



## VALIDACIÓN DEL QTL *HAP-6A-13* ASOCIADO A PESO DE GRANO EN TRIGOS HARINEROS DE PRIMAVERA

### VALIDATION OF QTL *HAP-6A-13* ASSOCIATED WITH GRAIN WEIGHT IN SPRING BREAD WHEATS

Guillermo García-Barríos<sup>1</sup>, Susanne Dreisigacker<sup>2\*</sup>, Deepmala Sehgal<sup>2</sup>, Serafín Cruz-Izquierdo<sup>1</sup>, Ricardo Lobato-Ortiz<sup>1</sup> y Rosa Angela Pacheco-Gil<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. <sup>2</sup>Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, Texcoco, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia (s.dreisigacker@cgiar.org)

#### RESUMEN

Este estudio se realizó para validar el locus de carácter cuantitativo (QTL-quantitative trait locus) *HAP-6A-13*, el cual fue reportado con asociación a peso de grano en trigos harineros de primavera del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Para realizar la validación se diseñaron dos marcadores de competencia alelo específica (KASP-kompetitive allele specific PCR) para los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) T/C y A/G integrados en el QTL. La asociación de los marcadores KASP con el peso de mil granos y rendimiento se verificó mediante estudio de asociación del genoma completo (GWAS) en cuatro colecciones de trigo. Los dos marcadores KASP mostraron asociación significativa con el peso de mil granos y rendimiento ( $P \leq 0.05$ ); adicionalmente, se generaron 10 familias endogámicas heterogéneas (HIF-heterogeneous inbred families) y se evaluó el peso de mil granos, rendimiento y otros caracteres morfométricos del grano. En contraste con los resultados de GWAS, en las evaluaciones de las HIF el efecto del QTL *HAP-6A-13* fue significativo ( $P \leq 0.05$ ) sólo en una HIF para peso de mil granos y en tres HIF para longitud de grano, lo que demuestra la dificultad de validar un QTL de efecto menor en trigo.

**Palabras clave:** *Triticum aestivum*, familias endogámicas heterogéneas, haplotipos SNP, peso de mil granos, validación de QTL.

#### SUMMARY

This study was conducted to validate the quantitative trait locus (QTL) *HAP-6A-13*, which was reported to be associated to grain weight in Spring bread wheat from the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). To perform the validation, two Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) markers were designed for the T/C and A/G single nucleotide polymorphisms (SNPs) comprising the QTL. The association of KASP markers with thousand kernel weight and grain yield was verified by genome-wide association study (GWAS) in four wheat collections. The two KASP markers showed significant association with thousand kernel weight and grain yield ( $P \leq 0.05$ ); in addition, 10 heterogeneous inbred families (HIF) were generated and thousand kernel weight, grain yield and other morphometric traits of the grain were evaluated. In contrast to the GWAS results, in the HIF evaluations the effect of the QTL *HAP-6A-13* was significant ( $P \leq 0.05$ ) only in one HIF for thousand grain weight, and in three HIF for grain length, which demonstrates the difficulty of validating a QTL of minor effect in wheat.

**Index words:** *Triticum aestivum*, heterogeneous inbred families, QTL validation, SNP haplotypes, thousand kernel weight.

#### INTRODUCCIÓN

El incremento del rendimiento de grano en trigo (*Triticum aestivum*) es uno de los objetivos más desafiantes en los programas de mejoramiento genético, debido a la compleja arquitectura genética, a la baja heredabilidad y por la influencia de interacciones ambientales en todas las etapas de crecimiento de la planta (Li *et al.*, 2019; Simmonds *et al.*, 2014). Dada la complejidad del rendimiento, éste se puede disectar en componentes, los cuales son el número de espigas por unidad de superficie, número de granos por espiga y peso de mil granos. Estos caracteres tienen mayor heredabilidad que el carácter rendimiento y son relativamente fáciles de seleccionar en los programas de mejoramiento (Li *et al.*, 2019).

La detección de un locus de carácter cuantitativo (QTL) con efecto en los componentes del rendimiento amplía las oportunidades para desarrollar marcadores diagnóstico que puedan utilizarse en la selección asistida por marcadores moleculares y en la piramidación de genes, permitiendo aumentar las ganancias genéticas para rendimiento (Sehgal *et al.*, 2019).

Sehgal *et al.* (2019) reportaron el QTL *HAP-6A-13* en el cromosoma 6A, el cual estaba asociado de manera significativa con el peso de mil granos ( $R^2$  del marcador = 0.007) en trigo harinero, el QTL se detectó mediante un estudio de asociación del genoma completo (GWAS - genome-wide association study) basado en haplotipos. En ese estudio se utilizaron 4302 líneas de trigo que comprendieron cinco ensayos de rendimiento del programa de mejoramiento de trigo harinero del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y 8443 marcadores moleculares del tipo genotipado por secuenciación (GBS-genotyping by sequencing). El

haplotipo favorable del QTL *HAP-6A-13* contribuyó con un incremento de hasta 2.6 g en muestras de mil granos.

Existen varias metodologías para validar el efecto de un QTL, una opción es la creación de líneas casi isogénicas (NIL), las cuales son un conjunto de líneas efectivas para estudiar los efectos fenotípicos atribuibles a un QTL, ya que el fondo genético, caracteres morfológicos y fenológicos que comúnmente influyen en las evaluaciones fenotípicas de los caracteres cuantitativos, son idénticos y sólo difieren en algunos loci específicos (Pumphrey *et al.*, 2007).

Las familias endogámicas heterogéneas (HIF – heterogeneous inbred families) son un tipo especial de NIL, se obtienen al cruzar dos progenitores distintos y realizar autopolinizaciones durante varias generaciones; posteriormente, se detectan líneas segregantes heterocigóticas para la región de un QTL a verificar, estas líneas identificadas se autopolinizan una vez más para obtener una segregación mendeliana del QTL, y finalmente se compara el fenotipo de las líneas segregadas (Tuinstra *et al.*, 1997).

Los objetivos de esta investigación fueron diseñar marcadores moleculares tipo KASP (kompetitive allele specific PCR) para el QTL *HAP-6A-13*, verificar la asociación de los marcadores con el peso de mil granos mediante GWAS en nuevas poblaciones de mejoramiento, validar el efecto del QTL en peso de mil granos empleando HIF y determinar si hay efecto en rendimiento, longitud, ancho y grosor del grano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño de marcadores KASP

Se diseñaron iniciadores de tipo KASP para los polimorfismos C/T y A/G (Cuadro 1) a partir de las secuencias GBS de los marcadores S6A\_481437887 y S6A\_481437894 que formaban el haplotipo del QTL *HAP-6A-13* reportado por Sehgal *et al.* (2019). El diseño de los KASP se realizó utilizando el software PolyMarker (Ramirez-Gonzalez *et al.*, 2015), mismo que se puede acceder de manera gratuita en: <http://polymarker.tgac.ac.uk/>.

La secuencia de los marcadores S6A\_481437887 y S6A\_481437894 es:

CGGGATGCTCTGCTTCTCTCTGTTCTCAGCCCAACATGT[C/T]TACACA[A/G]CCCACCTGCA

Un ensayo KASP tiene dos iniciadores directos alelo-específicos (un iniciador para cada SNP de cada alelo), un iniciador reverso común para ambos alelos y dos oligos,

uno marcado con el fluoróforo FAM y otro con el HEX, cada oligo es complementario a la secuencia terminal de cada uno de los iniciadores de los alelos a evaluar.

### Genotipado con los marcadores KASP

Se genotiparon tres colecciones de trigo harinero que forman parte de ensayos internacionales de rendimiento (EYT-elite yield trial) del CIMMYT y contienen líneas avanzadas de mejoramiento. Los ensayos EYT2013-14, EYT2014-15 y EYT2015-16 estuvieron formados por 983, 942 y 829 genotipos respectivamente. La extracción de ADN y la amplificación por PCR se realizó como lo describen Dreisigacker *et al.* (2016). Los ciclos de PCR se realizaron a una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C durante 15 min, seguido por 10 ciclos con rampa de temperatura (95 °C durante 20 s, 65 °C durante 25 s inicialmente y disminuyendo en 1 °C en cada ciclo posterior, seguido de 30 ciclos de alineamiento (95 °C durante 10 s y 57 °C durante 60 s). No fue necesario un paso de extensión porque los amplicones esperados tuvieron un tamaño de 50 pares de bases.

Las placas de PCR fueron leídas en PHERAstar Plus (BMG LABTECH, Ortenberg, Alemania) y las lecturas de genotipado se analizaron en el software KlusterCaller TM (LGC Genomics, Teddington, Reino Unido). El genotipado KASP de los EYT se comparó con los resultados previos del genotipado reportado por Sehgal *et al.* (2019).

### Validación de marcadores KASP mediante GWAS

La asociación de los marcadores KASP diseñados se probó con el peso de mil granos en cuatro colecciones de trigo harinero, mediante GWAS. Se incluyeron los EYT descritos anteriormente y el panel WAMI (wheat association mapping initiative). WAMI es un conjunto diverso de trigos harineros de primavera que consta de 287 líneas avanzadas liberadas por el CIMMYT (Lopes *et al.*, 2015).

Los paneles de validación EYT2013-14, EYT2014-15 y EYT2015-16 se genotiparon anteriormente usando el método de genotipado por secuenciación (GBS-genotyping by sequencing) como lo describen Poland *et al.* (2012) y Rutkoski *et al.* (2016), los datos fueron proporcionados por Sehgal *et al.* (2019). El panel WAMI fue genotipado con Illumina iSelect 90K SNP Assay, los datos fueron proporcionados por Sukumaran *et al.* (2015). A los resultados de secuenciación se les adicionó el genotipado KASP con los dos marcadores del Cuadro 1, el haplotipo fue formado al unir los resultados de los dos SNP como un solo marcador. Los marcadores con una frecuencia de alelos menores a 0.05 fueron eliminados. En el Cuadro 2

se muestra el total de individuos y número de marcadores finales utilizados en los GWAS.

El fenotipado de EYT y WAMI se realizó en el Campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB), Ciudad Obregón, Sonora (noreste de México). El cultivo se realizó en condiciones de riego. Los EYT forman parte de los ensayos de rendimiento de trigo harinero de CIMMYT en sus respectivos años (2013, 2014 y 2015) y fueron evaluados en un diseño  $\alpha$ -látice con tres repeticiones, la unidad experimental consistió de surcos de 2.8 m sembrados a doble hilera. Sehgal *et al.* (2019, 2020) proporcionan amplia información acerca de las evaluaciones fenotípicas de los EYT.

Los ensayos WAMI fueron sembrados en los años 2010, 2011 y 2013 en un diseño experimental  $\alpha$ -látice con dos repeticiones, la unidad experimental consistió de surcos de 2 m sembrados a doble hilera. Lopes *et al.* (2015) proporcionan información adicional acerca de las evaluaciones fenotípicas de WAMI.

En EYT se evaluó el peso de mil granos (g) y en WAMI peso de mil granos y rendimiento ( $\text{g m}^{-2}$ ), siguiendo la metodología de Pask *et al.* (2013). De los valores fenotípicos evaluados en WAMI se obtuvieron las mejores estimaciones lineales insesgadas (BLUPs-best linear unbiased predictions), mientras que en EYT se obtuvieron las medias ajustadas como se describe en Sehgal *et al.* (2017).

El mapeo de asociación se realizó en el software TASSEL 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007) <https://tassel.bitbucket.io/>. El efecto de la estructura de la población se trató mediante análisis de componentes principales, se emplearon los primeros tres componentes principales, los cuales se determinaron mediante la librería factoextra de R (Kassambara y Mundt, 2017), los componentes principales fueron incluidos en el modelo lineal generalizado (GLM).

### Validación del efecto del QTL en familias endogámicas heterogéneas

Se construyeron 10 familias endogámicas HIF (Cuadro 3) siguiendo el método de Tuinstra *et al.* (1997). En la primera siembra se utilizaron semillas de generación  $F_8$ , de 10 cruces de trigo harinero de primavera, desarrollado en el CIMMYT y se identificaron como generación  $HIF_{1:9}$ . La siembra se realizó en macetas bajo condiciones de invernadero y todas las plantas fueron genotipadas con los marcadores KASP diseñados, para identificar plantas segregantes en el QTL *HAP-6A-13*. Se seleccionó una planta heterocigota de cada cruce y se autopolinizó. La siguiente generación ( $HIF_{2:10}$ ) fue sembrada en condiciones similares a la siembra anterior, y dentro de cada familia se seleccionaron las plantas homocigotas para el QTL *HAP-6A-13*. En las dos generaciones posteriores se realizaron las evaluaciones fenotípicas en campo,  $HIF_{3:11}$  fue evaluada en El Batán, Estado de México (centro de México) y  $HIF_{4:12}$  fue evaluada en Ciudad Obregón, Sonora (noreste de México), en ambos ambientes hubo un manejo similar del cultivo.

La generación  $HIF_{3:11}$  fue sembrada en campo abierto el 3 de junio de 2020 en la Estación Experimental El Batán (CIMMYT), Texcoco, Estado de México, bajo un diseño experimental de bloques completos al azar con dos repeticiones. En cada bloque se aleatorizaron 20 unidades experimentales, las cuales son producto de las 10 HIF (para cada familia existía una NIL con el alelo favorable TG y otra con el alelo desfavorable CA). La unidad experimental fue un surco de 2 m sembrado a doble hilera. El cultivo se manejó en condiciones de riego. La cosecha se realizó de forma manual y la trilla mecánicamente.

La generación  $HIF_{4:12}$  fue sembrada en el campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB), Ciudad Obregón, Sonora. La siembra se realizó el 17 de diciembre de 2020, la unidad experimental fue un surco de 1.5 m sembrado

**Cuadro 1. Iniciadores KASP utilizados.**

SNP	Alelo favorable	Secuencia de iniciadores directos alelo-específicos		Alelo común
C/T	T	ctgttctcagcccaacatgtc	ctgttctcagcccaacatggt	ggttaggtgggctgcagg
A/G	G	tctcagcccaacatgtctacaaa	tctcagcccaacatgtctacacag	gaggggttaggtgggctgc

**Cuadro 2. Colecciones de trigo utilizadas en la validación de marcadores KASP.**

Colecciones de trigo	Número de individuos	Número de marcadores
EYT2013-14	983	13,770
EYT2014-15	942	13,768
EYT2015-16	829	13,768
WAMI	287	15,740

a doble hilera. El diseño experimental, manejo del cultivo, cosecha y trilla fueron similares a lo descrito para la generación HIF<sub>3,11</sub>.

El rendimiento, peso de mil granos, longitud, ancho y grosor de grano, se midieron como se describe en Pask *et al.* (2013).

Para estudiar simultáneamente el efecto de las familias y los haplotipos sobre las variables fenotípicas rendimiento, peso de mil granos, longitud, ancho y grosor de grano, se utilizó el siguiente modelo:

$$y_{ijr} = \mu + \tau_r + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijr}$$

Donde  $y_{ijr}$  es una observación de la variable fenotípica

estudiada,  $\mu$  es la media general,  $\tau_r$  el efecto del r-ésimo bloque con  $r = 1, 2$ ;  $\alpha_i$  el efecto del nivel  $i$  en el factor familia con  $i = 1, \dots, 10$ ;  $\beta_j$  el efecto del nivel  $j$  en el factor haplotipo con  $j = 1, 2$ ;  $(\alpha\beta)_{ij}$  el efecto de la interacción entre ambos factores; los factores y su interacción se consideraron como efectos fijos, en  $\varepsilon_{ijr}$  las desviaciones aleatorias alrededor de las medias, las cuales asumen una distribución normal independiente e idéntica con media 0 y varianza  $\sigma^2$ .

Bajo las pruebas de hipótesis del análisis de varianza de dos factores, se pudo concluir que las medias de las variables fenotípicas estudiadas difirieron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) en al menos dos de las medias de los niveles de cada factor; con esta conclusión se aplicó la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) para discernir cuales de las diferencias de los valores promedio de los haplotipos en cada familia fueron

**Cuadro 3. Pedigrí de las familias endogámicas heterogéneas evaluadas.**

HIF	Haplotipo	Pedigrí
HIF1	CA (-)	BAJ #1/3/TRCH/SRTU//KACHU
	TG (+)	BAJ #1/3/TRCH/SRTU//KACHU
HIF2	CA (-)	SAUAL/3/KAUZ/PASTOR//PBW343/4/TRCH/SRTU//KACHU/5/SAUAL//PI 610750/ATTILA/3/SAUAL
	TG (+)	SAUAL/3/KAUZ/PASTOR//PBW343/4/TRCH/SRTU//KACHU/5/SAUAL//PI 610750/ATTILA/3/SAUAL
HIF3	CA (-)	CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//BORL95/3/PRL/SARA//TSI/VEE#5/4/FRET2/6/MTRWA92.161/PRINIA/5/SERI*3//RL6010/4*YR/3/PASTOR/4/BAV92
	TG (+)	CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//BORL95/3/PRL/SARA//TSI/VEE#5/4/FRET2/6/MTRWA92.161/PRINIA/5/SERI*3//RL6010/4*YR/3/PASTOR/4/BAV92
HIF4	CA (-)	PRL/2*PASTOR//SUNSTATE/3/MUNAL #1/4/OTUS//PRL/2*PASTOR
	TG (+)	PRL/2*PASTOR//SUNSTATE/3/MUNAL #1/4/OTUS//PRL/2*PASTOR
HIF5	CA (-)	HEILO//MILAN/MUNIA/8/2*NG8201/KAUZ/4/SHA7//PRL/VEE#6/3/FASAN/5/MILAN/KAUZ/6/ACHYUTA/7/PBW343*2/KUKUNA
	TG (+)	HEILO//MILAN/MUNIA/8/2*NG8201/KAUZ/4/SHA7//PRL/VEE#6/3/FASAN/5/MILAN/KAUZ/6/ACHYUTA/7/PBW343*2/KUKUNA
HIF6	CA (-)	SOKOLL//W15.92/WBLL1/3/BAVIS
	TG (+)	SOKOLL//W15.92/WBLL1/3/BAVIS
HIF7	CA (-)	SAUAL/3/KAUZ/PASTOR//PBW343/4/TRCH/SRTU//KACHU
	TG (+)	SAUAL/3/KAUZ/PASTOR//PBW343/4/TRCH/SRTU//KACHU
HIF8	CA (-)	TRCH/SRTU//KACHU*2/3/KINGBIRD #1
	TG (+)	TRCH/SRTU//KACHU*2/3/KINGBIRD #1
HIF9	CA (-)	SUP152/KACHU/3/TRCH/SRTU//KACHU
	TG (+)	SUP152/KACHU/3/TRCH/SRTU//KACHU
HIF10	CA (-)	BL3264*2/PAURAQ
	TG (+)	BL3264*2/PAURAQ

significativamente distintos. Para obtener los resultados de estos análisis se usó el programa R (R Core Team, 2020).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diseño de marcadores moleculares

Se desarrollaron y verificaron dos marcadores KASP (Cuadro 1), a partir de secuencias GBS reportadas en Sehgal *et al.* (2019). Los ensayos KASP pudieron diferenciar genotipos en grupos separados, como se esperaba (Figura 1). Al comparar el genotipado GBS contra KASP se obtuvo una coincidencia del 96 % para el SNP C/T y 95 % para el SNP A/G.

Las diferencias en el genotipado correspondieron principalmente a los resultados reportados como heterocigotos, lo cual puede deberse a limitantes de la tecnología GBS, como la poca profundidad de secuenciación y la secuenciación multiplexada o por la heterocigosidad residual dentro y entre los lotes de semillas, la cual no es tan infrecuente (Dreisigacker *et al.*, 2020). En cuanto a datos faltantes, el genotipado KASP tuvo un porcentaje de datos perdidos del 6 %, mientras que en el GBS fue del 59 %.

Los dos métodos de genotipado tienen resultados similares para los polimorfismos C/T y A/G, esto prueba que los marcadores KASP amplifican el mismo locus que GBS. El buen desempeño de los ensayos KASP los convierte en herramientas útiles en la selección asistida, y al ser una plataforma de genotipado de alto rendimiento, los ensayos KASP pueden utilizarse para analizar un gran conjunto de accesiones de trigo.

Los polimorfismos C/T y A/G generaron los haplotipos TG, CA y CG que se encontraron en frecuencias de 30.3, 62.6 y 6.9 % respectivamente en el panel WAMI y frecuencias de 47.8, 32.4 y 19.7 % respectivamente en los EYT analizados. Considerando que WAMI está formado por líneas liberadas desde hace 35 años y los EYT contienen líneas más recientes, se demuestra la existencia de selección indirecta para el haplotipo favorable TG.

### Estudio de GWAS

En el mapeo de asociación, los dos marcadores KASP mostraron asociación significativa con el peso de mil granos en las cuatro colecciones de trigo analizadas (Cuadro 4) y, al analizar los dos marcadores como un haplotipo, se obtuvieron asociaciones más significativas que los análisis de marcador individual, esto fue así en seis de los siete análisis. La variación fenotípica explicada por el marcador ( $R^2$ ) osciló entre 4.6 y 5.9 % en las cuatro colecciones de trigo analizadas.

Debido al bajo  $R^2$  del marcador (menos de 10 %), se considera como un QTL menor para peso de grano y, dado que el QTL tuvo significancia estadística en las cuatro colecciones de trigo analizadas, se sugiere que el QTL *HAP-6A-13* es estable; por lo tanto, ofrece potencial de ser usado para la pirimidación de alelos favorables a través de selección asistida por marcadores.

La asociación de los marcadores KASP con el rendimiento sólo se analizó en WAMI, el análisis basado en haplotipos mostró significancia estadística en los años 2010 y 2011, no así en 2013, el valor promedio de  $R^2$  del marcador para estos tres años fue de 2 % (Cuadro 5). Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento propio de los

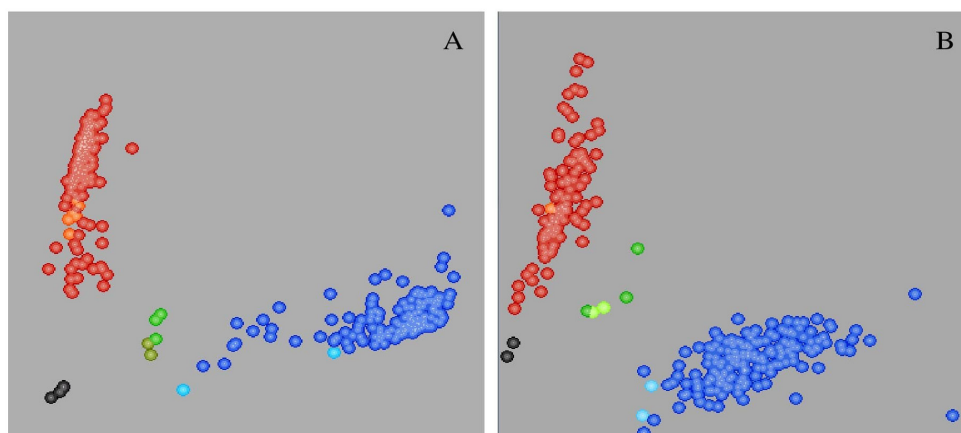


Figura 1. Gráficos de dispersión para ensayos KASP mostrando el agrupamiento de genotipos de trigo en los ejes X (FAM) y Y (HEX). A) ensayo KASP para SNP C/T, B) ensayo KASP para SNP A/G. Puntos de color rojo corresponden a genotipos con el alelo HEX, puntos en color azul corresponden a genotipos con el alelo FAM, puntos de color verde corresponden a genotipos heterocigotos y puntos de color negro corresponden a controles sin ADN.

QTL menores, los cuales tienen un efecto pequeño en el fenotipo y son afectados por las interacciones ambientales y epistáticas al punto de enmascarar su efecto (Zhang *et al.*, 2016). A pesar de las limitaciones de los QTL menores, éstos pueden usarse en conjunto con otros QTL para producir de manera aditiva o sinérgica incrementos en peso de grano y rendimiento.

La mayor significancia de los análisis basados en haplotipos comparados con los marcadores individuales puede deberse a que los haplotipos tienen el potencial de estar en mayor desequilibrio de ligamiento con las variantes causales que los SNP individuales (Sehgal y Dreisigacker, 2019).

#### Validación en familias endogámicas heterogéneas

El análisis de varianza reveló efectos significativos ( $P \leq 0.05$ ) del ambiente y de familia para los caracteres rendimiento, peso de mil granos, ancho y grosor de grano (Cuadro 6). El genotipo y el ambiente fueron los factores más importantes que explicaron la variación encontrada. El efecto del ambiente fue particularmente alto para

rendimiento (96 %) y ancho de grano (51.9 %). El efecto de familia se atribuye al fondo genético, los mayores efectos del fondo genético fueron para largo de grano (82.4 %) y peso de mil granos (66 %), lo que demuestra que el fondo genético está afectando el comportamiento del QTL HAP-6A-13.

La comparación de medias para los caracteres fenotípicos mostró un efecto significativo ( $P \leq 0.05$ ) del haplotipo TG en peso de mil granos en la familia HIF 3 y en longitud de grano en las familias HIF 3, HIF 5 y HIF 6, y no hubo un efecto significativo de algún haplotipo para rendimiento, ancho y grosor de grano (Cuadro 7).

El haplotipo TG confirió superioridad en peso de mil granos en las familias HIF 3 en los ambientes del centro y noreste de México ( $P \leq 0.05$ ), donde dicho haplotipo TG confirió incrementos del 10.9 %.

Los genotipos portadores del haplotipo TG mostraron un efecto superior en longitud del grano en las 10 familias cuando se cultivaron en el centro de México y en ocho familias cuando se cultivaron en el noreste de México,

**Cuadro 4. Resumen de resultados de GWAS con marcadores individuales y haplotipos para validar la asociación de los marcadores KASP con el peso de mil granos en cuatro colecciones de trigo.**

	Colección de trigo	P-valor	Marcador-R <sup>2</sup>
Marcador KASP C/T	EYT2013-14	2.70E-08	0.03670
	EYT2014-15	5.91E-04	0.01512
	EYT2015-16	0.0055	0.00927
	WAMI 2010	1.92E-04	0.03413
	WAMI 2011	6.94E-04	0.03188
	WAMI 2013	0.00929	0.02013
Marcador KASP A/G	EYT2013-14	7.64E-09	0.03873
	EYT2014-15	3.95E-09	0.03506
	EYT2015-16	1.07E-08	0.03923
	WAMI 2010	7.39E-06	0.05922
	WAMI 2011	6.57E-05	0.05450
	WAMI 2013	4.17E-04	0.04708
Haplotipo	EYT2013-14	3.95E-10	0.05077
	EYT2014-15	1.90E-10	0.04661
	EYT2015-16	4.87E-09	0.04841
	WAMI 2010	8.95E-06	0.05902
	WAMI 2011	1.18E-04	0.05177
	WAMI 2013	3.51E-04	0.04850

aunque sólo hubo significancia estadística ( $P \leq 0.05$ ) en las familias HIF 3, HIF 5 y HIF 6, donde el haplotipo TG confirió incrementos del 2.45, 1.96 y 2.07 % respectivamente.

Estudios anteriores de QTLs que controlan longitud del grano han reportado incrementos similares a los de este estudio para longitud de grano; por ejemplo, Guan *et al.* (2019) construyeron NIL para el QTL *QTgw.cau-4A.3*, el cual se había reportado como controlador del tamaño del grano; las NIL fueron evaluadas en tres ambientes durante dos años, el alelo favorable de este QTL confirió incrementos en longitud de grano desde 0.74 hasta 3.87 %. En otra investigación realizada para validar el QTL *QTgw.caas-5B* mediante NIL el alelo favorable (5B+) confirió incrementos de 2 a 10 % en longitud de grano (Zhao *et al.*, 2021).

Previo a este estudio, sólo se había analizado la asociación del QTL *HAP-6A-13* con el peso de mil granos; con los nuevos datos y análisis realizados en esta investigación se añade que el QTL también afecta la longitud de grano. Estudios posteriores para el QTL *HAP-6A-13* pueden incluir GWAS de caracteres morfométricos para validar el efecto en longitud de grano.

La asociación significativa encontrada mediante GWAS para peso de grano y rendimiento, pero con falta de significancia ( $P > 0.05$ ), al comparar líneas isogénicas se demuestra que el estudio de QTLs menores que afectan caracteres complejos sigue siendo un reto para la genética cuantitativa. El desempeño inestable de los QTLs menores son resultado de las interacciones del QTL con el ambiente y del fondo genético, el cual propicia interacciones complejas con otros QTLs.

**Cuadro 5. Resumen de resultados de GWAS con marcadores individuales y haplotipos para validar la asociación de los marcadores KASP con rendimiento en WAMI.**

	Año de cultivo	P-valor	Marcador_R <sup>2</sup>
Marcador KASP C/T	2010	3.57E-04	0.04059
	2011	0.00301	0.02652
	2013	0.24788	0.00466
Marcador KASP A/G	2010	1.79E-04	0.05491
	2011	0.01197	0.02710
	2013	0.07567	0.01831
Haplotipos	2010	2.07E-04	0.05396
	2011	0.00734	0.03038
	2013	0.30965	0.00846

**Cuadro 6. Efecto de ambiente, familia, haplotipo y sus interacciones, expresados como porcentajes de la suma total de cuadrados del ANOVA.**

Fuente de variación	Ren	PMG	LG	AG	GG
Ambiente	96.00 **	21.23 **	0.27	51.91 **	3.16 **
Familia	0.47	66.09 **	82.45 **	39.76 **	0.82 **
Haplotipo	0.07	0.34	4.91 **	0.11	0
Ambiente × Repetición	0.19	0.59 *	0.02	0.08	0
Ambiente × Familia	0.47	2.91 *	4.28 **	2.91 **	0.04
Ambiente × Haplotipo	0.07	0.00	0.88 **	0.00	0
Familia × Haplotipo	0.29	3.09 *	2.28 *	2.16 **	0.03
Ambiente × Familia × Haplotipo	0.29	0.78	1.31	0.37	0.02
Residual	2.14	4.96	3.58	2.70	0.12

Ren: rendimiento, PMG: peso de mil granos, LG: longitud de grano, AG: ancho de grano, GG: grosor de grano. Los asteriscos indican la significancia (\*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ ).

**Cuadro 7. Comparación de medias de rendimiento (Ren), peso de mil granos (PMG), longitud de grano (LG), ancho de grano (AG) y grosor de grano (GG) en 10 HIF portadoras de los haplotipos TG y CA del QTL *HAP-6A-13* evaluadas en los ambientes Batán y Ciudad Obregón, Mexico.**

Familia	Ambiente	Haplotipo	Ren (g)	PMG (g)	LG (mm)	AG (mm)	GG (mm)
HIF 1	Batán	CA (-)	849	43.75	6.4	3.52	3.38
		TG (+)	918.5	44.9	6.54	3.51	3.38
	Obregón	CA (-)	2070	42.8	6.54	3.35	3.01
		TG (+)	2034	42.3	6.5	3.3	3.01
		Efecto del QTL	ns	ns	ns	ns	ns
HIF 2	Batán	CA (-)	798.5	41.4	6.36	3.45	3.35
		TG (+)	742.5	40.6	6.49	3.43	3.28
	Obregón	CA (-)	2015	38.25	6.29	3.28	2.96
		TG (+)	1932	40.35	6.41	3.31	2.97
		Efecto del QTL	ns	ns	ns	ns	ns
HIF 3	Batán	CA (-)	957.5	39.4	6.26	3.39	3.24
		TG (+)	921	44.8	6.42	3.52	3.34
	Obregón	CA (-)	2130	35.8	6.38	3.09	2.82
		TG (+)	2054	38.6	6.53	3.15	2.87
		Efecto del QTL	ns	10.9 % *	2.45 % *	ns	ns
HIF 4	Batán	CA (-)	987.5	49.75	6.69	3.65	3.38
		TG (+)	890.5	51.55	6.72	3.7	3.43
	Obregón	CA (-)	1883	43.75	6.76	3.32	3
		TG (+)	1932	45.65	6.77	3.4	3
		Efecto del QTL	ns	ns	ns	ns	ns
HIF 5	Batán	CA (-)	1037.5	44.5	6.54	3.47	3.24
		TG (+)	886.5	45.15	6.74	3.47	3.24
	Obregón	CA (-)	2030	40.05	6.67	3.15	2.92
		TG (+)	2029	40.05	6.73	3.08	2.84
		Efecto del QTL	ns	ns	1.96 % *	ns	ns
HIF 6	Batán	CA (-)	977	35	6.48	3.2	3.09
		TG (+)	830	36.35	6.62	3.28	3.08
	Obregón	CA (-)	1889	33.5	6.54	2.89	2.63
		TG (+)	1926	32.65	6.67	2.97	2.57
		Efecto del QTL	ns	ns	2.07 % *	ns	ns
HIF 7	Batán	CA (-)	1037	42.35	6.51	3.43	3.27
		TG (+)	927	39.55	6.53	3.36	3.2
	Obregón	CA (-)	2022	35.5	6.43	3.1	2.87
		TG (+)	1850	34.3	6.47	3.06	2.82
		Efecto del QTL	ns	ns	ns	ns	ns



Cuadro 7. Continuación.

Familia	Ambiente	Haplotipo	Ren (g)	PMG (g)	LG (mm)	AG (mm)	GG (mm)
HIF 8	Batán	CA (-)	821.5	44.4	6.41	3.42	3.38
		TG (+)	865	43.2	6.53	3.39	3.3
	Obregón	CA (-)	1933	39.9	6.63	3.21	2.87
		TG (+)	2022	38.95	6.52	3.13	2.89
	Efecto del QTL		ns	ns	ns	ns	ns
HIF 9	Batán	CA (-)	915.5	38.15	6.22	3.33	3.15
		TG (+)	1064	39.8	6.28	3.37	3.16
	Obregón	CA (-)	2017	33.25	6.13	3.06	2.78
		TG (+)	1920	35.1	6.17	3.15	2.88
	Efecto del QTL		ns	ns	ns	ns	ns
HIF 10	Batán	CA (-)	978	48.35	6.68	3.6	3.37
		TG (+)	824.5	47.1	6.79	3.58	3.29
	Obregón	CA (-)	2140	41.95	6.71	3.3	2.94
		TG (+)	1903	41.75	6.75	3.32	2.96
	Efecto del QTL		ns	ns	ns	ns	ns

Los asteriscos indican las diferencias significativas entre haplotipos dentro de una misma familia (\*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$ ), ns: no significativo. El rendimiento se expresa como gramos obtenidos de la unidad experimental.

## CONCLUSIONES

El diseño de ensayos KASP a partir de secuencias GBS fue exitoso, los resultados de ambos métodos de genotipado fueron comparados y se obtuvieron altas similitudes, KASP tuvo mejor desempeño en el genotipado de individuos heterocigotos y tuvo menor cantidad de datos perdidos. *HAP-6A-13* es un QTL menor, que afecta el peso de mil granos a través del incremento en longitud de grano, su expresión está sujeta al fondo genético, interacciones ambientales e interacciones entre genotipo-ambiente. Para el aprovechamiento del QTL *HAP-6A-13* en un programa de mejoramiento genético se deben evaluar las combinaciones posibles con otros alelos favorables para peso de grano y rendimiento y seleccionar sólo las combinaciones que actúan de manera sinérgica para la piramidación de alelos favorables.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a Guillermo García Barrios para realizar sus estudios de Maestría, al Dr. Juan A. Burgueño Ferreira por su apoyo en los análisis estadísticos, a María Itria Ibba y al equipo del laboratorio de calidad y química de cereales

de CIMMYT por su colaboración en los análisis fenotípicos.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bradbury P. J., Z. Zhang, D. E. Kroon, T. M. Casstevens, Y. Ramdoss and E. S. Buckler (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>
- Dreisigacker S., D. Sehgal, A. E. Reyes-Jaimez, B. Luna-Garrido, S. Muñoz-Zavala, C. Núñez-Rios, ... and S. Mall (2016) CIMMYT Wheat Molecular Genetics: Laboratory Protocols and Applications to Wheat Breeding. CIMMYT. México. 142 p.
- Dreisigacker S., Y. Xiao, D. Sehgal, C. Guzman, Z. He, X. Xia and R. J. Peña (2020) SNP markers for low molecular glutenin subunits (LMW-GSs) at the *Glu-A3* and *Glu-B3* loci in bread wheat. *PLoS ONE* 15:e0233056, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233056>
- Guan P., N. Di, Q. Mu, X. Shen, Y. Wang, X. Wang, ... and H. Peng (2019) Use of near-isogenic lines to precisely map and validate a major QTL for grain weight on chromosome 4AL in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 132:2367-2379, <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03359-4>
- Kassambara A. and F. Mundt (2017) Package 'factoextra'. Extract and visualize the results of multivariate data analyses. <http://www.sthda.com/english/rpkgs/factoextra>.
- Li F., W. Wen, J. Liu, Y. Zhang, S. Cao, Z. He, ... and X. Xia (2019) Genetic architecture of grain yield in bread wheat based on genome-wide association studies. *BMC Plant Biology* 19:168, <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1781-3>
- Lopes M. S., S. Dreisigacker, R. J. Peña, S. Sukumaran and M. P. Reynolds (2015) Genetic characterization of the wheat association mapping initiative (WAMI) panel for dissection of complex traits in spring wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 128:453-464,

- <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2444-2>
- Pask A., J. Pietragalla, D. M. Mullan, P. N. Chávez y M. Reynolds (2013)** Fitomejoramiento Fisiológico II: Una Guía de Campo para la Caracterización Fenotípica de Trigo. CIMMYT. México, D. F. 132 p.
- Poland J., J. Endelman, J. Dawson, J. Rutkoski, S. Wu, Y. Manes, ... and J. L. Jannink (2012)** Genomic selection in wheat breeding using genotyping-by-sequencing. *Plant Genome* 5:103-113, <https://doi.org/10.3835/plantgenome2012.06.0006>
- Pumphrey M. O., R. Bernardo and J. A. Anderson (2007)** Validating the *Fhb1* QTL for fusarium headlight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. *Crop Science* 47:200-206, <https://doi.org/10.2135/cropsci2006.03.0206>
- R Core Team (2020)** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <https://www.R-project.org/>
- Ramirez-Gonzalez R. H., C. Uauy and M. Caccamo (2015)** PolyMarker: a fast polyploid primer design pipeline. *Bioinformatics* 31:2038-2039, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv069>
- Rutkoski J., J. Poland, S. Mondal, E. Autrique, L. González-Perez, J. Crossa, ... and R. Singh (2016)** Canopy temperature and vegetation indices from high-throughput phenotyping improve accuracy of pedigree and genomic selection for grain yield in wheat. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 6:2799-2808, <https://doi.org/10.1534/g3.116.032888>
- Sehgal D., E. Autrique, R. Singh, M. Ellis, S. Singh and S. Dreisigacker (2017)** Identification of genomic regions for grain yield and yield stability and their epistatic interactions. *Scientific Reports* 7:41578, <https://doi.org/10.1038/srep41578>
- Sehgal D. and S. Dreisigacker (2019)** Haplotypes-based genetic analysis: benefits and challenges. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 23:803-808, <https://doi.org/10.18699/VJ19.37-o>
- Sehgal D., S. Mondal, C. Guzman, G. Garcia-Barrios, C. Franco, R. Singh and S. Dreisigacker (2019)** Validation of candidate gene-based markers and identification of novel loci for thousand-grain weight in Spring bread wheat. *Frontiers in Plant Science* 10:1189, <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01189>
- Sehgal D, U. Rosyara, S. Mondal, R. Singh, J. Poland and S. Dreisigacker (2020)** Incorporating genome-wide association mapping results into genomic prediction models for grain yield and yield stability in CIMMYT Spring bread wheat. *Frontiers in Plant Science* 11:197, <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00197>
- Simmonds J., P. Scott, M. Leverington-Waite, A. S. Turner, J. Brinton, V. Korzun, ... and C. Uauy (2014)** Identification and independent validation of a stable yield and thousand grain weight QTL on chromosome 6A of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology* 14:191, <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0191-9>
- Sukumaran S., S. Dreisigacker, M. Lopes, P. Chavez and M. P. Reynolds (2015)** Genome-wide association study for grain yield and related traits in an elite spring wheat population grown in temperate irrigated environments. *Theoretical and Applied Genetics* 128:353-363, <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2435-3>
- Tuinstra M. R., G. Ejeta and P. Goldsbrough (1997)** Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* 95:1005-1011, <https://doi.org/10.1007/s001220050654>
- Zhang H. W., Y. Y. Fan, Y. J. Zhu, J. Y. Chen, S. B. Yu and J. Y. Zhuang (2016)** Dissection of the qTGW1. 1 region into two tightly-linked minor QTLs having stable effects for grain weight in rice. *BMC Genetics* 17:98, <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0410-5>
- Zhao D., L. Yang, D. Liu, J. Zeng, S. Cao, X. Xia, ... and Y. Zhang (2021)** Fine mapping and validation of a major QTL for grain weight on chromosome 5B in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 134:3731-3741, <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03925-9>