



I N T E C H

**Estudio de la variabilidad intraespecífica en la
acumulación de nutrientes en los granos de trigos
argentinos con perspectivas para su biofortificación**

Alexander Gabriel Rivero

2020

Tesis para optar por el título de Ingeniero en Agrobiotecnología

Director: Dr. Jorge Ignacio Moriconi

Codirector: Dr. Facundo Tabbita

Consejera de estudios: Dra. Analía Inés Sannazzaro

Laboratorio de Fisiología de las Plantas
Instituto Tecnológico Chascomús (INTECH)

Agradecimientos

En primer lugar, le quiero agradecer a mi madre Liliana, padre Jorge, abuelos Miguel, Gabriela y Lita y a mis tías Claudia y Gladys ya que gracias a su ayuda y apoyo pude llegar al INTECH y completar la Carrera.

A todas las personas con las que conviví en estos 5 años ya sea en Chascomús o en Castelar ya que me llevo gratos recuerdos.

A mis compañeros de curso los Laurencios y en particular a Fer, Fran y Tamy ya juntos fuimos parte del Core, el núcleo, un grupo de amigos geniales con los que viví los mejores momentos en estos 5 años!

A la UNSAM, el INTA y el INTECH y a todos los profesores que tuve durante la carrera ya que sin su formación no hubiera llegado hasta donde estoy.

A mi Director de tesis, Jorge, quien me ayudo en todo momento y me abrió las puertas de su laboratorio para trabajar allí. Sos una persona excelente y ¡espero que logres todo lo que te propongas! ¡Y también a mi Codirector Facundo, gracias por tu colaboración!

A mis compañeros de UB5 Leo, Marta y Sonia. Gracias por todos sus consejos y ayuda!!!

Y en particular al Dr. Guillermo Santa María gracias por sus valiosos consejos y por compartir todo su conocimiento; a la Dra. María Llames, gracias por toda información sobre estadística la cual fue esencial para desarrollar los resultados de este trabajo; a los Dres. Nazareno Castagno y Elisa Gonzales de UB3, gracias por sus consejos y por haberme transportado tantas veces hasta el laboratorio.

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
ρ	Rho, Coeficiente de Spearman
D.E.	Desvío estándar
hs	Horas
g	Gramos
L/min	Litros por minuto
LD	Desequilibrio de ligamiento
log₁₀(P)	Logaritmo en base 10 de la probabilidad
Máx.	Máximo
Mb	Megabases / Millones de bases
mg	Miligramos
mg/kg	Miligramos por Kilogramo
MHa	Millones de Hectáreas
Mín.	Mínimo
ml	Mililitros
mm	Milímetros
n	Cantidad de individuos (líneas) estudiados
nm	Nanómetros
PCA	Análisis de Componentes Principales
ppm	Partes por millón
Q₁	Cuartil 1
Q₃	Cuartil 3
QTL	Locus de Caracteres Cuantitativos
rpm	Rotaciones por Minuto
s	Segundos
SNPs	Polimorfismos de Nucleótido Simple
T°	Temperatura
t/Ha	Toneladas por Hectárea
TWG	Peso de Mil Granos

Tabla de Contenido

Agradecimientos	2
Abreviaturas.....	3
Tabla de Contenido.....	4
Introducción	6
Necesidad de aumentar la concentración de Zn y Fe en las partes comestibles de los cultivos	8
Biodisponibilidad de nutrientes esenciales.....	9
Otros elementos de interés constituyentes de los granos de trigo.....	10
El estudio del ionoma como una estrategia de biofortificación para el mejoramiento de la calidad nutricional de los cultivos	10
Objetivo general	14
Hipótesis y objetivos secundarios	14
Materiales y métodos.....	16
Material vegetal.....	16
Obtención y digestión ácida de los granos de trigo.....	16
Determinación de contenido de nutrientes en los digestos.....	17
Determinación de micro y macroelementos por emisión atómica de plasma por microondas	17
Determinación de contenido de P	18
Determinación de la concentración de potasio (K)	18
Criterio para la incorporación y/o exclusión de datos.....	19
Evaluación de las diferencias en la acumulación de nutrientes entre subpoblaciones de trigos argentinos.....	19

Estudio de correlación entre los elementos contenidos en los granos y una característica de valor agronómico: el peso de mil granos.....	19
Análisis para la identificación de zonas genómicas asociadas a la acumulación de nutrientes: análisis de mapeo por asociación.....	20
Resultados.....	22
Análisis de Componentes Principales (PCA)	22
Variabilidad de la concentración de nutrientes en los granos de trigos argentinos estudiada.	23
Distribución de frecuencias de las concentraciones de los elementos estudiados.	25
Acumulación de elementos entre subpoblaciones	27
Estudio de correlación entre los elementos contenidos en los granos y su relación con una característica de valor agronómico: el peso de mil granos	30
Identificación de zonas genómicas asociadas a la acumulación de nutrientes.....	33
Hierro (Fe).....	33
Potasio (K)	34
Fosforo (P).....	35
Aluminio (Al).....	36
Conclusiones y perspectivas a futuro.....	38
Referencias bibliográficas	39
Anexos.....	46
Anexo 1.	46
Anexo 2.....	48

Introducción

Se estima que para el año 2050 la población mundial alcanzará los 10.000 millones de personas. En este contexto, uno de los desafíos que enfrenta la humanidad es proveer de alimentos en cantidad y calidad necesaria a esta población en constante aumento. Para alcanzar este desafío se estima que el rendimiento de los principales cultivos, incluido el trigo, debería aumentar en gran medida durante las próximas décadas (Basile, 2019). A nivel mundial, el trigo (*Triticum aestivum*) es considerado uno de los tres cereales más importantes debido principalmente a su volumen de producción, a su dispersión geográfica y a que es una fuente de nutrientes y proteínas esenciales para la nutrición (FAO, 2002). En los países en desarrollo el trigo provee el 28% de la materia seca consumida y el 60% de las calorías ingeridas diariamente (Kenzhebayeva *et al.*, 2019; Balk *et al.*, 2019) y en las regiones del mundo que tienen gran parte de su dieta basada en trigo, los granos enteros representan la mayor fuente de micronutrientes tales como Zinc (Zn), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Magnesio (Mg), y vitaminas B y E (Velu *et al.*, 2017).

Desde hace más de medio siglo el área total cultivada con trigo a nivel mundial se encuentra estabilizada en un poco más de 200 MHa; sin embargo, a pesar de que en los últimos años se ha puesto de manifiesto una leve disminución de la tasa de crecimiento de la producción, las nuevas prácticas agrícolas y el mejoramiento del cultivo llevaron a un aumento sostenido de la productividad (González *et al.*, 2018).

En Argentina el trigo, junto a la soja y el maíz, es el tercer cultivo más importante. El rendimiento promedio de este cereal en Argentina durante el periodo 2013-2017 fue de 2,86 t/Ha ubicándose por bajo del maíz (7,15 t/Ha) y la soja (2,93 t/Ha). En cuanto al área cosechada durante el mismo periodo de tiempo, el área destinada al trigo fue de 4,20 MHa mientras que para la soja y el maíz fue de 18,97 y 5,25 MHa respectivamente (FAO, 2017).

Durante los últimos 50 años y, a partir de la denominada Revolución Verde, los esfuerzos de mejoramiento de trigo estuvieron focalizados en el aumento de la productividad y en los factores

relacionados a la misma (Trethowan *et al.*, 2007). La generación de plantas semienanas, mediante la introgresión de variantes alélicas de los genes *Rht* (*Reduced height genes*), *Rht1* (*Rht-B1b*) y *Rht2* (*Rht-D1b*), promovió el aumento de los rendimiento debido principalmente a una disminución de las pérdidas por volcamiento cuando las plantas son cultivadas en ambientes muy productivos, además de mejorar los índices de cosecha (Velu *et al.*, 2017). Otro avance importante en el mejoramiento de la productividad de trigo vino de la mano de la incorporación de variantes alélicas de los genes *Pdp₁*, *Pdp₂* y *Pdp₃* (Trethowan *et al.*, 2007). Dichos genes regulan el tiempo de floración en trigo, el que es influenciado por el fotoperíodo. La insensibilidad al fotoperíodo es un carácter dominante y basta con que un solo alelo de esos tres genes sea dominante para que se manifieste (Trethowan *et al.*, 2007). De esta manera, si se usan trigos sensibles al fotoperíodo en bajas latitudes disminuye el rendimiento, por lo que el uso de variedades insensibles al fotoperíodo y que florecen tempranamente promovió a un aumento de la productividad (Trethowan *et al.*, 2007). Además de la modificación de la altura de las plantas y de la sensibilidad al fotoperíodo, se destacan otras características no menos relevantes para la mejora de este cereal, por ejemplo: la incorporación de resistencia a enfermedades y una mayor acumulación de biomasa (Velu *et al.*, 2014), resistencia a herbicidas (Zhou *et al.*, 1995 y Hu *et al.*, 2003), resistencia a estrés hídrico y salinidad (Abebe *et al.*, 2003) y el aumento de la calidad nutricional del grano (Uauy *et al.*, 2006). Sin embargo, y a pesar de que en este periodo de tiempo se ha alcanzado un aumento sostenido de la productividad, en términos de calidad no hubo una mejora de la misma magnitud en cuanto a la cantidad de proteínas ni de los nutrientes minerales contenidos en los granos (Velu *et al.*, 2014). El aumento del rendimiento promovió una disminución de la concentración de elementos esenciales para la dieta humana debido a un “efecto de dilución” (Cakmak & Kutman, 2018), observándose una correlación negativa entre algunos nutrientes (Zn y Fe) y el rendimiento (Fan *et al.*, 2008). La introducción de los genes *Rht* disminuyó la concentración de nutrientes en el grano y, a pesar de que hubo un aumento en la redistribución de fotosintatos en la planta desde los tejidos vegetativos al grano, éste no se vio reflejado en la redistribución de los minerales hacia los granos (Fan *et al.*, 2008).

Necesidad de aumentar la concentración de Zn y Fe en las partes comestibles de los cultivos

En las células el Zinc (Zn) cumple funciones catalíticas y estructurales junto a un número considerable de proteínas. El 10% del proteoma humano (unas 3000 proteínas) tiene al Zn como su cofactor (Palmgren *et al.*, 2008; Kenzhebayeva *et al.*, 2019). A su vez, el hierro (Fe), está involucrado en un gran número de procesos metabólicos tales como el transporte de oxígeno, la síntesis del ADN y la cadena transportadora de electrones. El 70% del Fe del cuerpo humano se encuentra unido a hemoglobina en la sangre y a la mioglobina en los músculos, mientras que el otro 30% se encuentra unido a otras proteínas o almacenado en tejidos. (Kenzhebayeva *et al.*, 2019). Como se observa, tanto el Fe como el Zn son micronutrientes esenciales para la dieta humana y cuando su ingesta es insuficiente se pone en riesgo el normal crecimiento y desarrollo de las personas. Las deficiencias de Fe y Zn se encuentran en el 5° y 6° lugar respectivamente en el ranking de los factores de riesgo para la salud en países en desarrollo, posicionándose en el 11° y 9° lugar a nivel mundial, respectivamente (WHO, 2002). Actualmente, la deficiencia de micronutrientes, también conocida como “hambre oculta”, es uno de los desafíos más importantes a los que se enfrenta la humanidad (Velu, *et al.*, 2019), siendo un problema de consideración en países con bajos y medianos ingresos donde la dieta está constituida básicamente por cereales, en gran medida trigo, los cuales carecen de niveles adecuados de estos micronutrientes (Figura 1; Kenzhebayeva *et al.*, 2019). Es por ello que, una mejora de la acumulación de Fe y Zn en los granos de trigo podría resultar en una mejora de las condiciones nutricionales de un número considerable de personas a nivel mundial, sobre todo en países en vías de desarrollo.

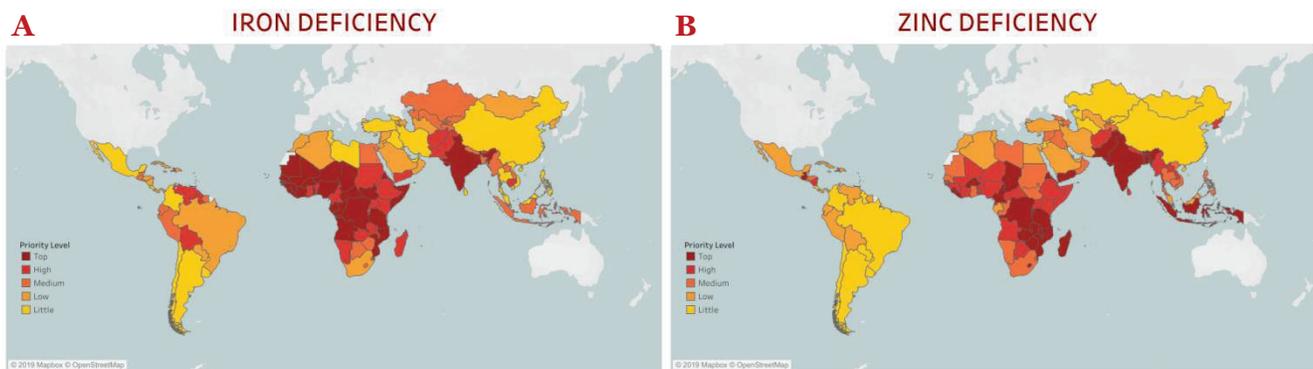


Figura 1. Mapas de distribución de la deficiencia de Hierro (A) y Zinc (B) en humanos. Extraídos del BPI (Índice de Prioridad de Biofortificación) de HarvestPlus (<https://www.harvestplus.org/>).

Biodisponibilidad de nutrientes esenciales

La biodisponibilidad puede ser definida como la proporción de nutrientes que es verdaderamente absorbido y utilizado por quien ingiere los alimentos. La presencia de cantidades elevadas de algunos compuestos puede afectar la biodisponibilidad de Fe, Zn y eventualmente otros nutrientes contenidos en los granos de trigo. El ácido fítico es un ácido orgánico que contiene fósforo en su composición química, encontrándose preferencialmente en los granos de los cereales. La presencia de ácido fítico (o fitatos) en los alimentos reduce la biodisponibilidad de Zn y Fe (y otros elementos) impidiendo la correcta absorción de estos nutrientes en los intestinos por lo que es considerado un antinutriente. En los granos de trigo, del total de P contenido, entre un 65% - 85% corresponde a fitatos (Cakmak, 2008; Yousaf *et al.*, 2019; Saxena *et al.* 2019) por lo que se estima que la biodisponibilidad de Zn y Fe es del 25% y el 5%, respectivamente (Cakmak *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta lo expuesto, una disminución del contenido de P en los granos podría eventualmente redundar en una mejora de la biodisponibilidad del Zn y Fe ya presente en los granos, por lo que es fundamental estudiar este elemento.

Debido a que los nutrientes no están distribuidos uniformemente en los granos de trigo, un aspecto a considerar, es la disposición de los mismos en los diferentes tejidos de los granos. La mayor proporción del Zn, las proteínas y el fitato de la semilla se ubica en la capa de aleurona y en el embrión, los que son removidos durante el proceso de molienda tradicional del grano para la fabricación de

harina (Cakmak, 2008). La identificación de los genes determinantes del aumento de la concentración de Zn, Fe, y de forma simultánea, una disminución de fitatos, además de la relocalización de estos elementos en partes constituyentes de las harinas (endosperma) de los granos de trigo, es un objetivo ampliamente buscado en los programas de mejoramiento de la calidad nutricional de trigo.

Otros elementos de interés constituyentes de los granos de trigo

Con respecto a los otros elementos, el Mn está asociado con el desarrollo del sistema óseo y con el metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidratos (Fraga, 2005). El Cu es necesario para el desarrollo del tejido conectivo, nervioso y óseo, también participa junto al Fe en el metabolismo y actúa junto a una gran variedad de enzimas como reductor (Fraga, 2005). El K es el catión principal en el fluido intracelular regulando la presión osmótica, también está involucrado en el metabolismo energético, el impulso nervioso y la contracción muscular (Soetan *at al.*, 2010). El P juega un rol fundamental en el metabolismo energético como parte del ATP y es componente de los fosfolípidos y fosfoproteínas además de actuar como buffer del pH (Soetan *at al.*, 2010). El Ca es requerido para el desarrollo y crecimiento del esqueleto (Frossard *et al.*, 2000) y para la regulación de la función motora (Soetan *at al.*, 2010). El Mg actúa en la síntesis proteica y es el componente de diversas enzimas actuando como un activador de las mismas, en particular en las que utilizan ATP (Cashman & Flynn, 1999). El Sr tiene propiedades químicas muy similares a las del Ca por lo que suele sustituirlo (Maksimovic *et al.*, 2017) y causar problemas en la calcificación de los huesos y caries dentales (Soetan *at al.*, 2010). El Al es tóxico para el cerebro, hígado, corazón y la medula ósea y causa diversas patologías en los sistemas que involucran a esos órganos (Nayak, 2002).

El estudio del ionoma como una estrategia de biofortificación para el mejoramiento de la calidad nutricional de los cultivos

La composición de nutrientes minerales y elementos traza presentes en un organismo se conoce con el nombre de ionoma (Salt *et al.*, 2008). Su estudio (la ionómica) ha permitido la identificación de genes que controlan su composición o las variaciones naturales de éste en distintos grupos de plantas

(Huang & Salt, 2016). Tomando como ejemplo a *Arabidopsis thaliana*, Huang & Salt (2016) mencionan algunos de los genes identificados utilizando el ionoma como: *FRD3* un transportador de citrato que se asocia a un alto contenido de Mn y Cobalto, *SGN1* una quinasa asociada a alto Mg o *MOT1* un transportador de Molibdeno (Mo) asociado a bajo contenido de Mo.

El proceso de incrementar la densidad de nutrientes en los granos de los cultivos primarios a través del cruzamiento vegetal tradicional y/o mediante el uso de técnicas biotecnológicas modernas, con el objetivo de lograr un impacto apreciable y positivo en la salud humana, se conoce con el nombre de biofortificación (Cakmak, 2010). Esta estrategia se presenta como una solución económica y sustentable a los problemas mundiales de malnutrición mineral (Velu & Singh, 2019; Kenzhebayeva *et al.*, 2019). Dos mecanismos han sido propuestos para alcanzar una mejora en la biofortificación de los cultivos: *i*) La biofortificación agronómica que consiste en la aplicación de fertilizantes durante el crecimiento de los cultivos, ofreciendo una solución rápida al problema, sin embargo presenta un alto costo económico debido a que hay que aplicar fertilizante cada vez que se cultiva; y *ii*) La biofortificación genética, que consiste en la mejora genética por cruzamiento o por la modificación genética de los cultivos, con el objetivo de obtener genotipos capaces de acumular más nutrientes minerales en sus partes comestibles (Cakmak *et al.*, 2008; Velu *et al.*, 2014; Balk *et al.*, 2019). Esta última, es una estrategia cuyo costo se disuelve en el tiempo y es duradera ya que, una vez finalizado el desarrollo del cultivar, se lo introduce en el mercado amortizándose en el tiempo debido a que se reduce la cantidad de fertilizante y otros insumos utilizados. Por otro lado, hay algunos beneficios agronómicos asociados al uso de cultivares con una mayor capacidad de acumulación de Zn, y eventualmente otros nutrientes, en donde se destaca una mayor tolerancia al estrés abiótico y a los patógenos del suelo, un aumento del vigor y la viabilidad de las semillas y la reducción de la densidad de siembra lo que permitiría minimizar pérdidas y reducir los costos (Cakmak, 2008; Velu *et al.*, 2014; Velu *et al.*, 2019, Cu *et al.*, 2020). Dentro de las desventajas asociadas a esta segunda estrategia podemos destacar: el tiempo de desarrollo de los cultivares, ya que no se puede saber *a priori* si será efectiva y depende de la

cantidad de nutrientes disponibles en el suelo, por tal motivo, se considera a la fertilización como complementaria a la biofortificación genética (Cakmak, 2008).

En la actualidad diversas herramientas son utilizadas para avanzar en la biofortificación de los cultivos, incluido el trigo: *i*) El cruzamiento convencional y el molecular, referido al cruzamiento asistido por marcadores, a la selección genómica, al mapeo de Locus de Caracteres Cuantitativos (QTL, Quantitative Trait Loci) o al mapeo por asociación (GWAS, Genomic Wide Association Studies), y *ii*) la modificación genética mediante transgénesis (Cakmak & Kutman, 2018). Aunque el mapeo de QTL es clave para entender la genética detrás de los caracteres complejos (Basile *et al.*, 2019), los análisis de mapeo por asociación usando Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) presentan algunas ventajas adicionales: se alcanza una mejor resolución, hay una mayor cobertura del genoma y se puede trabajar con gran cantidad de líneas (Velu *et al.*, 2018). Además los análisis de mapeo por asociación permiten el estudio de caracteres complejos, controlados por múltiples genes, como es el caso de la acumulación de minerales en el grano (Arora *et al.*, 2019; Velu *et al.*, 2018). La publicación del genoma de trigo (Appels *et al.*, 2018), así como el desarrollo de marcadores moleculares con una alta resolución para trigo (Allen *et al.*, 2017) ha posibilitado la realización de estudios de mapeo por asociación en esta especie. Si bien, el uso de SNPs en estos análisis presenta algunas limitaciones: solo proveen información bialélica y las asociaciones entre fenotipo y genotipo encontradas no se deben en general a las razones causales del fenotipo, sino a que hay loci en desequilibrio de ligamiento (LD) con un gen o una secuencia controladora (Basile *et al.*, 2019). Para superar estos 2 problemas del uso de SNPs, en Basile *et al.* (2019) sugieren que en el análisis de mapeo por asociación se utilicen haplotipos, es decir, combinaciones de SNPs en una región cromosómica determinada. Al hacer uso de herramientas con la capacidad de producir gran cantidad de resultados de manera eficiente, como por ejemplo un estudio de mapeo por asociación con haplotipos, es necesario utilizar herramientas de fenotipado de una calidad equivalente como el análisis del ionoma (Huang & Salt, 2016).

Para poder llevar a cabo un programa de mejoramiento, se hace necesario evaluar la variabilidad genética intraespecífica mediante el análisis del ionoma y, eventualmente, identificar los factores genéticos que la promueven, para la característica de interés (Cakmak *et al.*, 2008), en nuestro caso esa característica es la acumulación de nutrientes en el grano de trigo.

Recientemente ha sido desarrollada una población de mapeo por asociación conformada por cultivares de trigos argentinos (Vancetti *et al.* 2013). Dicha población está conformada por 102 líneas subdivididas en 4 subpoblaciones (Figura 2, Basile *et al.*, 2019) que se corresponden con sus orígenes. La subpoblación 1 incluye cultivares de origen francés y contiene las líneas de las compañías Nydera, Syngenta y Sursem. La subpoblación 2 comprende a la mayoría de cultivares antiguos o también llamados tradicionales (9 de los 12 liberados entre 1930 y 1990), y a las líneas liberadas hasta el 2010 por la compañía Don Mario. La subpoblación 3 incluye cultivares liberados por la compañía Klein (46,15% de la subpoblación), ACA, Buck, INTA y Relmó, encontrándose también cultivares del CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo). La subpoblación 4 está conformada por cultivares liberados por INTA (33,33% de la subpoblación), Klein, ACA, Relmó y CIMMYT. Mediante un mapeo por asociación utilizando haplotipos Basile *et al.*, 2019 encontraron en esta población 97 regiones cromosómicas asociadas a componentes del rendimiento y otras características.

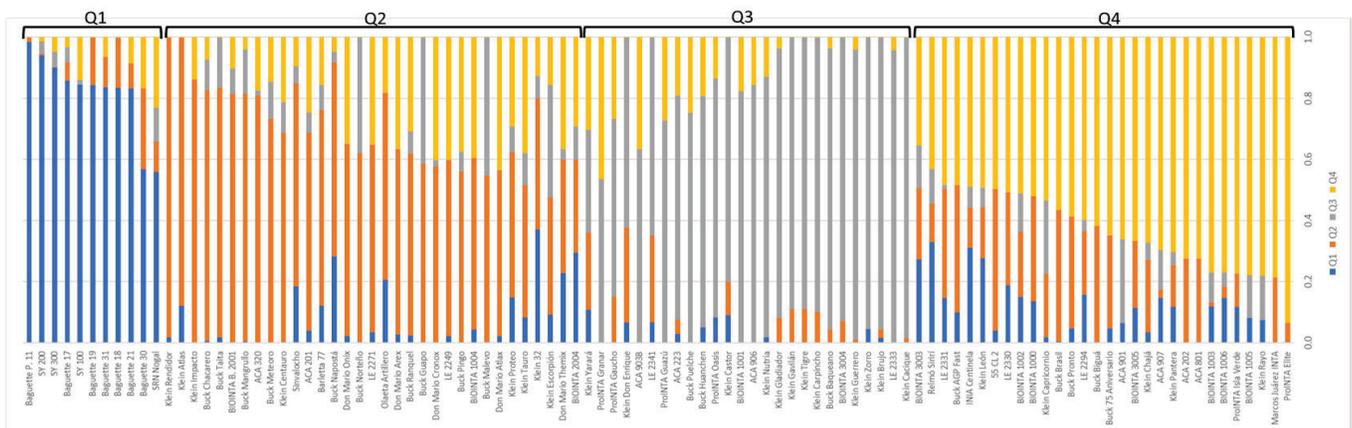


Figura 2. Detalle de la estructura de la población de mapeo por asociación conformada por 102 líneas de trigos argentinos donde se observan 4 subpoblaciones (Adaptado de Basile *et al.*, 2019).

Objetivo general

Uno de los interrogantes que se busca explorar en este trabajo es la posibilidad de la existencia de variabilidad para la acumulación de nutrientes en los granos de trigo, la que eventualmente podría estar asociada a regiones discretas del genoma.

Por tal motivo, el objetivo general de este trabajo fue evaluar la variabilidad en la acumulación de macronutrientes (P, K, Mg y Ca) y micronutrientes (Zn, Fe, Mn y Cu) además de Al y Sr en una población de mapeo por asociación de trigos argentinos con el objeto de identificar regiones genómicas de interés, y eventualmente identificar genes de interés, para ser incorporados en estudios tendientes a la biofortificación de esta especie.

Hipótesis y objetivos secundarios.

Las hipótesis de partida son:

- En la población estudiada existe suficiente variabilidad en la acumulación de Zn, Fe, Mn, Cu, P, K, Mg, Ca, Al y Sr en los granos, por lo que es posible identificar regiones genómicas asociadas a un aumento de la concentración de tales elementos.
- Existen diferencias significativas para el contenido de elementos entre subpoblaciones.
- Existe una relación negativa entre los principales nutrientes y el peso de mil granos, uno de los componentes del rendimiento.

Los objetivos específicos son:

- Estudiar la variabilidad intraespecífica en la composición del ionoma de los granos presente en una población de mapeo por asociación de cultivares argentinos.
- Estudiar la variabilidad en la acumulación de elementos entre las subpoblaciones de la población.
- Conocer la relación que existe entre los principales elementos constituyentes del ionoma de la población estudiada, y también su relación con un carácter agronómico de interés (peso de mil granos).
- Sobre la base de datos obtenidos, avanzar en la identificación de las regiones genómicas, y eventualmente genes candidatos, asociadas a variaciones significativas de la acumulación micronutrientes de interés, particularmente zinc (Zn), hierro (Fe) y fosforo (P).

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado corresponde a muestras de semillas provenientes de una población de mapeo por asociación conformada por 102 líneas de trigo panadero (*Triticum aestivum*) de cultivares argentinos (Basile *et al.*, 2019). Las muestras fueron obtenidas de un experimento realizado a campo en la localidad de Marcos Juárez (Provincia de Córdoba) durante el año 2017. Se analizó una réplica por línea ensayada. Las semillas de las líneas estudiadas fueron generosamente proveídas por el Dr. Leonardo Vanzetti (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA).

Obtención y digestión ácida de los granos de trigo

Para la obtención de las muestras de harina, aproximadamente 1 g de semillas fueron molidas en un molinillo mecánico equipado con una malla de 0,1 mm. Previo a la digestión, la harina obtenida se secó en estufa a 70 °C durante, al menos, 48 hs. La digestión de las muestras se realizó según un protocolo adaptado de Gyóri (2005) y que se detalla a continuación:

- Predigestión: Una vez que las muestras fueron extraídas de la estufa fueron mantenidas en un desecador con silica gel de forma de prevenir su rehidratación. Alrededor de 250 mg de harina se transfirieron a tubos de vidrio debidamente rotulados. Posteriormente se adicionó 2 ml de HNO₃ 65% (Suprapur, Merk). Con el objetivo de reducir la emisión de vapores, los tubos se taparon con una esfera de vidrio. La predigestión se llevó adelante durante la noche a T° ambiente.

- Digestión: Primeramente, los tubos conteniendo las muestras predigeridas se incubaron durante 30 minutos a 105 °C en un Termoreactor HI 839800 (HANNA instruments). Posteriormente se adicionaron 0,75 ml de H₂O₂ 30% Pro-análisis (Cicarelli) y se incubaron durante 3 hs a 105 °C. Luego, las muestras se incubaron a 150 °C durante 1 hora para finalizar el proceso de digestión. El digesto obtenido fue transferido a un tubo donde se enrazó a un volumen final de 5 ml. Para eliminar impurezas, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a media potencia en una centrifuga CM

2036 (Rolco S.R.L.). Finalmente se obtuvo una alícuota de 4 ml a partir de la cual se realizaron las determinaciones analíticas. Con el objetivo de minimizar el error asociado a posibles contaminaciones, en cada ronda de digestión se colocaron los controles correspondientes.

Determinación de contenido de nutrientes en los digestos.

Distintas aproximaciones metodológicas fueron utilizadas para la cuantificación y posterior estimación de las concentraciones de distintos elementos presentes en los granos.

Determinación de micro y macroelementos por emisión atómica de plasma por microondas

En los digestos obtenidos, se determinó la concentración de Aluminio (Al), Calcio (Ca), Cobre (Cu), Estroncio (Sr) Hierro (Fe), Magnesio (Mg), Manganeso (Mn) y Zinc (Zn) mediante espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES 4200, Agilent Technologies). Las longitudes de onda de lectura para cada elemento químico fueron seleccionadas teniendo en cuenta maximizar la señal de emisión y simultáneamente minimizar interferencias con otros elementos. Las condiciones de medición se ajustaron a las recomendaciones del fabricante del equipo. En la tabla siguiente se resumen las condiciones de medición utilizadas.

Tabla 1. Condiciones de operación del equipo de MP-AES para la estimación de la concentración de Ca, Mg, Al, Cu, Sr, Fe, Mn y Zn.

Parámetros	Ca	Mg	Al	Cu	Sr	Fe	Mn	Zn
Longitud de onda (nm)	422.673	285.213	396.152	324.754	421.552	371.993	403.076	213.857
Replicas	3							
<i>Pump Rate</i> (rpm)	15							
<i>Read time</i> (s)	3							
<i>Nebulizer Flow</i> (L/min)	0,55							
<i>Rinse time</i> (s)	10							
<i>Sample uptake delay</i> (s)	30							
<i>Stabilization time</i> (s)	10							

Determinación de contenido de P

La concentración de P de los digestos se determinó según la técnica colorimétrica del amarillo de vanadato adaptado de Kitson & Mellon (1944) para la medición en microplaca. La mezcla de reacción se realizó de la siguiente manera: Primeramente, y para asegurar que la concentración de P estimado en las muestras se encuentre dentro de la curva de calibración, 75 μL de una dilución 1/10 de los digestos originales fueron utilizados en cada medición. Siguiendo una secuencia, luego se adicionó 30 μL de Solución A (ver composición más abajo) a cada pocillo, seguido de 30 μL de Solución B y 165 μL de H_2O desionizada-destilada. La curva de calibración se construyó con soluciones conteniendo 0, 10, 20, 40, 50 y 60 ppm de P. Previa agitación durante 20 segundos, se midió la absorbancia a 460 nm en el lector de microplacas Synergy H1 (Biotek). Tanto, los puntos de la curva de calibración como de los digestos se midieron por triplicado, promediándose los valores obtenidos. La presencia de P en las muestras control fueron tratadas sin ser diluidas.

Preparación de las soluciones de reacción:

Solución A: disolver 1,25 g de NH_4VO_3 en 250 ml de H_2O hirviendo, enfriar a T° ambiente, agregar 10 ml de HNO_3 , llevar a 500 ml con H_2O desionizada-destilada.

Solución B: 5% de $((\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O})$ en H_2O (2,5 g en 50 ml).

Determinación de la concentración de potasio (K)

La concentración de K se determinó mediante espectrofotometría de llama. Para ello, apropiadas diluciones de los digestos se midieron en un fotómetro de llama (Zeltec), ZF-250. Previo a la lectura de las muestras, y para obtener una mayor resolución en la lectura, se realizó la calibración del fotómetro de llama configurando la ganancia en 150 unidades para el punto más concentrado de la curva de calibración (solución 40 ppm). La curva de calibración se construyó con soluciones conteniendo 0, 2,5, 5, 10, 20 y 40 ppm de K. A partir de la ecuación de una recta que ajustó la curva de calibración se realizaron los cálculos de concentración de las muestras y los controles correspondientes.

Criterio para la incorporación y/o exclusión de datos

De las mediciones obtenidas, para los macronutrientes (Ca, Mg, P y K) y los micronutrientes (Al, Cu, Sr, Fe, Mn y Zn) se calcularon las concentraciones cuyos valores se expresan en ppm (mg/kg).

Mediante el uso del software Past 3.26b (Hammer *et al.*, 2001) se realizó un análisis de componentes principales (PCA) conteniendo los registros de todas las concentraciones estimadas para cada elemento evaluado para las 102 líneas. Posteriormente, el criterio de eliminación de datos aberrantes fue la exclusión de aquellas líneas que quedaron fuera de una elipse que representa el 95% de confianza. La estadística descriptiva se realizó con el software Infostat 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Evaluación de las diferencias en la acumulación de nutrientes entre subpoblaciones de trigos argentinos.

Se realizaron gráficos de caja para visualizar el rango de la concentración de cada elemento, en las 4 subpoblaciones. Para ello se utilizó el paquete *ggplot2* (Wickham, 2016) en RStudio 2019 (RStudio Team, 2019) trabajando con la versión R 3.6.2 (R Core Team 2019). Para evaluar posibles diferencias en la concentración de elementos entre subpoblaciones, se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) y test de comparación de medias de Tukey. Los datos que no cumplieron con los supuestos (normalidad y homocedasticidad) fueron transformados (como se indica más adelante en “Análisis para la identificación de zonas genómicas asociadas a la acumulación de nutrientes: análisis de mapeo por asociación”) utilizando el programa InfoStat versión 2018 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

Estudio de correlación entre los elementos contenidos en los granos y una característica de valor agronómico: el peso de mil granos.

Dos tipos de correlaciones fueron realizadas: *i*) la primera de ellas para evaluar la asociación existente entre las concentraciones de elementos entre sí; *ii*) y la segunda para evaluar las asociaciones presentes entre la concentración de elementos en el grano respecto de una característica de interés agronómico: el peso de 1000 granos (TWG).

Debido a la carencia de normalidad de los datos en ambos estudios se llevó a cabo un análisis de correlación de Spearman utilizando el paquete *PerformanceAnalytics* (Peterson & Carl, 2019) en RStudio 2019 (RStudio Team, 2019) trabajando con la versión R 3.6.2 (R Core Team 2019). Cabe mencionar que para el análisis de correlación entre elementos se trabajó con 96 líneas (6 líneas excluidas al realizar el PCA). Mientras que para la correlación entre contenido de elemento y el TWG se utilizó el mismo grupo de semillas que fueron utilizadas para el cálculo de la concentración de elementos y dada la disponibilidad de semillas, este fue realizado para 93 de las 96 líneas.

Análisis para la identificación de zonas genómicas asociadas a la acumulación de nutrientes: análisis de mapeo por asociación.

Uno de los supuestos subyacentes al análisis de mapeo por asociación es que los datos a ser analizados deben presentar una distribución normal. La falta de réplicas impide la apropiada realización de un test de normalidad. Por tal motivo se realizó una evaluación de la distribución y la normalidad mediante interpretación gráfica de histogramas y QQ plot correspondientes (White *et al.*, 1930). Mientras que se utilizaron los datos primarios para el manganeso (Mn), los datos correspondientes al Al, fueron transformados mediante la aplicación de logaritmo en base 10 (Log_{10}). Para el resto de los datos se utilizó el algoritmo de Box-Cox (Box y Cox, 1964) como se sugiere en Ziegler *et al.*, 2018. Tal algoritmo fue ejecutado en RStudio 2019 (RStudio Team, 2019) trabajando con R 3.6.2 (R Core Team 2019) a partir de un script adaptado de Mangiafico (2016). La fórmula utilizada por el algoritmo para la conversión de los datos mediante Box-Cox es la siguiente:

$$\text{Dato transformado} = (\text{Dato sin transformar}^{\lambda} - 1) / \lambda$$

Donde λ toma un valor determinado por el algoritmo para cada conjunto de datos.

Para la identificación de regiones genómicas asociadas a la acumulación de nutrientes de interés en los granos de trigo, se realizó un análisis de mapeo por asociación o *Genome-Wide Association Studies* (GWAS). Los datos fueron normalizados utilizando el método SUPER (Wang *et al.*, 2014) implementado en el paquete de R GAPIT (Lipka *et al.*, 2012) para realizar el análisis de mapeo por

asociación, tomando como referencia las indicaciones del manual de instrucciones. Además de los datos fenotípicos del contenido de cada elemento, GAPIT requiere la matriz correspondiente a la estructura de subpoblaciones y la matriz genotípica, las que fueron cedidas gentilmente por el Dr. Vanzetti (Vanzetti *et al.*, 2013; Basile *et al.*, 2019). Mientras que los datos presentes en la matriz de la estructura corresponden a las cuatro subpoblaciones descritas en la introducción, los genotípicos consistieron en 4516 haplotipos y 495 genes marcadores o SNPs (Polimorfismos de nucleótido simple) informativos. Los SNPs fueron obtenidos a partir del *35k Axiom Wheat Breeder's Genotyping Array* (Allen *et al.*, 2017), esos mismos SNPs fueron utilizados por Basile *et al.*, 2019 para la construcción de los haplotipos.

A partir de los resultados del GAPIT se estudiaron los Manhattan plot de cada elemento para buscar asociaciones con alta significancia usando como punto de corte un p-Valor $< 0,001$ (es decir $-\log_{10}(P) > 3$), se tomó el valor más alto de significancia en todos los casos excepto para Fe donde se tomaron 2. Luego se identificó si esas asociaciones correspondían a SNPs o Haplotipos, y haciendo uso de la base de datos Ensembl (Cunningham *et al.*, 2019) y la base de datos PANTHER versión 14 (Mi *et al.*, 2019) se exploró el genoma de *Triticum aestivum* (Appels *et al.*, 2018) tomando como criterio, la inclusión de los 10 genes flanqueantes en ambas direcciones cuando se trató de SNPs, y cuando se trató de Haplotipos se analizaron los genes que lo componían, excepto en un caso del Fe donde un haplotipo estaba compuesto por solo 2 SNPs y se tomaron los 10 genes flanqueantes a esos SNPs. El análisis realizado en GAPIT (Lipka *et al.*, 2012) se llevó a cabo usando un LD =0,1 (desequilibrio del ligamiento), lo que equivale a 50 Mb (Basile *et al.*, 2019), por lo que se tomaron 50 Mb a cada lado del haplotipo o SNP encontrado para determinar la región genómica en la cual puede estar el gen causante del fenotipo. El análisis de posibles genes candidatos asociados a la concentración de los elementos en las regiones genómicas ($> 100\text{Mb}$) se realizó mediante una búsqueda bibliográfica.

Resultados

Análisis de Componentes Principales (PCA)

En las estimaciones de concentraciones de elementos en las 102 líneas estudiadas, se observó que algunos genotipos mostraron una gran variabilidad en la composición elemental de los granos. Un análisis de componentes principales (PCA) dio como resultado (Figura 3) que la componente 1, distribuida a lo largo de la abscisa, explicó el 36,5% de la variabilidad de los datos y está relacionada con la concentración de Sr, Mn y Mg; mientras que la componente 2, distribuida a lo largo de la ordenada, y que está relacionada principalmente a la concentración de Al y Cu, explicó el 15,9% de la variabilidad del conjunto de los datos. Por otro lado, y con el objetivo de detectar posibles datos extremos y que pudieran conducir a la aparición de falsos positivos en nuestro estudio de mapeo por asociación, este mismo PCA (Figura 3) se utilizó para la remoción de datos anómalos. Para ello, se excluyeron de análisis posteriores las líneas que quedaron por fuera de la elipse que determina un intervalo de confianza del 95% (seis líneas en total). Cabe mencionar que tales líneas mostraron una elevada concentración de uno o más elementos. A saber: **BIOINTA1006** (Zn: 154,65 ppm; Sr: 9,23 ppm), **BIOINTA2001** (Cu: 35,59 ppm), **Klein32** (Mn: 120,11 ppm; K: 7076,83 ppm; Ca: 1585,17 ppm, Mg: 2997,57 ppm), **BaguetteP.11** (Mn: 101,46 ppm; K: 6663,49 ppm), **KleinRendidor** (Al: 430,43 ppm) y **KleinGuerrero** (Al: 383,60 ppm). En un nuevo PCA con las 96 líneas no se identificó la formación de grupos distintivos dentro de la población. Es necesario aclarar que para poder utilizar un criterio con mayor robustez para detectar y descartar datos extremos, es condición necesaria contar con réplicas verdaderas que reflejen la variabilidad biológica de cada uno de los genotipos.

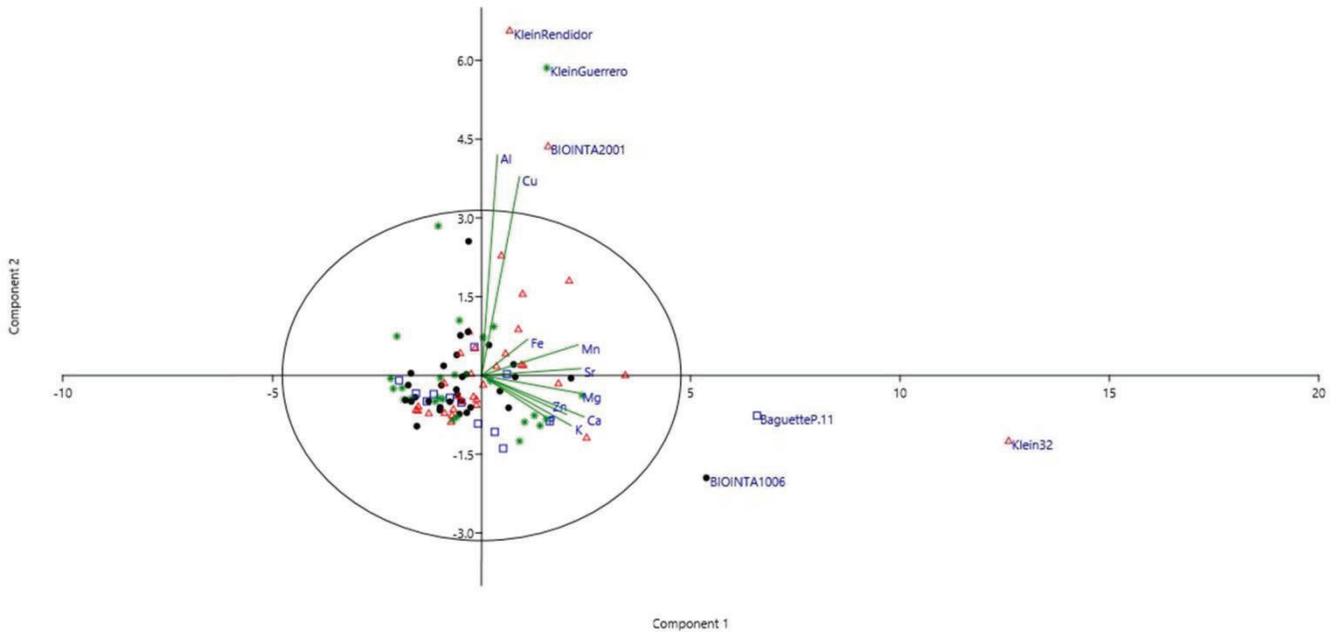


Figura 3. Análisis de componentes principales (PCA) realizado para las 102 líneas y los elementos estimados (Fe, Mn, Sr, Ca, Mg, Zn, K, Cu y Al). La elipse determina un intervalo de confianza del 95%. Las líneas por fuera de la elipse fueron excluidas por contener datos extremos.

Variabilidad de la concentración de nutrientes en los granos de trigos argentinos estudiada.

En la tabla 2 se muestra de forma resumida los valores de concentración para cada uno de los elementos estudiados. Teniendo en cuenta los elementos esenciales, y de forma particular los micronutrientes, se observó que la concentración media de Zn en los granos fue alrededor de 38 ppm, cuyo rango varió entre 23,8 y 116,7 ppm. Por otro lado, para el Fe, la media estimada fue alrededor de 40 ppm con un rango de valores entre 2 y 132 ppm, aproximadamente. El Cu, mostró una media cercana a 6,9 ppm con valores distribuidos en un rango de 3,8 y 17,5 ppm. En tanto que para el Mn la media fue de 47,2 ppm y un rango aproximado de 31 y 68,5 ppm. Por otro lado, dentro de los macronutrientes, se observó una media de 4084 ppm para K con un rango entre 2669 y 5703 ppm. La media registrada para P fue de 3672 ppm aproximadamente con un rango de 2886 y 8290 ppm. El valor medio de Ca fue de 754 ppm y estuvo distribuido entre 523 y 1469 ppm. Finalmente, los valores

medios para Mg fueron de alrededor de 1266 ppm distribuidos en un rango de 1002 y 2391 ppm. Cabe destacar que, de los elementos no esenciales estudiados, el Sr mostró una media de 3,7 ppm con una variación entre 2,4 y 7,4 ppm. En tanto que, para el Al, los valores medios estuvieron alrededor de 38,4 ppm con una variación entre 1.97 y 175.9 ppm.

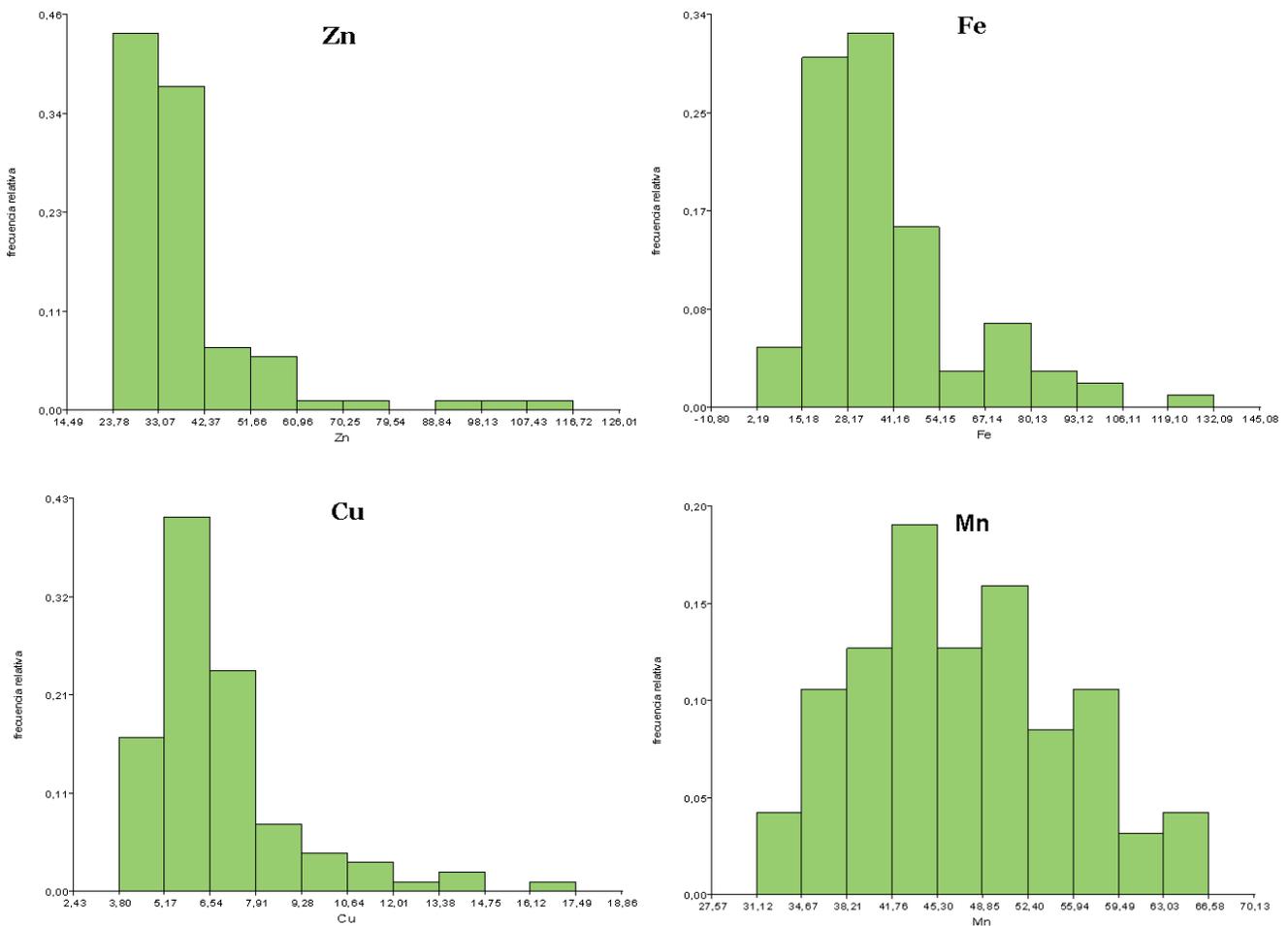
Tabla 2. Concentración de elementos en ppm en los granos de trigo estudiados. n: cantidad de líneas analizadas para cada elemento; D.E., Desvío estándar; Mín. y Máx., valores mínimo y máximo registrados, respectivamente (ppm); Q1: Cuartil 1 (percentil 25); Q3: Cuartil 3 (percentil 75).

Elemento	n	Media	D.E.	Mín.	Máx.	Mediana	Q1	Q3
Zn	96	38,13	15,00	23,78	116,72	34,68	29,99	39,04
Fe	96	39,67	21,59	2,19	132,09	35,20	25,25	45,12
Cu	96	6,89	2,26	3,80	17,49	6,19	5,61	7,50
Mn	96	47,22	8,18	31,12	66,58	46,61	41,14	52,41
K	96	4084,40	478,46	2968,89	5702,96	4069,19	3770,94	4375,12
P	96	3671,87	712,91	2886,07	8289,87	3542,75	3320,77	3804,77
Ca	96	754,12	148,24	523,44	1469,53	731,42	658,13	801,39
Mg	96	1265,92	184,07	1002,38	2391,64	1244,68	1165,47	1339,33
Sr	96	3,71	0,75	2,41	7,43	3,65	3,21	4,05
Al	96	38,39	34,94	1,97	175,88	26,06	16,86	42,22

Posteriormente, se analizó el cociente valor máximo/valor mínimo de concentración, con el objetivo de tener una idea del grado de variabilidad de las concentraciones de cada uno de los nutrientes estudiados dentro de la población. Para micronutrientes esenciales, el orden de variación observado fue Fe>Zn>Cu>Mn con valores de 60,3; 4,9; 4,6 y 2,2 veces, respectivamente; mientras que, para los macronutrientes, dicho orden fue P≥Ca>Mg>K con valores de 2,87; 2,8; 2,4 y 1,75 respectivamente. Cuando se analizan tales variaciones de los nutrientes no esenciales, se observó que Al>Sr con valores de 89 y 3 respectivamente. La variabilidad mostrada por el Al sugiere la existencia de una variación importante en su acumulación en el grano, la cual podría ser explorada en futuros estudios. Además, junto a la elevada variabilidad del Fe, parece haber una relación entre ambos elementos, la cual detallaremos en los resultados del análisis de correlación más adelante.

Distribución de frecuencias de las concentraciones de los elementos estudiados.

Posteriormente, y para realizar una evaluación de la distribución y de la variabilidad de la acumulación de elementos en la población estudiada, se analizó la distribución de las frecuencias de las concentraciones de cada elemento (Figura 4). Puede observarse de manera general que, solo el Mn presenta una distribución cercana a la normalidad, en tanto que para el resto de los elementos estudiados, se observa una distribución asimétrica positiva con algunos datos separados del grupo principal. Con respecto a la variabilidad, los datos que se observan separados del grupo principal indican que hay unas pocas líneas con una alta concentración del nutriente en cuestión. Tomando como ejemplo para el caso del Zn, se observan tres barras con una frecuencia relativa equivalente a 3 líneas que tienen un elevado contenido de este elemento.



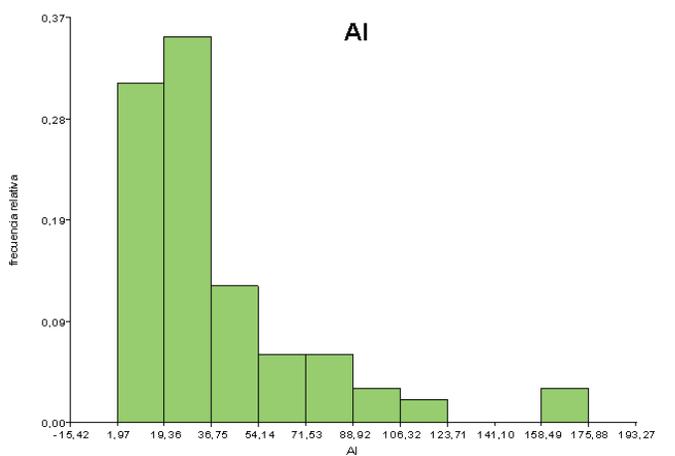
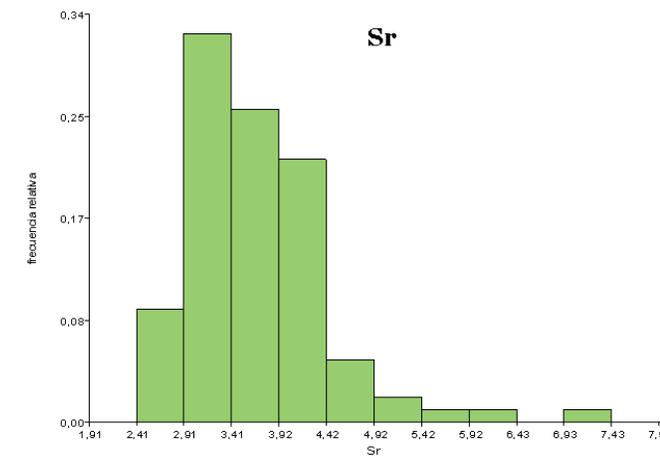
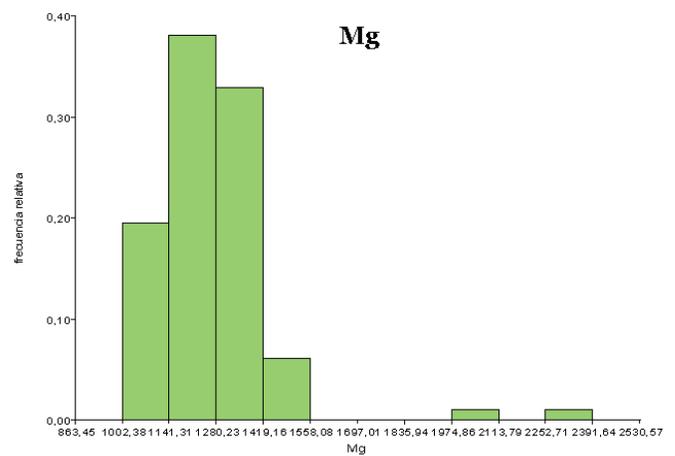
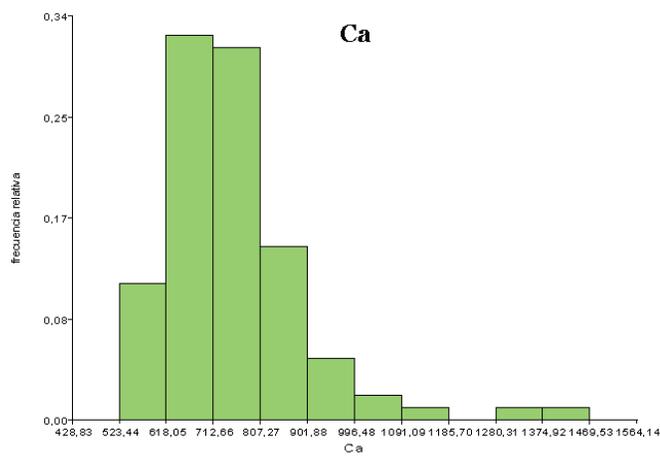
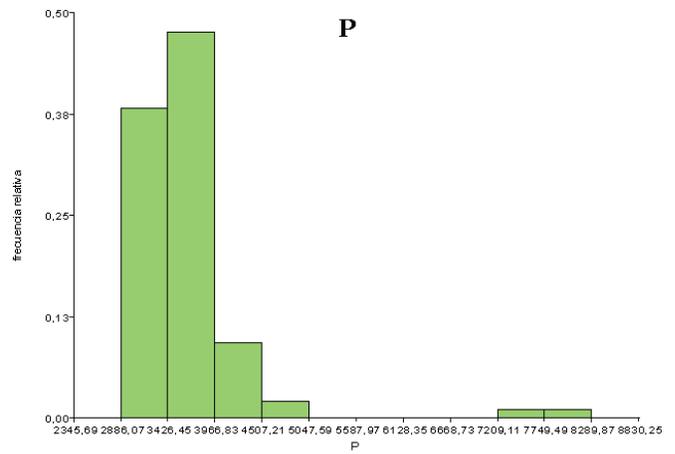
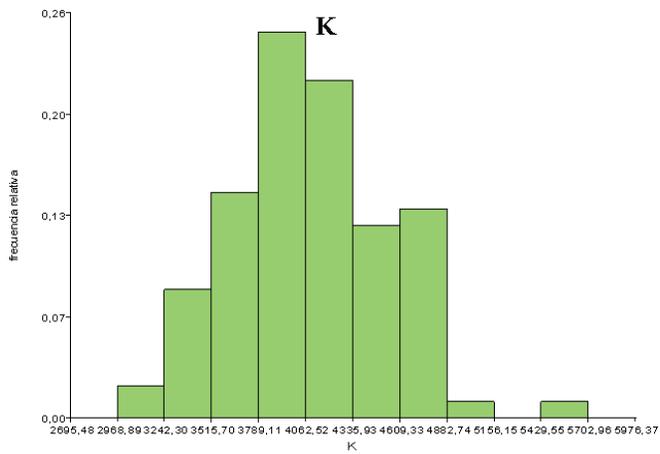


Figura 4. Histogramas de distribución de la frecuencia relativa en función de la cocentración de cada elemento analizado.

Acumulación de elementos entre subpoblaciones

Recientemente y a través un análisis de conglomerados basados en modelos (*Model-based cluster analysis*), en donde se evaluó la similitud génica entre genotipos sin utilizar información previa, se estableció que la población estudiada está constituida por cuatro subpoblaciones (Basile *et al.*, 2019) y cuya composición ha sido descripta en la introducción. Una posibilidad descansa sobre la suposición de que las diferencias genotípicas entre subpoblaciones podrían estar asociadas a diferencias en la acumulación de alguno de los elementos en los granos. Para poner a prueba la hipótesis de que existe variabilidad en el contenido de elementos entre subpoblaciones, se evaluaron las diferencias en la acumulación de nutrientes entre las 4 subpoblaciones.

Un análisis de la acumulación de los micronutrientes en cada subpoblación mostró que la concentración de Zn y Fe fue menor en la Q4 con valores medios de 34,88 y 36,19 ppm (Figura 5, Tabla 3). En tanto que, para el Cu, la subpoblación que mostró una mayor acumulación fue la Q2 con valores medios de 7,55 ppm, mientras que para la Q1 fue de 5,71 ppm. Para Mn, mientras que la concentración media entre las subpoblaciones Q1, Q2 y Q4 fue de alrededor de 48.45 ppm, la subpoblación Q1 mostró valores medios de 43,63 ppm (Figura 5, Tabla 3). Para Al, mientras que la población Q1 mostró los menores valores medios cercanos a 30 ppm, la Q2 mostró la mayor acumulación de Al en los granos, con una media de 42,67 ppm. Para el caso del Sr, los valores medios de concentración estuvieron distribuidos entre 3,39 ppm y 3,81 ppm para las poblaciones Q1 y Q2, respectivamente (Figura 5, Tabla 3). Un análisis de la varianza (ANOVA, $p=0,05$) para cada elemento, indicó que no existen diferencias entre las subpoblaciones estudiadas.

En tanto que la para la acumulación de macronutrientes, se observó que para K y Mg las concentraciones medias mostraron valores similares entre las cuatro subpoblaciones (Figura 6), con valores cercanos a 4115 ppm y 1265 ppm para K y Mg, respectivamente (Tabla3). En tanto que, para P, la población Q1 mostró los valores medios más bajos (675,5 ppm), respecto de la media para las

poblaciones Q2-4 con valores medios de 765,6 ppm (Figura 6, Tabla 3). No se observaron diferencias significativas entre subpoblaciones cuando se realizó el ANOVA.

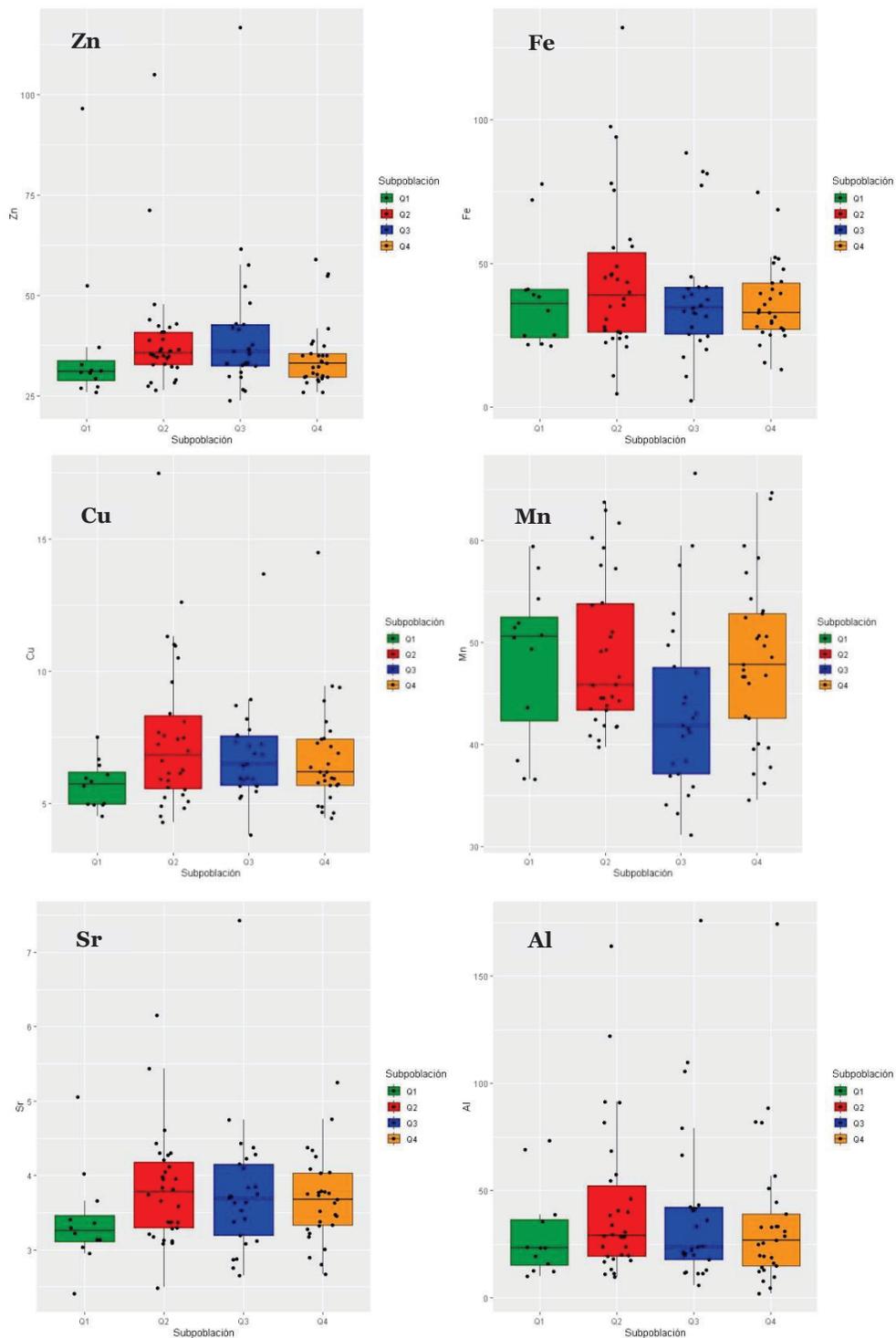


Figura 5. Gráficos de caja en donde se muestra la acumulación (ppm) de Zn, Fe, Cu, Mn Sr y Al, en cada una de las subpoblaciones (Q1, Q2, Q3 y Q4). Las diferencias en la concentración de cada elemento fueron evaluadas mediante ANOVA y test de comparación de medias de Tukey ($p=0,05$).

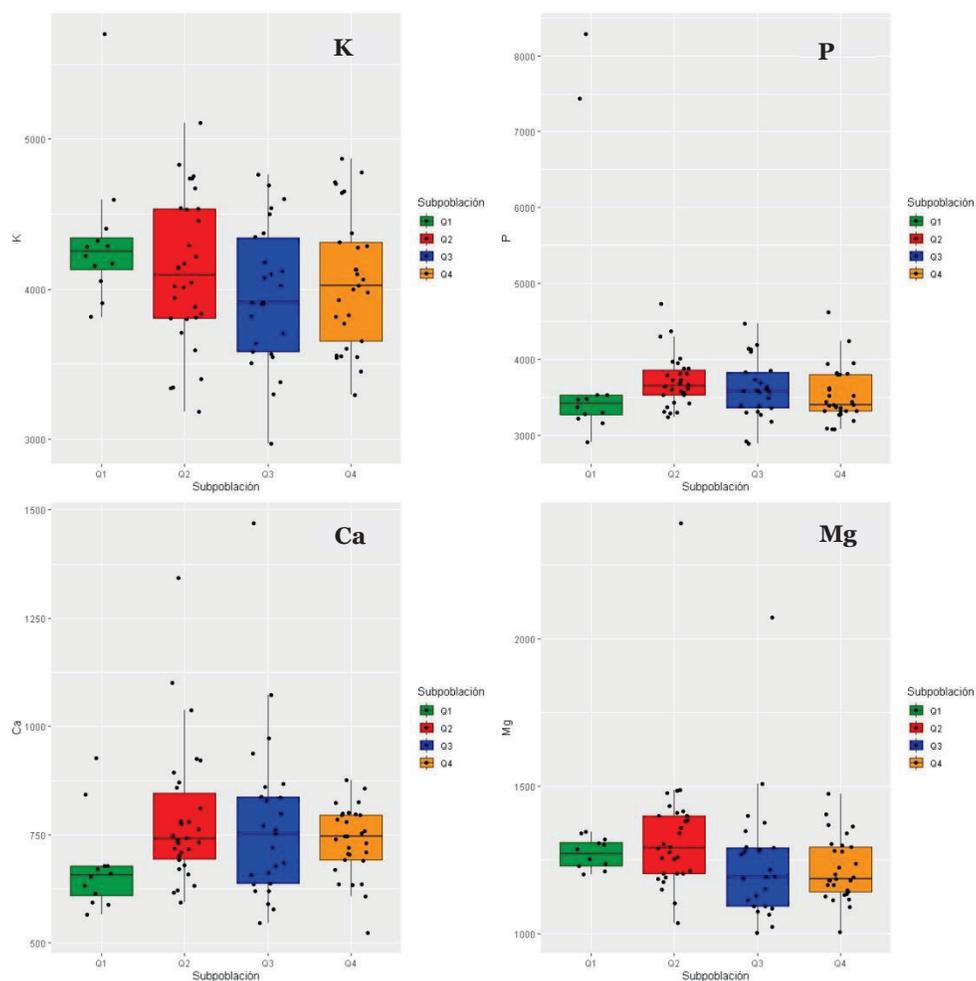


Figura 6. Gráficos de caja en donde se muestra la acumulación (ppm) de K, P, Ca y Mg en cada una de las subpoblaciones (Q1, Q2, Q3 y Q4). Las diferencias en la concentración de cada elemento fueron evaluadas mediante ANOVA y test de comparación de medias de Tukey ($p=0,05$).

Tabla 3. Valores medios de la concentración (ppm) de los elementos en cada subpoblación de las 96 líneas de trigos argentinos estudiadas.

Subpoblación	n	Zn	Fe	Cu	Mn	K	P	Ca	Mg	Sr	Al
Q1	12	37,68	38,08	5,71	48,33	4326,27	4078,43	675,46	1271,24	3,39	29,79
Q2	30	39,27	44,56	7,55	48,86	4119,46	3706,59	785,40	1331,60	3,81	42,67
Q3	25	40,74	38,59	6,85	43,63	3961,46	3604,98	775,66	1240,31	3,79	40,36
Q4	29	34,88	36,19	6,72	48,17	4054,04	3525,38	735,75	1217,86	3,67	35,82

Estudio de correlación entre los elementos contenidos en los granos y su relación con una característica de valor agronómico: el peso de mil granos

Es sabido que los elementos que forman parte del ionoma de las plantas guardan una estrecha relación entre ellos inclusive, conformando una red iónica finamente reguladas (Baxter 2015; Huang & Salt, 2016). Para evaluar las relaciones existentes entre los elementos de la población aquí estudiada, se realizó un estudio de correlación de las concentraciones de los elementos (Figura 7).

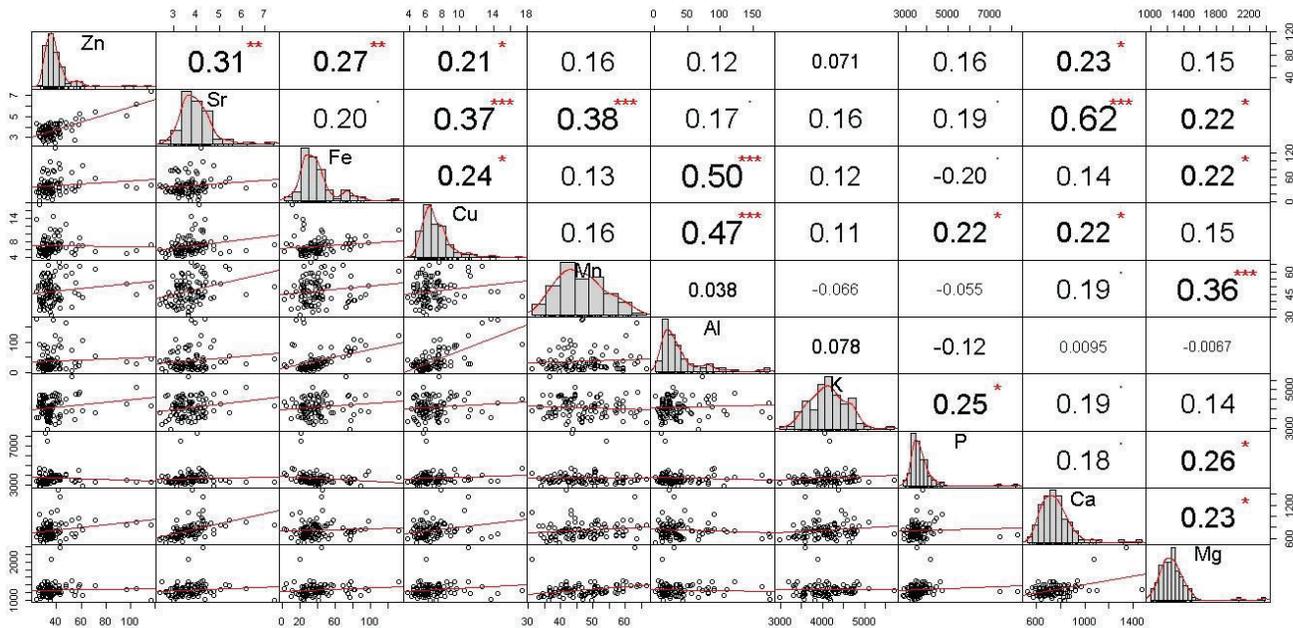


Figura 7. Matriz de correlación (Spearman) de las concentraciones de elementos. Los números dentro de los recuadros son los valores de los coeficientes de Spearman (ρ). Los asteriscos rojos denotan el nivel de significancia de p : *** p valor $<0,001$, ** p valor $<0,01$, * p valor $<0,05$, \cdot p valor $<0,1$. En la parte inferior se muestra las distribuciones de las relaciones. La línea roja indicando el mejor ajuste de la nube de datos.

Del análisis de correlación (Figura 7), se observa que las correlaciones más significativas ($p \leq 0,001$) fueron entre los siguientes pares de elementos: Ca-Sr (0,62), Fe-Al (0,50), Cu-Al (0,47) Sr-Mn (0,38), Cu-Sr (0,37) y Mn-Mg (0,36). Seguidas por las correlaciones que mostraron un $p \leq 0,01$, Zn-Sr (0,31) y Zn-Fe (0,27). Por último, se observó correlaciones con un nivel de significancia menor ($p \leq 0,05$) para los pares P-Mg (0,26), P-K (0,25), Fe-Cu (0,24), Ca-Mg y Ca-Zn con valores de correlación de 0,23; los pares Cu-P; Fe-Mg; Sr-Mg; Cu-Ca con valores de correlación de 0,22 y Zn-Cu con 0,21.

A los fines de los objetivos propuestos en este trabajo, podemos destacar el par Zn-Fe ($\rho=0,27$ con p -valor $<0,01$). Al respecto, valores similares han sido observados para trigo. Por ejemplo, en 28 cultivares de trigo que mostraron altas concentraciones de Zn en los granos y, que fueron cultivadas a campo con aplicación de $ZnSO_4 \cdot H_2O$, se observó una correlación de 0,25 y 0,21 ($p \leq 0,05$) para dos años consecutivos (2017 y 2018) (Velu *et al.*, 2019). En tanto que Zhao *et al.*, 2009 observaron una correlación de 0,294 ($p < 0,01$) en un estudio de 150 líneas de trigo. Por otro lado, en un panel conformado por 34 líneas de *T. aestivum* y 2 líneas de *T. durum* se observó una correlación de aproximadamente 0,7 y 0,5 para dos años consecutivos (Khokhar *et al.*, 2018). También fueron observados valores de 0,68 y 0,70 en granos de un panel compuesto por 330 líneas de *T. aestivum* (Cu *et al.*, 2020). Nuestros datos confirman la relación positiva existente entre estos dos elementos, sin embargo, los valores de correlación observados resultan ser moderados cuando se comparan con los resultados de otros trabajos. Un esfuerzo experimental adicional que contemple la posibilidad de incorporar otras localidades y temporadas distintas es necesario para confirmar esta relación dentro de la población estudiada.

Por otro lado, se destacamos la correlación de $\rho=0,62$ entre Sr y Ca. A pesar de que Sr es un elemento no esencial para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas, este resultado es explicado, al menos parcialmente, por la gran similitud química que existe entre ambos elementos del grupo II de la tabla periódica lo que conduce a que ambos sean capturados y traslocados por las plantas a través de los mismos mecanismos de transporte (Maksimovic *et al.*, 2017; Andersen & Jackson, 1972). Estos valores del coeficiente de correlación son similares a los observados por Khokhar *et al.*, 2018 (aproximadamente 0,75 para los años 2013 y 2014).

En cuanto al par K-P, dos de los macronutrientes más importantes presentes en los tejidos vegetales y, cuyo coeficiente de correlación en este estudio fue de $\rho=0,25$ ($p \leq 0,05$), ha sido observado en el vástago de plantas valores de una importante correlación $\rho=0,58$ y 0,73 ($p \leq 0,05$) cuando las plantas fueron cultivadas en condiciones hidropónicas y en suelo respectivamente (Pii *et al.*, 2015). La

baja relación observada en nuestro conjunto de datos podría estar relacionada a que en los granos la relación K-P es más débil que la observada en el vástago.

Un caso que amerita un mejor estudio, está dado por las correlaciones observadas entre el Al, el Fe y el Cu (Al-Fe $\rho=0,50$ y Al-Cu $\rho=0,50$; $p<0,001$). Es conocido que una disminución del pH del suelo tiene un impacto en la acumulación de Fe y simultáneamente de Al en los tejidos vegetales, lo podría llevar a las plantas a una situación estrés por toxicidad (Khabaz-Saberi *et al.*, 2006). Desconocemos si este caso particular de estrés puede conducir a una acumulación desmesurada de Al en los granos, lo que podría perjudicar la calidad de los mismos.

Por otro lado, se realizó un estudio de correlación entre los elementos estudiados y uno de los componentes del rendimiento: el peso de mil granos (*Thousand Grain Weight*, TGW). En la tabla 4 se observa que, en términos generales existe una relación negativa entre la concentración de algunos nutrientes en los granos y el TGW. La tendencia obtenida de ρ fue: $Ca < K < Zn < Sr \leq Al$ (Tabla 4). Independientemente de los elementos implicados en tales relaciones negativas, las mismas pueden ser explicadas parcialmente a un efecto de dilución que se lleva a cabo durante el llenado de los granos con sustancias tales como los carbohidratos y proteínas.

Tabla 4. Estudio de correlación de Spearman entre las concentraciones de elementos medidas y el peso de mil granos (TGW) del año 2017. En negrita y con un * coeficientes ρ significativos, p-valor $<0,05$.

Elemento	Característica	n	ρ	p-valor	Elemento	Característica	n	ρ	p-valor
Zn	TGW2017	93	-0,24*	0,0182	Al	TGW2017	93	-0,21*	0,0400
Sr	TGW2017	93	-0,21*	0,0479	K	TGW2017	93	-0,25*	0,0170
Fe	TGW2017	93	-0,15	0,1435	P	TGW2017	93	-0,12	0,2474
Cu	TGW2017	93	-0,19	0,0727	Ca	TGW2017	93	-0,27*	0,0081
Mn	TGW2017	93	0,05	0,6418	Mg	TGW2017	93	-0,02	0,8426

Identificación de zonas genómicas asociadas a la acumulación de nutrientes

Con el objetivo de determinar el tamaño, posición de las regiones genómicas y eventualmente genes asociados a la acumulación de los elementos estudiados se decidió analizar los gráficos Manhattan producidos en el análisis GAPIT, en concreto se decidió avanzar con el análisis de los siguientes elementos: Fe, K, P y Al. Para ello se tomó como criterio de significancia que el p valor sea $< 1 \times 10^{-3}$. Se decidió estudiar el K debido a que se encontró un haplotipo significativamente asociado a la concentración de este elemento, y también se estudió el Al debido a la gran variabilidad en su concentración que encontramos en la población. La búsqueda de genes presentes en las regiones genómicas de interés se realizó buscando en bibliografía y la búsqueda dentro de los haplotipos /genes flanqueantes se realizó utilizando la base de datos Ensembl Plants (Cunningham *et al.*, 2019) en donde se utilizó la base de datos PHANTER 1.4 para identificar la familia de las proteínas codificadas por los genes de interés (Mi *et al.*, 2019).

Hierro (Fe)

Para Fe, se identificaron 2 haplotipos (Figura 8) con un p menor al punto de corte propuesto ($p < 1 \times 10^{-3}$). El primer haplotipo que mostró valores significativos ($p=7,42 \times 10^{-5}$) en el cromosoma 3B (Chr3B-B77-Hap1), se ubica entre las bases 598.995.656 y 606.570.991 y la región genómica queda delimitada por 50 Mb flanqueantes en cada dirección. El segundo haplotipo, identificado en el cromosoma 1B (Chr1B-B49-Hap1) y que mostró un menor nivel de significancia que el anterior ($p= 1,79 \times 10^{-4}$), se ubica entre las bases 564.908.889 y 565.336.801, y cuya región genómica queda delimitada de la misma manera que la mencionada anteriormente.

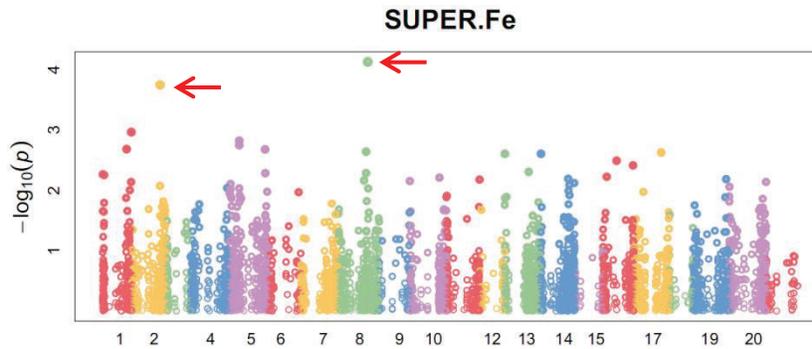


Figura 8. Grafico Manhattan para la asociación entre los haplotipos y SNPs y la concentración de Fe en el genoma de *T. aestivum* (21 cromosomas) realizado con GAPIT mediante el método SUPER. Flechas rojas indican haplotipos con alta significancia que fueron seleccionados para análisis. A la izquierda el haplotipo Chr1B-B49-Hap1 ($p= 1,79 \times 10^{-4}$) en el cromosoma 2 (1B) y a la derecha el haplotipo Chr3B-B77-Hap1 ($p=7,42 \times 10^{-5}$) en el cromosoma 8 (3B).

Para este elemento se analizó la presencia de genes presentes dentro del haplotipo Chr3B-B77-Hap1 en el cromosoma 3B. Se encontraron 49 genes (Anexo 2) de los cuales se destaca el TraesCS3B02G382100 que codifica para un representante de la familia METAL-NICOTIANAMINE TRANSPORTER YSL18-RELATED PROTEIN. En arroz, se han descrito 18 genes de la familia YSL (Yellow stripe-like). *OsYSL18* (miembro del grupo IV de la familia YSL) es un transportador de Fe(III)-DMA (deoxymugineic acid) siendo principalmente expresado en las flores, por lo que podría estar implicado en la traslocación de Fe en los órganos reproductivos y en la homeostasis de Fe. (Aoyama *et al.*, 2009).

Potasio (K)

El haplotipo identificado fue el Chr5A-B34-Hap2 ($p= 2,6 \times 10^{-7}$), en el cromosoma 5A (Figura 9) situado entre las bases 445.278.539 y 447.536.759. La región genómica queda delimitada por los 50 Mb flanqueantes a las bases que demarcan el haplotipo.

Dentro de este haplotipo se encontraron 18 genes (Anexo 2), sin que se hayan identificado buenos candidatos para la acumulación de K en los granos. Sin embargo, han sido reportados genes representantes de la familia de transportadores de alta afinidad de K KT/HAK/KUP y que se encuentran dentro de la región de 50 Mb flanqueantes a esta zona de interés, TaHAK17a-5AL

(TraesCS5A02G233300, 448.614.349-448.619.914) y TaHAK23-5AL (TraesCS5A02G198700, 403.350.814-403.355.442) (Cheng *et al.*, 2018).

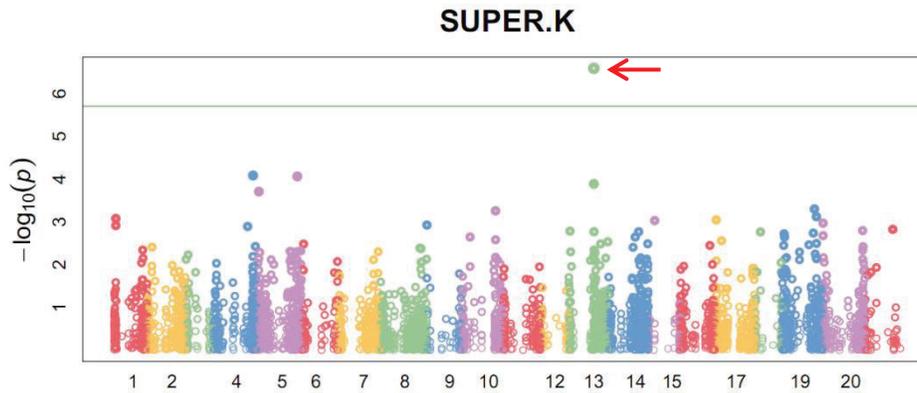


Figura 9. Grafico Manhattan para la asociación entre los haplotipos y SNPs y la concentración de K en el genoma de *T. aestivum* (21 cromosomas) realizado con GAPIT mediante el método SUPER. Flecha roja indica haplotipo Chr5A-B34-Hap2 en el cromosoma 13 (5A) con alta significancia ($p= 2,6 \times 10^{-7}$) que fue seleccionado para análisis.

Fosforo (P)

Para P se identificó al haplotipo Chr3B-B46-Hap1 ($p= 8,63 \times 10^{-5}$) en el cromosoma 3B (Figura 10), entre las bases 452.107.838 y 456.553.872. La región genómica queda delimitada por los 50 Mb flanqueantes a las bases que demarcan el haplotipo. A pesar de que se encontró también el haplotipo Chr3B-B77-Hap1 para Fe en el mismo cromosoma, cuando analizamos la distancia entre las regiones genómicas de ese haplotipo y este encontramos que se ubican a aproximadamente 43 Mb lo que indica que ambas regiones genómicas no estarían relacionadas ya que no se superponen.

Se identificaron 35 genes dentro del haplotipo (Anexo 2), sin embargo, al momento de la escritura de este manuscrito, no pudimos determinar una asociación entre la acumulación de P y la funcionalidad de las proteínas codificadas.

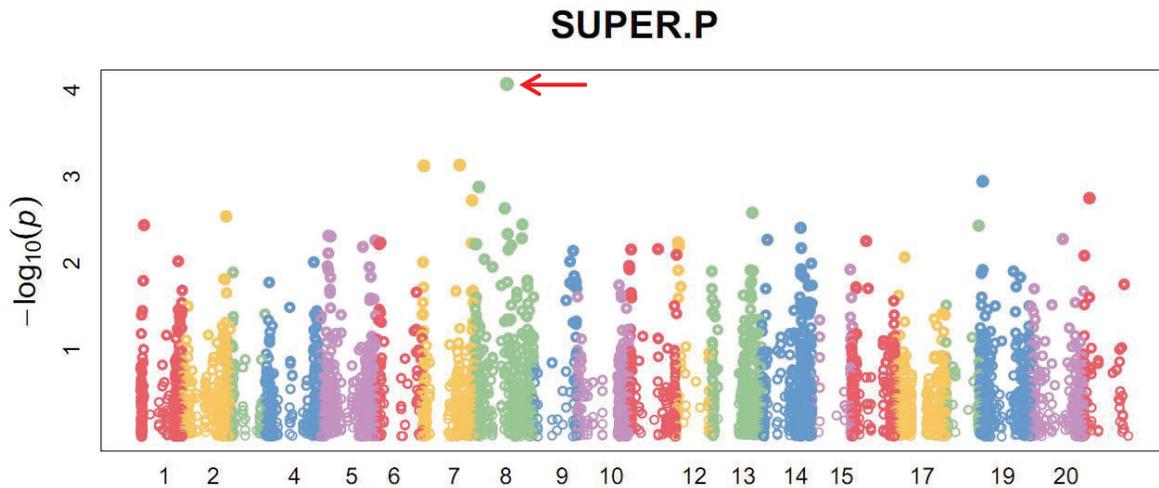


Figura 10. Grafico Manhattan para la asociación entre los haplotipos y SNPs y la concentración de P en el genoma de *T. aestivum* (21 cromosomas) realizado con GAPIT mediante el método SUPER. Flecha roja indica haplotipo Chr3B-B46-Hap1 en el cromosoma 8 (3B) con alta significancia ($p= 8,63 \times 10^{-5}$) que fue seleccionado para análisis.

Aluminio (Al)

Para este elemento, se identificó el SNP AX-94633924 ($p= 9,51 \times 10^{-5}$) en el cromosoma 6B (Figura 11), ubicado entre las bases 714.578.914 y 714.578.915. La región genómica queda delimitada por los 50 Mb flanqueantes a las bases que demarcan este SNP.

Se tomó como criterio explorar 10 genes flanqueantes a cada lado de las bases que delimitan el haplotipo (20 genes en total, Anexo 2), sin embargo, al momento de la escritura de este manuscrito, no pudimos determinar una asociación entre la acumulación de Al y la funcionalidad de las proteínas codificadas. Se explorará las regiones flanqueantes de 50Mb en búsqueda de genes candidatos.

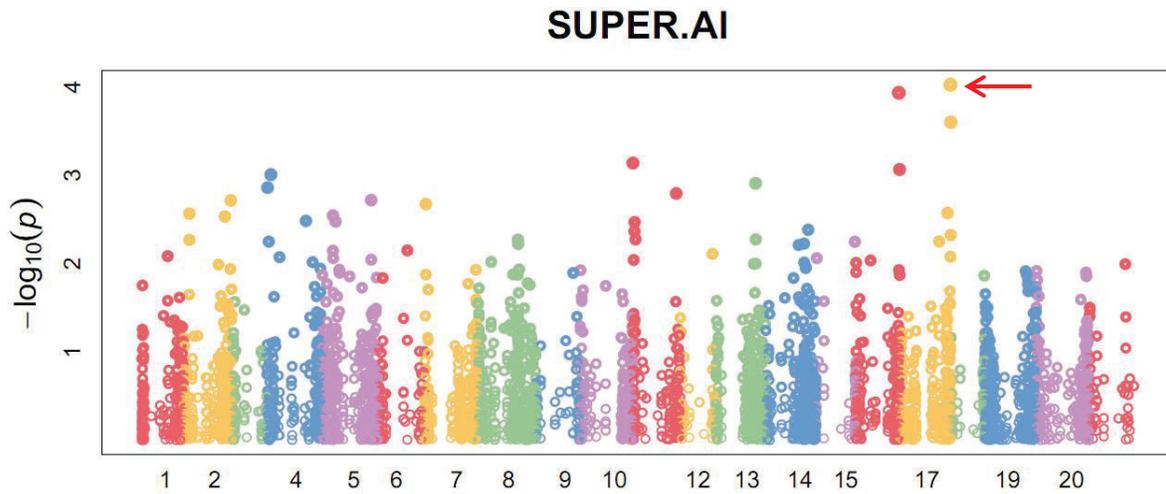


Figura 11. Grafico Manhattan para la asociación entre los haplotipos y SNPs y la concentración de AI en el genoma de *T. aestivum* (21 cromosomas) realizado con GAPIT mediante el método SUPER. Flecha roja indica SNP AX-94633924 en el cromosoma 17 (6B) con alta significancia ($p= 9,51 \times 10^{-5}$) que fue seleccionado para análisis.

Conclusiones y perspectivas a futuro

Se encontró que hay variabilidad en la concentración de elementos dentro de la población estudiada, donde se destaca el Al (valor máximo/valor mínimo = 89) y el Fe (valor máximo/valor mínimo = 60).

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los elementos entre las distintas subpoblaciones que conforman a la población estudiada.

Se encontraron correlaciones significativas las cuales fueron similares a las reportadas en otros trabajos como los casos de los pares Fe-Zn, Ca-Sr y K-P. Además, se observó una importante correlación entre los pares Al-Fe y Al-Cu.

Se observó una correlación negativa entre TGW y todos los elementos estudiados.

En las regiones genómicas analizadas se encontraron genes candidatos para Fe (TraesCS3B02G382100, METAL-NICOTIANAMINE TRANSPORTER YSL18-RELATED PROTEIN) y K (TraesCS5A02G233300, TaHAK17a-5AL y TraesCS5A02G198700, TaHAK23-5AL).

Finalmente se sugiere finalizar con el análisis de las regiones genómicas asociadas a la acumulación de los elementos estudiados con el fin de identificar posibles genes candidatos.

La realización de experimentos adicionales (con un adecuado diseño experimental), podría ayudar a la identificación de nuevas regiones cromosómicas asociadas a la acumulación de elementos de importancia para el mejoramiento de la calidad de los granos de trigo.

Identificar y generar líneas portadoras de variantes alélicas que codifican para proteínas no funcionales mediante la técnica de TILLING (*Target Induced Local Lesions In Genome*) de los genes de interés, para avanzar con su posterior caracterización fisiológica.

Referencias bibliográficas

- Abebe, T., Guenzi, A. C., Martin, B., & Cushman, J. C. (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant physiology*, 131(4), 1748-1755.
- Allen, A. M., Winfield, M. O., BurrIDGE, A. J., Downie, R. C., Benbow, H. R., Barker, G. L., ... & Scopes, G. (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(3), 390-401.
- Andersen, A. J., & Jackson, W. A. (1972). Influence of nitrogen supply on uptake and translocation of strontium and calcium in wheat seedlings. *Physiologia Plantarum*, 26(1), 175-181.
- Aoyama, T., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nagasaka, S., Usuda, K., Kakei, Y., ... & Nishizawa, N. K. (2009). OsYSL18 is a rice iron (III)-deoxymugineic acid transporter specifically expressed in reproductive organs and phloem of lamina joints. *Plant molecular biology*, 70(6), 681-692.
- Appels, R., Eversole, K., Feuillet, C., Keller, B., Rogers, J., Stein, N., ... & Ronen, G. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361(6403), 7191.
- Arora, S., Cheema, J., Poland, J., Uauy, C., & Chhuneja, P. (2019). Genome-Wide Association Mapping of Grain Micronutrients Concentration in *Aegilops tauschii*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 54.
- Balk, J., Connorton, J. M., Wan, Y., Lovegrove, A., Moore, K. L., Uauy, C., Sharp, P. A., & Shewry, P. R. (2019). Improving wheat as a source of iron and zinc for global nutrition. *Nutrition Bulletin*, 44(1), 53-59.
- Basile, S. M. L., Ramirez, I. A., Crescente, J. M., Conde, M. B., Demichelis, M., Abbate, P. E., Rogers, W. J., Pontaroli, A. C., Helguera, M. & Vanzetti, L. S. (2019). Haplotype block analysis of an Argentinean hexaploid wheat collection and GWAS for yield components and adaptation. *BMC Plant Biology*, 19(1), 553.

Baxter, I. (2015). Should we treat the ionome as a combination of individual elements, or should we be deriving novel combined traits? *Journal of experimental botany*, 66(8), 2127-2131.

Box, G. E., & Cox, D. R. (1964). An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 26(2), 211-243.

Cakmak, I. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil*, 302(1-2), 1-17.

Cakmak, I., Pfeiffer, W. H., & McClafferty, B. (2010). REVIEW: Biofortification of Durum Wheat with Zinc and Iron. *Cereal Chemistry Journal*, 87(1), 10-20.

Cakmak, I., & Kutman, U. B. (2018). Agronomic biofortification of cereals with zinc: A review: Agronomic zinc biofortification. *European Journal of Soil Science*, 69(1), 172-180.

Cashman, K. D., & Flynn, A. (1999). Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(2), 477-487.

Cheng, X., Liu, X., Mao, W., Zhang, X., Chen, S., Zhan, K., ... & Xu, H. (2018). Genome-wide identification and analysis of HAK/KUP/KT potassium transporters gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3969.

Cu, S. T., Guild, G., Nicolson, A., Velu, G., Singh, R., & Stangoulis, J. (2020). Genetic dissection of zinc, iron, copper, manganese and phosphorus in wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and rachis at two developmental stages. *Plant Science*, 291, 110338.

Cunningham, F., Achuthan, P., Akanni, W., Allen, J., Amode, M. R., Armean, I. M., ... & Cummins, C. (2019). Ensembl 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D745-D751.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat, versión 2018, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL: <http://www.infostat.com.ar>

- Fan, M. S., Zhao, F. J., Fairweather-Tait, S. J., Poulton, P. R., Dunham, S. J., & McGrath, S. P. (2008). Evidence of decreasing mineral density in wheat grain over the last 160 years. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 22(4), 315-324.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2002). *Plant Production and Protection Series (30)*. Rome: FAO.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). FAOSTAT Online Statistical Service. Rome: FAO. URL: <http://faostat.fao.org/>
- Fraga, C. G. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(4-5), 235-244.
- Frossard, E., Bucher, M., Machler, F., Mozafar, A., & Hurrell, R. (2000). Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J Sci Food Agric*, 19.
- González, F. G., Perez-Gianmarco, T., Pretini, N., & Curín, F. (2018). Producción de trigo: evolución, demanda y alternativas para mejorarla. Una visión ecofisiológica. Ediciones INTA. *Revista de tecnología agropecuaria* 10 (36): 35-37. (abril 2018).
- Gyóri, Z. (2005). Sulphur Content of Winter Wheat Grain in Long Term Field Experiments. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36(1-3), 373-382.
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp
- HarvestPlus. (n.d.). Retrieved December 10, 2019, from https://bpi.harvestplus.org/subindex_micronutrients.html.
- Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H. P., Biest, N., Chen, G., ... & Fry, J. (2003). Agrobacterium-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports*, 21(10), 1010-1019.

Huang, X.-Y., & Salt, D. E. (2016). Plant Ionomics: From Elemental Profiling to Environmental Adaptation. *Molecular Plant*, 9(6), 787-797.

Kenzhebayeva, S., Abekova, A., Atabayeva, S., Yernazarova, G., Omirbekova, N., Zhang, G., Turasheva, S., Asrandina, S., Sarsu, F., & Wang, Y. (2019). Mutant Lines of Spring Wheat with Increased Iron, Zinc, and Micronutrients in Grains and Enhanced Bioavailability for Human Health. *BioMed Research International*, 2019, 1-10.

Khabaz-Saberi, H., Setter, T. L., & Waters, I. (2006). Waterlogging induces high to toxic concentrations of iron, aluminum, and manganese in wheat varieties on acidic soil. *Journal of Plant Nutrition*, 29(5), 899-911.

Khokhar, J. S., Sareen, S., Tyagi, B. S., Singh, G., Wilson, L., King, I. P., Young, S. D., & Broadley, M. R. (2018). Variation in grain Zn concentration, and the grain ionome, in field-grown Indian wheat. *PLOS ONE*, 13(1), e0192026.

Kitson, R. E., & Mellon, M. G. (1944). Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadophosphoric Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16(6), 379-383.

Lipka, A. E., Tian, F., Wang, Q., Peiffer, J., Li, M., Bradbury, P. J., Gore, M. A., Buckler, E. S., & Zhang, Z. (2012). GAPIT: Genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics*, 28(18), 2397-2399.

Mangiafico, S.S. 2016. Summary and Analysis of Extension Program Evaluation in R, version 1.18.1. https://rcompanion.org/handbook/I_12.html.

Maksimovic, I., Kastori, R., Momcilovic, V., Dencic, S., Putnik-Delic, M., & Danicic, M. (2017). The concentration ratio of alkaline earth elements calcium, barium and strontium in grains of diploid, tetraploid and hexaploid wheat. *Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke*, 132, 87-100.

Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., & Thomas, P. D. (2019). PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic acids research*, 47(D1), D419-D426. <http://www.pantherdb.org/>

Nayak, P. (2002). Aluminum: impacts and disease. *Environmental research*, 89(2), 101-115.

Palmgren, M. G., Clemens, S., Williams, L. E., Krämer, U., Borg, S., Schjørring, J. K., & Sanders, D. (2008). Zinc biofortification of cereals: Problems and solutions. *Trends in Plant Science*, 13(9), 464-473.

Peterson, B. G., Carl, P. (2019). *PerformanceAnalytics: Econometric Tools for Performance and Risk Analysis*. R package version 1.5.3. <https://CRAN.R-project.org/package=PerformanceAnalytics>

Pii, Y., Cesco, S., & Mimmo, T. (2015). Shoot ionome to predict the synergism and antagonism between nutrients as affected by substrate and physiological status. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 48-56.

R Core Team (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RStudio Team (2019). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Saini, D. K., Devi, P., & Kaushik, P. (2020). Advances in Genomic Interventions for Wheat Biofortification: A Review. *Agronomy*, 10(1), 62.

Salt, D. E., Baxter, I., & Lahner, B. (2008). Ionomics and the Study of the Plant Ionome. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 709-733.

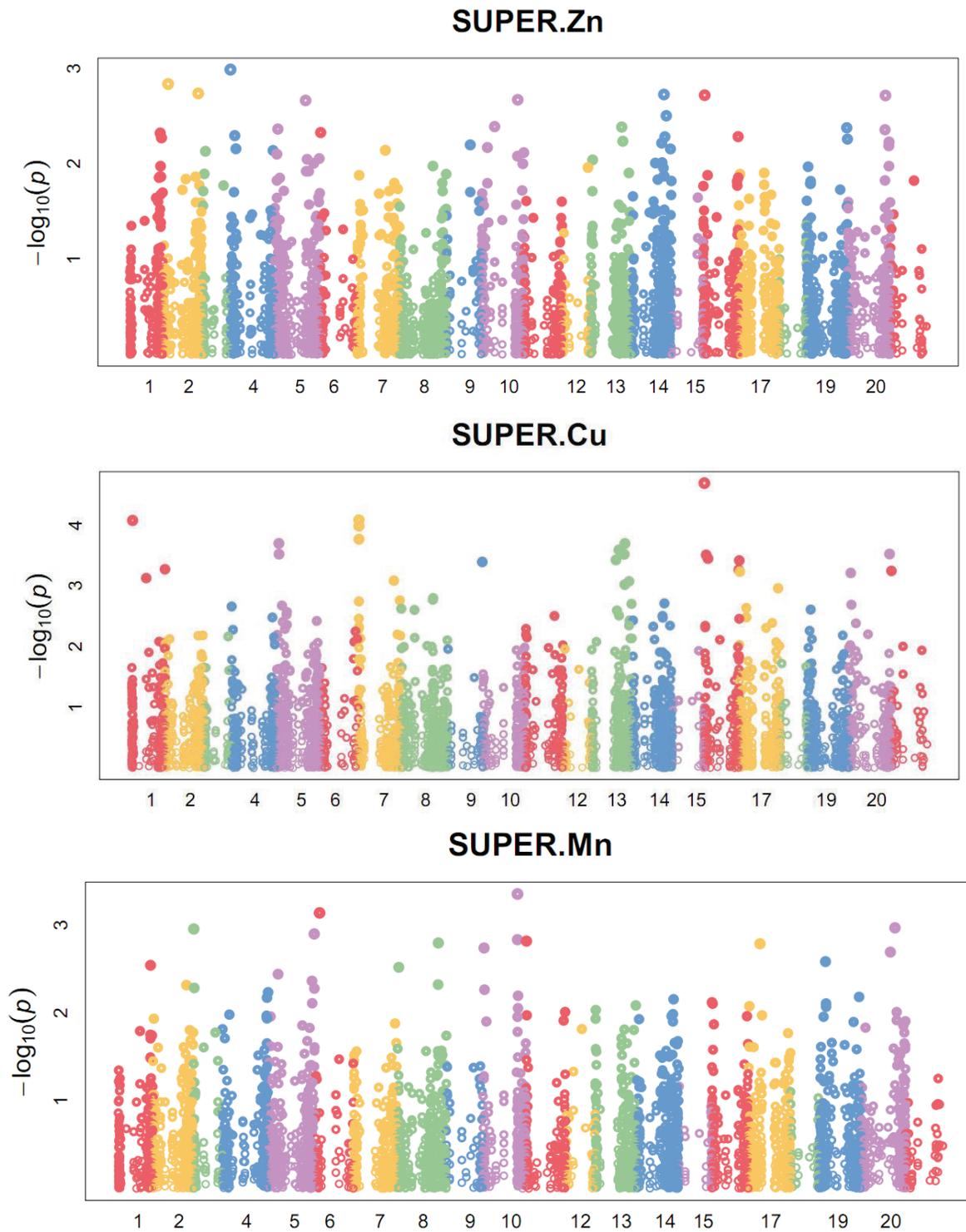
Saxena, A., Verma, M., Singh, B., Sangwan, P., Yadav, A. N., Dhaliwal, H. S., & Kumar, V. (2019). Characteristics of an Acidic Phytase from *Aspergillus aculeatus* APF1 for Dephytinization of Biofortified Wheat Genotypes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.

- Soetan, K. O., Olaiya, C. O., & Oyewole, O. E. (2010). The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants: A review. *African journal of food science*, 4(5), 200-222.
- Trethowan, R. M., Reynolds, M. P., Ortiz-Monasterio, J. I., & Ortiz, R. (2007). The Genetic Basis of the Green Revolution in Wheat Production. En J. Janick (Ed.), *Plant Breeding Reviews* (pp. 39-58). John Wiley & Sons, Inc.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., & Dubcovsky, J. (2006). A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science*, 314(5803), 1298-1301.
- Vanzetti, L. S., Yerkovich, N., Chialvo, E., Lombardo, L., Vaschetto, L., & Helguera, M. (2013). Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm. *Genetics and Molecular Biology*, 36(3), 391-399.
- Velu, G., Ortiz-Monasterio, I., Cakmak, I., Hao, Y., & Singh, R. P. (2014). Biofortification strategies to increase grain zinc and iron concentrations in wheat. *Journal of Cereal Science*, 59(3), 365-372.
- Velu, G., Singh, R. P., Huerta, J., & Guzmán, C. (2017). Genetic impact of Rht dwarfing genes on grain micronutrients concentration in wheat. *Field Crops Research*, 214, 373-377.
- Velu, G., Singh, R. P., Crespo-Herrera, L., Juliana, P., Dreisigacker, S., Valluru, R., ... & Balasubramaniam, A. (2018). Genetic dissection of grain zinc concentration in spring wheat for mainstreaming biofortification in CIMMYT wheat breeding. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
- Velu, G., Crespo Herrera, L., Guzman, C., Huerta, J., Payne, T., & Singh, R. P. (2019). Assessing Genetic Diversity to Breed Competitive Biofortified Wheat With Enhanced Grain Zn and Fe Concentrations. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1971.
- Velu, G., & Singh, R. P. (2019). Genomic Approaches for Biofortification of Grain Zinc and Iron in Wheat. En A. M. I. Qureshi, Z. A. Dar, & S. H. Wani (Eds.), *Quality Breeding in Field Crops* (pp. 193-198).
- Wang, Q., Tian, F., Pan, Y., Buckler, E. S., & Zhang, Z. (2014). A SUPER powerful method for genome wide association study. *PloS one*, 9(9).

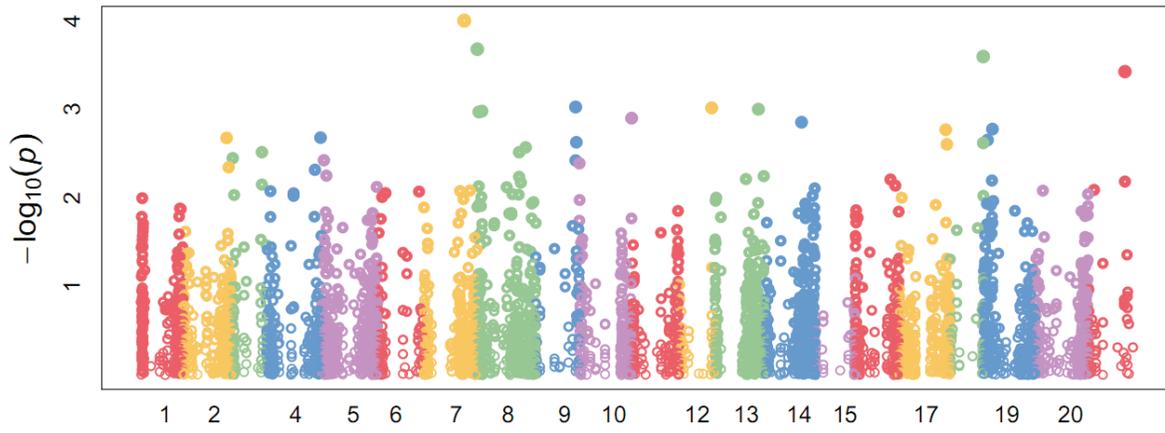
- White, P., Redford, P., & Macdonald, J. (1930). That assumption of normality.
- WHO. World Health Organization. (2002). World Health Report, pp. 82-83.
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York.
- Yousaf, S., Akhtar, M., Sarwar, N., Ikram, W., & Hussain, S. (2019). Sustaining zinc bioavailability in wheat grown on phosphorus amended calcisol. *Journal of Cereal Science*, 90, 102846.
- Zhao, F. J., Su, Y. H., Dunham, S. J., Rakszegi, M., Bedo, Z., McGrath, S. P., & Shewry, P. R. (2009). Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *Journal of Cereal Science*, 49(2), 290-295.
- Zhou, H., Arrowsmith, J. W., Fromm, M. E., Hironaka, C. M., Taylor, M. L., Rodriguez, D., ... & Fry, J. E. (1995). Glyphosate-tolerant CP4 and GOX genes as a selectable marker in wheat transformation. *Plant Cell Reports*, 15(3-4), 159-163.
- Ziegler, G., Nelson, R., Granada, S., Krishnan, H. B., Gillman, J. D., & Baxter, I. (2018). Genomewide association study of ionomic traits on diverse soybean populations from germplasm collections. *Plant Direct*, 2(1), e00033.

Anexos

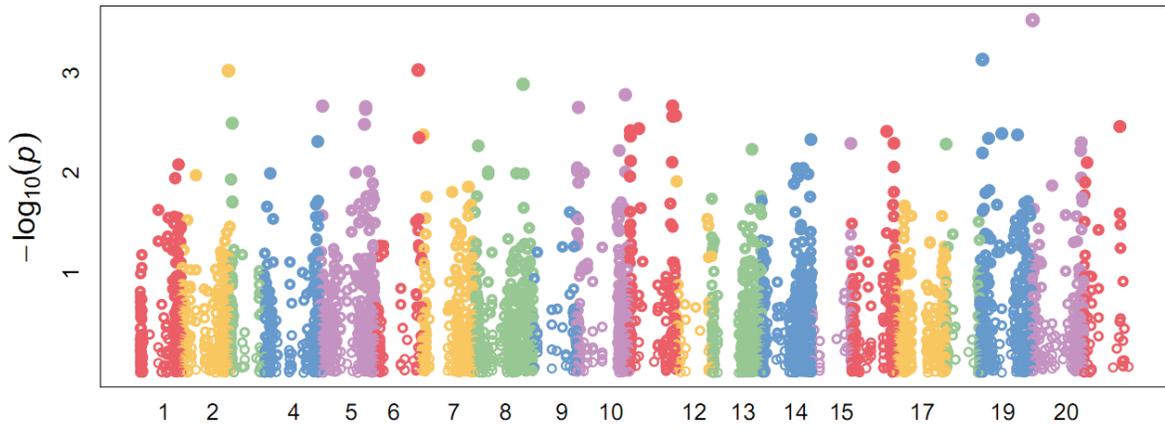
Anexo 1. Grafico Manhattan para la asociación entre los haplotipos y SNPs y la concentración de diversos elementos en el genoma de *T. aestivum* (21 cromosomas) realizado con GAPIT mediante el método SUPER.



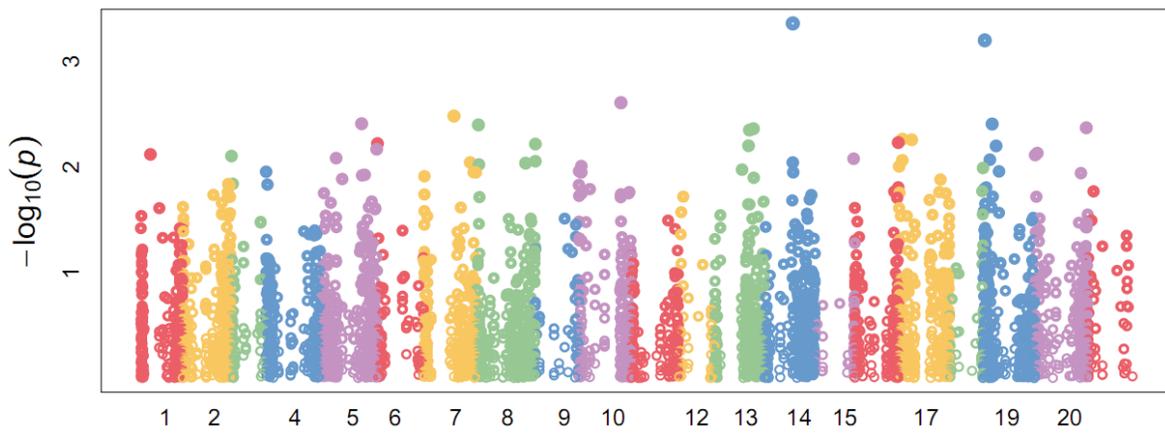
SUPER.Ca



SUPER.Mg



SUPER.Sr



Anexo 2. Tabla donde se muestra la identificación según Ensembl (Cunningham *et al.*, 2019) de cada gen estudiado en particular detallando a qué elemento corresponde, el cromosoma donde se ubica y la información extraída de la base de datos PANTHER versión 14 (Mi *et al.*, 2019). El gen resaltado en amarillo fue seleccionado como candidato. NA: no hay datos en PANTHER. En **negrita** los genes que flanquean directamente el haplotipo (para el Fe en cromosoma 1B) o el SNP (para el Al en cromosoma 6B).

Elemento	Cromosoma	gene_id	PHANTER
Fe	3B	TraesCS3Bo2G381500	DEFENSIN-LIKE PROTEIN 1
		TraesCS3Bo2G381600	PROTEIN DEHYDRATION-INDUCED 19
		TraesCS3Bo2G381700	Uncharacterized protein
		TraesCS3Bo2G381800	Uncharacterized protein
		TraesCS3Bo2G381900	OSo2Go783600 PROTEIN
		TraesCS3Bo2G382000	SORTING AND ASSEMBLY MACHINERY SAMM50 PROTEIN FAMILY MEMBER
		TraesCS3Bo2G382100	METAL-NICOTIANAMINE TRANSPORTER YSL18-RELATED
		TraesCS3Bo2G382200	Uncharacterized protein
		TraesCS3Bo2G382300	ENDOCHITINASE
		TraesCS3Bo2G382400	FES CLUSTER ASSEMBLY PROTEIN SUF
		TraesCS3Bo2G382500	NADH DEHYDROGENASE
		TraesCS3Bo2G382600	E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE RNF5-RELATED
		TraesCS3Bo2G382700	Uncharacterized protein
		TraesCS3Bo2G382800	2-OXOGLUTARATE (2OG) AND FE(II)-DEPENDENT OXYGENASE SUPERFAMILY PROTEIN
		TraesCS3Bo2G382900	PROTEIN TRICHOME BIREFRINGENCE-LIKE 9-RELATED
		TraesCS3Bo2G383000	TRANSCRIPTION FACTOR HEC3-RELATED
		TraesCS3Bo2G383100	3-5 EXONUCLEASE (PTHR13620)
		TraesCS3Bo2G383200	RING FINGER AND PROTEASE ASSOCIATED DOMAIN-CONTAINING
		TraesCS3Bo2G383300	BAG family molecular chaperone regulator 4
		TraesCS3Bo2G383400	AMMONIUM TRANSPORTER MEP2
		TraesCS3Bo2G383500	PHYTOL KINASE 1, CHLOROPLASTIC
		TraesCS3Bo2G383600	GDSL ESTERASE/LIPASE EXL3
		TraesCS3Bo2G383700	SELENOPROTEIN T
		TraesCS3Bo2G383800	SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE
		TraesCS3Bo2G383900	OXIDOREDUCTASE, 2OG-Fe II OXYGENASE FAMILY PROTEIN
		TraesCS3Bo2G384000	DUAL SPECIFICITY PROTEIN KINASE
		TraesCS3Bo2G384100	Uncharacterized protein
		TraesCS3Bo2G384200	Uncharacterized protein
		TraesCS3Bo2G384300	MITOCHONDRIAL GROUP I INTRON SPLICING FACTOR CCM1
		TraesCS3Bo2G384400	NUCLEAR LIM INTERACTOR-INTERACTING FACTOR-RELATED
		TraesCS3Bo2G384500	UREIDOGLYCOLATE HYDROLASE
		TraesCS3Bo2G384600	UREIDOGLYCOLATE HYDROLASE
		TraesCS3Bo2G384700	METHIONINE-S-OXIDE REDUCTASE
TraesCS3Bo2G384800	SERINE PROTEASE FAMILY S10 SERINE CARBOXYPEPTIDASE		
TraesCS3Bo2G384900	ATP-DEPENDENT CLP PROTEASE ADAPTER PROTEIN CLPS1, CHLOROPLASTIC		

		TraesCS3B02G385000	COATOMER SUBUNIT DELTA
		TraesCS3B02G385100	IQ-DOMAIN 5-RELATED
		TraesCS3B02G385200	INTERACTOR OF CONSTITUTIVE ACTIVE ROPS 2, CHLOROPLASTIC-RELATED
		TraesCS3B02G385300	NA
		TraesCS3B02G385400	DNA GLYCOSYLASE SUPERFAMILY PROTEIN
		TraesCS3B02G385500	V-type proton ATPase subunit a
		TraesCS3B02G385600	NUCLEAR TRANSCRIPTION FACTORY SUBUNIT B-2
		TraesCS3B02G385700	30S RIBOSOMAL PROTEIN S12 FAMILY MEMBER
		TraesCS3B02G385800	NA
		TraesCS3B02G385900	ZINC FINGER-CONTAINING PROTEIN P48ZNF
		TraesCS3B02G386000	NA
		TraesCS3B02G386100	NA
		TraesCS3B02G386200	NA
		TraesCS3B02G386300	NA
	1B	TraesCS1B02G336300	SULFITE REDUCTASE [NADPH] SUBUNIT BETA-RELATED
		TraesCS1B02G336400	DNA POLYMERASE I
		TraesCS1B02G336500	OS02G0583500 PROTEIN
		TraesCS1B02G336700	DISEASE RESISTANCE PROTEIN RP
		TraesCS1B02G336800	OS01G0212500 PROTEIN
		TraesCS1B02G336900	CLAVATA3/ESR (CLE)-RELATED PROTEIN 26
		TraesCS1B02G337100	FERREDOXIN-LIKE PROTEIN
		TraesCS1B02G337200	RHO FAMILY GTPASE
		TraesCS1B02G337300	NA
		TraesCS1B02G337400	PROTEIN SULFUR DEFICIENCY-INDUCED 2
		TraesCS1B02G337500	ACTIN CROSS-LINKING PROTEIN
		TraesCS1B02G337600	ARM REPEAT SUPERFAMILY PROTEIN
		TraesCS1B02G337700	ACTIN CROSS-LINKING PROTEIN
		TraesCS1B02G337800	PROTEIN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 3
		TraesCS1B02G337900	OS07G0486400 PROTEIN
		TraesCS1B02G338000	F16B3.27 PROTEIN-RELATED
		TraesCS1B02G338100	NA
		TraesCS1B02G338200	NA
		TraesCS1B02G338400	NA
		TraesCS1B02G338500	CYSTEINE PROTEASE FAMILY C1-RELATED (PTHR12411)
		TraesCS1B02G338600	JACALIN-RELATED LECTIN 3 (PTHR47293)
		TraesCS1B02G338700	B3 DOMAIN-CONTAINING (PTHR31920)
K	5A	TraesCS5A02G230400	NAD(P)H-QUINONE OXIDOREDUCTASE SUBUNIT L, CHLOROPLASTIC
		TraesCS5A02G230500	TRANSCRIPTION FACTOR BHLH30
		TraesCS5A02G230600	LEUCINE-RICH REPEAT-CONTAINING
		TraesCS5A02G230800	NA
		TraesCS5A02G230900	NA

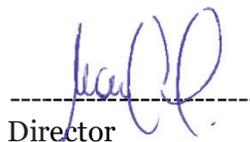
		TraesCS5A02G231000	SHN SHINE , DNA BINDING / TRANSCRIPTION FACTOR
		TraesCS5A02G231100	PROTEINASE INHIBITOR I4, SERPIN (DUF716)-RELATED
		TraesCS5A02G231200	PROTEINASE INHIBITOR I4, SERPIN (DUF716)-RELATED
		TraesCS5A02G231300	PROTEINASE INHIBITOR I4, SERPIN (DUF716)-RELATED
		TraesCS5A02G231400	3-5 EXONUCLEASE
		TraesCS5A02G231500	ZINC FINGER PROTEIN GIS
		TraesCS5A02G231600	EXPRESSED PROTEIN-RELATED-RELATED
		TraesCS5A02G231700	NA
		TraesCS5A02G231800	BCS1 AAA-TYPE ATPASE
		TraesCS5A02G231900	CELL DIVISION PROTEIN KINASE
		TraesCS5A02G232000	Protein of unknown function DUF3128
		TraesCS5A02G232100	GAMMA TUBULIN COMPLEX PROTEIN
		TraesCS3B02G281500	TELOMERE REPEAT-BINDING FACTOR 4-RELATED
P	3B	TraesCS3B02G281600	TRANSCRIPTION FACTOR HEC3-RELATED
		TraesCS3B02G281700	XANTHINE-URACIL / VITAMIN C PERMEASE FAMILY MEMBER
		TraesCS3B02G281800	Uncharacterized protein
		TraesCS3B02G281900	39S RIBOSOMAL PROTEIN L18, MITOCHONDRIAL
		TraesCS3B02G282000	LYSYL-TRNA SYNTHETASE
		TraesCS3B02G282100	Uncharacterized protein
		TraesCS3B02G282200	Ankyrin repeat family protein
		TraesCS3B02G282300	GERMIN-LIKE PROTEIN SUBFAMILY 3 MEMBER 3
		TraesCS3B02G282400	GERMIN-LIKE PROTEIN SUBFAMILY 3 MEMBER 3
		TraesCS3B02G282500	GERMIN-LIKE PROTEIN SUBFAMILY 3 MEMBER 3
		TraesCS3B02G282600	GLUCOSYL/GLUCURONOSYL TRANSFERASES
		TraesCS3B02G282700	T31J12.3 PROTEIN-RELATED
		TraesCS3B02G282800	TRNA (ILE)-LYSIDINE SYNTHASE
		TraesCS3B02G283000	EXPRESSED PROTEIN-RELATED
		TraesCS3B02G283100	EXPRESSED PROTEIN-RELATED
		TraesCS3B02G283200	EXPRESSED PROTEIN-RELATED
		TraesCS3B02G283300	znc fngr doman
		TraesCS3B02G283400	CW14 PROTEIN
		TraesCS3B02G283500	EXPRESSED PROTEIN-RELATED
		TraesCS3B02G283600	T31J12.3 PROTEIN-RELATED
		TraesCS3B02G283700	T31J12.3 PROTEIN-RELATED
		TraesCS3B02G283800	VESICLE TRANSPORT V-SNARE PROTEIN VTI1-RELATED
		TraesCS3B02G283900	IAA-AMINO ACID HYDROLASE ILR1-LIKE 2
		TraesCS3B02G284000	ARABINO GALACTAN PEPTIDE 3
		TraesCS3B02G284100	NGEP-RELATED
		TraesCS3B02G284200	OS01G0558700 PROTEIN
		TraesCS3B02G284300	60S RIBOSOMAL PROTEIN L28
		TraesCS3B02G284400	OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE, CHLOROPLASTIC

		TraesCS3Bo2G284500	F-BOX DOMAIN CONTAINING PROTEIN-LIKE-RELATED
		TraesCS3Bo2G284600	IST1 FAMILY MEMBER
		TraesCS3Bo2G284700	RNA POLYMERASE II TRANSCRIPTIONAL COACTIVATOR
		TraesCS3Bo2G284800	MYC
		TraesCS3Bo2G284900	PROTEIN PLASTID TRANSCRIPTIONALLY ACTIVE 7
		TraesCS3Bo2G285000	TRANSMEMBRANE PROTEIN
AI	6B	TraesCS6Bo2G460000	DISEASE RESISTANCE PROTEIN RP
		TraesCS6Bo2G460100	TEX2 PROTEIN-RELATED
		TraesCS6Bo2G460200	CASKIN
		TraesCS6Bo2G460300	PLANT/F9H3-4 PROTEIN
		TraesCS6Bo2G460400	CASKIN
		TraesCS6Bo2G460500	CASKIN
		TraesCS6Bo2G460600	CASKIN
		TraesCS6Bo2G460800	CASKIN
		TraesCS6Bo2G460900	WALL-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE-LIKE 21
		TraesCS6Bo2G461100	F-BOX/KELCH-REPEAT PROTEIN-RELATED
		TraesCS6Bo2G461200	E3 UBIQUITIN-PROTEIN LIGASE
		TraesCS6Bo2G461300	BRO1 domain-containing protein BROX
		TraesCS6Bo2G461400	PROTEIN LAZY 1
		TraesCS6Bo2G461700	DISEASE RESISTANCE PROTEIN RP
		TraesCS6Bo2G461800	CASKIN
		TraesCS6Bo2G461900	DISEASE RESISTANCE PROTEIN RP
		TraesCS6Bo2G462000	DISEASE RESISTANCE PROTEIN RP
		TraesCS6Bo2G462100	TRANSCRIPTION FACTOR TCP4-RELATED
		TraesCS6Bo2G462200	NA
		TraesCS6Bo2G462300	L-ASCORBATE PEROXIDASE 8, CHLOROPLASTIC-RELATED (PTHR31356:SF11)

El autor de esta tesis, Alexander Gabriel Rivero y el director de la misma, Jorge Ignacio Moriconi, avalamos este manuscrito que es la última versión de la tesis e incluye las correcciones de los jurados.

Handwritten signature of Alexander Gabriel Rivero in blue ink, written over a horizontal dashed line.

Firma Autor

Handwritten signature of Jorge Ignacio Moriconi in blue ink, written over a horizontal dashed line.

Firma Director