherlands. 383.
- Somers DJ, Isaac P, Edwards K. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1105–1114.
- Sonah H, Bastien M, Iquira E, Tardivel A, Legare G, Boyle B, Normandeau E, Laroche J, Larose S, Jean M, Belzile F. 2013. An Improved Genotyping by Sequencing (GBS) Approach Offering Increased Versatility and Efficiency of SNP Discovery and Genotyping. *Plos one* 8 (1): e54603.
- Sramková Z, Gregová E, Sturdik E. 2009. Genetic Improvement of wheat-a review. *Nova Biotechnologica*, 9-1.
- Sysoeva MI, Markovskaya EF, Shibaeva TG. 2010. Plants under continuous light: a review. *Plant Stress*, 4(1): 5-17.

- Thomas SG. 2017. Novel *Rht-1* dwarfing genes: tools for wheat breeding and dissecting the function of DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany*, 68 (3): 354-358.
- Torkamaneh D, Laroche J, Bastien M, Abed A, Belzile F. 2017. Fast-GBS: a new pipeline for the efficient and highly accurate calling of SNPs from genotyping-by-sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 18 (5).
- Uauy C. 2017. Wheat genomics comes of age. *Plant Biology*, 36: 142–148.
- Wang G, Hyne V, Chao S, Henry Y, De Buyser J, Gale MD, Snape JW. 1995. A comparison of male and female recombination frequency in wheat using RFLP maps of homoeologous group 6 and 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 744-746.
- Watson A, Ghosh S, Williams MJ, Cuddy WS, Simmonds J, Rey MD, Md Hatta MA, Hinchliffe A, Steed A, Reynolds D, Adamski N, Breakspear A, Korolev A, Rayner T, Dixon LE, Riaz A, Martin W, Ryan M, Edwards D, Batley J, Raman H, Rogers C, Domoney C, Moore G, Harwood W, Nicholson P, Dieters MJ, DeLacy IH, Zhou J, Uauy C, Boden SA, Park RF, Wulff BBH, Hickey LT. 2018. Speed breeding: a powerful tool to accelerate crop research and breeding. *Nature Plants*, 4: 23-29.
- William HM, Trethowan R, Crosby-Galvan EM. 2007. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica*, 157: 307-319.
- Wingen LU, West C, Leverington-Waite M, Collier S, Orford S, Goram R, Yang CY, King J, Allen AM, Burridge A, Edwards KJ, Griffiths S. 2017. Wheat Landrace Genome Diversity. *Genetics*, 205: 1657-1676.

- Yang HB, Kang WH, Kang BC. 2015. Methods for Developing Molecular Markers. En: H.-J. Koh et al. (eds.), Current Technologies in Plant Molecular Breeding. Breeding for researchers. DOI 10.1007/978-94-017-9996-6_2.
- Zheng Z, Wang HB, Chen GD, Yan GH, Liu CJ. 2013. A procedure allowing up to eight generations of wheat and nine generations of barley per annum. Euphytica, 191: 311-316.
- Zheng MY. 2003. Microspore culture in wheat (*Triticum aestivum*) – doubled haploid production via induced embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73: 213–230.

6. ANEXOS

POBLACIÓN	No. SNPs	No. BINs	GENOMA (cM.)	COBERTURA PROMEDIO	GRUPOS DE LIGAMIENTO PROMEDIO
DH466	15949	1089 (42%A, 45%B, 13%D)	2862 (1258A, 1066B, 538D)	1locus/3 cM A 1locus/2cM B 1locus/4cM D	2 (2,4A; 1,6B; 2,1D)
ARG466	16580	2383 (42%A, 46%B, 12%D)	2876 (1262 A, 1122B, 492D)	1locus/1cM A 1locus/1cM B 1locus/2cM D	3 (2,9A; 3B; 2,7D)
DH553	13702	1009 (42%A, 47%B, 11%D)	2431 (1077 A,1020B, 334D)	1locus/3cM A 1locus/2cM B 1locus/3cM D	2 (2A; 2B; 2D)
ARG553	12192	2110 (44%A, 45%B, 10%D)	2525 (1091 A, 1134B, 299D)	1locus/1cM A 1locus/1cM B 1locus/1cM D	3 (3,4A; 3B; 2,4D)

ANEXO 1: Características de los mapas genéticos de cada población.