

OPTIMIZACIÓN DE MAPEO DE LOCI DE CARACTERES CUANTITATIVOS ASOCIADOS A EFICIENCIA DE USO DE NITRÓGENO EN MAÍZ E IDENTIFICACIÓN DE GENES CANDIDATOS

Manzelli, Gisela Andrea; Mandolino, Cecilia Inés

giselamanzelli@hotmail.com; ceciliamandolino@gmail.com;

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires

Resumen

La absorción de nitrógeno por las plantas tiene un papel importante en su crecimiento. Los fertilizantes nitrogenados son una herramienta útil para aumentar el rendimiento de los cultivos, pero su uso indiscriminado puede causar severos daños ambientales y económicos. Por lo tanto, el mejoramiento para la adaptación a tipos de estrés como la falta de nitrógeno es muy importante. La mayoría de los caracteres más relevantes para el mejoramiento vegetal son cuantitativos. El mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) permite identificar regiones del genoma que explican parte de la variación fenotípica observada.

El objetivo de este trabajo fue aumentar la precisión de la localización de QTL para eficiencia de uso de nitrógeno (EUN) detectados en los cromosomas 1, 8 y 9 de maíz sobre el mapa genético elaborado a partir de la población de 181 líneas endocriadas recombinantes (RILs) derivada del cruzamiento B100xLP2 incrementando el número de microsatélites o SSR (*simple sequence repeats*) e INDEL (inserciones-delecciones).

En la caracterización genotípica se probaron 149 marcadores moleculares en los parentales, de los cuales 40 fueron usados para evaluar la población de RILs. La incorporación de marcadores nuevos a los mapas de ligamiento permitió una mejor representación de los cromosomas y mayor precisión en la localización de los QTL.

El mapeo de QTL se realizó mediante mapeo por intervalo compuesto y se detectaron 11 QTL en los cromosomas 1, 8 y 9.

Se identificaron 3155 genes dentro de los intervalos de los QTL detectados y se clasificaron según su función. El 67% de los genes corresponden a proteínas con función putativa. Se identificaron genes relacionados al metabolismo del nitrógeno, respuesta al estrés debido a la falta de nitrógeno en el suelo y transporte de aminoácidos.

Palabras clave: Eficiencia de uso de nitrógeno, Líneas endocriadas recombinantes, *Loci* de caracteres cuantitativos, maíz, marcadores moleculares.

Introducción

El maíz es uno de los cultivos alimentarios más importantes en el mundo, es también un componente clave en la alimentación animal y se utiliza ampliamente en productos industriales (Shiferaw et al., 2011).

La futura demanda de alimentos seguirá exigiendo la expansión continua de la superficie sembrada y las mejoras en los rendimientos, basadas en nuevas variedades vegetales y tecnologías de cultivo.

Una de las fuentes principales para aumentar la producción de cultivos es la mejora del rendimiento. Uno de los medios principales para aumentar los rendimientos es la aplicación de más fertilizantes (Harrison, 2002).

Los fertilizantes nitrogenados han contribuido de manera significativa al aumento en la producción de alimentos. El nitrógeno (N) aportado por estos fertilizantes es el principal elemento mineral absorbido por las plantas e interviene en procesos fisiológicos esenciales para su crecimiento y desarrollo (Cárdenas-Navarro et al., 2004). El N disponible en el suelo está presente típicamente en forma de nitrato y amonio, los cuales son muy móviles y las plantas cultivadas solo son capaces de utilizar el 30-40% del N aplicado. Por lo tanto, más de 60% del N del suelo se pierde a través una combinación de lixiviación hacia aguas subterráneas,

escurrimiento superficial, desnitrificación, volatilización y consumo microbiano. De este modo, la utilización excesiva implica riesgos de contaminación ambiental y degradación de la calidad del suelo (Raun y Johnson, 1999).

La mejora genética del cultivo de maíz por una mayor EUN permitiría el logro de mejores rendimientos con menor aplicación de fertilizantes en suelos pobres en el nutriente y/o una mayor respuesta por unidad de N aplicado como fertilizante (Arellano et al., 1996).

La EUN se define como la materia seca producida por unidad de N disponible en el suelo. En el maíz esta eficiencia depende de numerosos procesos, que incluyen la absorción de N por las raíces, la translocación a las hojas y la removilización de N desde hojas y tallos hacia los granos. Por tal motivo, el mejoramiento genético en EUN en maíz depende del mejoramiento en uno o más de estos procesos (Agrama, 2006).

La mayoría de los caracteres de importancia agronómica son heredados cuantitativamente y se conocen como caracteres cuantitativos. Los caracteres cuantitativos son controlados por varios genes cada uno de los cuales, en general, contribuyen al carácter con un pequeño efecto. Las regiones genómicas que comprenden genes que controlan la expresión de un carácter cuantitativo se conocen como QTL (Boopathi, 2013).

Los marcadores moleculares tienen varias ventajas sobre los marcadores fenotípicos tradicionales ya que permiten la selección indirecta del rasgo de interés a través de marcadores moleculares ligados a ese rasgo. Los SSR reflejan polimorfismo basado en el número de unidades de repetición en una región definida del genoma, entre 2 y 6 pares de bases (pb). Las secuencias de nucleótidos que flanquean la repetición se utilizan para diseñar cebadores para amplificar las secuencias. Este tipo de marcadores son altamente reproducibles, muy útiles para la detección rápida y precisa de *loci* polimórficos, y la información podría ser utilizada para el desarrollo de un mapa genético (Mohan et al., 1997). Los INDEL pueden producirse por deslizamiento de las cadenas nucleotídicas durante la replicación o por entrecruzamiento desigual (Levinson y Gutman, 1987), pueden ser tratados como marcadores bialélicos y utilizados para el mapeo genético, el polimorfismo INDEL puede analizarse fácilmente como diferencias en longitud de los productos de PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) (Bhatramakki et al., 2002)

Uno de los principales usos de marcadores moleculares en la investigación agrícola ha sido la construcción de mapas de ligamiento. Los mapas de ligamiento se utilizan para la identificación de regiones cromosómicas que contienen genes que controlan los

caracteres simples y cuantitativos a través de análisis de QTL. El proceso de construcción de mapas de ligamiento y la realización de análisis de QTL para identificar regiones genómicas asociadas con caracteres se conoce como mapeo de QTL (Collard et al., 2005).

El mapeo de QTL se basa en el principio de que algunos genes y ciertos marcadores están ligados y cosegregan a pesar de la recombinación durante la meiosis, permitiendo su análisis en la progenie. Los genes o marcadores que están fuertemente ligados serán transmitidos juntos de los padres a la progenie con más frecuencia que los genes o marcadores que se encuentran más separados (Paterson, 1996).

En estudios anteriores, se ha logrado identificar 17 QTL asociados a EUN y caracteres relacionados en una población de RILs de maíz derivada del cruzamiento de las líneas B100 (dentado, norteamericano) y LP2 (flint, caribeño-argentino) (Mandolino, 2015). El fenotipado de la población de RILs se realizó a través de dos años de ensayos y se usaron 94 marcadores moleculares neutros SSR en el genotipado. La mayoría de los QTL detectados se localizaron sobre los cromosomas 1, 8 y 9 de maíz. Los QTL para diferentes caracteres compartieron, al menos en parte, el intervalo entre marcadores flanqueantes, lo que podría deberse a la existencia de un único QTL con efectos pleiotrópicos.

Para el carácter EUN en particular, se identificaron dos QTL, uno en el cromosoma 1 (QTL-1) y otro en el cromosoma 9 (QTL-2). El QTL-1 se expresó en los dos años de experimentación indicando que dicho QTL fue estable a través de los ambientes y comparte el intervalo con QTL detectados para otros caracteres asociados a EUN como son el índice de cosecha de N (ICN) y el porcentaje de proteína en grano. El QTL-2 sobre el cromosoma 9, sólo se expresó en uno de los ambientes de experimentación y compartió intervalo con un QTL para ICN. Por último, sobre el cromosoma 8 se detectaron QT para proporción de N en la biomasa y porcentaje de proteína. La distancia media resultante entre marcadores de 12 cM y la localización de los QTL dentro de intervalos de confianza muy amplios fue poco precisa. Consecuentemente se demarcaron extensas zonas físicas en las cuales pueden existir centenares de genes. La saturación de dichas regiones con un mayor número de marcadores posibilitará la búsqueda de genes candidatos. El descubrimiento y/o validación de genes que controlan la EUN y sus componentes, junto con el desarrollo de marcadores moleculares podrían contribuir al proceso de mejoramiento de la EUN a través de la selección asistida por marcadores.

Hipótesis

Existe variabilidad alélica detectable a través de marcadores SSRs e INDEL dentro de las zonas adyacentes a los QTL identificados para EUN en la población de RILs derivada del cruzamiento B100xLP2.

Objetivo general

Aumentar la precisión de la localización de QTL para EUN detectados en los cromosomas 1, 8 y 9 de maíz sobre el mapa genético elaborado a partir de la población de 181 RILs derivada del cruzamiento B100xLP2 aumentando el número de marcadores ensayados.

Objetivos específicos

- Desarrollar marcadores SSR polimórficos nuevos e identificar marcadores SSR públicos y marcadores INDEL polimórficos dentro de los intervalos correspondientes a los QTL detectados.
- Ubicar los marcadores polimórficos en un mapa genético a partir de la población de 181 RILs mencionada.
- Analizar la asociación entre los marcadores y los caracteres relacionados a la EUN.
- Buscar genes candidatos dentro de los nuevos intervalos.

Materiales y Métodos

El material genético evaluado consistió en una población de mapeo de 181 RILs S6 derivada del cruzamiento B100xLP2 (Mandolino, 2015)

Evaluación fenotípica

Las RILs junto con los parentales fueron evaluadas fenotípicamente para EUN y caracteres relacionados durante dos años de ensayos en el campo experimental de INTA EEA Pergamino en condiciones contrastantes de N en el suelo. Dichos datos fenotípicos fueron utilizados para la optimización del análisis de QTL.

En los experimentos en condiciones contrastantes de N en el suelo se encontró diferencia significativa entre los parentales B100 y LP2 cuando el N fue escaso, siendo LP2 significativamente superior a B100 para los caracteres número de granos por planta (NGP) y EUN y, B100 fue significativamente superior a LP2 para N absorbido, rendimiento y porcentaje de proteína (Mandolino, 2015).

Evaluación genotípica

La extracción de ADN de cada RIL se realizó a partir de plantas adultas de maíz. Se tomaron muestras de cinco plantas de cada genotipo. El tejido vegetal se liofilizó y se molió de manera conjunta para obtener bulks. Para cada bulk, se extrajo el ADN genómico utilizando el método de Kleinhofs et al. (1993). El ADN extraído se cuantificó en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (5% v/v).

Análisis de los marcadores moleculares

Se seleccionaron 21 marcadores SSRs públicos. Para ello, se utilizó la base de datos pública Maize Gene Data Base (MGDB) <http://www.maizegdb.org/> y se

obtuvo información de la ubicación de los SSRs en los cromosomas, el tipo y composición de la repetición y la secuencia de los oligonucleótidos.

Se seleccionaron 116 marcadores INDEL dentro de la región de los QTL, según Settles et al. (2014), con diferencias en la longitud de pb mayor a 7.

Se buscaron SSRs nuevos dentro de la región de los QTL, utilizando el programa WebSat (Martins et al., 2009) que permite identificar secuencias repetidas en tándem. Se seleccionaron regiones sucesivas de hasta 150.000 pb dentro del QTL en la base de datos Gramene <http://gramene.org/> y se diseñaron 12 cebadores correspondientes con la aplicación Primer Blast de la base de datos del NCBI <http://ncbi.nlm.nih.gov/>.

Se evaluaron las líneas parentales B100 y LP2 con los marcadores SSRs e INDEL. Para ello, los marcadores se amplificaron mediante la técnica de PCR en un volumen de reacción de 13 µl.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando un programa de ciclado del tipo *touchdown* (Don et al., 1991):

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 minutos;
- 10 ciclos:
 - Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos;
 - Hibridación: 65-55°C (decrece 1°C/ciclo) durante 30 segundos;
 - Extensión: 72°C durante 30 segundos;

- 25 ciclos:
 - Desnaturalización: 94°C durante 30 segundos;
 - Hibridación: 55°C durante 30 segundos;
 - Extensión: 72°C durante 30 segundos;
- Extensión final: 72°C durante 10 minutos.

Los productos de PCR se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida: acrilamida/bis-acrilamida (29/1) al 6% m/v y urea 7 M.

Los geles se corrieron en cubas de electroforesis a una potencia constante de 55 W.

Posteriormente, los patrones de bandas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata (AgNO₃) siguiendo el protocolo para secuenciación de Promega (2007).

La lectura del gel se realizó utilizando un transiluminador de luz blanca.

Los marcadores SSR e INDEL evaluados se clasificaron en marcadores polimórficos (revelaron diferencias en la secuencia de ADN de la región amplificada), marcadores monomórficos (no revelaron diferencias en la secuencia de ADN de la región amplificada), marcadores dudosos (el patrón de bandas no pudo identificarse claramente) y marcadores sin producto de amplificación.

Los marcadores polimórficos entre las líneas parentales fueron seleccionados y usados para evaluar la población de RILs.

La línea de referencia secuenciada B73 (Schnable et al., 2009) se utilizó como

control de peso molecular (PM) de los SSRs e INDEL.

Caracterización genotípica de la población de mapeo

Se seleccionaron los marcadores polimórficos reconocidos en los parentales para caracterizar genotípicamente la población de 181 RILs derivada del cruzamiento B100xLP2 y se registró el genotipo de cada RIL siguiendo el mismo procedimiento indicado para los genotipos parentales.

El análisis de segregación de los marcadores se llevó a cabo utilizando el programa QMMol Versión 2008 6.1 (Cruz y Schuster, 2008).

La segregación mendeliana 1:1 para una población de RILs de los marcadores SSR e INDEL fue evaluada mediante la prueba tasa de falsos descubrimientos o FDR (*del inglés False Discovery Rate*) (Benjamini y Hochberg, 1995). Se consideró un nivel de significancia global del 5%.

Mapeo de QTL

La construcción de los mapas de ligamiento se llevó a cabo utilizando en programa QMMol Versión 2008 6.1.

Se usaron 77 marcadores para la construcción de los mapas de ligamiento.

Se utilizó la función de mapeo de Kosambi y la estimación Máxima Verosimilitud para determinar el mejor orden posible.

De los datos fenotípicos evaluados para EUN y caracteres relacionados durante dos años de ensayo, los caracteres utilizados para la optimización del análisis

de QTL fueron: porcentaje de proteína en grano (Proteína), índice de cosecha de nitrógeno (ICN), proporción de nitrógeno en biomasa a madurez fisiológica (N/BiomMF), eficiencia de uso de nitrógeno (EUN) y rendimiento en grano por planta (RGP).

La detección de QTL se realizó mediante el programa Win QTL Cartographer V2.5 (Wang et al., 2013) mediante el método de mapeo por intervalo compuesto (MIC), para cada año y cada carácter por separado.

En el método de MIC se estimaron, para cada posición en el genoma, la presencia de un QTL, los efectos de aditividad y la proporción de la variancia fenotípica explicada por el QTL (R^2).

Para identificar la presencia de un QTL el valor de LOD umbral considerado fue 3.

Identificación de genes candidatos

Se identificaron posibles genes candidatos dentro de los intervalos de los QTL detectados. Para ello se determinaron las coordenadas en pb de los marcadores flanqueantes usando la aplicación Locus Lookup en la base de datos MGDB. Luego, se identificaron los genes putativos dentro de dichas regiones, usando la aplicación BioMart en la base de datos Gramene. La función de cada gen fue confirmada mediante análisis de genes ortólogos en *Arabidopsis thaliana* u *Oryza sativa*. Los genes dentro de cada intervalo fueron clasificados según la función predicha en seis categorías principales

basado en el criterio establecido por *Munich Information Center for Protein Sequences* (Ruepp et al., 2004).

Resultados y Discusión

Caracterización genotípica

Se probaron un total de 149 marcadores en las líneas parentales B100 y LP2, de los cuales 21 corresponden a SSR públicos, 12 SSR diseñados y 116 INDEL. De los 149 marcadores moleculares que se evaluaron, el 32,2% resultó polimórfico, el 44,3% monomórfico y el 23,5% falló en la amplificación. Asimismo, se analizó la distribución de los resultados de la prueba de polimorfismo entre los parentales para cada tipo de marcador en particular. Un alto porcentaje de los SSRs resultaron polimórficos coincidiendo con los resultados obtenidos por Olmos et al. (2014). Contrariamente, casi el 50% de los marcadores INDEL resultaron monomórficos entre los parentales, indicando que los SSRs serían más informativos que los INDEL para el estudio de esta población.

En la Tabla 1 se muestra el número y porcentaje de los marcadores moleculares usados en los parentales B100 y LP2.

Los 48 marcadores polimórficos resultantes fueron corridos en la población de 181 RILs. Ocho de los marcadores amplificaron sólo en unos pocos individuos por lo que no se tuvieron en cuenta para realizar el análisis de segregación.

Tabla 1. Número y porcentaje de marcadores moleculares utilizados en los parentales B100 y LP2.

Cromosoma	Polimórficos		Monomórficos		Falló amplificación		Total	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
1	8	27,6%	15	51,7%	6	20,7%	29	19,5%
8	11	34,4%	16	50,0%	5	15,6%	32	21,5%
9	29	33,0%	35	39,8%	24	27,3%	88	59,1%
Total	48	32,2%	66	44,3%	35	23,5%	149	100,0%

Se evaluó la segregación 1:1 de la población RILs de 94 marcadores, 40 de ellos corridos en la población durante este trabajo y 54 marcadores SSRs y SNPs (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) corridos en la población de 181 RILs en estudios anteriores (Mandolino, 2015) ubicados en los cromosomas 1, 8 y 9.

De los 94 marcadores, 77 presentaron segregación 1:1. Los 17 marcadores que segregaron de manera distorsiva no se tuvieron en cuenta para la construcción de los mapas de ligamiento.

Hay regiones en los cromosomas que tienden a segregar de manera distorsiva, llamadas SDR (del inglés *Segregation Distortion Regions*). En maíz, los factores genéticos más comunes asociados a la segregación distorsiva son factores gametofíticos (Lu et al., 2002).

Mapeo de QTL

Se construyeron los mapas de ligamiento de los cromosomas 1, 8 y 9 de maíz (Figura 1). De los 77 marcadores con segregación 1:1, 53 fueron usados para la construcción de los mapas, los 24 restantes fueron eliminados por no asociarse con otros marcadores dentro de sus respectivos grupos de ligamiento o

porque el orden del mapa no coincidió con el orden esperado.

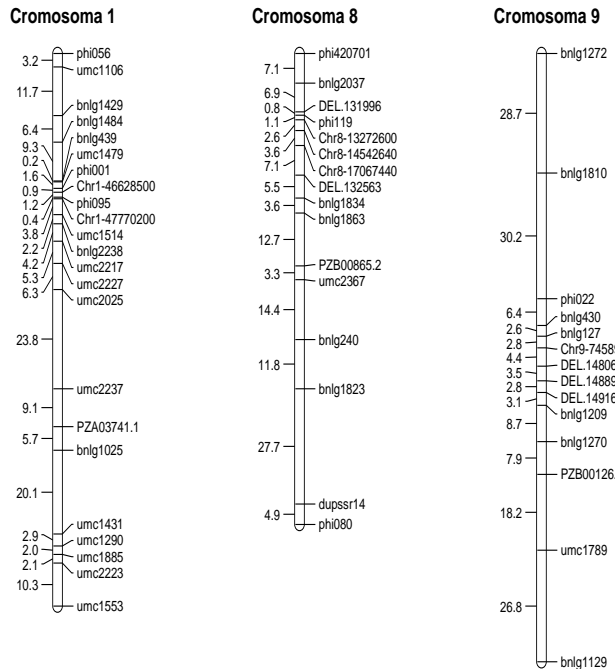
Los marcadores se agruparon en tres grupos de ligamiento, uno por cromosoma. En el cromosoma 1 se cubrió una distancia genética total de 132,7 cM, con una separación promedio entre marcadores de 5,8 cM. En el cromosoma 8 se cubrió una distancia total de 113,1 cM, con una separación promedio entre marcadores de 7,1 cM. En el cromosoma 9 se cubrió una distancia total de 146,1 cM, con una separación promedio entre marcadores de 10,4 cM.

El orden de los marcadores en el mapa de la población de RILs se correlacionó con lo esperado según la posición en el mapa físico.

Para todos los cromosomas se logró incrementar la longitud del mapa con respecto al obtenido previamente (Mandolino, 2015) y aumentar la cobertura genómica.

Se detectaron 11 QTL para los caracteres Proteína, ICN, N/BiomMF, EUN y RGP mediante MIC (Tabla 2). La localización de los QTL en los cromosomas detectados por MIC se muestra en la Figura 2.

Figura 1. Mapas de ligamiento de los cromosomas 1, 8 y 9 de maíz mostrando la localización de los 53 marcadores moleculares basados en la población de RILs. A la derecha de cada cromosoma se indica el nombre de los marcadores y a la izquierda la distancia en cM entre marcadores.



En el cromosoma 1 se detectaron tres QTL, dos para EUN, uno para cada año de ensayo (EUN-1a y EUN-2). Estos QTL comparten parcialmente sus intervalos de confianza, coincidiendo en parte con la región de interés en el cromosoma 1 (entre los marcadores phi339017 – phi095). El otro QTL detectado en el cromosoma 1 estuvo asociado a porcentaje de proteína en el primer ensayo (Pr-1), pero localizado en otra región del cromosoma que no coincide con la región de interés estudiada.

En el cromosoma 8 se detectaron tres QTL, todos en el ensayo 1 donde la disponibilidad de N en el suelo fue buena y ninguno de ellos comparte intervalo de confianza. Los QTL detectados fueron,

uno para ICN (ICN-1a) y uno para rendimiento (RGP-1) que se localizaron fuera de la región de interés, tratándose de QTL nuevos, y un QTL para N/BiomMF (N/Biom-1) localizado en la misma región que el QTL para N/BiomMF detectado en el trabajo doctoral de Mandolino.

En el cromosoma 9 se detectaron cinco QTL, todos en un solo ensayo, tres QTL para EUN en el ensayo 1 (EUN-1b, EUN-1c y EUN-1d). El QTL EUN-1d es el único localizado dentro del intervalo de interés del cromosoma 9 (entre los marcadores bnlgl127 – bnlgl1209) y la incorporación de los marcadores SSR e INDEL permitió acotar el intervalo del QTL detectado sobre el cromosoma 9 de 55,3 Mpb a 15,4 Mpb. Por otro lado, los QTL EUN-1b y EUN-1c se detectaron fuera de la región de interés, tratándose de QTL nuevos.

Asimismo, se detectó un QTL para ICN en el ensayo 1 (ICN-1b) y un QTL para rendimiento en el segundo año de ensayo (RGP-2) dentro de la región de interés. Los QTL EUN-1d e ICN-1b se encuentran dentro de la región de interés sobre el cromosoma 9 y comparten intervalo de confianza entre los marcadores Chr9-74589140 y DEL.148060, por lo que podría tratarse de un único QTL con posible efecto pleiotrópico.

Sólo el QTL para EUN en el cromosoma 1 parecería manifestarse en los dos ambientes, el resto de los QTL se expresaron en uno de los dos ambientes, indicando la importancia de los efectos

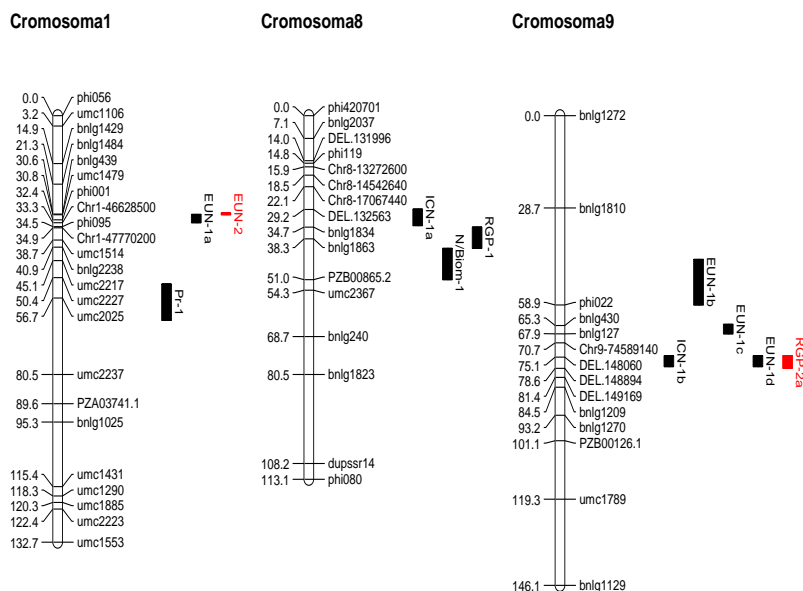
Tabla 2. QTL detectados mediante el método de Mapeo por Intervalo Compuesto.

QTL	Año ^a	Posición del QTL					LODmax	Efecto Genético	
		Cr	cM ^b	IC ^c (cM)	IC (Mpb)	MM Flanqueantes		R ²	A
EUN									
EUN-1 ^a		1	31.8	30.7-33.3	35.3-46.6	bnlg1484/Chr1-46628500	3.03	5.9	1.11
EUN-1b	Exp 1	9	58.7	44.7-58.9	9.12-23.3	bnlg1810-phi022	4.96	10.1	1.45
EUN-1c		9	67.3	64.9-67.9	23.3-51.7	phi022/bnlg127	5.56	11.4	1.55
EUN-1d		9	75.1	74.7-78.1	77.6-93.0	Chr9-74589140/DEL.148060	6.10	12.1	1.58
EUN-2	Exp 2	1	30.7	30.3-30.8	35.3-43.1	bnlg1484/umc1479	3.29	6.8	2.26
ICN									
ICN-1 ^a	Exp 1	8	30.2	29.1-34.2	17.1-21.0	Chr8-1706740/DEL.132563	3.67	7.2	-1.90
ICN-1b		9	75.1	74.7-78.1	77.6-93.0	Chr9-74589140/DEL.148060	6.50	12.6	2.45
N/BiomMF									
N/Biom-1	Exp 1	8	47.4	41.3-51.0	91.6-125.0	bnlg1863/PZA0865.2	3.82	10.3	-0.18
Proteína									
Pr-1	Exp 1	1	56.4	52.4-63.7	67.8-91.2	umc2227/umc2025	3.73	8.4	-0.15
RGP									
RGP-1	Exp 1	8	37.7	34.7-41.3	64.0-91.6	bnlg1834/bnlg1863	4.04	8.6	-3.05
RGP-2	Exp 2	9	75.1	74.7-78.6	77.6-105.0	Chr9-74589140/DEL.148894	3.27	6.7	2.06

Cr: Cromosoma; LODmax: máximo valor de LOD para el QTL; MM: Marcadores Moleculares; ^a Sólo aquellos con dato; ^b Posición del valor de LODmax en cM; ^c Intervalo de confianza calculado ± 1 LOD de LODmax; A: Efecto aditivo con respecto al alelo del parental LP2; R² proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL. En los nombres de los QTL el número indica si corresponde al Exp 1 o Exp 2, la letra enumera los diferentes QTL para un determinado carácter en el Exp.

ambientales sobre la expresión de los caracteres cuantitativos. selección asistida por marcadores para mejorar la EUN.

Figura 2. Localización de los QTL en los cromosomas 1, 8 y 9 de maíz detectados por MIC. El tamaño de las barras es proporcional a la longitud del intervalo de confianza de cada QTL en cM. Las barras negras corresponden a



Identificación de genes candidatos

Se identificaron 3155 genes

distintos dentro de los intervalos de los QTL detectados y se clasificaron según su función putativa en seis categorías principales (Tabla 3) basado en el criterio de establecido por *Munich Information Center for Protein Sequences* (Ruepp et al., 2004). El 67% de los genes identificados correspondieron a proteínas con función putativa, mientras que el 33%

La detección de asociaciones significativas entre rasgos relacionados a la EUN y marcadores moleculares posibilitará el uso de métodos de

aún no tienen una función caracterizada. De los genes con función predicha, 513

Tabla 3. Número de genes identificados dentro de los intervalos de cada uno de los QTL detectados, clasificados según su función putativa.

Principales categorías funcionales	Subcategorías	QTL										
		EUN					ICN		N/Biom	Proteína	RGP	
		EUN-1a	EUN-1b	EUN-1c	EUN-1d	EUN-2	ICN-1a	ICN-1b	N/Biom-1	Pr-1	RGP-1	RGP-2
Metabolismo	Energía	6	4	6	0	5	1	0	-1	11	8	1
	Metabolismo	59	75	54	28	36	17	28	93	60	41	66
Vías de información	Ciclo celular y procesamiento de ADN	3	17	17	1	2	4	1	20	6	10	4
	Procesamiento de proteínas (plegado, modificación y destino)	26	41	31	6	26	5	6	38	29	29	22
	Proteína con función de unión o requisito de cofactor	19	14	15	12	14	4	12	33	35	19	25
	Regulación de la actividad proteica	3	1	0	0	2	0	0	2	3	2	2
	Síntesis de proteína	7	13	12	5	4	1	5	20	7	16	11
	Transcripción	25	57	46	25	21	12	25	58	40	58	55
Transporte	Transporte	12	23	20	13	6	6	13	48	19	28	29
Percepción y respuesta a estímulos	Interacción con el ambiente	0	3	4	0	0	1	0	5	3	7	0
	Mecanismo de comunicación celular/transducción de señales	22	13	19	7	10	3	7	25	12	15	11
	Rescate celular, defensa y virulencia	18	18	19	5	11	7	5	29	34	18	11
Procesos de desarrollo	Biogénesis de componentes celulares	1	3	6	3	1	3	3	18	6	22	5
	Desarrollo	11	9	26	2	8	7	2	22	19	15	2
	Destino celular	0	1	3	0	0	0	0	6	6	1	0
	Diferenciación (célula, tejido, órgano)	0	0	0	5	0	1	5	1	5	1	9
No caracterizadas		85	128	150	81	55	29	81	208	130	139	165
Total		297	420	428	193	201	101	193	637	425	429	418

genes fueron asignados a la categoría metabolismo.

En la categoría vías de información se asignaron 917 genes. 185 genes corresponden a proteínas que participan en el transporte de iones, carbohidratos, aminoácidos, proteínas y lípidos. 297 genes fueron asignados a la categoría percepción y respuesta a estímulos. Por último, 209 genes corresponden a proteínas que participan en procesos de desarrollo. Si bien algunos QTL comparten parcial o totalmente el intervalo, el número total de genes por categoría se determinó considerando una sola vez cada gen.

Entre los genes con función predicha detectados en los QTL, los más

importantes relacionados a la EUN se detallan en la Tabla 4.

Los genes que codifican proteasas son son requeridos para removilizar el N y exportarlo para el desarrollo y crecimiento del grano (Donnison et al., 2007). Las transaminasas participan en el flujo de N entre compuestos orgánicos y la asparagina sintetasa es esencial para la asimilación, distribución y removilización de N (Chevalier et al., 1996).

El gen *snf-1-related protein kinase regulatory subunit beta1* y la proteína glutamato sintasa 1 participan en la asimilación de N (Crawford y Arst, 1993).

Se encontraron genes relacionados al estrés, como la proteína hidrofóbica RC12B y el receptor de ácido abscísico

Tabla 4. Genes candidatos detectados en los intervalos correspondientes a los QTL.

QTL	ID	Descripción del gen	Nombre del gen
EUN-1a	Zm00001d028549	Proteína de la superfamilia de las cisteínas proteasas	
	Zm00001d028750	Asparagina sintetasa 3	asn3 - asparagine synthetase3
	Zm00001d028766	Asparagina sintetasa 1	
	Zm00001d028718	Proteína hidrofóbica RC12B	pmpm4 - proteolipid membrane potential regulator4
	Zm00001d028793	Receptor de ácido abscísico PYL5	
	Zm00001d028721	Proteína con dominio LOB	lbd4 - LBD-transcription factor 4
EUN-1b	Zm00001d045226	Proteína de la superfamilia de las cisteínas proteasas	
	Zm00001d045132	Alantoinasa	
	Zm00001d044994	Transportador de aminoácidos	
	Zm00001d045392	Nodulina temprana 93	early nodulin 93
	Zm00001d045390	Proteína relacionada a nodulina temprana	
EUN-1c	Zm00001d045675	Asparagina sintetasa 1	asparagine synthetase1
	Zm00001d045740	Transportador de aminoácidos transmembrana	
EUN-1d / ICN-1b	Zm00001d046383	Proteína transportadora de nitrato NRT1	
N/Biom-1	Zm00001d010355	Asparagina sintetasa 1	
	Zm00001d010196	Asparagina sintetasa 3	
	Zm00001d010190	Glutamato-oxaloacetato transaminasa 5	got5 - glutamate-oxaloacetate transaminase5
	Zm00001d010662	SNF1- Subunidad regulatoria relacionada a proteína quinasa 1	snrkb1 - SNF1-related protein kinase regulatory subunit beta1
ICN-1a	Zm00001d008744	Transaminasa/transferasa	
	Zm00001d008691	Proteína relacionada a la autofagia	atg18d - autophagy18d
Pr-1	Zm00001d029732	Glutamato sintasa 1 [NADH] cloroplástica	
	Zm00001d029510	Ureasa	
RGP-1	Zm00001d009843	Proteína homóloga de ROOT HAIR DEFECTIVE 3	
	Zm00001d009580	Proteína accesoria de Ureasa (UreG)	
	Zm00001d009823	Proteína con dominio LOB	LBD-transcription factor 35

(ABA) PYL5 que están involucrados en la respuesta al ABA (Ma et al., 2009).

El gen Zm00001d046383 (Protein NRT1/ PTR FAMILY 4.6) es un transportador de nitrato involucrado en la asimilación de N (Kanno et al., 2013).

Atg18d es un gen relacionado a la autofagia y tiene un rol central en la removilización de N en el maíz, contribuyendo al mantenimiento y el reciclaje celular (Li et al., 2015).

Conclusiones

El 32,2 % de los marcadores moleculares probados entre las líneas parentales fueron polimórficos. Casi el 50% de los SSR públicos y el 32% de los INDEL fueron polimórficos.

La incorporación de marcadores nuevos a los mapas de los cromosomas 1, 8 y 9 de maíz construidos previamente (Mandolino, 2015), permitió aumentar la longitud de los mapas y mejorar la representación de los mismos. La mayoría de los marcadores incorporados a los mapas fueron INDEL.

Se detectaron 11 QTL por MIC en los cromosomas 1, 8 y 9. En el cromosoma 1 se detectaron dos QTL para EUN, uno para cada año de ensayo y que comparten parte del intervalo de confianza. Este podría tratarse de un QTL estable en los diferentes ambientes. La incorporación de marcadores permitió acotar el intervalo del QTL para EUN detectado sobre el cromosoma 9 de 55,3 Mpb a 15,4 Mpb. Los QTL EUN-1d e ICN-

1b colocaron entre los mismos marcadores indicando que se podría tratar de un único QTL pleiotrópico. En los cromosomas 8 y 9 se detectaron QTL nuevos para EUN, ICN y rendimiento fuera de la región de interés.

Se lograron identificar genes relacionados al metabolismo del nitrógeno en la mayoría de los intervalos de los QTL. La identificación de genes candidatos dentro de los intervalos de los QTL resulta interesante, ya que permite la selección de regiones de interés dentro de los intervalos amplios de los QTL. Algunos de los genes de mayor importancia son los que participan en la asimilación, distribución y removilización de N, tales como asparagina sintetasa y glutamato sintasa, genes involucrados en la respuesta al estrés y en el transporte de aminoácidos.

Los intervalos de los QTL aún son muy amplios, por lo tanto, será necesario un mapeo más fino para acercar nuevos marcadores a los QTL de interés de los distintos caracteres.

Bibliografía

Agrama, H.A. (2006). Application of molecular markers in breeding for nitrogen use efficiency. *Journal of crop improvement*, 15(2), 175-211.

Arellano, J.V., Castillo, F.G., Alcántar, G.G., y Martínez, A.G. (1996). Parámetros genéticos de la eficiencia en el uso de nitrógeno en líneas de maíz de

valles altos. In Edmeades, G.O.; Bänziger, M.; Mickelson, H.R.; Peña-Valdivia, C.B. eds. *Developing drought and soil nitrogen tolerant in maize*. CIMMYT, El Batán México, pp. 320-325.

Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*, 57(1), 289-300.

Bhatramakki, D., Dolan, M., Hanafey, M., Wineland, R., Vaske, D., Register J.C., Tingey, S.V., y Rafalski, A. (2002). Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant molecular biology*, 48(5-6), 539-547.

Boopathi, N.M. (2013). Marker assisted selection. In *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection: Basics, Practice and Benefits*. Ed Springer. pp. 117-165.

Cárdenas-Navarro, R., Sánchez-Yáñez, J., Farías-Rodríguez, R., y Peña-Cabriales, J. (2004). Los aportes del nitrógeno en la agricultura. *Chapingo*, 10(2), 173-178.

Chevalier, C., Bourgeois, E., Just, D., y Raymond, P. (1996). Metabolic regulation of asparagine synthetase gene expression in maize (*Zea mays* L.) root tips. *The Plant Journal*, 9(1), 1-11.

Collard, B., Jahufer, M., Brouwer, J., y Pang, E. (2005). An introduction to

- markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142, 169-196.
- Crawford, N.M., y Arst, H.N. (1993). The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annual review of genetics*, 27(1), 115-146.
- Cruz, C.D., y Schuster, I. (2008). GQMol V2008 6.1. Genética Cuantitativa e Molecular. Universidad Federal de Viçosa. Laboratório de Bioinformática. Consultado 22 oct. 2015. Disponible en <http://www.ufv.br/dbg/gmol.htm>.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., y Mattick, J.S. (1991). "Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification". *Nucleic Acids Research*, 19(14), 4008.
- Donnison, I.S., Gay, A.P., Thomas, H., Edwards, K.J., Edwards, D., James, C.L., y Ougham, H.J. (2007). Modification of nitrogen remobilization, grain fill and leaf senescence in maize (*Zea mays*) by transposon insertional mutagenesis in a protease gene. *New Phytologist*, 173(3), 481-494.
- Harrison, P. (2002). Agricultura mundial: hacia los años 2015/2030. Dirección de Información de la FAO.
- Kanno, Y., Kamiya, Y., y Seo, M. (2013). Nitrate does not compete with abscisic acid as a substrate of AtNPF4.6/NRT1.2/AIT1 in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, 8(12), e26624.
- Kleinhofs, A., SaghaiMaroof, M., Biyashev, R.M., Hayes, P., Chen, F.Q., Lapitan, N., Fenwick, A., y Steffenson, B.J. (1993). A Molecular isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 705-712.
- Levinson, G., y Gutman, G.A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 203-221.
- Li, F., Chung, T., Pennington, J.G., Federico, M.L., Kaeppeler, H.F., Kaeppeler, S.M., y Vierstra, R.D. (2015). Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. *The Plant Cell*, 27(5), 1389-1408.
- Lu, H., Romero-Severson, J., y Bernardo, R. (2002). Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(4), 622-628.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., y Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930), 1064-1068.
- Mandolino, C.I. (2015). Mapeo de QTL para Eficiencia de Uso de Nitrógeno en Maíz mediante SSRs y SNPs. Tesis doctoral, Rosario, Argentina, Facultad de Cs. Agrarias, Universidad de Rosario.
- Martins, W.S., Lucas, D.C.S., de Souza Neves, K.F., y Bertoli, D.J. (2009). WebSat-A web software for microsatellite

- marker development. *Bioinformatics*, 3(6), 282.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T., Yano, M., Bhatia, C., y Sasaki, T. (1997). Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular breeding*, 3(2), 87-103.
- Olmos, S.E., Delucchi, C., Ravera, M., Negri, M.E., Mandolino, C., y Eyherávide, G.H. (2014). Genetic relatedness and population structure within the public Argentinean collection of maize inbred lines. *Maydica*, 59, 16-31.
- Paterson, A.H. (1996). Making genetic maps. In Paterson, A.H. ed. *Genome mapping in plants*. Landes Company. San Diego. California, Academic Press. Austin. Texas. 23–39.
- Promega. (2007). Technical manual: Silver sequence DNA sequencing system. Instructions for use of products Q4130. Disponible en <http://www.promega.com>.
- Raun, W.R., y Johnson, G.V. (1999). Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy journal*, 91(3), 357-363.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mpkrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Münsterkötter, M., y Mawes, W. (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research*, 32(18), 5539-5545.
- Schnable, P.S., Ware, D., Fulton, R.S., et al. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 326(5956), 1112-1115.
- Settles, A.M., Bagadion, A.M., Bai, F., Zhang, J., Barron, B., Leach, K., Mudunkothge, J., Hoffner, C., Bihmidine, S., Finefield, E., Hibbard, J., Dieter, E., Malidelis, A., Gustin, J.L., Karoblyte, V., Tseung, C., y Braun, D.M. (2014). Efficient molecular marker design using the MaizeGDB Mo17 SNPs and Indels track. *G3: Genes/ Genomes/ Genetics*, 4(6), 1143-1145.
- Shiferaw, B., Prasanna, B.M., Hellin, J., y Bänziger, M. (2011). Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. *Food Security*, 3(3), 307-327.
- Wang, S., Basten, J., y Zeng, Z. (2013). *Windows QTL Cartographer 2.5*. Raleigh, NC: Department of Statistics, North Carolina State University.

