

Tesis de Posgrado

Asociación de marcadores moleculares a la calidad panadera en trigos argentinos

Feingold, Sergio

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Feingold, Sergio. (1998). Asociación de marcadores moleculares a la calidad panadera en trigos argentinos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3049_Feingold.pdf

Cita tipo Chicago:

Feingold, Sergio. "Asociación de marcadores moleculares a la calidad panadera en trigos argentinos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3049_Feingold.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Asociación de marcadores moleculares a la calidad
en trigos argentinos**

Tesis Doctoral

Sergio Feingold

Director: H. Esteban Hopp

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires**

1998

**Asociation of molecular markers to breadmaking quality in
argentinean wheats**

Ph. D. Thesis

Sergio Feingold

Supervisor: H. Esteban Hopp

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires**

1998

A Nelly y Pincas,

Promiscuos

Sopa de víboras, hervimos -uno entre todas, una entre todos-
jugando a la meiosis, intercambiando palmos,
decímetros.
Hechos de retacería. Cruzádonos.

Recuerdo de quién fue la parte que aquí tuviste.
No innata casi. De eso poco queda.
Dónde la entregas ahora,
por qué calle, en cuál número, sobre qué cuatro patas.
Lo mejor que damos era de alguien, nos lo dio.
Lo mejor que dimos lo masca alguien de alguien.
Crossing-over.

Este tramo de arcoíris que reparto al azar, tuyo,
de que ajeno procede?
Cómo te quiso dirían los *crooners*,
para haberte dejado lo que ofrezco sonriendo y jadeante.
A estas horas ya nada es ya de nadie. Quiasmas.

O ese pálpito -ligeramente abyecto-
que llega a veces raras,
será cuando al ir devolviendo nos devuelven,
casualidad desde la quinta o séptima potencia,
un segmento que fue propio muy de veras hace siglos,
y sin reconocerlo nos retorna -pulsado, tostado al sol,
milvivido:
intacto?

Gerardo Deniz
Mexico, 1978

Agradecimientos

Escribir los agradecimientos al final va a hacer que, probablemente, me olvide de alguien. Van mis disculpas por eso.

A Esteban Hopp, quien fue mi director desde mi tesis de *Magister*, y que me estimuló desde mis inicios en investigación a aprender y a formarme con un criterio independiente.

A Jorge Dubcovsky y su gente, especialmente a Marcela Manifesto y Barbara Tanos, que generaron la mayoría de los datos poblacionales de RFLPs y algunos de microsatélites que se presentan en este estudio, y que sin ellos esta tesis todavía sería futuro.

A mis compañeros de laboratorio que me ayudaron en casi cualquier tarea que lo requiriera (siembra del ensayo, cosecha de hojas, extracción de ADN) en especial a Diego, Susana, Daniela y Magdalena.

A todos con los que compartí mis años en INTA: aftosos, brucelosos, tuberculosos y de plantas. Fueron buenos momentos.

A Eduardo Palma, entonces director del Instituto de Biotecnología del INTA- Castelar, donde se desarrolló la mayor parte del trabajo de laboratorio.

A Enrique Suárez, Director del Instituto de Recursos Biológicos del INTA-Castelar, que facilitó el sitio donde se hizo el ensayo y aportó su gente para el cuidado del mismo.

A Alberto León y en su nombre al Centro de Investigaciones Balcarce de Zeneca que me permitió realizar los últimos análisis de microsatélites en el Laboratorio de Biología Molecular, mi actual lugar de trabajo.

A Adrian Roberts, por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A Nati y Silvina, por los geles de plata y las fotos.

A Martín Grondona, por suministrarme los datos climáticos presentados y por la figura 10.

A Dave Hoisington, Mireille Khairallah y Diego González de León del Laboratorio de Biología Molecular Aplicada del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) de México, quienes fueron parte importante de mi formación en marcadores moleculares, y colaboraron en la transferencia de tecnología para montar el laboratorio de marcadores moleculares del CICV-INTA.

A Javier Peña, del Laboratorio de Calidad de Trigo del CIMMYT que, desinteresadamente, brindó sus instalaciones y experiencia para los análisis de sedimentación en SDS.

A Marta Cuniberti del Laboratorio de Calidad de Trigo y Soja del INTA-Marcos Juárez que prestó el servicio de determinaciones mixográficas y de sedimentación en ácido acético.

A Pauline Stephenson del John Innes Institute (Norwich, Inglaterra) que me proveyó de gran parte de los microsatélites utilizados.

A la Universidad de Buenos Aires que fue mi sustento a través de sus planes de becas para graduados.

A la Red Latinoamericana de Botánica que financió parte del entrenamiento en el CIMMYT.

A los subsidios de SECyT y UBACyT que sustentaron parte de este proyecto.

Fundamentalmente a Cris, que cuando estuvimos juntos trabajó en este proyecto como si fuera propio, que me siguió a donde este trabajo me llevara y porque sé que ahora está tan feliz como yo que la tesis tenga un final.

Resumen

La variación en la calidad panadera ha sido asociada a el tenor proteico y a la composición de proteínas de reserva del grano.

Entre las proteínas de reserva, variación alélica en las gluteninas de alto peso molecular han podido explicar hasta el 50% de la calidad en trigos europeos.

Klein 32 (K32), un cultivar argentino de buena calidad cultivado en los años 30, presenta las mismas subunidades de gluteninas de alto peso molecular que Chinese Spring (CS) de mala calidad panadera.

Estudios previos realizados sobre estos materiales mostraron que las gluteninas de bajo peso molecular y/o las gliadinas, cuyos genes están codificados en los brazos cortos de los cromosomas homeólogos de los grupos 1 y 6, podrían ser responsables de la diferencia en calidad entre estos genotipos.

Se encontró que marcadores moleculares localizados en el cromosoma 1BS pudieron explicar alrededor del 20% de la variación en calidad de una población $F_{2:3}$ derivada del cruzamiento de K32 y CS. Además, se encontraron efectos positivos de alelos de CS de marcadores localizados en el cromosoma 6AS.

Los marcadores asociados a la calidad panadera se encontraron ligados a los loci *X-Glu3* y *X-Gli1* en el cromosoma 1BS; y a *X-Gli2* el 6AS

El contenido proteico relativo influyó marcadamente en la calidad panadera estimada por la prueba de sedimentación en SDS. El uso de este carácter como covariable permitió mejorar la porción de varianza de la calidad explicada por los marcadores del 1BS. La determinación de la calidad mediante el uso del mixógrafo no se vieron tan influenciadas por el contenido proteico.

La utilización de los marcadores moleculares identificados, para seleccionar los alelos de K32 en el 1BS y los de CS en el 6AS podría resultar en un incremento del 30% de la calidad a igualdad de contenido proteico.

Asimismo, se encontraron evidencias de nuevos genes de proteínas de reserva recientemente reportados por otros investigadores.

Summary

Breadmaking quality variation is related to differences in protein content and protein composition.

Among storage proteins, it has been reported that variation in the high molecular weight (HMW) glutenin subunit composition can explain about 50% of breadmaking quality in European varieties.

Klein 32 (K32), an old Argentinean variety with good rheological properties presents the same HMW glutenin subunit composition than Chinese Spring (CS), a poor baking quality genotype.

Previous studies indicated that low molecular weight glutenins and/or gliadins whose genes are coded on the short arms of chromosome groups 1 and 6 could be responsible of the difference in quality showed by these genotypes.

The association of molecular markers located in these regions showed that the short arm of chromosome 1B, could explained around 20% of the variation in the trait in an $F_{2:3}$ population derived from K32 and CS.

Moreover, positive effects of alleles from CS located on chromosome 6A were found.

Markers associated to breadmaking quality were found linked to the *X-Glu3* and *X-Gli1* loci in chromosome 1BS; and to *X-Gli2* in chromosome 6AS.

Protein content largely affected breadmaking estimation by SDS sedimentation test, and the use of this trait as a covariant improved the degree of explanation of the breadmaking quality by markers on chromosome 1BS. Mixing parameters behave more independently of protein content.

The use of markers to select K32 alleles at 1BS and CS alleles at 6AS in breeding programs could result in a 30% increase in quality at the same protein level.

Evidence of novel storage protein genes proposed by other researchers was found.

Indice

Introducción	1
1.-El trigo y la calidad panadera	1
2.-Las proteínas de reserva	2
3.-Relación entre las proteínas de reserva y la calidad panadera	5
3.1.-Gluteninas de alto peso molecular	6
3.2.-Gliadinas	9
3.3.-Gluteninas de bajo peso molecular	10
4.-Caracterización de las secuencias asociadas a la calidad panadera	12
5.-La calidad panadera en Argentina	13
6.-Mejoramiento de la calidad panadera	14
7.Los marcadores genéticos en el mejoramiento vegetal	17
7.1.1.- Caracteres cuantitativos, heredabilidad y selección	17
7.2.2.- Marcadores Genéticos	18
7.2.1.Marcadores morfológicos	19
7.2.2.Marcadores proteicos	20
7.2.3.Marcadores moleculares	21
7.2.3.1.RFLPs	22
7.2.3.2.RAPDs	25
7.2.3.3.Los microsatélites	25
7.2.3.4.AFLPs	28
8.3.- Métodos estadísticos para determinar asociaciones entre marcadores genéticos y caracteres fenotípicos.	29
8.1.Ligamiento y recombinación	29
8.2.Construcción de mapas genéticos	31
8.3.Localización de regiones de ADN responsables de caracteres fenotípicos.	33
8.3.1.Máxima verosimilitud	34
8.3.2.Mapeo de intervalos	35
9.Marcadores para la calidad panadera	36
10.Objetivos de este estudio	39
Materiales	41
Métodos	43

1.Ensayo a campo.....	43
2.Datos fenológicos.....	43
3.Determinación del contenido de humedad.....	45
4.Determinación de la concentración de proteínas.....	45
5.Determinación de la Calidad Panadera.....	45
5.1.Prueba de sedimentación en dodecil sulfato de sodio (SDSS).....	45
5.2.Prueba de sedimentación en ácido acético.....	47
5.3.Mixogramas.....	47
6.Extracción de ADN.....	49
7.Determinación de la concentración de ADN.....	50
8.Análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP).....	51
8.1.Sondas.....	51
8.2.Corte de ADN con enzimas de restricción.....	51
8.3.Separación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.....	53
8.4.Transferencia de fragmentos de ADN a membranas de nylon (Southern Blotting).....	53
8.6.Marcado de sondas.....	54
8.7.Hibridación de ADN (Southern).....	57
8.8.Exposición y revelado de los resultados.....	59
9.Microsatélites o SSRs.....	60
9.1.Amplificación de ADN por PCR.....	60
9.2.Separación en geles de poliacrilamida.....	61
9.3.Revelado de los geles por tñido no radioactivo en nitrato plata.....	62
10.Análisis estadístico de los datos.....	64
11.Test de normalidad para los datos fenotípicos.....	64
12.Análisis de covarianza.....	65
13.Evaluación de los datos genotípicos.....	65
14.Ordenamiento de los marcadores en un mapa.....	66
15.Asociación entre caracteres fenotípicos y marcadores.....	66
15.1.Análisis de varianza (ANOVA).....	66
15.1.1Aditividad y dominancia.....	67
15.2Mapeo de intervalo.....	68
Resultados.....	69
1.Datos fenotípicos.....	69

1.1.Fenología.....	69
1.2.Humedad.....	69
1.3.Contenido Proteico.....	70
1.4.Calidad panadera.....	70
1.4.1.Sedimentación en dodecil sulfato de sodio (SDSS).....	70
1.4.2.Sedimentación en ácido acético.....	73
1.4.3.Mixogramas.....	73
1.4.3.1.Tiempo de desarrollo y clase mixográfica.....	73
1.4.3.2.Integral de la curva mixográfica (área).....	74
1.5.Relación entre la calidad panadera y el contenido de proteínas.....	75
1.6.Variación espacial en el contenido proteico y la calidad panadera.....	77
1.7.Correlación entre parámetros de calidad y fenología.....	79
1.8.Correlaciones entre distintos estimadores de la calidad panadera.....	80
2.Marcadores moleculares.....	82
2.1.Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs).....	82
2.2.Microsatélites (SSRs).....	83
2.3.Mapeo y segregación de los marcadores moleculares.....	84
3.Asociación entre marcadores y caracteres fenotípicos.....	88
3.1.Días a floración y contenido proteico.....	91
3.2.Calidad Panadera.....	91
3.3.El contenido de proteínas como cofactor de la calidad panadera.....	93
3.4.Acción e interacción génica.....	95
3.5.Mapeo de intervalo.....	96
Discusión.....	99
1.Factores que influyen sobre la calidad panadera.....	99
1.1.El contenido proteico.....	99
1.2.Días de siembra a floración.....	101
2.Distintos métodos de evaluación de calidad.....	103
3.Marcadores moleculares.....	104
3.1.Polimorfismos y diferencias genéticas.....	104
3.2.Segregación.....	108
3.3.El mapa genético.....	112
4.Asociación entre marcadores y calidad.....	114

4.1. Contenido relativo de proteínas.....	114
4.2. Calidad panadera.....	114
4.3. Efectos génicos.....	121
4.4. Mapeo de intervalo.....	123
Consideraciones finales y perspectivas futuras.....	125
Bibliografía.....	126

Indice de Tablas

Tabla 1.....	8
Tabla 2.....	52
Tabla 3.....	59
Tabla 4.....	78
Tabla 5	85
Tabla 6.....	88
Tabla 7.....	89
Tabla 8.....	90
Tabla 9	95

Indice de Figuras

Figura 1.....	7
Figura 2.....	24
Figura 3.....	41
Figura 4.....	44
Figura 5	46
Figura 6.....	71
Figura 7.....	74
Figura 8.....	76
Figura 9	77
Figura 10	79
Figura 11	81
Figura 12	82
Figura 13	83
Figura 14	84
Figura 15	87
Figura 16.....	97
Figura 17	97
Figura 18	122

Introducción

1.-El trigo y la calidad panadera

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cuatro cultivos básicos que consume el hombre, junto con el arroz, el maíz y la papa. La concentración proteica de este cereal es baja comparada con otros alimentos, sin embargo, en virtud de su alto consumo, contribuye con casi un 40% de la nutrición básica de la humanidad (Milner et al., 1966).

La importancia de este cereal por sobre otros cereales o cultivos ricos en hidratos de carbono (v.g. papa) radica en la característica única de su harina, que permite su panificación. Así es que, aunque sus rendimientos unitarios medios son sensiblemente inferiores a otros cereales como el maíz, su producción se mantiene, e inclusive se está extendiendo su cultivo hacia zonas más cálidas (Fischer y Byerlee, 1991). Esta característica consiste en la capacidad de la harina de desarrollar una matriz viscoelástica durante la formación de la masa, que permite retener el gas producido por la fermentación (por levaduras) expandiendo esta masa. Después del horneado, el volumen final del pan revela la cantidad total de gas retenido, y la medición de este volumen constituye un método directo de caracterizar la calidad panadera de la harina.

La calidad panadera de una harina está determinada tanto por el contenido proteico, como por el tipo de proteína. Finney y Barmore (1948) encontraron que el contenido relativo de proteínas de los granos está altamente asociado con el volumen de pan producido. Cuando esta relación se establece dentro de una determinada variedad, la pendiente de la curva resulta un indicador del tipo de proteínas presentes en la

misma. Resultados similares fueron obtenidos luego por Bushuk et al. (1969) y Simmonds (1989).

2.-Las proteínas de reserva

Una de las primeras clasificaciones de las proteínas del endosperma de los granos de trigo fue propuesta por Osborne (1907) en base a su solubilidad diferencial.

De esta manera, se determinaron cuatro grupos producto de una extracción secuencial. Estos son: 1) las albúminas, solubles en agua; 2) las globulinas, en soluciones salinas; 3) las prolaminas (o gliadinas), en soluciones alcohólicas (70% etanol) y 4) las glutelinas (o gluteninas), en ácidos o bases débiles.

Esta clasificación que se ha mantenido en el tiempo debido a su simplicidad, es compatible con una clasificación funcional, que separa las proteínas totales en dos grupos:

1) Las albúminas y globulinas son las llamadas proteínas citoplásmicas o metabólicamente activas ya que comprenden enzimas y proteínas ribosomales y de membrana. Constituyen entre el 15 y el 20 % de las proteínas totales, están localizadas en la capa de aleuronas y en el embrión y son ricas en aminoácidos esenciales. Es una fracción relativamente constante en valor absoluto. Son polipéptidos monoméricos, globulares y sus pesos moleculares varían de 12 a 16 kDa y de 20 a 200 kDa para albúminas y globulinas respectivamente.

2) Las gliadinas y gluteninas son las llamadas proteínas de reserva y están localizadas en cuerpos proteicos o en la matriz proteica del endosperma.

Las gliadinas son solubles en soluciones alcohólicas. Son la fracción más abundante de las proteínas totales del grano y constituyen una mezcla compleja de polipéptidos cuyos pesos moleculares van de 30.000 a 70.000 (Bietz y Wall, 1972). Han sido clasificadas en α , β , γ y ω de acuerdo a su movilidad en electroforesis en geles ácidos de poliacrilamida (APAGE) (Woychik et al., 1961), siendo las de mayor peso molecular las ω . Cada variedad posee de 30 a 50 subunidades distintas cuando se las separa mediante APAGE, y la gran variación alélica observada ha llevado a utilizarlos para identificaciones varietales (Wrigley et al., 1982a), e inclusive se ha reportado su uso como marcadores genéticos de calidad industrial en trigos duros (du Cros, 1987) y hexaploides (Wrigley et al., 1982b) y de otros caracteres fenotípicos en trigos hexaploides (Metakovsky et al., 1990).

La complejidad presente en la composición de gliadinas es debida, probablemente, a que los genes estructurales para su síntesis se presentan en loci complejos (Metakovsky et al., 1990). Estos loci están ordenados en bloques de ligamiento en 6 de los cromosomas del trigo, en los brazos cortos de cada uno de los cromosomas homeólogos de los grupos 1 y 6 (Metakovsky et al., 1990). Otros estudios (Jackson et al., 1983; Lafiandra et al., 1984) confirmaron que los componentes γ y ω estaban codificados por genes en los brazos cortos de los cromosomas del grupo 1 y los α y β por los del grupo 6.

Las gluteninas, requieren de agentes reductores y de soluciones alcalinas o ácidas para su extracción. Constituyen el segundo grupo en importancia entre las proteínas más abundantes y presentan complejos enlaces disulfuro intermoleculares que agrupan varias subunidades

proteicas en agregados de alto peso molecular. Estas subunidades pueden separarse en geles desnaturizantes de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). y se definen de acuerdo a su movilidad, las fracciones A (gluteninas de alto peso molecular, HMW), B y C (gluteninas de bajo peso molecular, LMW).

Cada variedad generalmente presenta de 3 a 5 subunidades de gluteninas HMW, y se han descrito hasta 20 variantes en trigos hexaploides (Payne et al., 1981b) y otras distintas en especies silvestres relacionadas (Nevo y Payne, 1987). Algunas de estas variantes no se presentan nunca juntas en una variedad sugiriendo que son formas alélicas, mientras que otras aparecen altamente ligadas en pares (Payne et al., 1981b). Estos pares consisten en una subunidad de menor y otra de mayor movilidad en SDS-PAGE, designadas x e y respectivamente (Payne et al., 1981b). Estudios genéticos utilizando materiales nuli-tetrasómicos, ditelosómicos y líneas de sustitución, han determinado que las subunidades están codificadas por loci simples ubicados en los brazos largos de los cromosomas homeólogos del grupo 1 (Lawrence y Shepherd, 1981, Payne et al., 1982). Análisis moleculares indicaron que en cada locus están presentes dos genes fuertemente ligados, que codifican para los polipéptidos x e y (Harberd et al, 1986). Sin embargo, no todos los productos de esos genes están presentes en las variedades de trigo hexaploide. Tal es el ejemplo de la proteína codificada por el gen Glu-A1y que no se expresa en ninguna de las variedades conocidas, constituyendo un alelo nulo (ver Tabla1).

Las gluteninas de bajo peso molecular están presentes en un número de 2 a 9 por variedad (usualmente 3 ó más), y similarmente a lo que ocurre en

las gluteninas de HMW algunas de ellas son formas alélicas (Gupta y Shepherd., 1988). Estas subunidades fueron subdivididas, según su comportamiento en electroforesis en dos dimensiones, en subunidades B y C (Jackson et al., 1983) debidas a diferencias en puntos isoeléctricos y en menor medida por su tamaño. El control genético de estas subunidades ha sido determinado por análisis similares a los utilizados en las gluteninas de HMW, y se demostró que los mismos estaban ubicados en los brazos cortos de los cromosomas homeólogos del grupo 1 (Shepherd, 1988). Además se ha determinado poca (Singh y Shepherd, 1988) o nula (Payne et al.,1984b) recombinación entre los genes de gluteninas LMW y las gliadinas γ y ω en los cromosomas 1A y 1B evidenciando que los genes de estos tipos proteicos están codificados en loci complejos altamente ligados.

3.-Relación entre las proteínas de reserva y la calidad panadera

Al conjunto de gliadinas y gluteninas se lo conoce como proteínas del gluten. Esto se debe a que el gluten es el producto del lavado de la harina en agua, quedando estas proteínas como precipitado junto a otros compuestos insolubles. Se ha asociado la calidad panadera al contenido de gluten de la harina (Dimler, 1965), y gracias a la aparición de técnicas de separación más efectivas de estas fracciones (SDS-PAGE y APAGE) ha sido posible identificar variaciones en componentes individuales (subunidades) de gliadinas y gluteninas que contribuyen diferencialmente a este carácter (Payne et al., 1979; 1981a entre otros). La asociación entre subunidades de proteínas del gluten y la calidad panadera ha sido realizada también con el objeto de contar con

marcadores genéticos que sean útiles en planes de mejoramiento. Este objetivo ha sido abordado a través de dos aproximaciones:

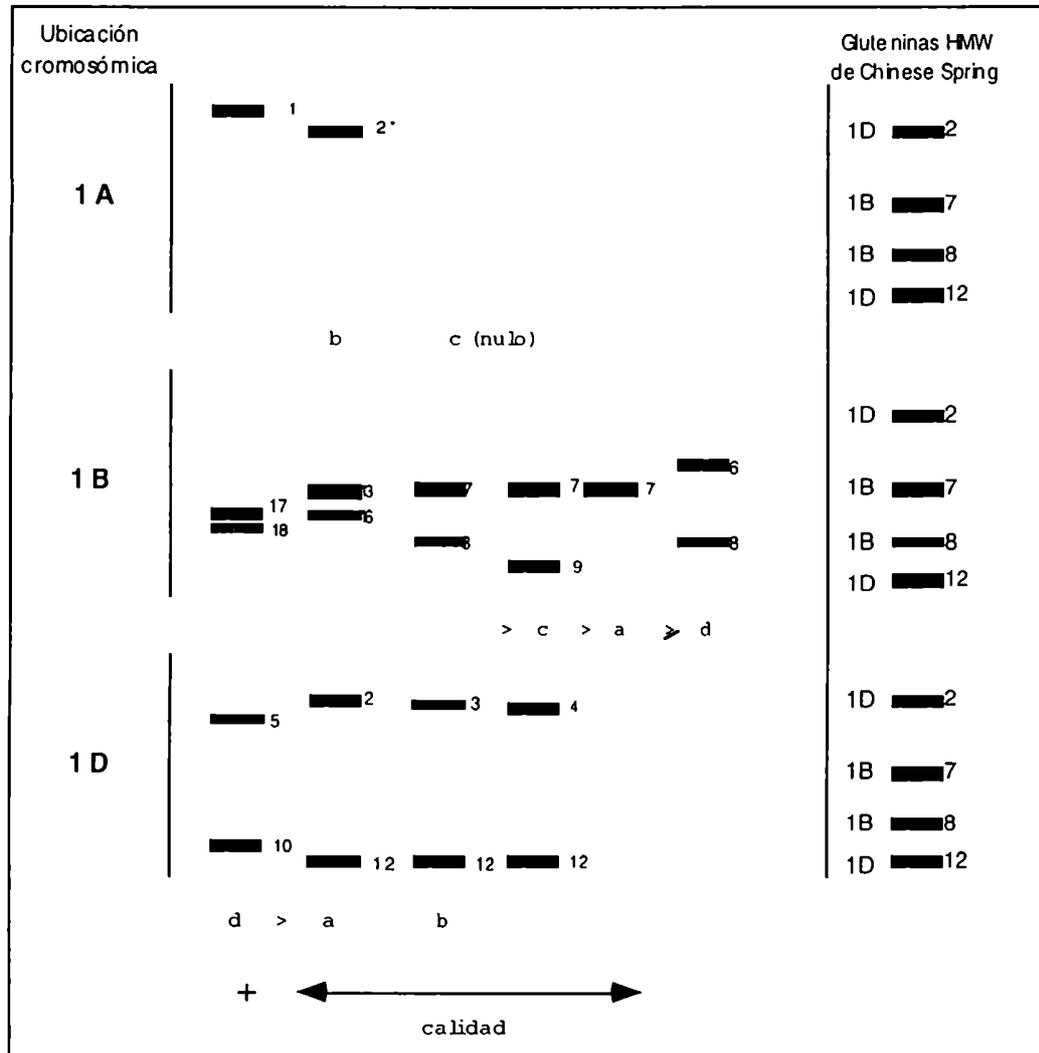
i) comparación de los valores medios de calidad panadera de grupos de variedades cuyos integrantes comparten la presencia de determinada/s subunidades proteicas (Burnouf y Bouriquet, 1980; Rogers et al., 1989) o ii) análisis de poblaciones segregantes (v.g. F₂, recombinantes endocriadas), productos del cruzamiento de genotipos de calidad panadera contrastante (Payne et al., 1979; Odenbach y Mahgoub, 1988).

Algunos trabajos, utilizan la primera aproximación con el objetivo de identificar rápidamente asociaciones entre proteínas y calidad, para luego corroborar las mismas en progenies de cruzamientos de genotipos previamente seleccionados por presentar polimorfismos en las proteínas supuestamente asociadas (Moonen et al., 1982).

3.1.-Gluteninas de alto peso molecular

A partir de estas aproximaciones, en el Plant Breeding Institute en Cambridge, el grupo de Payne (Payne et al., 1979, 1981a, 1987; Rogers et al., 1989) ha determinado alelos de subunidades de gluteninas de alto peso molecular que confieren buena aptitud panadera en variedades principalmente europeas. Estos resultados se presentan resumidos en la figura 1. Otros investigadores han llegado a resultados similares independientemente (Moonen et al., 1982; 1983; Burnouf y Bouriquet, 1980)

Figura 1: Esquema de la variación alélica de subunidades de gluteninas de alto peso molecular, su ubicación cromosómica y su relación con la calidad panadera según el patrón en electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida. Las bandas proteicas se simbolizan con números y sus correspondientes alelos con letras minúsculas. Adaptado de Blackman y Payne, 1987



En base a estos resultados el grupo de Payne ha propuesto un índice de calidad, llamado índice Glu-1, basado en la composición de las

subunidades de gluteninas de alto peso molecular codificadas por los cromosomas homeólogos del grupo 1 (Blackman y Payne, 1987). A cada subunidad se le asigna un valor arbitrario de acuerdo a los resultados previamente obtenidos, que se resume en la tabla 1, obteniéndose el valor del índice mediante la adición de los valores individuales de las subunidades presentes. Más de un 50% de la variación de calidad pudo ser explicada utilizando este índice en variedades británicas (Payne et al., 1987a) y alemanas (Rogers et al., 1989).

Tabla 1: Índices de calidad asociados a subunidades o pares de subunidades de gluteninas de alto peso molecular (de Blackman y Payne, 1987).

índice	subunidades de gluteninas HMW		
	ubicación cromosómica		
	1A	1B	1D
4			5+10
3	1, 2*	17+18, 7+8	
2		7+9	2+12, 3+12
1	nulo	7, 6+8	4+12

Sin embargo, existen evidencias que indican que la calidad panadera no siempre puede ser explicada por el índice Glu-1.

Trabajos previos han demostrado que sólo el 11% de la variación en calidad panadera presentada por un grupo de variedades utilizadas entre 1912 hasta 1984 pudo ser explicado a través de su

composición de gluteninas de alto peso molecular (Feingold, 1993). Más aún, se determinó que cultivares que mostraban idénticos patrones electroforéticos en una y dos dimensiones (y por lo tanto igual índice Glu-1) presentaban diferencias significativas en su calidad panadera. Análogamente, el índice Glu-1 no proporcionó una predicción satisfactoria de la calidad panadera en dos grupos distintos de cultivares australianos (Lawrence, 1986; Metakovsky et al., 1990).

Estos resultados indican que la calidad panadera puede explicarse a través del tipo de gluteninas de alto peso molecular, pero también evidencian la dependencia o interacción con otros factores, proteicos o no, que hacen a este carácter.

3.2.-Gliadinas

Las primeras evidencias de asociaciones de subunidades de gliadinas con la calidad fueron reveladas en *Triticum durum* (Damidaux et al., 1980; Kosmolak et al., 1980) donde la presencia de las subunidades alélicas 45 y 42 fue asociada, respectivamente, a buena y mala calidad de la harina para la producción de pasta. Posteriormente fue demostrado que la gliadina 45 no confería, *per se*, la calidad mencionada, sino que el gen que la codifica está genéticamente ligado a genes de gluteninas de bajo peso molecular que serían las responsables del efecto en la calidad (Payne et al., 1984a).

En trigos hexaploides se reconoce que la fracción ω de alto peso molecular posee componentes que influyen en la calidad panadera (Sozinov y Popereya, 1980; Wrigley et al., 1982b; Branlard y

Dardevet, 1985; Campbell et al., 1987) Sin embargo, la caracterización de subunidades dentro de esta fracción se hace compleja debido a la superposición que ésta presenta con gluteninas LMW en SDS-PAGE. A pesar de esta desventaja, la separación de las gliadinas en geles de pH ácido (APAGE) ha posibilitado la identificación de algunas subunidades asociadas a ciertos parámetros que hacen a la calidad panadera como resistencia a la extensión (Campbell et al., 1987 Metakovsky et al., 1990) y extensibilidad (Metakovsky et al., 1990). Existe aún cierta divergencia entre los investigadores acerca de la denominación de las subunidades de gliadinas, por lo cual la comparación entre polipéptidos estudiados por distintos grupos de investigación se ve dificultada. Campbell et al. (1987) intentan una comparación entre distintos autores (Sozinov y Poperelya, 1980; Wrigley et al., 1982b; Branlard y Dardevet, 1985), pero las correspondencias entre factores de calidad y gliadinas, no es consistente entre ellos, probablemente debido a que estas asociaciones están restringidas al rango de genotipos estudiados en cada caso.

3.3.-Gluteninas de bajo peso molecular

Las gluteninas LMW, como se mencionó anteriormente, son agregados multiméricos de subunidades que se asocian a través de enlaces disulfuro. Esta característica sugiere que las mismas pueden estar involucradas en la determinación de las propiedades físicas de la harina, como fue demostrado en trigo candeal (Payne et al., 1984a).

Sin embargo, esta fracción proteica no ha sido bien caracterizada ya que, una vez reducidas, las subunidades se superponen a las gliadinas de mayor peso en SDS-PAGE unidimensional. Utilizando electroforesis en dos dimensiones fue posible determinar las ubicaciones cromosómicas de los genes que controlan las gluteninas LMW (Jackson et al., 1983), sin embargo la dificultad que esta técnica presenta junto con la imposibilidad de analizar un gran número de muestras simultáneamente, limitó el estudio de asociaciones con características de calidad.

El desarrollo de un procedimiento de electroforesis unidimensional en dos pasos (Singh y Shepherd, 1988) permitió una mejor separación de las subunidades proteicas y facilitó el análisis de una mayor cantidad de muestras. Utilizando esta técnica, Gupta y Shepherd (1988) distinguieron dos grupos dentro de las gluteninas de LMW de acuerdo a su movilidad (B y C de menor y mayor movilidad, respectivamente) y detectaron, analizando más de 200 genotipos, gran variabilidad en el patrón de bandas de las subunidades B, que eran las de mejor resolución en el sistema utilizado.

Posteriormente, Gupta et al. (1989) encontraron variaciones alélicas significativamente asociadas a variaciones en componentes de calidad panadera (extensibilidad, dada por el farinógrafo de Brabender) en dos localidades diferentes. Alguno de estos efectos fueron cuantitativamente más importantes que los debidos a variaciones en gluteninas de alto peso molecular.

Estos estudios realzan la importancia de otros componentes proteicos en la determinación de la calidad panadera, y que una vez identificados, podrían ser utilizados en planes de mejoramiento.

4.-Caracterización de las secuencias asociadas a la calidad panadera.

La estructura de las gluteninas HMW, deducida a partir de los genes correspondientes aislados de genotecas, está conformada por tres dominios estructurales i) un extremo amino-terminal no repetitivo, ii) una región central altamente repetitiva de hexámeros (PGQGQQ) y nonámeros (Gy/hYPt/aSp/IQQ) y iii) un extremo carboxi-terminal no repetitivo (Greene et al., 1988; Flavell et al., 1989). Estas proteínas poseen varios residuos de cisteínas, mayoritariamente confinados en las regiones no repetitivas, responsables de las uniones disulfuro intermoleculares que producen agregados multiméricos (Tatham et al., 1985). Estudios estructurales (según Chou y Fasman, 1978) basados en la secuencia aminoacídica de la región repetitiva ha evidenciado una alta predisposición a formar configuraciones de tipo giro- β en la cual la cadena aminoacídica gira 180 grados (Greene et al., 1988; Flavell et al., 1989). Tatham et al. (1985) han propuesto que sucesivos giros pueden formar una espiral de giros β , estabilizada por puentes hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, que sería la responsable de las propiedades viscoelásticas de la harina del trigo. Las variaciones en secuencia entre subunidades de gluteninas HMW, ya sean i) tipos "x" e "y" ii) homeoalelos y iii) alelos verdaderos, es reducida y está mayormente restringida a la región repetitiva central (Flavell et al., 1989). En comparaciones de

subunidades de tipo “y” de los distintos genomas la mayoría de las variaciones fueron debidas a eventos de tipo inserción/delección de hexámeros y nonámeros (Halford et al., 1987), mientras que entre variantes alélicas de un mismo locus son más frecuentes mutaciones puntuales que producen cambios de aminoácidos dentro de unidades repetitivas (Flavell et al., 1989). Estas variaciones interrumpen una serie regular de giros β , disminuyendo la probabilidad de formación de una espiral β , influyendo negativamente en la elasticidad de las harinas que posean las subunidades con hexámeros y/o nonámeros que difieran de las secuencias consenso (Greene et al., 1988; Flavell et al., 1989).

5.-La calidad panadera en Argentina

El mejoramiento de trigo en Argentina comenzó a principios de siglo teniendo como objetivos la resistencia a enfermedades, tolerancia a estreses ambientales, y rendimiento en grano (Slafer y Andrade, 1989). Posteriormente, a partir de 1935, comenzó a tener importancia la calidad panadera (Klein, 1953). La calidad de los trigos argentinos ha sido tradicionalmente alta, hecho que determinó que fueran exportados para utilizarse como harinas correctoras para las variedades cultivadas en los países europeos y latinoamericanos. Sin embargo, repetidas veces se ha mencionado que la calidad de los cultivares modernos es menor que los utilizados antiguamente. Utilizando cultivares argentinos generados entre 1912 a 1984, Slafer et al. (1990) demostraron que el contenido relativo de nitrógeno de los granos ha ido disminuyendo a lo largo del proceso de mejoramiento en Argentina y puede ser explicado por un

aumento no proporcional de la biomasa en granos con respecto al aumento en la acumulación de compuestos nitrogenados. Esta reducción neta de la concentración proteica puede haber inducido a la idea manifestada anteriormente y sugiere que la calidad panadera de los trigos argentinos actuales debería estar sustentada en el tipo de proteínas presentes y no en el contenido de las mismas. Por otro lado, en un estudio con nueve variedades de trigo utilizadas entre 1912 y 1984 no pudo establecerse ninguna tendencia de la calidad en función del tiempo (Feingold, 1993).

Sin embargo, si bien no puede afirmarse que la calidad panadera ha variado durante el mejoramiento de trigo en la Argentina, la composición de gluteninas de alto peso molecular en los cultivares modernos difiere de la de los cultivares antiguos. Feingold (1993) reveló que los cultivares más modernos presentan subunidades que fueron asociadas positivamente con la calidad panadera y ha atribuido este hecho a la incorporación de los genes de enanismo en la década del 60, proveniente del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Este germoplasma ha sido ampliamente distribuido en todo el mundo, y también en Argentina (Nisi y Legasa, 1986), y ésta podría ser una de las causas que contribuyen a la presencia limitada de variantes alélicas en los genotipos actuales.

6.-Mejoramiento de la calidad panadera

La calidad panadera puede ser mejorada mediante un aumento en la cantidad de proteínas y/o por selección del tipo de proteínas de reserva presentes en el grano.

La factibilidad de aumentar el contenido relativo de proteínas, paralelamente con un alto rendimiento, ha sido cuestionado por la conocida asociación negativa que presentan estos caracteres (Gupta et al., 1989). Sin embargo, ha sido sugerido que es posible mejorar la concentración de proteínas, independientemente del rendimiento, a través de una mayor absorción y más eficiente removilización del nitrógeno (Slafer et al., 1990). Si bien han sido identificados determinantes genéticos sobre el contenido relativo de proteínas de reserva en trigo tetraploide (Blanco et al., 1996; Joppa et al., 1997), y en trigo pan (Kuspira y Unrau, 1957; Morris et al., 1978; Law et al., 1978; Snape et al., 1995) éste es un carácter con una marcada influencia de la disponibilidad de nitrógeno en el suelo y las condiciones ambientales durante el período de crecimiento de los granos. La variabilidad genética observada en este carácter es generalmente de menor magnitud que la variabilidad ambiental (Blackman y Payne, 1987), implicando que la selección de este carácter cuantitativo es de baja heredabilidad.

Por otro lado, Flavell et al. (1984), sugirieron que la modificación del tipo de gluteninas HMW sería una alternativa válida en el mejoramiento de la calidad panadera, manteniendo el tenor proteico de los granos.

Más recientemente, Gupta et al. (1989) obtuvieron resultados que indican que la selección de alelos asociados positivamente a la calidad panadera, mejoran esta característica independientemente del nivel de proteínas.

Si bien el rol de las gluteninas en la determinación de la calidad panadera no está suficientemente entendido a nivel molecular, se sabe que la presencia de residuos de cisteínas en las regiones no repetitivas (tanto carboxi- como amino-terminal) juegan un papel determinante en

la formación de los polímeros que constituyen la red del gluten a través de puentes disulfuro (Tatham et al., 1985; Vasil y Anderson, 1997).

Asimismo, existen evidencias de que el número de genes activos de HMW gluteninas se correlaciona de manera lineal y positiva con la calidad panadera (Vasil y Anderson, 1997).

Estos indicios, junto con la reciente posibilidad de transformar genéticamente al trigo (Vasil et al., 1993; Weeks et al., 1993), han determinado que se considere a la ingeniería genética como un camino alternativo para mejorar las características reológicas de las harinas. D'Ovidio et al. (1997) han propuesto que genes de proteínas modificadas tanto en el tipo y longitud de las secuencias repetitivas centrales como en el número de residuos de cisteínas en las regiones terminales, pueden ser construidos y expresados en *E. coli* para determinar su efecto en la calidad panadera. Posteriormente, este conocimiento puede ser aplicado a la construcción de genes sintéticos para la transformación de plantas de trigo de alta calidad panadera. Se han reportado simultáneamente transformación de trigo con los genes de HMW gluteninas Dy10-Dy5 (Blechl y Anderson., 1996) y Ax1 (Altpeter et al., 1996) sobre genotipos que carecen esos alelos y se ha demostrado que la expresión de los transgenes es aditiva a la de los genes nativos, incrementando así el nivel de proteínas totales. Estos resultados permiten suponer que el mejoramiento de la calidad panadera a través de la bioingeniería es posible.

Se ha indicado que las variedades modernas de trigo presentan un fondo genético estrecho (Blum et al., 1987) y se ha recurrido a especies afines al trigo con el objeto de identificar fuentes de calidad distintas a las ya

utilizadas (Blum et al., 1987; Ciaffi et al., 1992; Rogers et al., 1997). La utilización de estas fuentes, sin embargo, dependerá del comportamiento de los alelos de las especies relacionadas (generalmente di o tetraploides) en un fondo genético hexaploide y en condiciones distintas de dosaje. La identificación de fuentes de calidad en genotipos hexaploides, proveería variantes de utilización más directa que las mencionadas anteriormente.

Los marcadores genéticos en el mejoramiento vegetal

1.- Caracteres cuantitativos, heredabilidad y selección

Muchos de los caracteres que revisten mayor importancia en el mejoramiento vegetal, tales como rendimiento o factores de calidad, presentan herencia cuantitativa (Falconer, 1989). Esto es, que el carácter en cuestión presenta una variación continua en una población segregante.

Este tipo de herencia, que contrapone la variación discreta y mendeliana de factores genéticos a una variación fenotípica continua, puede responder a dos modelos: i) un gen con alta influencia ambiental o ii) a varios genes de pequeño efecto (Falconer, 1989).

La heredabilidad (h^2) es la proporción de la varianza fenotípica (V_p) que es atribuible a efectos genéticos (V_g), y es expresada mediante la ecuación: $h^2 = V_g/V_p$. En sentido estricto, sólo la componente genética aditiva (V_a) es considerada y se enuncia $h^2 = V_a/V_p$.

De estas ecuaciones se desprende que los caracteres cuantitativos presentan baja heredabilidad, ya sea por una alta varianza ambiental

(varianza fenotípica= varianza genética + varianza ambiental) (modelo i) o por un efecto génico individual pequeño (modelo ii).

El éxito en el mejoramiento genético consiste en seleccionar en una población segregante los individuos que posean la mejor combinación genética para el carácter que se desea mejorar. Una medida de esto puede estimarse a través de la comparación de la media fenotípica de la progenie del individuo selecto y la media fenotípica de la población de la cual provino ese individuo. Cuanto mayor sea la diferencia (S) entre estos dos valores (en el sentido deseado) mayor será la respuesta a la selección (R). Este parámetro, como puede suponerse, está estrechamente ligado a la heredabilidad del carácter ($R = h^2 S$) (Falconer, 1989).

Por consiguiente, puede decirse que la selección de caracteres cuantitativos mediante evaluación fenotípica es un proceso dificultoso debido a la baja heredabilidad de tales caracteres.

2.- Marcadores Genéticos

La utilidad de los marcadores genéticos reside en el ligamiento de los mismos con un carácter de interés agronómico. Si este grado de ligamiento es estrecho (~5-10 cM), se puede realizar una selección indirecta del carácter a través de la presencia de su marcador. Si el marcador se localiza a una mayor distancia genética se corre el riesgo de ocurrencia de un evento de recombinación (cross-over) entre el marcador y el gen responsable del efecto fenotípico, haciendo así poco exitosa la selección a través del uso del marcador genético.

Un marcador genético ideal debe además, cumplir con los siguientes requisitos: 1) ser polimórfico, de ser posible altamente polimórfico y multialélico. 2) ser de alta heredabilidad, o sea, altamente reproducible en la progenie 3) presentar segregación mendeliana y comportamiento co-dominante, esto es, la factibilidad de identificar las tres clases alélicas (AA, Aa y aa) 4) ser abundantes y dispersos por todo el genoma 5) fenotípicamente neutros y 6) detectables en cualquier momento del desarrollo del individuo (Tanskley et al., 1989; Paterson et al., 1991; Bretting y Widrlechner, 1995).

Existen tres tipos de marcadores genéticos: morfológicos, bioquímicos (o proteicos) y moleculares. Todos los marcadores detectan variaciones en el ADN, sin embargo lo hacen a niveles diferentes. Los morfológicos evalúan el efecto final de un gen a través de un fenotipo (una coloración o morfología distintiva). Los marcadores proteicos (considerados por algunos autores dentro de los marcadores moleculares), se centran en polimorfismos (de tamaño o carga) del producto de traducción del gen y los marcadores moleculares detectan variaciones directamente sobre el ADN.

Marcadores morfológicos

La idea de utilizar métodos genéticos para inferir la presencia o ausencia de un gen o grupo de genes no es nueva. Sax (1923) fue el primero en sugerir la utilización de los patrones de pigmentación de la semilla del poroto como marcadores de su tamaño.

Los marcadores morfológicos presentan la desventaja de ser muy escasos y de causar cambios fenotípicos notables, no siempre deseados (Tanskley, 1983). Su gran utilidad, sin embargo, consiste en la simpleza

de su evaluación. Existen muchos marcadores morfológicos que se utilizan con fines filogenéticos (como el número de filas en el marlo de maíz; *Zea mais*, L.), pero pocos son los que presentan ligamiento a caracteres de interés en el mejoramiento vegetal. Uno de ellos es el ligamiento de la coloración rojiza del hipocótilo y la esterilidad nuclear masculina del girasol (Leclercq, 1966).

Marcadores proteicos

El descubrimiento de variantes alélicas de proteínas de reserva y de enzimas de igual función bioquímica, pero de distinta composición molecular (llamadas isoenzimas) proveyó un tipo de marcador molecular sin los efectos epistáticos mencionados de los marcadores morfológicos (Markert y Moller, 1959). El polimorfismo en las isoenzimas está dado por un cambio en el punto isoeléctrico de las mismas causado por cambios en su composición aminoacídica y que se revela después de su fraccionamiento en geles de almidón en presencia de sustratos coloreados específicos (Tanskley, 1983), mientras que las proteínas de reserva presentan un polimorfismo en su peso molecular relativo (Mr) que se revela por separación electroforética en geles de poliacrilamida y tinción total de proteínas. Tanto las isoenzimas como las proteínas de reserva han sido utilizadas para identificación varietal y estudios evolutivos (Gepts, 1990; Wendel y Weeden, 1989) en los últimos 25 o 30 años.

Las isoenzimas y variantes alélicas de las proteínas de reserva son más abundantes que los marcadores morfológicos (en trigo existen 65 loci identificados entre isoenzimas y proteínas de reserva; Hart, 1996), son altamente heredables y presentan un nivel aceptable de polimorfismo en

germoplasma silvestre (Bretting y Widlechner, 1995). Sin embargo, cuando se trata de genotipos utilizados en mejoramiento, y por lo tanto de base genética más estrecha, el nivel de polimorfismo presente en este tipo de marcadores puede ser limitante (Serre et al., 1998) y carecen de la posibilidad de generar mapas de alta saturación (De Verna y Alpert, 1990). Sin embargo, las isoenzimas constituyen quizás el tipo de marcador más utilizado en manejo de germoplasma (Simpson y Withers, 1986) y como se ha mencionado anteriormente, las proteínas de reserva de trigo han sido asociadas a caracteres de calidad, y existen ejemplos de isoenzimas ligadas a resistencia a enfermedades en *Aegilops* (McMillin et al., 1986) y a caracteres cuantitativos en tomate (Tanskley et al., 1982).

Marcadores moleculares

Los marcadores a nivel de ADN son quizás los que más se acercan a la descripción ideal de un marcador genético. La secuencia de ADN de los organismos sufre a lo largo de su evolución un gran número de mutaciones puntuales, deleciones y/o rearrreglos de fragmentos cromosómicos. Dada la dispersión y dilución de secuencias codificantes en el genoma de los organismos superiores y a la falta de presión de selección, la mayoría de estos cambios se acumulan en las regiones no codificantes. Es interesante remarcar que el ADN tanto de plantas como de animales presenta una gran cantidad de secuencias no codificantes, llamada por algunos autores ADN "basura" (Ohno, 1972) por no poseer función conocida. Sin embargo, desde el punto de vista de los marcadores genéticos este ADN es de suma utilidad. Esto se debe a que los cambios ocurridos en el transcurso de la evolución, en secuencias

codificantes están sujetos a presión de selección. Un cambio nucleotídico que provoque la aparición de un codón de terminación en una proteína vital para la supervivencia de un organismo, el cambio en secuencias reguladoras de genes importantes y hasta la inclusión de una mutación silenciosa pero que no esté en coincidencia con el uso de codones de un organismo puede tener efectos letales o deletéreos y habrá de ser seleccionado en contra. Esto nos lleva a una acumulación de variantes a nivel ADN que por ser selectivamente neutras, han ido acumulándose estocásticamente en las regiones no codificantes de los organismos superiores.

Los marcadores a nivel ADN tratan de explotar esa variabilidad de diferentes maneras.

Existen dos maneras básicas de revelar polimorfismos entre genotipos:

- i) mediante el corte de ADN con enzimas de restricción.
- ii) mediante amplificación de ADN.

Diferentes técnicas utilizan uno u otro método y algunas más novedosas que utilizan ambos.

Los polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) se ubican dentro del primer grupo.

RFLPs

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) se basan en separar mediante electroforesis los fragmentos de ADN obtenidos por digestión con una enzima de restricción, y detectar mediante hibridación con fragmentos de ADN marcados (sondas), correspondientes a secuencias únicas o de bajo número de copias (Tanskley et al., 1989), que determinará la generación de un patrón

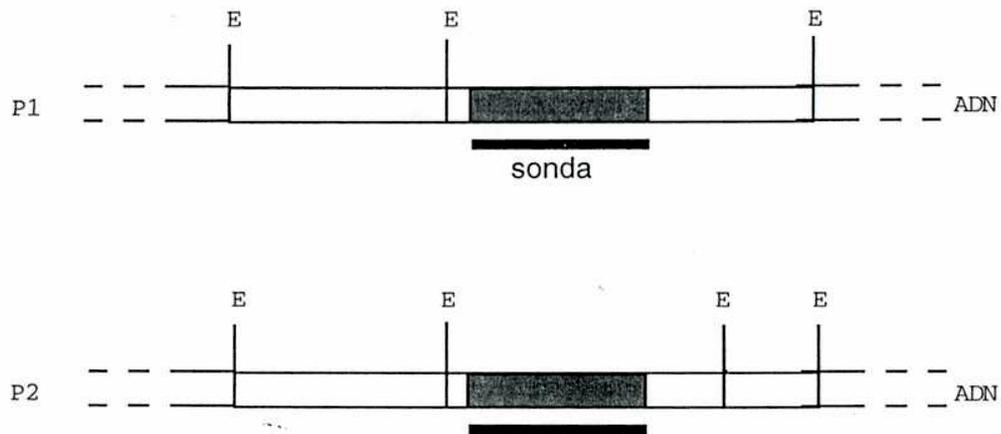
simple de hibridación. Un RFLP ocurrirá cuando existan variaciones en la secuencia de ADN que involucren cambios en la distancia entre sitios de corte de la enzima, en fragmentos que incluyan la secuencia correspondiente a la sonda utilizada (figura 2). Los RFLPs detectan tanto mutaciones puntuales que afecten sitios de restricción, como rearrreglos cromosómicos (inversiones, deleciones e inserciones) en la vecindad de sitios de corte, siendo éstos últimos las causas más frecuentes de polimorfismos en vegetales superiores.

Los RFLPs son alta y establemente heredables, de efecto fenotípico neutro, no influenciados ambientalmente, de segregación mendeliana, multialélicos y fueron los primeros marcadores que se desarrollaron con posibilidad de saturar un mapa (De Verna y Alpert, 1990). Si bien esto es teóricamente irrefutable, en la práctica existen dos limitaciones: el número de sondas desarrolladas y la falta de polimorfismo encontrado en ciertos organismos.

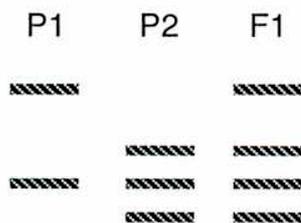
El desarrollo de sondas para RFLP incluye el aislamiento, clonado y selección de fragmentos de ADN y requiere una extensiva evaluación para identificar secuencias de bajo número de copias (o ADN de secuencia única).

Existen evidencias de bajo nivel de polimorfismos en tomate (Helentjaris et al., 1985), soja (Keim et al., 1992) y trigo (Liu et al., 1990).

Figura 2: Detección de polimorfismos en fragmentos de restricción



Corte con la enzima de restricción E
y separación por electroforesis



Después de la hibridación y
detección de la sonda



- región complementaria a la sonda
- E sitio de corte de la enzima de restricción E
- P1: genotipo 1, línea homocigota
- P2: genotipo 2, línea homocigota
- F1: filial 1, heterocigota

Otra desventaja inherente a los RFLPs es que son técnicamente complejos (requieren cierta infraestructura), de alto costo e involucran mucho trabajo. Además, la cantidad de ADN necesario (un mínimo de 10

µg por dato) hace impracticable detectar RFLPs para un gran número de sondas partiendo de plántulas.

En el segundo grupo de marcadores, aquellos que utilizan la amplificación de ADN como método para detectar variabilidad, están incluidos, entre otros, los RAPDs (ADN polimórfico amplificado al azar), y los microsatélites o SSRs (repeticiones de secuencia simple).

RAPDs

Los RAPDs son productos de amplificación cuyo único proceso azaroso consiste en la elección del iniciador o "primer" (oligonucleótido sintético, ~10 nt) de secuencia arbitraria, que se utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos productos se generan por la existencia de secuencias complementarias al "primer" en una cadena y la reversa de la complementaria en la otra cadena a una distancia no mayor de 2 ó 3 kb. Los fragmentos amplificados son posteriormente separados mediante electroforesis y visualizados en tinciones con bromuro de etidio.

Los polimorfismos en RAPDs son en general de tipo dominante (presencia vs. ausencia) y se producen cuando el arreglo espacial de secuencias enunciado no se produce, ya sea por falta de alguna de las secuencias complementarias al "primer" o por una excesiva distancia entre las mismas.

Los microsatélites

El origen del término microsatélite proviene de los estudios iniciales de sedimentación del ADN en gradientes de cloruro de cesio, donde se visualizaba una banda definida de ADN y otra banda extra de densidad diferente. Esto era causado por regiones con un porcentaje de GC (GC%)

distinto a la media del organismo estudiado. Regiones con mayor GC% presentan mayor densidad dada por la mayor compactación del ADN ya que estos pares están unidos por tres puentes hidrógeno mientras que los pares AT sólo por dos. Estudios posteriores revelaron que estas bandas extras o satélites estaban conformadas por secuencias de ADN repetitivo localizadas en la mayoría de los casos en regiones centroméricas o heterocromáticas (Pardue y Gall, 1970).

La técnica de huellas dactilares de ADN (DNA fingerprinting) desarrollada por Jeffreys y colaboradores, consiste en secuencias de alrededor de 50 pares de bases (pb) de longitud, repetidas en tándem de número de copias variables (también denominadas VNTRs). Debido a su carácter repetitivo pero de motivos de longitud pequeña, Jeffreys (1985) se refiere a ellas como minisatélites por homología con al ADN repetitivo de los experimentos de sedimentación.

El término de microsatélites fue introducido por Litt y Luty (1989) para describir repeticiones cuyos motivos van de 1 a 6 pb.

Los microsatélites (también denominados repeticiones de secuencia simple, SSRs) fueron identificados primeramente en humanos (Miesfeld et al., 1981) y se evidenció la presencia de distintos motivos a través de búsquedas en base de datos genéticos (i.e. EMBL y GenBank) (Tautz et al., 1989). Estos estudios revelaron que la presencia de motivos de di y trinucleótidos era de 5 a 10 veces más abundante de lo que se esperaría en una distribución arbitraria. En animales la secuencia más abundante es (AC) n mientras que en vegetales lo es (AT) n , y en menor medida (AG) n . Se propuso que la diferencia encontrada en distintos individuos en el número de repeticiones del motivo central era debido a entrecruzamiento

desigual y/o a deslizamientos de la polimerasa durante la replicación del ADN, junto con una deficiencia en la corrección de errores, dada la naturaleza repetitiva del segmento (Tautz et al, 1989). La hipervariabilidad encontrada junto con la alta presencia de microsatelites llevó a que se propusiera su uso como marcadores moleculares (Beckman y Soller, 1990; Morgante y Olivieri, 1993).

Los polimorfismos son detectados a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando "primers" complementarios a regiones únicas que flanquean a los microsátélites (Brown et al., 1996). Estos productos son luego separados por electroforesis en agarosa o en poliacrilamida y teñidos con bromuro de etidio en el primer caso y radioactivamente o con plata en el segundo.

La ventaja que ofrecen estos marcadores es que a partir del uso de la PCR son técnicamente simples, económicos y automatizables. Además utilizan muy poca cantidad de ADN, lo que permite múltiples determinaciones aún partiendo de una pequeña porción de tejido.

La mayor desventaja que presentan los microsátélites es el alto costo que implica su desarrollo. Brown et al., (1986) han propuesto tres alternativas de desarrollo de SSRs. Las dos primeras consisten en buscar en bancos de datos secuencias de la especie en estudio o de especies relacionadas, en caso de no existir suficiente información de las primeras. La tercera alternativa es la construcción de una biblioteca genómica para identificar clones que contengan SSRs.

La disponibilidad actual de secuencias en base de datos es aún limitada, inclusive incluyendo en la búsqueda especies afines a la de estudio. Además, en su gran mayoría los bancos de datos presentan secuencias

codificantes correspondientes a genes. Asimismo el nivel de variación que es posible encontrar puede estar limitado por un proceso de selección en contra de las mutaciones que afecten adaptativamente a los individuos. Existen evidencias en humanos de enfermedades relacionadas a variaciones en la longitud de microsatélites (en general trinucleótidos) como el síndrome de fragilidad del cromosoma X (Kremer et al. 1991) o la distrofia miotónica muscular (Fu et al., 1992).

Por lo tanto, si bien los bancos de datos de secuencia pueden constituir una aproximación a la obtención de microsatélites, la tercera alternativa parece la más razonable para la obtención de un gran número de marcadores con alta variabilidad. Recientemente, han sido propuestos distintos métodos de construcción de bibliotecas genómicas de tal manera que resultan enriquecidas en secuencias que contienen microsatélites (Karagoyozov et al., 1993; Kandpal et al., 1994; Prochazka, 1996; Edwards et al., 1997)

AFLPs

Recientemente se ha desarrollado una nueva técnica que utiliza ambos métodos para detectar variabilidad. Se la denomina polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y combina la presencia o ausencia de sitios de restricción y la existencia de polimorfismos de secuencia adyacente a esos sitios. Los AFLPs consisten en la digestión de ADN con una o más enzimas de restricción. Los fragmentos de restricción son ligados posteriormente a oligonucleótidos específicos (adaptadores) y se los utiliza como templado de una reacción de PCR con "primers" de secuencias complementarias a los adaptadores con el agregado de una o más bases en su extremo 3' (bases discriminativas).

De esta manera sólo los fragmentos de ADN ligados a los adaptadores que presenten bases complementarias a las bases discriminativas generarán producto. Estos productos se separan posteriormente en geles desnaturizantes de poliacrilamida y se tiñen con Ag^{++} , o se revelan en placas autorradiográficas en caso marcarse los primers o los nucleótidos radioactivamente.

Los AFLPs tienen la ventaja de que no se necesita conocimiento previo de secuencia para su uso, y con una sola reacción se evalúan varias regiones del genoma simultáneamente. Asimismo, el uso de AFLPs ha evidenciado gran utilidad en especies que han presentado bajo nivel de polimorfismo con RFLPs y RAPDs, (Maughan et al., 1996).

Las desventajas inherentes al método es que requiere ADN de alta calidad, y genera marcadores dominantes (aunque es posible identificar heterocigotas en base a intensidad de señal mediante el uso de programas de computación específicos y radioactividad; KeyGene Inc. comunicación personal). Otro aspecto a tener en cuenta es que esta metodología está protegida por una patente y que es necesario un licenciamiento para utilizarla con fines distintos a la investigación (Zabeau y Vos, 1993).

3.- Métodos estadísticos para determinar asociaciones entre marcadores genéticos y caracteres fenotípicos.

Ligamiento y recombinación

La construcción de mapas genéticos se basa en el principio de cosegregación o ligamiento genético descubierto por Morgan (1911). En

ellos se representa el orden en que los marcadores se encuentran y la distancia relativa entre ellos.

La constitución genética de un individuo diploide es producto de la suma de dos gametas haploides parentales. Durante la meiosis, los cromosomas homólogos se alinean y existe la probabilidad de entrecruzamiento entre cromátidas no hermanas, produciéndose así la recombinación de un fragmento de ADN, que se transmitirá a las gametas.

Dos loci que se encuentren cerca en un cromosoma tendrán menor probabilidad de recombinación que otros que se encuentren más alejados sobre el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes. Por ese motivo, los alelos de regiones cromosómicas cercanas tenderán a permanecer juntos en la mayoría de los individuos de la progenie y se dice que cosegregan o que están ligados.

El grado de ligamiento entre dos loci está en relación inversa con la distancia entre ellos, y se define como:

$$\text{grado de ligamiento} = (1 - p) \cdot 100$$

siendo p la fracción de recombinación:

$$p = \frac{\text{número de individuos recombinantes}}{\text{número total de individuos}}$$

La probabilidad de ocurrencia de cosegregación entre dos loci cualesquiera es de $1/2$. Por lo tanto para dos loci no ligados el número de

plantas recombinantes será aproximadamente igual al número de plantas no recombinantes. $p \approx 0,5$ y el grado de ligamiento será 50%.

Si por el contrario el número de plantas recombinantes es menor al esperado entonces: $0 \leq p < 0,5$. Para dos loci totalmente ligados $p=0$ y el grado de ligamiento es 100%.

Construcción de mapas genéticos

Los mapas genéticos se construyen asignando la posición más probable de los marcadores, en base a la cosegregación de los mismos. Para poder determinar esto, es necesario que los alelos que llevan los cromosomas homólogos sean diferentes en un número suficiente de loci. Este proceso se realiza en dos etapas: En la primera, se agrupan los marcadores en "grupos de ligamiento" (que deberían corresponder al número haploide de cromosomas si se cuenta con un número suficientes de marcadores), y en la segunda se asigna el orden más probable dentro de cada grupo.

Como se vió anteriormente, la presencia de ligamiento entre marcadores puede ser detectada cuando "p" es significativamente menor que 0,5. Esto puede ser testeado mediante la pruebas de contingencia (χ^2) o de máxima verosimilitud, entre todos los pares de marcadores posibles.

Entre el gran número de programas de computación diseñados para construir mapas genéticos a partir de datos de segregación de marcadores, MAPMAKER 3.0 (Lander et al., 1987) es el más utilizado. Este programa agrupa los marcadores mediante análisis de dos puntos, y posteriormente calcula el orden más probable de los marcadores utilizando análisis de tres puntos.

El ligamiento es determinado calculando el valor LOD para cada par posible de marcadores utilizando máxima verosimilitud. Este proceso es realizado iterativamente mediante el algoritmo EM de dos etapas. La primera etapa de "expectativa" (E) estima la distancia para cada intervalo entre marcadores (a través de la fracción de recombinación "p") que podría haber dado lugar a una población como la evaluada. La segunda etapa consiste en la "maximización" (M) que utiliza los datos de la primera etapa, para calcular las fracciones de recombinación que estos producirían. De esta manera las etapas E y M son repetidas iterativamente hasta que se logra máxima verosimilitud, la que es convertida luego a valores LOD.

El valor LOD (Ott, 1985) está definido como el logaritmo en base 10 del cociente de la probabilidad que dos marcadores estén ligados sobre la probabilidad de que no lo estén. Usualmente se utilizan LODs de 3.0 (la probabilidad de que marcadores no ligados generen los datos en estudio es 0,001) para determinar ligamiento entre marcadores.

Los valores de recombinación son convertidos posteriormente en distancias genéticas (dadas en centiMorgans; cM) utilizando las funciones de Haldane (1919) o Kosambi (1944). Estas funciones toman en cuenta la probabilidad de ocurrencia de recombinaciones dobles partiendo de dos supuestos distintos con respecto a la interferencia. Interferencia es la disminución de la probabilidad de que ocurra un entrecruzamiento en un segmento de ADN cuando se produce otro en la vecindad del primero. Haldane asume interferencia nula, mientras que Kosambi asume interferencia total. El valor real de interferencia estará pues en algún lugar en medio de estos dos supuestos.

Localización de regiones de ADN responsables de caracteres fenotípicos.

Los caracteres monogénicos pueden ser medidos en clases discretas y su localización en un mapa es factible de realizar determinando las clases genéticas del carácter (dos, si el carácter se ajusta al modelo dominante/recesivo) y tomándolo como un marcador más.

En el caso de caracteres cuantitativos los fenotipos no pueden ser clasificados de manera discreta ya que su variación es continua dentro de una población segregante. El mapeo de los QTLs es posible mediante el uso de marcadores genéticos y varios métodos pueden ser utilizados.

El método más simple está basado en marcadores individuales. Este análisis parte del supuesto que el QTL se encuentra en la misma localización que el marcador genético. Esta hipótesis se prueba para cada marcador agrupando a los integrantes de una población segregante de acuerdo a su genotipo. Mediante un análisis de varianza (ANOVA) entre las medias fenotípicas de cada una de las tres clases genotípicas (cada homocigota parental y el heterocigota) se acepta o se rechaza la hipótesis. Un valor F se obtiene para cada marcador al comparar las diferencias de las medias de cada clase genotípica. Un valor de F indica asociación entre el QTL y el marcador. El valor de F está asociado a un nivel de significancia "p". En general, cuando la densidad de marcadores es baja, se acostumbra a fijar el valor de P en 5%. Si la cantidad de marcadores es mayor, es necesario bajar el nivel de significancia.

Este método de análisis no precisa de la existencia de un orden predeterminado de marcadores, aunque un mapa genético ayuda a la interpretación de los resultados. La localización exacta y el efecto real del QTL no pueden ser inferidos mediante el método de marcadores

individuales. Esto se debe a que el efecto aditivo del marcador (α) depende del efecto aditivo del QTL (a) afectado por la distancia o grado de ligamiento (r) entre el marcador y el QTL (Lander y Botstein, 1989), según la siguiente expresión:

$$\alpha=(1-2r)a$$

De esta manera, un marcador fuertemente ligado a un QTL de bajo efecto puede presentar el mismo nivel de significancia que un marcador debilmente ligado a un QTL de gran efecto.

Sin embargo la posición del QTL puede inferirse si existen varios marcadores, ya que el marcador más cercano al QTL será el de mayor valor de F o menor p .

Esta interpretación es válida siempre que no haya más de un QTL por cromosoma. El efecto combinado de QTLs ligados puede llevar a una localización inexacta de los mismos, infiriéndose la ocurrencia de un sólo QTL (Martínez y Curnow, 1992).

Máxima verosimilitud

La idea de máxima verosimilitud es relativamente simple, aunque sus detalles teóricos sean complejos (ver Cox y Hinley, 1974). La verosimilitud es una medida de el ajuste de los datos a una distribución o modelo estadístico establecido previamente, y puede ser expresado como una función de las variables del modelo. La estimadores de máxima verosimilitud son los valores de las variables que maximizan la función de verosimilitud y que por lo tanto presentan el mejor ajuste a los datos, el cual es alcanzado a través de un proceso iterativo.

La máxima verosimilitud puede ser utilizada para estimar tanto el efecto de un QTL como el grado de ligamiento entre el QTL y el marcador utilizado (Simpson, 1989). El modelo parte del supuesto que los valores del carácter fenotípico deben distribuirse normalmente dentro de cada clase genotípica, pudiendo las varianzas ser diferente entre grupos. Para cada clase genotípica la media del carácter fenotípico depende de los parámetros de aditividad, dominancia y del grado de recombinación entre el QTL y el marcador utilizado. Cuando la distancia entre el marcador y el QTL es cero, el modelo se asemeja al análisis de varianza anteriormente presentado.

Este método, presentado originalmente para un marcador individual (Weller, 1986) fué rápidamente adaptado al uso con dos marcadores flanqueantes.

Mapeo de intervalos

Lander y Botstein (1989) en un trabajo pionero, presentaron un método basado en máxima verosimilitud sobre un intervalo de un mapa de recombinación, flanqueado por marcadores. Como la distancia entre los marcadores es conocida, el modelo calcula para cada punto del intervalo, la verosimilitud de que un determinado QTL esté o no en ese punto, utilizando un modelo de regresión lineal. El logaritmo en base 10 del cociente entre estos valores constituye el valor de LOD. El punto de mayor LOD dentro de un determinado intervalo es evidencia de la existencia de un QTL, cuando este valor de LOD excede determinado nivel umbral que en general se fija en 2 (1% de probabilidad que la determinación de un QTL sea producto del azar). La localización se asume

dentro de un intervalo de confianza de un LOD de 1, alrededor del pico de máximo LOD.

Es posible graficar los valores de LOD en función de la posición en un mapa de recombinación conformando un mapa de verosimilitud (ver figura 15 en resultados). Se han diseñado programas de computación que resuelven y grafican los valores de máxima verosimilitud y de LOD, como Mapmaker/QTL 1.1 (Lincoln et al., 1992).

Marcadores para la calidad panadera

La calidad panadera es una caracter complejo que presenta una gran variabilidad ambiental, pero que sin embargo es susceptible de ser analizado particionándolo en componentes más simples.

Como se ha mencionado, el contenido proteico es un factor con alta influencia sobre la calidad panadera de una harina y el mismo presenta componentes genéticas y ambientales. Por otro lado, el tipo de proteínas de reserva, tanto las gluteninas de alto y bajo peso molecular como las gliadinas, han sido asociadas a efectos en la calidad panadera. A estos aspectos se le agregan a textura del endosperma (la distribución y tamaño de los gránulos de almidón en la matriz proteica), que influye en la eficiencia del proceso de molienda, y que está determinada genéticamente y la actividad endógena de α -amilasa, la cual tiene efectos negativos sobre la panificación (Blackman y Payne., 1987).

De este modo, la calidad o aptitud panadera de una harina es un carácter complejo de suma importancia que está determinado sobre el cual inciden aspectos genéticos localizados en diversas regiones del genoma y que presenta influencia ambiental en cuanto a la concentración

proteica. Esto determina que la calidad panadera constituye un modelo experimental ideal para el estudio de la utilización de marcadores moleculares para la identificación de QTLs.

La asociación de alelos de subunidades de gluteninas de alto peso molecular (Payne et al., 1981a; Payne et al., 1987) gluteninas de bajo peso molecular y gliadinas (Metakovsky et al., 1990) con parámetros de alta calidad panadera ha posibilitado su utilización en la selección de genotipos con el objeto de mejorar este carácter. La identificación de los alelos presentes en un determinado genotipo se realiza a nivel proteico comparando la migración relativa de las subunidades proteicas en geles de poliacrilamida. Si bien este método permite una rápida identificación alélica, presenta la desventaja de que debe realizarse una vez que los granos han sido cosechados en la planta a analizar. Mas aún, Anderson y Green (1989), encontraron subunidades de dos genotipos que diferían en su estructura, pero que fueron catalogadas como la misma en base a su migración en geles de poliacrilamida. Similarmente, algunos genes de gluteninas de alto peso molecular presentan discrepancias entre los pesos moleculares derivados de su secuencia nucleotídica y su migración es SDS-PAGE (Goldsbrough et al., 1989; Shewry et al., 1992) y las gluteninas de bajo peso molecular presentan superposición con las gliadinas en este tipo de sistemas.

Alternativamente, otros métodos han sido propuestos para la identificación de subunidades proteicas asociadas a calidad panadera y su posterior selección en programas de mejoramiento. Sutton y Bietz (1997) utilizaron electroforesis capilar para distinguir variantes alélicas de gluteninas de alto peso molecular. Andrews y Skerrit (1996)

propusieron el uso anticuerpos monoclonales anti-gluteninas de bajo peso molecular para diseñar un método a escala para programas de mejoramiento. Estas metodologías, si bien tecnológicamente innovativas, deben realizarse después de la cosecha de los granos.

Otra aproximación es el uso de los marcadores moleculares que detectan el estado del gen sin necesidad de que éste se exprese.

A partir de la secuenciación del gen 1D5x, que codifica para la subunidad de glutenina 5x del cromosoma homeólogo 1D, asociada a alta calidad panadera, D'Ovidio y Anderson (1994) diseñaron "primers" que mediante PCR amplifican específicamente un producto de peso esperado de 450 pb en aquellos genotipos que poseen la subunidad 5x y no en aquellos que poseen cualquiera de las variantes alélicas posibles (marcador dominante). La utilización de este marcador permite identificar genotipos de alta calidad panadera al estado de plántula y evita los problemas mencionados en la selección mediante SDS-PAGE.

Posteriormente, Devos et al., (1995) diseñaron primers flanqueantes a secuencias repetitivas encontradas en genes de proteínas reserva de trigo presentes en bases de datos genéticos. Los "primers" diseñados a partir de los genes de una γ -gliadina (Rafalski, 1986) y de una glutenina de bajo peso molecular (Pitts et al., 1988) mostraron una alta variabilidad en los productos obtenidos por PCR (marcadores codominantes). Este tipo de marcador molecular presenta la ventaja sobre el descrito por D'Ovidio y Anderson (1994) de permitir identificar las distintas variantes alélicas, así como individuos al estado homocigota. La existencia de información sobre la contribución de cada

variante a la calidad panadera posibilitará su uso para la identificación de genotipos de mayor aptitud panadera u otros fines industriales.

Objetivos de este estudio

El objetivo general de este trabajo consiste en la evaluación de los marcadores moleculares como herramientas que permiten diseccionar a un carácter complejo modelo (como la calidad panadera) en componentes más simples que permitan un mejor entendimiento de las bases genéticas del mismo y la selección de mejores genotipos en programas de mejoramiento.

En particular, este trabajo intenta identificar factores determinantes de la calidad panadera que no hayan sido descritos previamente, y la asociación de esos factores a un marcador molecular que facilite su selección en planes de mejoramiento.

En concordancia a lo enunciado anteriormente, se parte de la hipótesis de que la calidad panadera de un cultivar de trigo no sólo está explicada a través de su composición de gluteninas de alto peso molecular.

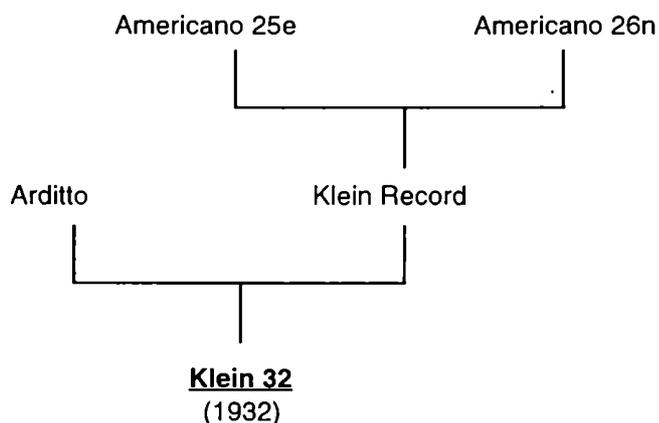
Klein 32 (K32), un trigo cultivado en Argentina durante los años 30 y 40 y Chinese Spring (CS) presentan la misma composición de gluteninas de alto peso molecular (analizadas en electroforesis en dos dimensiones, Feingold, 1993). Sin embargo, K32 posee una calidad panadera significativamente mayor que CS. Estos genotipos proporcionan un modelo en el cual sería factible identificar los factores proteicos que determinan la mayor calidad de K32, independientemente de las gluteninas de alto peso molecular.

Asimismo, la identificación de nuevos componentes responsables de la calidad panadera permitirá entender mejor las bases bioquímicas de este carácter e identificar variantes que se hayan perdido por deriva génica mediante el proceso de selección a lo largo de los años y puedan ser incorporadas en planes de mejoramiento modernos.

Materiales

Klein 32 es un cultivar de trigo argentino proveniente de un cruzamiento entre Klein Récord y Arditto (figura 3) del criadero Klein de comercialización y cultivo en la década del 30, que se ha destacado por su buena aptitud panadera.

Figura 3: Pedigree de K32



Chinese Spring (CS) es un genotipo de origen chino, que a partir del desarrollo de líneas aneuploides (Sears, 1954) es la línea modelo en estudios genéticos de trigo, siendo de pobre aptitud panadera (Vasil y Anderson, 1997).

Para este estudio se construyó una población F2:3 generada a partir del cruzamiento de Chinese Spring y Klein 32 con posterior autofecundación de la filial 1 (F1) y de cada una de las plantas de la filial 2 (F2) resultantes.

Cada familia F2:3 consiste en la progenie de la planta F2 , y que analizada en conjunto representa a la planta F2 madre.

Asimismo se utilizaron líneas ditelosómicas (dt) para los cromosomas homeólogos de los grupos 1 y 6. Estas líneas presentan doble dotación de un brazo cromosómico (por ejemplo 1BL) y ausencia del brazo opuesto (1BS) y se lo denomina dt1BL. Siendo el trigo hexaploide, con 3 cromosomas homeólogos por grupo se utilizaron un total de 6 líneas ditelosómicas para cada uno de los grupos 1 y 6 (una por cada brazo cromosómico).

Las líneas ditelosómicas de CS fueron facilitadas por el Ing. Agr. Enrique Y. Suárez del Instituto de Recursos Biológicos y fueron utilizadas en cruzamientos con K32 descriptos previamente (Feingold, 1993)

Los productos químicos utilizados en el trabajo de laboratorio fueron de calidad analítica o biología molecular producidos y/o comercializados por las compañías Sigma Chemical Co., Merck Biochemica, Mallinkrodt, Sintorgan, Fluka, Aldrich, Carlo Erba y Riedel van Haen.

El uracilo conjugado con digoxigenina (DIG-UTP), el anticuerpo (anti-digoxigenina), y el agente bloqueante utilizados en la detección no isotópica fueron producidos por Boehringer Mannheim (Alemania), y el sustrato quimioluminiscente de Tropix (EEUU).

Los isótopos radioactivos fueron adquiridos a NEN-DuPont (EEUU).

Las enzimas de restricción, la Taq polimerasa y la ARNasa fueron de Gibco-BRL (EEUU).

Métodos

Ensayo a campo

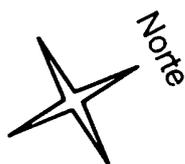
Ciento cincuenta familias F2:3 provenientes de un cruzamiento de CS y K32 fueron sembradas en un ensayo siguiendo un diseño completamente aleatorizado con dos repeticiones.

Un mínimo de 20 semillas F3 provenientes de cada planta F2 fueron sembradas en un surco de 1m de longitud con una distancia entre surcos de 50 cm. Cada 5 surcos de familias F2:3 se intercalaron los padres con el objeto de evaluar la variabilidad inherente al lote (figura 4). La siembra se realizó entre el 29 y el 30 de Julio de 1993. Durante el mes de Septiembre se realizó la cosecha de hojas para la obtención de ADN de cada una de las familias. En la misma se cuidó de representar por igual a cada una de las plantas F3 de cada familia. El tejido fue inmediatamente congelado utilizando nitrógeno líquido y liofilizado durante 72 horas. Adicionalmente, se tomó registro de la floración de cada una de las familias, ocurriendo la misma entre el 28 de Octubre para las más tempranas y el 22 de Noviembre las mas tardías. La cosecha de granos se realizó después de madurez fisiológica cuando el cultivo no presentaba vestigios de coloración verde. Los granos cosechados fueron almacenados en ambientes de temperatura y humedad controlados hasta su procesamiento.

Datos fenológicos

Se registró el período de siembra a espigazón y de cada parcela, tomándose como día de espigazón cuando aproximadamente el 50% de las plantas presentaban espigas visibles.

Figura 4: diseño del ensayo biológico.



CS	CS	CS	CS	CS	CS
4	181	16	76	104	171
6	182	112	67	218	13
18	187	26	125	105	212
24	190	17	129	226	242
29	192	118	152	160	185
K32	K32	K32	K32	K32	K32
41	195	171	83	52	240
44	199	137	100	177	16
45	202	249	162	57	193
49	207	62	141	139	116
52	210	126	157	187	247
CS	CS	CS	CS	CS	CS
56	214	124	133	161	118
57	218	46	154	70	87
67	226	64	144	181	140
68	227	13	158	44	46
70	230	74	119	192	93
K32	K32	K32	K32	K32	K32
72	235	77	117	45	122
73	236	80	78	123	213
76	239	12	174	239	43
78	241	201	235	6	17
83	244	221	210	199	137
CS	CS	CS	CS	CS	CS
85	193	205	241	230	150
90	122	247	244	156	110
100	115	128	236	168	111
104	189	138	176	224	201
105	179	108	56	64	26
K32	K32	K32	K32	K32	K32
107	217	110	167	211	69
117	156	170	136	54	62
119	220	114	175	221	115
123	111	97	153	112	124
125	211	116	145	12	84
CS	CS	CS	CS	CS	CS
129	212	109	135	74	220
133	10	185	107	217	92
135	165	98	214	205	189
136	54	178	227	131	77
139	87	243	190	138	81
K32	K32	K32	K32	K32	K32
141	168	242	49	179	109
142	91	240	68	149	91
143	84		72	128	165
144	213		195	80	108
145	324		29	170	243
CS	CS	CS	CS	CS	CS
152	92		68	97	249
153	149		142		
154	96		24		9
155	27		155	96	
157	48		18		
K32	K32	K32	K32	K32	K32
158	69		85		178
160	131		173	10	27
161	43		41	114	
162	9		90	148	
167	81		73		126
CS	CS	CS	CS	CS	CS
173	148		207	98	
174	150		202		
175	140		143	48	
176	132		182		
177	93		4	132	
K32	K32	K32	K32	K32	K32

Análogamente, el período a floración, fue tomado de siembra hasta el día en que el 50% de los estambres de las espigas visibles, estaban exertos.

Determinación del contenido de humedad

Se realizó en un número limitado de muestras (40) con el objeto de determinar la existencia de diferencias entre familias, ya que este parámetro puede influir en la determinación de caracteres de calidad. La determinación consistió en la diferencia entre peso húmedo y peso seco (después de someterse a secado en estufa a 105 °C) de una muestra de 10g.

Determinación de la concentración de proteínas

La determinación del contenido proteico de las muestras fue realizado mediante el método de radiación infrarroja cercana (NIR). Las lecturas fueron estandarizadas tomando como referencia 10 muestras con contenidos proteicos contrastantes, determinados por el método de digestión ácida de Kjeldahl.

Determinación de la Calidad Panadera

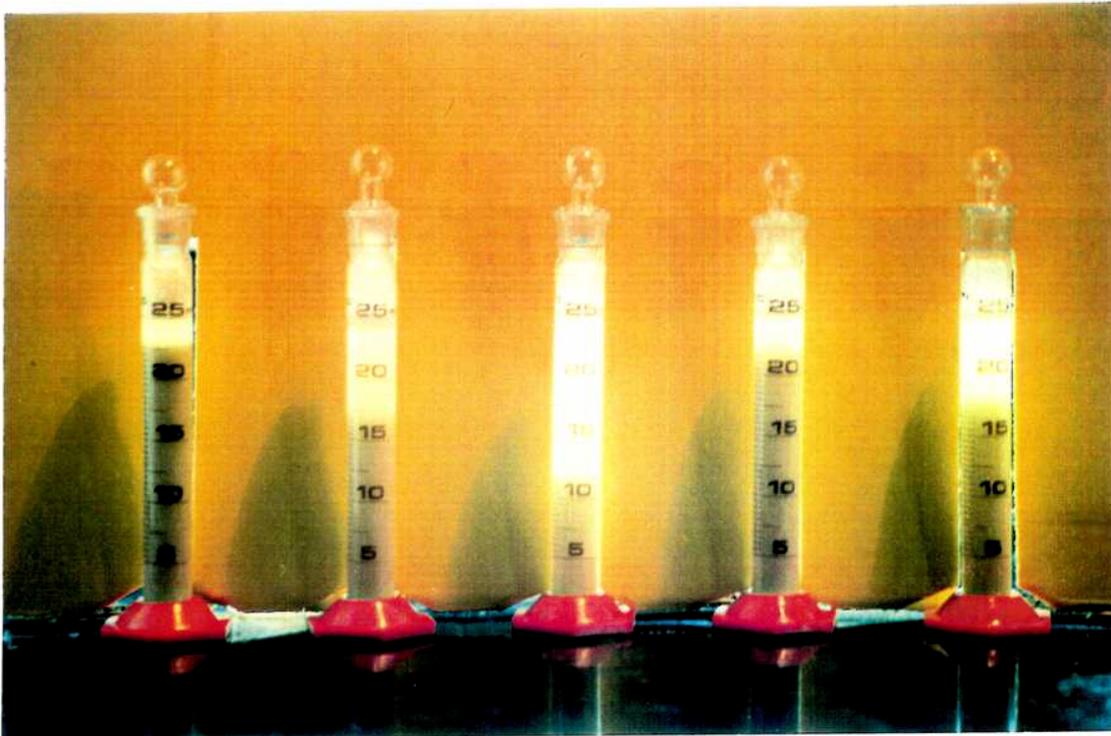
Prueba de sedimentación en dodecil sulfato de sodio (SDSS)

La calidad panadera fue evaluada utilizando una modificación de la prueba de sedimentación en dodecil sulfato de sodio (SDSS), según Axford et al. (1978) (Peña et al., 1990). Para la misma, muestras de granos de cada una de las variedades fueron molidas en un molinillo ciclónico tipo Udy (Tecator Ciclotec, Suecia), y pasada por un tamiz de 0,2 mm.

Brevemente, el método consiste en la suspensión de 1 g de harina integral en 6 ml de dH_2O mediante el agitado por 5 segundos en un vórtex, repitiéndose esta operación a los 2 minutos 40 segundos y a los 4 minutos 40 segundos de la primera agitación. A los 4 minutos 45 segundos se agregan 19 ml de una solución SDS-láctico (0,2% ácido láctico; 2% SDS). Inmediatamente se incuba 1 minuto en un agitador oscilante (tipo Zeleny) y al finalizar el mismo se deja reposar 20 minutos a temperatura ambiente (20- 23 °C) y se registra la lectura del volumen sedimentado en ml (Figura 5).

Estas determinaciones se realizaron por duplicado en cada una de las repeticiones de campo, repitiéndose la determinación cuando la diferencia de los valores para cada muestra era mayor que el 10%.

Figura 5: Estimación de la calidad panadera mediante la prueba de sedimentación en SDS.



Prueba de sedimentación en ácido acético

Esta determinación fue realizada en el Laboratorio de Calidad de Trigo y Soja de la Estación Experimental de Marcos Juárez, del INTA, siguiendo el método propuesto por Pumpiasky del Instituto Vavilov de Rusia. La misma consiste en el agregado de 10 ml de solución de ácido acético (2%) a 0,5 g de harina en una probeta de 10 ml, seguido de una agitación manual vigorosa durante 5 a 8 segundos para asegurar una correcta suspensión. Posteriormente, se somete a la mezcla a una agitación mecánica utilizando un agitador tipo Zeleny, durante 22 a 25 segundos, de tal manera que el tiempo total de agitación sea de 30 segundos. Luego de 5 minutos de reposo se toma la lectura del sedimento en ml y se multiplica este valor por 10.

Mixogramas

Esta determinación de calidad fue realizada utilizando el mixógrafo de Swanson (Swanson y Working, 1933) siguiendo la metodología aprobada por la AACC (1983) y evaluada por Tombetta y Cuniberti (1994) en el INTA Marcos Juárez.

El mixógrafo mide y grafica en forma automática el desarrollo y la resistencia de la masa a la acción mecánica en función del tiempo. La amasadora posee un conjunto de vástagos fijos y otros móviles que giran accionados por un motor. La resistencia al amasado produce un par sobre el recipiente que posee los vástagos fijos que se transmite a un brazo oscilante conectado a una aguja graficadora que imprime su registro sobre una cinta de

papel que se mueve accionada por un mecanismo de relojería (figura 7, en resultados).

En los mixogramas pueden identificarse tres áreas definidas a) un período inicial de resistencias crecientes (desarrollo de la masa) b) un período de resistencia máxima al amasado (desarrollo pleno) y c) un período de resistencia decreciente al amasado (ruptura de la masa) (figura 7).

La forma de la curva refleja la calidad panadera. Parámetros asociados positivamente son: el tiempo de desarrollo (el tiempo en minutos hasta alcanzar la máxima altura de la curva), también llamado punto de movilidad mínima; lenta ruptura de la masa (baja pendiente de caída); el ángulo entre las porciones ascendentes y descendentes de la curva en la proximidad del máximo y el área total debajo de la curva (figura 7).

En base a los parámetros mencionados, personal entrenado deriva los valores de clase mixográfica. Este es un índice creciente que generalmente varía entre 2 y 7. A mayor índice, mejor calidad. Las clases 2 y 3 son típicas de curvas con tiempo de desarrollo menores a 2 min., pendientes iniciales altas, desarrollo pleno corto (baja estabilidad) y rápida ruptura de la masa. Las clases 6 y 7 por el contrario corresponden a curvas con lento tiempo de desarrollo (mayores a 3 min. 30"), alta estabilidad y lenta ruptura de masa. Consecuentemente, clases intermedias presentan valores intermedios.

Las clases 2 y 3 corresponden a trigos blandos, no panificables. La clase 4 a trigos semiduros y las clases 5 y 6 a trigos duros,

panificables. La clase 7 o mayor corresponden a trigos de alta tenacidad llamados correctores.

Se determinaron los siguientes parámetros:

- 1.- tiempo de desarrollo
- 2.- clase de desarrollo
- 3.- integral de la curva (área debajo de la curva)

El tiempo de desarrollo se tomó como el tiempo en minutos hasta la altura máxima de la curva. La clase mixográfica fue determinada a partir de las curvas, por la Ing. M. Cuniberti del laboratorio de calidad de Trigo y Soja de la EEA Marcos Juárez del INTA. La integral de la curva mixográfica fue estimada como el área en cm^2 debajo de una curva de ajuste promedio dibujada sobre el mixograma.

Extracción de ADN

La extracción de ADN fué realizada utilizando un método derivado de Saghai-Marooft et al. (1984) (Hoisington et al., 1994).

El ADN fué extraído de hojas sanas, cosechadas en el período de macollaje, e inmediatamente puestas en frío en una conservadora con hielo. Posteriormente, el tejido se roció con nitrógeno líquido para lograr un descenso inmediato a bajas temperaturas que imidieran la degradación enzimática del ADN.

El tejido congelado fue sometido a secado en vacío en un liofilizador LABCONCO (EEUU), durante 72 horas.

En un tubo de polipropileno de 15ml se pesaron de 300 a 400 mg del tejido liofilizado molido en un molinillo ciclónico tipo Udy (Tecator Cyclotec, Suecia) al cual se agregaron 9 ml de solución de extracción CTAB (100mM Tris-HCl, pH7,5; 10mM EDTA, pH8; 700mM NaCl; 140mM 2-mecaptoetanol; 1% p/v bromuro de cetiltrimetil amonio) a 65°C. Se homogenizó la muestra mediante inversiones suaves. A continuación se incubó durante 60 - 90 minutos a 65°C con movimiento continuo. Se agregaron posteriormente 4,5 ml de cloroformo:octanol (24:1) seguido de varias inversiones suaves de los tubos (1 a 2 minutos). La separación de la fase acuosa fue realizada después de centrifugar los tubos por 10 minutos en una centrífuga de mesa a 1300 xg y se la transvasó a nuevos tubos. Se repitió la extracción con cloroformo:octanol una segunda vez. El ARN de la muestra fue eliminado con el agregado de 50 µl de ARNasa (10 mg/ml) e incubado 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN fue precipitado con el agregado de 6 ml de isopropanol (2-propanol) a temperatura ambiente y el ADN rescatado con un capilar de vidrio en forma de gancho. El ADN así obtenido fue resuspendido en 1 ml de TE 1X (10mM Tris-HCl, pH8; 1mM EDTA, pH8) Adicionalmente, el ADN fue reprecipitado agregando 50 µl de NaCl 5M y 2,5 ml de etanol frío. Nuevamente se rescató el ADN precipitado utilizando un capilar de vidrio y después de lavarlo con etanol 70% fue resuspendido en 1 ml de TE 1X.

Determinación de la concentración de ADN.

La concentración de ADN fue calculada utilizando un espectrofotómetro, a partir de la absorbancia a 260nm (OD₂₆₀) de

diluciones 1:20 (en agua o TE 1X) de las muestras y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \times \text{Factor de dilución} \times 50\mu\text{g/ml} \times 10^{-3}$$

Adicionalmente se calculó la relación $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ y se consideró al ADN suficientemente puro cuando este valor se ubicó entre 1,8 y 2.

La concentración de ADN se ajustó a $0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ con el agregado de TE 1X.

Las muestras de ADN así obtenidas fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior utilización.

Análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP)

Sondas

Se utilizaron en este estudio sondas de trigo genómicas (WGs), pertenecientes a genes de proteínas de reserva (tabla 2), de cADN de cebada (BCDs), de avena (CDOs) y genómicas de *T. taushii* (KSU, CSIH). Estas sondas fueron escogidas por presentar homología con regiones localizadas en los cromosomas homeólogos del grupo 1 y 6.

Corte de ADN con enzimas de restricción

Se realizaron digestiones con las siguientes enzimas de restricción:

EcoRI, EcoRV, HindIII, BamHI, DraI y XbaI.

Se utilizaron 2,5 unidades de enzima por microgramo de ADN en el buffer correspondiente a cada enzima (1X concentración final) con el agregado de espermidina (100 mM concentración final). Se incubó a 37°C desde 4

hs a 16 hs. La reacción se detuvo con el agregado de NaCl para lograr una concentración final de 250mM. Posteriormente, se precipitó el ADN digerido con 2,5 volúmenes de etanol en frío (30 min. a -80°C ó 12-16hs a -20°C).

Tabla 2: Sondas utilizadas, su localización cromosómica, polimorfismo y referencia.

	sonda	localización	locus	polimorfismo	mapeado?	referencia
BCD	22	1L		monomórfico		Heun et al., 1991;
	98	1S		HindIII/BamHI	si	Anderson et al, 1992 y
	115	1L		monomórfico		Kleinhofs et al. 1993
	200	1L		monomórfico		"
	249	1		monomórfico		"
	371	1S		monomórfico		"
	442	1L		monomórfico		"
	592	1L		monomórfico		"
	921	1L		monomórfico		"
	1434	1S		DraI	no	"
CDO	534	1S		monomórfico		Heun et al., 1991
	572	1L		EcoRV	no	Anderson et al, 1992
	836	1L		monomórfico		"
	1173	1S		monomórfico		"
IPSR	8	6S	<i>Gli2</i>	EcoRI/XbaI	si	Gale et al., 1995
	10	6S		DraI	no	"
	161	1S		monomórfico		"
	162	1L		monomórfico		"
KSU	D003			monomórfico		Gill et al., 1991
	D0014			EcoRI	si	"
	E18	1S		HindIII	si	"
	G9			monomórfico		"
WG	180	1L		monomórfico		Heun et al., 1991 y
	241	1H		monomórfico		Anderson et al., 1992
	920			DraI	no	"
	983	1L		HindIII	si	"
otras	pcP387		<i>Gli1</i>	XbaI	si	Forde et al., 1985
	pTu1	6S	<i>Gli2</i>	DraI	si	D'Ovidio et al., 1992
	pDY10A/KS-	1L	<i>Glu1</i>	XbaI	si	Anderson et al., 1989
	pTdUCD1	1S	<i>Glu3</i>	XbaI	si	Cassidy y Dvorak, 1991
	pNVR20	1S	<i>Lec</i>	DraI	no	Reikhel y Wilkins, 1987
	CSIH69			monomórfico		Lagudah, et al. 1991

El ADN precipitado fue secado y resuspendido en 1X TE a una concentración final de 0,75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para facilitar la carga en geles de agarosa.

Separación de fragmentos de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN digeridos fueron separados de acuerdo a su peso molecular sometiéndose las muestras a electroforesis en geles de agarosa de 0,7%. Estos geles de 20 x 25 cm con 2 ó 4 peines de 30 calles cada uno fueron cargados con 12 μg de ADN digerido por calle (16 μl) a los que se les agregó 4 μl de buffer de corrida (50mM Tris-HCl, pH8; 5mM EDTA, pH8; 0,5% SDS; 50% glicerol; 0,0015% azul de bromo fenol; 0,0015% xilene cianol) y se los corrió a una corriente constante de 15 mA en buffer de corrida TAE 1x (40mM Tris-acético, pH8; 5mM NaOAc; 0,77 mM Na₄EDTA) hasta antes que el azul de bromofenol llegara al nivel de las celdas de siembra siguientes.

Una vez finalizada la corrida los geles se tiñeron en bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en agitación por 20 min. con posterior desteñido en agua de igual manera, se visualizó en un transiluminador de UV (300 nm de longitud de onda) para confirmar la digestión y se fotografió con filtros UV.

Transferencia de fragmentos de ADN a membranas de nylon (Southern Blotting)

El ADN de los geles fue desnaturalizado en 1l de solución de desnaturalización (0,4N NaOH, 0,6M NaCl) durante 30 min. con agitación,

seguido de una neutralización en solución de neutralización (0,5M Tris-HCl pH 7,5, 1,5M NaCl) durante 30 min. con agitación.

La transferencia se realizó en una bandeja plástica con 2l de buffer de transferencia (25mM NaPO₄, pH 6,5) en la cual se sumergió una esponja sobre la que se construyó el aparato de transferencia capilar. El mismo consistió en depositar sobre la esponja una hoja de papel secante grueso de 20 x 25 cm sobre la cual se depositó el gel boca abajo, seguido de una membrana no cargada de nylon (MSI Magnagraph, EEUU) junto con varias hojas de papel secante grueso (Sigma, catálogo: P4556), finalizando con una cantidad de toallas de papel secas (Valot, Argentina) formando un espesor de 10 a 15 cm. Cada una de las hojas de papel secante y la membrana de nylon fueron previamente remojadas en buffer de transferencia y se las ubicó cuidando que no quedaran burbujas de aire atrapadas entre el gel y el papel, que interrumpirían la capilaridad del sistema. Un peso de 1kg dispuesto sobre una placa de acrílico para lograr una buena distribución, fue puesto en el tope de la pila de toallas. Se dejó proseguir la transferencia durante la noche (14-16hs).

Una vez finalizada la misma, se retiró la membrana y se la sometió a un lavado en 2X SSC (300mM NaCl; 30mM citrato de sodio; pH 7,4) durante 15 min. El ADN fue fijado mediante radiación UV utilizando un UV crosslinker (Stratagene, EEUU) a 120,000 μ joules/cm² y posterior horneado a 90°C, durante 2 horas.

Marcado de sondas

Las sondas fueron marcadas no radiactivamente mediante la incorporación por PCR de uracilos covalentemente ligados a digoxigenina

(Digoxigenin-11dUTP; Boehringer Mannheim, Alemania) en una proporción de 5% con respecto a dTTPs incorporados.

La PCR se realizó a partir de lisados de bacterias conteniendo los plásmidos transformados. De un cultivo de bacterias se picó una colonia con un palillo estéril y se la resuspendió en 50ul de TTE (1% Triton X-100; 20mM Tris-HCl pH 8,5; 2mM EDTA) en un microtubo de 0,5ml. Se incubó el tubo a 95°C durante 10 min. y previa centrifugación se tomaron 2,5 µl del sobrenadante que se utilizaron como templado en una reacción de 100µl como se detalla a continuación:

	[final]	reacción de 100µl (µl)
10X PCR Buffer	1X	10
25mM MgCl ₂	2mM	8
10mM dNTPs (- dTTPs)	50µM	0,5
10mM dTTPs	47,5µM	0,475
1mM Dig-dUTP	2,5µM	0,25
2µM primer cv72	0,2µM	10
2µM primer cv76	0,2µM	10
5u/µl Taq Polimerasa	2u	0,4
ddH ₂ O	-	57,875
Templado	?	2,5

Las reacciones de PCR fueron realizadas a una temperatura de apareamiento de 55°C, y se utilizó el siguiente programa:

paso 1: 1 min. a 94°C

paso 2: 1 min. a 94°C

paso 3: 2 min. a 55°C

paso 4: 2 min. a 72°C

paso 5: repite pasos 2 a 4, 25 veces

paso 6: 4 min. a 72°C

Secuencias de los primers utilizados

Los primers utilizados corresponden a secuencias universales de los vectores derivados del tipo pUC y M13 que flanquean el sitio de inserción.

CV72: 5'-ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG T-3'

CV76: 5'-AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC C-3'

Los productos de PCR (5µl por reacción) fueron posteriormente sometidos a electroforesis en un minigel de agarosa al 1% con el objeto de determinar el éxito de la amplificación y la coincidencia entre los tamaños esperados y observados de los amplicones. La cuantificación del producto fue determinada visualmente en el gel por comparación con muestras o estándares de concentración conocida o utilizando un fluorómetro TKO 100 (Hoëffer, EEUU) previamente calibrado. Las sondas así marcadas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Hibridación de ADN (Southern)

La hibridación se llevó a cabo en un horno de hibridación rotativo tipo Hybaid (Reino Unido). Se utilizaron tubos Falcon (EEUU) de 50ml para membranas pequeñas (7x7 cm) y botellas siliconadas (Robbins Scientific, EEUU) de 30 cm de largo para la evaluación de la población (membranas de 20 x 25cm).

Las membranas fueron prehibridadas por 1 a 3 hs a 65°C en solución de hibridación (5X SSC; 0,01% laurilsarcosina; 0,02% SDS; 0,2% reactivo de bloqueo; Boehringer Mannheim, Alemania) en un volumen de 3 ml cada 100 cm² de membrana. Las membranas fueron enrolladas dentro de los tubos cuidando que no quedaran atrapadas burbujas de aire, para lo cual se humedeció la membrana en solución de hibridación previamente a su introducción en los tubos.

La sonda fue desnaturalizada en un baño de agua hirviendo durante 10 min. y puesta en hielo inmediatamente después, para evitar la renaturalización de las cadenas complementarias.

La hibridación se llevo a cabo durante 15 a 18 hs con 50-100ng de sonda por ml de solución de hibridación.

El principio de detección no radiactiva se basa en el marcado de la sonda con un antígeno (Digoxigenina, DIG, patente Boehringer Mannheim) que luego es detectado por un anticuerpo (Anti-DIG) que está unido covalentemente a un molécula de fosfatasa alcalina (AP) que al desfosforilar un sustrato fotolítico (AMPPD o CSPD; Tropix, EEUU) emite luz a 470nm.

El siguiente cuadro resume los pasos realizados en la hibridación y posterior detección de la sonda.

pasos	tiempo	temperatura	objetivo
hibridación	15-18 hs	65°C	pegado de sonda
lavado en 0,15 X SSC, 0,1% SDS	2 x 5 min.	temperatura ambiente	eliminación del excedente de sonda
lavado en 0,15 X SSC, 0,1% SDS	3 x 15 min.	65°C	eliminación de sonda pegada inespecíficamente
Enjuague en Buffer1 (10mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl)	1 x 5 min.	temperatura ambiente	lavar SDS
Incubación en Buffer 2 (idem Buffer 1 + 0,1% de reactivo de bloqueo)	1 x 30 min.	temperatura ambiente	evitar pegado inespecífico de anticuerpo
Incubación en Anti-DIG (idem buffer 2 + 1:15000 anti-dig)	1 X 30 min.	temperatura ambiente	pegar anticuerpo
Lavado en Buffer 1	3 x 10 min.	temperatura ambiente	lavar exceso de anticuerpo
Lavado en Buffer 3 (10mM Tris-HCl pH 9,5; 100mM NaCl; 50mM MgCl ₂)	1x 5 min.	temperatura ambiente	equilibrar la membrana a pH adecuado para la acción de la AP
Incubación en sustrato quimioluminiscente (idem buffer 3 + 15ul/ml de AMPPD)	1 x 20 min.	temperatura ambiente	

Exposición y revelado de los resultados

La exposición se realizó con películas autorradiográficas durante 15-18 hs (durante la noche) a temperatura ambiente. Ocasionalmente, se incubó previamente a 37°C por 1 -2 hs para incrementar la actividad inicial de la enzima.

Los films se revelaron y fijaron utilizando reactivos KodaK GBX (EEUU).

Tabla 3: Microsatélites utilizados, su localización cromosómica, temperatura de alineamiento, polimorfismo presentado entre K32 y CS y su fuente de obtención.

microsatélite	localización	temperatura de alineamiento	polimorfismo	referencia	comentarios
Cnl5	1A _L	60	polimórfico	1	
psp3003	1A _L	63	polimórfico	2	
psp2999	1AS	55	monomórfico	3	(<i>Glu-A3</i> locus)
psp3151	1AS	61	polimórfico	1	
psp3100	1BL	61	polimórfico	1	
psp3000	1BS	55	polimórfico	2, 3	(<i>Gli-B1</i> locus)
psp3004	1D	61	monomórfico	3	
psp3071	6A	61	polimórfico	3	
psp3152	6A	61	polimórfico	3	
psp3029	6A *	58	No amplifico en K32	2, 3	
psp3070	6AS	61	polimórfico	3	
psp3009	6B	63	monomórfico	3	
psp3131	6B	61	monomórfico	3	
psp3139	6BS	63	polimórfico	3	
psp3058	6D	61	monomórfico	3	
psp3200	6DS	61	polimórfico	3	

- Referencias 1: Sorrells, 1996
2: Stephenson et al., 1998
3: Devos et al., 1995
*: banda secundaria

Microsatélites o SSRs

ADN genómico de K32 y CS fue amplificado con “primers” correspondientes a 16 microsatélites de los cromosomas homeólogos de los grupos 1 y 6 (tabla 3).

Los “primers” fueron sintetizados a partir de secuencias publicadas (Devos et al., 1996; Sorrells, 1996) o gentilmente provistos por el Instituto John Innes de Inglaterra (Stephenson et al., 1997). La secuencia de éstos últimos es confidencial, pero los mismos están disponibles bajo pedido para fines de investigación (Pauline Stephenson, comunicación personal)

En algunas oportunidades se determinó la localización cromosómica mediante el uso de líneas ditelosómicas de CS (figura 13, en resultados). Los microsatélites que presentaron polimorfismo entre los padres fueron utilizados luego para determinar el genotipo de los individuos F2 de la población segregante mediante el análisis a partir de ADN de su progenie F3.

Amplificación de ADN por PCR

Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó a partir de ADN genómico extraído como se mencionó anteriormente. La reacción de PCR fue realizada bajo las condiciones que se muestran en el cuadro adjunto:

	concentración final	reacción de 25ul
50mM MgCl ₂	1,5mM	0,75μl
10X PCR buffer	1X	2,5μl
10mM dNTPs	0,2mM	0,5μl
10μM primer izquierdo	0,2μM	0,5μl
10μM primer derecho	0,2μM	0,5μl
5u/μl Taq polimerasa	1u/reacción	0,2μl
ddH ₂ O		15,05μl
10ng/μl templado ..	50ng	5μl

Se utilizó el siguiente programa en el ciclador térmico (MJ Research, EEUU).

1 desnaturalización inicial	90°C	3 min.
2 desnaturalización	90°C	20 seg.
3 apareamiento*	55-63°C	1 min.
4 extensión	72°C	1 min.
5 extensión final	72°C	5 min.

los pasos 2 a 4 fueron repetidos por 35 ciclos.

* dependiendo de los primers utilizados (tabla 3)

Separación en geles de poliacrilamida

Luego de comprobarse la amplificación de un fragmento de ADN de tamaño esperado mediante corrida electroforética en geles de agarosa

se procedió a la separación en geles de poliacrilamida al 4% de mayor resolución.

Se utilizaron vidrios de 30 x 40 cm previamente tratados de tal manera que en uno de ellos se adhiriera el gel, mientras que el otro lo repeliera. Esto se logró utilizando un producto hidrofílico (bind silane, Sigma; 3 μ l en 1ml de ácido acético) y otro hidrofóbico (Sigmacote, Sigma SL-2 o Rain-X, EEUU).

Los vidrios fueron ensamblados utilizando espaciadores de 4mm de espesor, y posteriormente se introdujo entre ellos 50 ml de solución de poliacrilamida al 4% (7M urea; 1X TBE; 4% acrilamida:bisacrilamida, 19:1; 0,1% v/v TEMED; 0,1% persulfato de amonio). Se dejó polimerizar al menos una hora.

Los geles fueron pre-corridos en 1X TBE durante una hora a 60W o hasta que alcanzaron una temperatura de 50°C. Durante ese período las muestras se prepararon mediante agregado de 2 μ l de buffer de corrida (10mM NaOH; 95% formamida; 0,05% azul de bromofenol; 0,05% Cyan de xileno) a 4 μ l de reacción de PCR. Las muestras fueron calentadas a 90°C durante 2 min. e inmediatamente puestas en hielo, para evitar la renaturalización de los fragmentos de ADN.

Las muestras se sembraron en el gel (6 μ l/muestra) y se corrió a 60W durante 1,5 horas o hasta que el azul de bromofenol salió por la parte inferior del gel.

Revelado de los geles por tñido no radioactivo en nitrato plata

El ADN amplificado fue tñido con plata utilizando reactivos de Promega (EEUU, catálogo nº Q4132). El método consiste en la reducción en medio

alcalino de los iones Ag^{++} que se depositan sobre el ADN, en presencia de formaldehído.

Después de finalizada la corrida electroforética, los geles fueron fijados en ácido acético al 10% durante 20 min. para prevenir la difusión de los fragmentos de ADN. Posteriormente, se removió el exceso de urea y buffer Tris Borato mediante 3 lavados con dH_2O de 2 min. cada uno. El gel se incubó en solución de tinción (1g/l de $AgNO_3$; 0,15% v/v formaldehído 37%) durante 30 min. El exceso de plata fue removido mediante un breve enjuague en dH_2O (10 segundos) y posteriormente se reveló por precipitado de la plata en solución de revelado (30g/l $NaCO_3$; 0,15% v/v formaldehído 37%; 2mg/l $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) a baja temperatura inicial (10°C) ya que la velocidad de la reacción es dependiente de la temperatura. La reacción de tinción fué detenida por el agregado de 1 volumen de ácido acético 10%. Finalmente, después de enjuagar con dH_2O , el gel se secó al aire durante la noche. Los resultados fueron evaluados directamente en el gel o después de hacer una copia positiva en papel fotográfico compatible con procesadores automáticos (APC film, Promega Biotech, EEUU).

La metodología detallada fue ensayada primeramente en los genotipos parentales y las líneas ditelosómicas de CS para los cromosomas homeólogos de los grupos 1 y 6 según correspondiera en base a informaciones previas, tal como se hizo con las sondas de RFLPs. Primeramente se determinó la existencia de polimorfismos y la localización genética correspondiente de los alelos variables. Una vez corroborada la existencia de polimorfismos en las regiones de interés, se procedió al análisis de la población segregante.

Análisis estadístico de los datos

La diferencia entre medias de clases de valores fenotípicos (%humedad, %proteína, SDSS) fue realizada mediante ANOVA y diferencia significativa mínima, o alternativamente mediante la prueba de t para varianzas desiguales cuando la dispersión de los datos así lo requirieron. La relación entre variables fue realizada mediante regresión de la variable dependiente sobre la independiente o mediante correlación entre variables cuando no había relación de dependencia entre ellas. Los datos de calidad de las familias F2:3, estimados por la prueba de sedimentación en SDS (SDSS) fueron transformados en datos corregidos sustrayendo su valor del promedio de los genotipos parentales más cercanos geográficamente en el ensayo a campo (figura 4) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{SDSS corregido} = \text{SDSS (F2:3)} - \frac{[\text{SDSS (K32)} + \text{SDSS (CS)}]}{2}$$

Test de normalidad para los datos fenotípicos

El ajuste de los datos a una distribución normal se evaluó mediante la prueba del coeficiente de correlación del gráfico de probabilidad (Fillben, 1975).

Esta prueba se realiza ordenando los datos de manera creciente según su valor y asignando un valor "X" a cada uno de ellos de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$X = (i - 0,5) / n$$

donde i es el número de orden y n el número total de individuos evaluados.

Posteriormente se grafican los datos fenotípicos originales para cada individuo en función de la inversa de la distribución normal acumulada de X . El coeficiente de regresión entre las variables es comparado luego con los valores de tabla de la prueba de Schapiro-Wilk para normalidad. Cuanto mejor sea el ajuste de estas variables a una función lineal mejor será el ajuste de los datos a una distribución normal.

Análisis de covarianza

Cuando la regresión entre variables presentó valores significativos, el efecto de la variable independiente se removió mediante el uso de la misma como covariable. Para esto se sustituyeron los valores de la variable dependiente por los valores residuales en función al modelo establecido entre ambas covariables. Este fue el caso de la calidad estimada por SDSS y el contenido proteico, y estas dos con el período a floración.

Evaluación de los datos genotípicos

Los datos genotípicos de los individuos segregantes fueron registrados como homocigotas tipo CS (B), tipo K32 (A) o heterocigotas (H) cuando los marcadores presentaron codominancia. Alternativamente, para los marcadores dominantes, los individuos fueron registrados como A o C cuando la presencia del marcador estaba asociada al alelo de CS, y como B o D cuando lo estaba con el alelo de K32.

La segregación mendeliana de los datos genotípicos (1:2:1 ó 3:1 para marcadores codominantes y dominantes, respectivamente) fue analizada mediante la prueba de χ -cuadrado.

Ordenamiento de los marcadores en un mapa

El ordenamiento de los marcadores en un mapa fue realizado en base a su segregación utilizando el programa MAPMAKER 3.0 (Lander et al., 1987). Los marcadores fueron inicialmente agrupados en base al análisis de ligamiento de dos puntos. Se consideraron dos marcadores ligados cuando el valor de verosimilitud (LOD) fue mayor o igual a 3.00 y la distancia de ligamiento menor a 50 cM.

Una vez reunidos los marcadores en grupos de ligamiento, se determinó el orden más probable entre ellos en base a análisis de tres puntos (comando "order") y multipunto a continuación (comando "ripple"). Los valores de recombinación fueron convertidos a distancias en cM utilizando la función de Haldane (Haldane, 1919, citado por Lander et al., 1987).

Asociación entre caracteres fenotípicos y marcadores

Análisis de varianza (ANOVA)

Para este análisis se agruparon los datos fenotípicos de las familias F2:3 según clases genotípicas para cada marcador. (A/B/H; para marcadores codominantes y A/C ó B/D para marcadores dominantes). Los valores medios de los grupos así formados fueron analizados mediante ANOVA. Se consideró como asociado a los marcadores que generaran

grupos genotípicos de medias fenotípicas significativamente diferentes al 5%.

La proporción de la varianza poblacional explicada por cada marcador con asociación significativa fue estimada mediante el valor de r^2 (suma de cuadrados entre grupos/suma de cuadrados total) proveniente de los datos del ANOVA.

El efecto de interacción entre marcadores no ligados genéticamente, sobre un carácter fenotípico, fue realizado mediante ANOVA para dos factores.

Los análisis de varianza para uno y dos factores fueron realizados mediante el uso de los programas Excel (Windows'95) y SAS (Massachusetts Institute of Technology).

Aditividad y dominancia

Los efectos de aditividad y dominancia se calcularon para cada marcador asociado a los caracteres de calidad según las siguientes fórmulas (Mather y Jinks, 1977)

$$\text{aditividad (a)} = AA - (AA+BB)/2$$

$$\text{dominancia (d)} = AB - (AA+BB)/2$$

siendo AA: la media de los individuos homocigotas tipo K32

BB: la media de los individuos homocigotas tipo CS

AB: la media de los individuos heterocigotas

el cociente d/a resultante varía entre 0 y 1; denotando 0 aditividad total y 1 dominancia total. Valores intermedios denotan dominancia parcial o incompleta. Los valores de las medias se tomaron en valor absoluto.

Mapeo de intervalo

Se determinó la localización de QTLs en regiones donde se encontraron efectos significativos entre parámetros de calidad y marcadores que determinaran un intervalo.

Se utilizó el programa MAPMAKER/QTL 1.1 (Lincoln et al., 1992b) que calcula el ajuste de los datos a un modelo de regresión lineal entre el carácter fenotípico y cada uno de los puntos del intervalo a distancias de 1cM entre sí (comando "scan") utilizando el método de máxima verosimilitud. El programa calcula la proporción de varianza fenotípica explicada por el QTL mediante la disminución del valor de la varianza cuando se considera al putativo QTL controlando parte del carácter fenotípico. Este número es equivalente al valor del coeficiente de correlación r^2 de una regresión lineal.

Resultados

Datos fenotípicos

Fenología

Tanto Chinese Spring como Klein 32 presentaron un período a floración de 96 días a través de 28 y 31 repeticiones respectivamente.

Sin embargo, las familias $F_{2:3}$ presentaron un rango de días a floración entre 83 días para las familias más precoces y 111 días para las más tardías. los datos no ajustaron a una distribución normal y presentaron un gran número de familias con período a floración similar al de los genotipos parentales (figura 6a).

En la mayoría de los casos las repeticiones a campo presentaron valores similares. Sin embargo, 16 familias (11%) evidenciaron diferencias marcadas entre repeticiones (> a 10 días). Estas diferencias no son esperables ya que el tiempo a floración depende de la acumulación de temperaturas sobre un valor base (suma térmica) y del fotoperíodo. Esto puede responder a que los individuos presentan segregación dentro de las familias $F_{2:3}$ y como la evaluación de floración se hizo en base a un promedio de al menos 20 individuos, la diferente proporción de individuos precoces y tardíos en distintas repeticiones de una familia $F_{2:3}$ que presente segregación podría haber determinado distintos períodos a floración entre las mismas.

Humedad

El contenido de humedad promedio presentado por 25 muestras tomadas al azar fue de 12,4 (+/- 0,04), variando entre 12,0 y 12,8% no

existiendo diferencias significativas entre los valores individuales de acuerdo con el valor de diferencia significativa mínima de 2,05 (DSM 25; 0,05).

Contenido Proteico

Las 36 parcelas de cada uno de los genotipos parentales fueron analizadas en su contenido proteico. Chinese Spring (CS) presentó un contenido proteico promedio de 12,9% mientras que el de Klein 32 (K32) fue de 12,2%. Estos valores medios correspondieron a rangos de variación de 11,5 a 14,5 para CS y de 11,6 a 12,8 para K32.

Se determinó que ambas medias mostraron diferencias significativas, mediante la prueba de t de Student para variancias desiguales, ya que este parámetro fue de 0,35 para CS y de 0,09 para K32.

El contenido proteico de las familias F_{2:3} varió entre un 11,7% y 14,5%, presentando una media general de 12,7% (figura 6b).

Los datos poblacionales presentaron una distribución normal para este carácter con una probabilidad del 95% (figura 6b).

Calidad panadera

La calidad panadera fue estimada mediante los siguientes métodos:

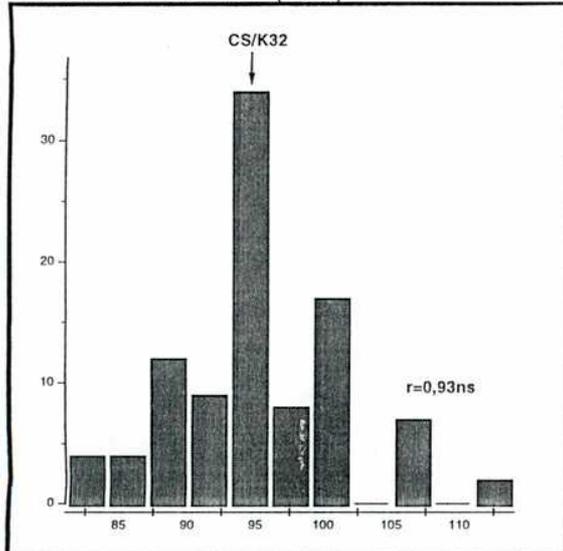
Sedimentación en dodecil sulfato de sodio (SDSS)

Los genotipos parentales presentaron valores medios (n=36) para este parámetro de 9,72 ml para CS y de 13,44 ml para K32 (figura 6c). Estas medias fueron significativamente diferentes entre sí mediante el análisis de varianza con una diferencia mínima significativa de 0,67.

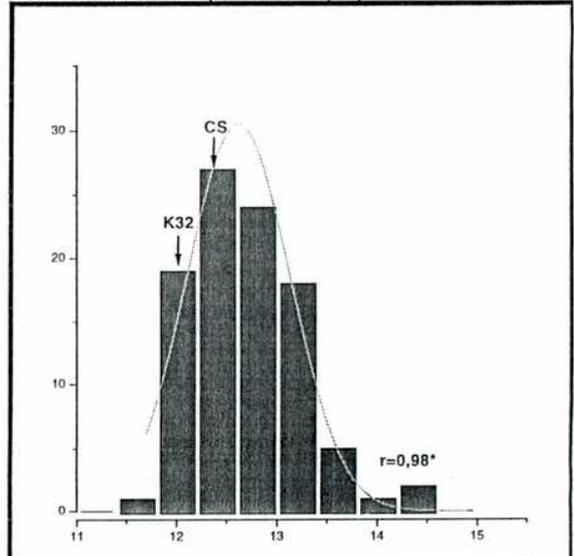
Figura 6: Distribución de los caracteres fenotípicos de la población F_{2:3}. Las flechas indican los valores parentales y se incluye ajuste normal cuando los valores de r son significativos.

ns, +; *, **; indican distribuciones no normales, normales significativas al 10%, 5% y 1%, respectivamente

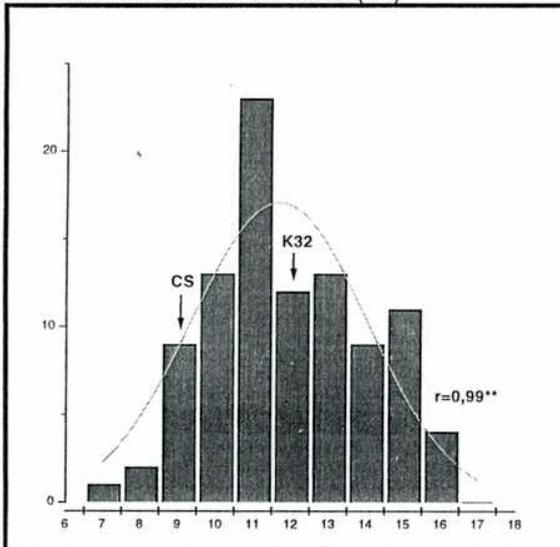
6a. Días a floración (días)



6b. Contenido proteico (%)



6c. Sedimentación en SDS (ml)



6d. Sedimentación en acético (ml)

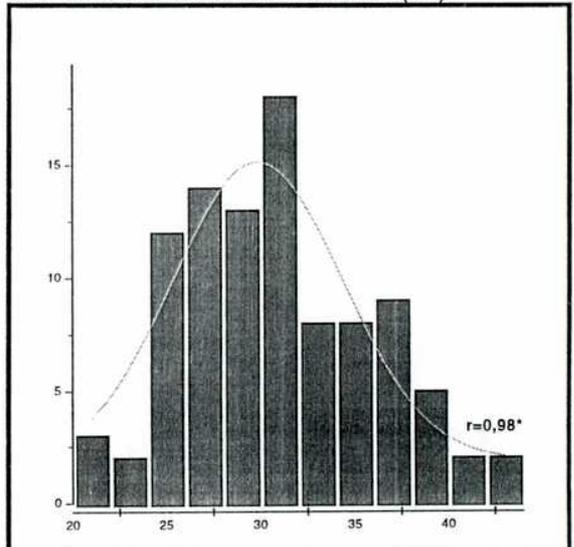
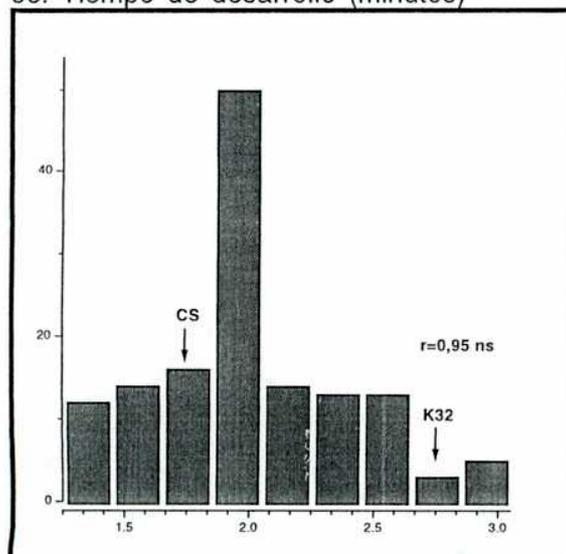
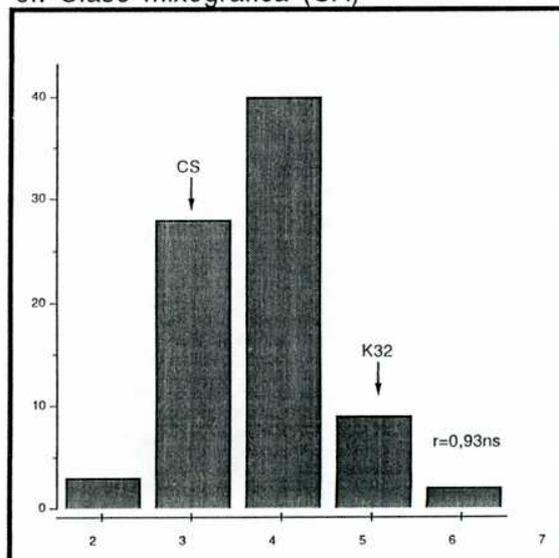


Figura 6: continuación

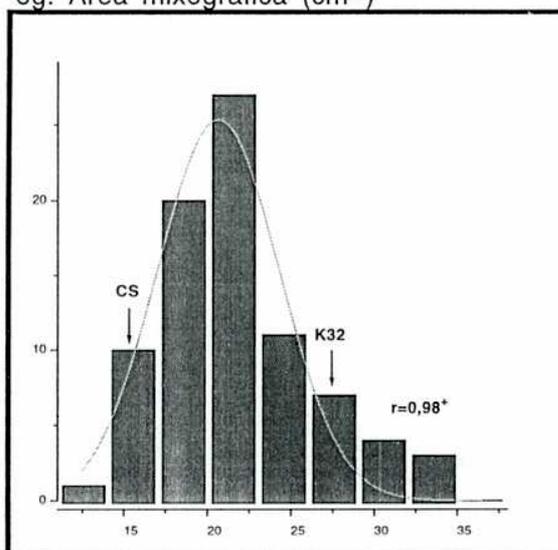
6e. Tiempo de desarrollo (minutos)



6f. Clase mixográfica (UA)



6g. Area mixográfica (cm²)



Los valores de la población $F_{2:3}$ resultaron transgresivos a los de los padres variando entre un mínimo de 7,13 ml y un máximo de 17,0 ml con un valor promedio de 12,03 ml (figura 6c).

La distribución poblacional de la calidad panadera estimada mediante la prueba de SDSS en la población segregante se ajustó a un modelo normal (figura 6c) con una probabilidad mayor a 99%.

Sedimentación en ácido acético

Los valores de las familias $F_{2:3}$ presentaron una media general de 30 ml variando entre 20 y 44 ml. La distribución poblacional se ajustó a un modelo normal significativo al 5% (figura 6d)

Mixogramas

Tiempo de desarrollo y clase mixográfica

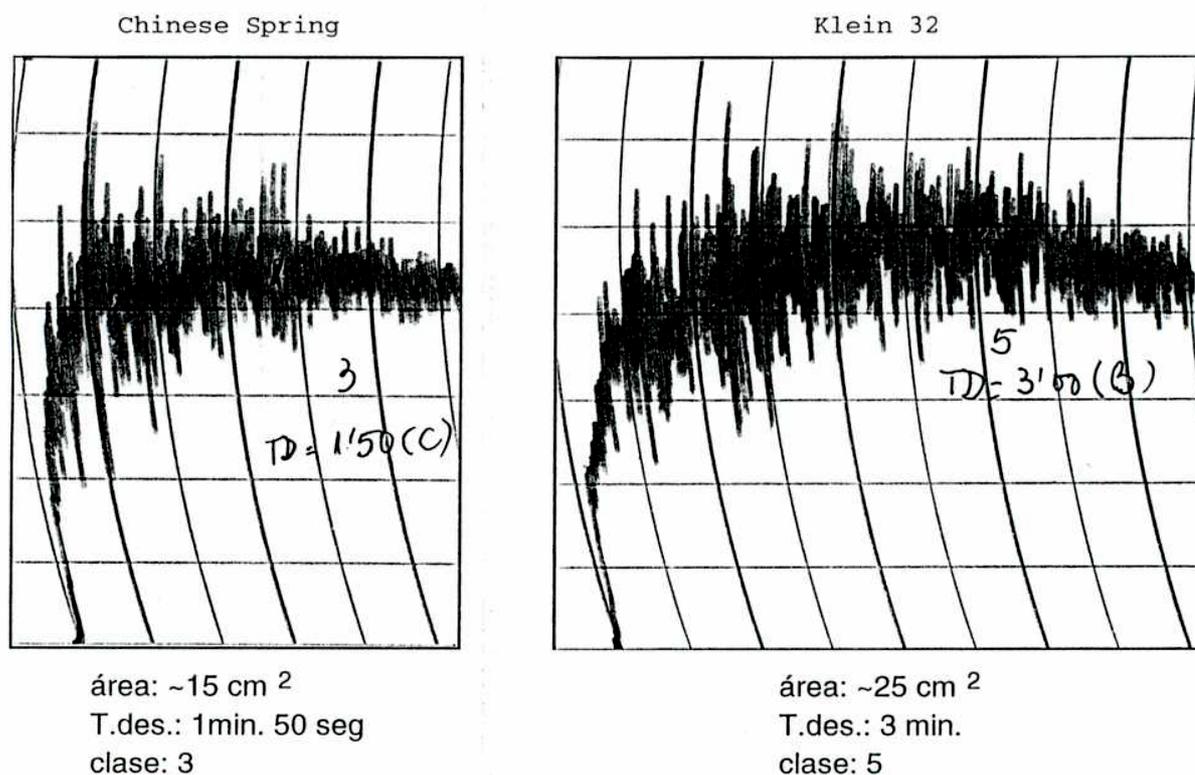
De las pruebas mixográficas se evaluaron el tiempo de desarrollo de la masa (en minutos) y se clasificó según el tipo de curva presentada.

Los genotipos parentales presentaron diferencias en ambos parámetros evaluados. En once repeticiones tomadas al azar de CS, éste presentó un promedio de 1min. 44 seg. de tiempo de desarrollo, con una curva típica de clase 3; mientras que K32 necesitó mayor tiempo de desarrollo (2 min. 51 seg., promedio de 17 repeticiones) y mostró una curva típica de clase 5. (figura 7)

Asimismo, se realizaron mixogramas para cada una de las familias $F_{2:3}$. El valor medio poblacional para el tiempo de desarrollo fue de 2 min. variando entre 1,3 y 3 minutos, mientras que la clase de mixograma promedio fue de 3,7 variando entre clase 2 y clase 6 (figuras 6e y 6f).

Estos parámetros no se ajustaron significativamente a una distribución normal.

Figura 7: Mixogramas tipo de los genotipos parentales



Integral de la curva mixográfica (área)

Chinese Spring y Klein 32 presentaron valores promedios de 12,9 y 23,2 cm², respectivamente. Estos valores presentaron una gran variación dentro de cada genotipo, especialmente en CS, debido, probablemente a la determinación de curvas con tiempos muy reducidos y a que el área debajo de la curva presenta una disminución que responde a un modelo logarítmico.

Las curvas típicas de los padres presentaron valores de 15 cm² y de 25 cm² para CS y K32, respectivamente (figura 7).

Las familias segregantes presentaron una media general de 22,3 cm² variando entre 13,7 y 34,1 cm² ajustándose a una distribución normal significativa al 10% (figura 6g).

Relación entre la calidad panadera y el contenido de proteínas

Se realizaron regresiones de la calidad panadera estimada por SDSS sobre el contenido de proteína de CS y K32.

Para cada genotipo se evidenció una tendencia positiva en el aumento de la calidad en función de la concentración de proteínas (figura 8).

Los datos para ambos genotipos ajustaron a un modelo lineal representado por las siguientes ecuaciones:

$$SDSS_{CS} = 0,95 (\%proteína) - 2,5$$

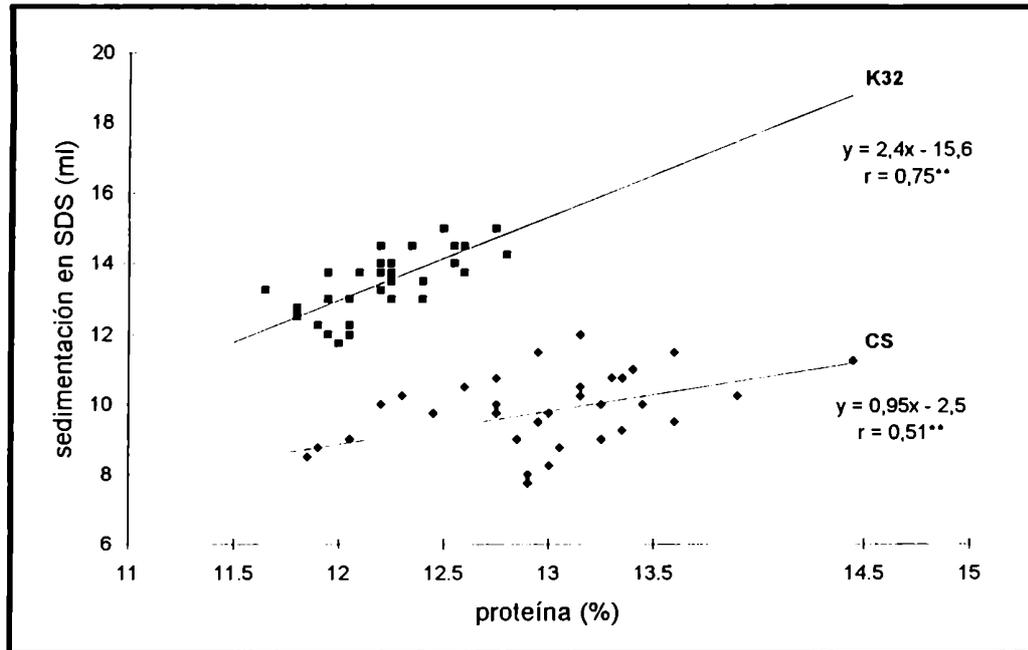
$$SDSS_{K32} = 2,37 (\%proteína) - 15,5$$

La regresión entre ambos parámetros fue de 0,51 y de 0,75 para CS y K32 respectivamente, ambos valores significativos al 1%.

En las familias F_{2:3} la regresión de la calidad por SDSS sobre la concentración de proteínas ajustó a un modelo lineal con una pendiente positiva de 2,9 y un r=0,67 (p ≤ 0,01) (tabla 4). La concentración de proteínas explicó un 42% de la variación en la calidad panadera estimada por SDSS (figura 9).

Figura 8: Relación entre el contenido relativo de proteínas del grano y la calidad panadera estimada por la prueba de SDSS en los genotipos parentales. Se grafica la recta de ajuste y su ecuación.

** valores de regresión estadísticamente significativos al 1%.

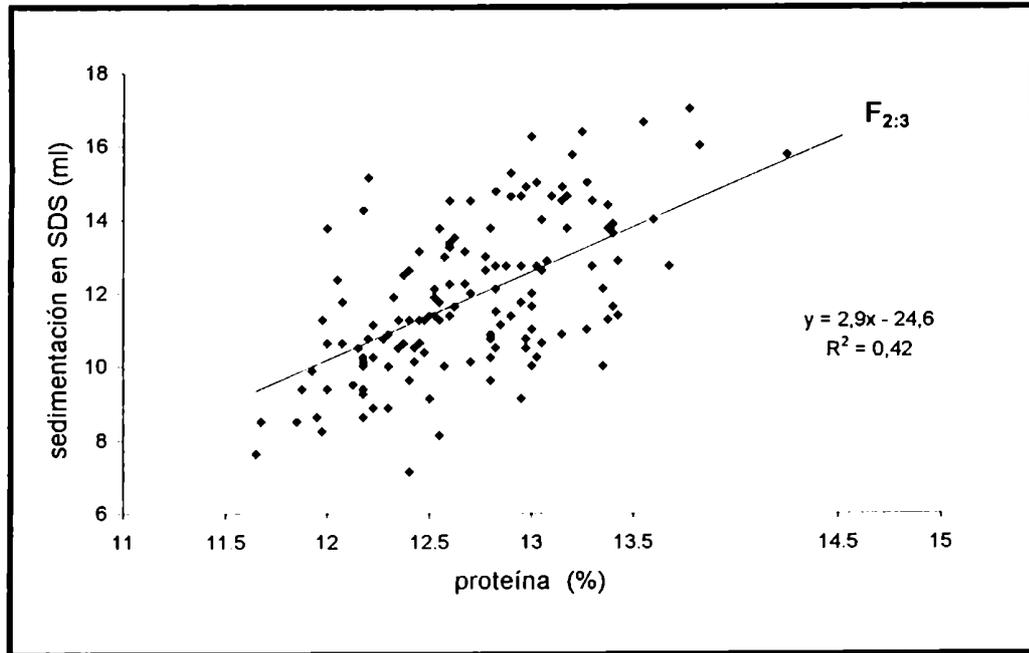


La prueba de sedimentación en ácido acético evidenció también una relación significativa y positiva con el tenor proteico ($r=0,56$ $p \leq 0,01$) aunque la porción de varianza explicada de este carácter fue menor (31%)

Otros parámetros de calidad no mostraron el mismo grado de asociación, evidenciando menor influencia del contenido proteico relativo sobre los mismos.

El tiempo de desarrollo se asoció negativamente al tenor de proteínas ($r=-0,23$ $p \leq 0,05$), explicando el modelo un 5% de la variación total (tabla 4).

Figura 9: Relación entre el contenido relativo de proteínas del grano y la calidad panadera estimada por la prueba de SDSS en la población F_{2:3}. Se grafica la recta de ajuste y su ecuación.



El contenido relativo de proteínas no pudo explicar los valores de clase y de área mixográfica ($r=0,14$; n.s. y $r=0,19$; n.s., respectivamente) (tabla 4).

Variación espacial en el contenido proteico y la calidad panadera

Un análisis de varianza realizado para los genotipos parentales incluidos como controles internos en el diseño del ensayo a campo (figura 4) evidenció efectos significativos en el contenido proteico (% proteínas) y la calidad panadera estimada por SDSS (SDSS) en función de la posición en el campo.

El modelo que incluyó a los genotipos, filas y columnas, presentó valores significativos en ambos caracteres para cada una de las fuentes de

Tabla 4 Correlaciones entre los caracteres fenotípicos evaluados en la población F_{2:3} proveniente de CS x K32.

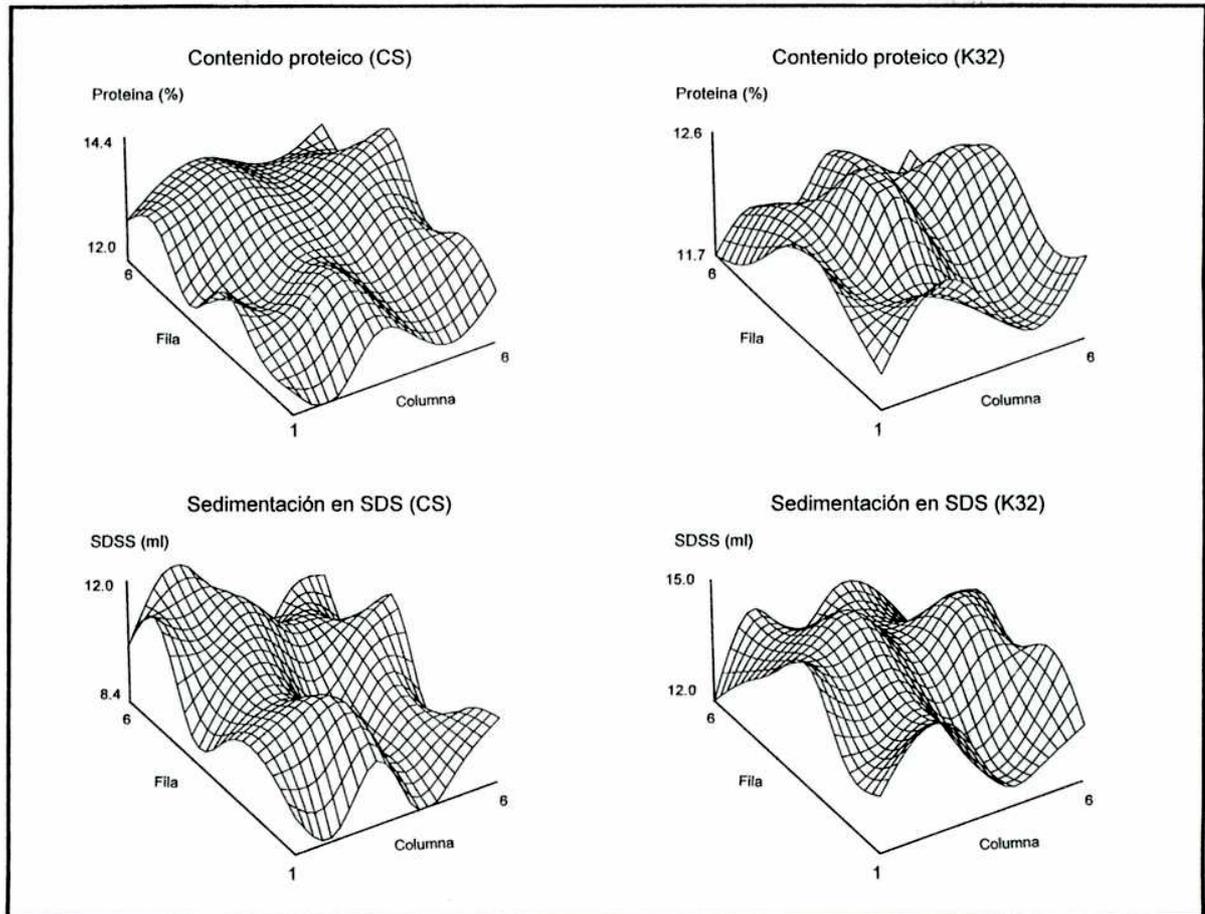
	días a floración	% proteína	Sedim. en SDS	SDSS corregido	Sedim. en Acético.	área	tiempo desarrollo	individuos
días a flor.	1							98
%proteína	0,41**	1						98
Sed. SDS	0,38**	0,65**	1					98
SDSS corr.	0,37**	0,60**	0,96**	1				98
S. Ac.	0,17 ns	0,56**	0,73**	0,67**	1			98
área	-0,06 ns	0,20 ns	0,36**	0,33**	0,53**	1		84
T. des.	-0,23*	-0,23*	0,08 ns	0,11 ns	0,28*	0,83**	1	83
clase	-0,02ns	0,13 ns	0,39**	0,39**	0,56**	0,83**	0,81**	83

*, **, ns: correlaciones significativas al 5%, 1% y no significativas, respectivamente.

variación, y no se detectaron interacciones significativas entre filas y columnas. Cuando se realizó el análisis para cada genotipo, CS presentó valores significativos para filas y columnas tanto para el % proteínas como para SDSS. K32 en cambio sólo evidenció efectos significativos al tomar filas como fuente de variación para ambos caracteres.

La figura 10 muestra el gradiente de variación espacial en el contenido proteico los valores de SDSS de CS y K32. Cada uno de los genotipos parentales presentó un gradiente único de variación en el contenido proteico, que guarda una estrecha relación con los valores de SDSS. La variabilidad detectada de esta forma evidenció una interacción genotipo-ambiente y justificó la modificación de los datos de SDSS en

Figura 10: Variación espacial del contenido proteico y la calidad panadera estimada por SDSS para Chinese Spring y Klein 32.



relación a los controles internos (SDSS corregido) y a la covarianza con el contenido proteico.

Correlación entre parámetros de calidad y fenología

El tiempo a floración, un estimador de las condiciones ambientales a las que está sometido el cultivo durante el período de llenado de grano, mostró asociaciones significativas con el contenido relativo de

proteínas, las pruebas de sedimentación en SDS y en ácido acético y con el tiempo de desarrollo, no así con la clase y el área mixográfica (tabla 4).

El coeficiente de regresión del porcentaje de proteínas sobre los días a floración fue altamente significativo ($r=0,41$; $p \leq 0,01$), y explicó el 17% de la variación de este carácter (figura 11a). En cuanto a la calidad estimada por SDSS, ésta fue explicada en un 14% por la variación en el período a floración ($r=0,38$; $p \leq 0,01$) (figura 11b). Sin embargo, la calidad panadera corregida por el contenido proteico no presentó asociación alguna con los días a floración ($r=0,04$ ns; figura 11b). El tiempo de desarrollo mixográfico presentó una asociación significativa y negativa ($r= -0,23$; $p \leq 0,05$), y explicó el 5% de la variación observada en este carácter. Los otros parámetros mixográficos no presentaron asociación alguna.

Correlaciones entre distintos estimadores de la calidad panadera

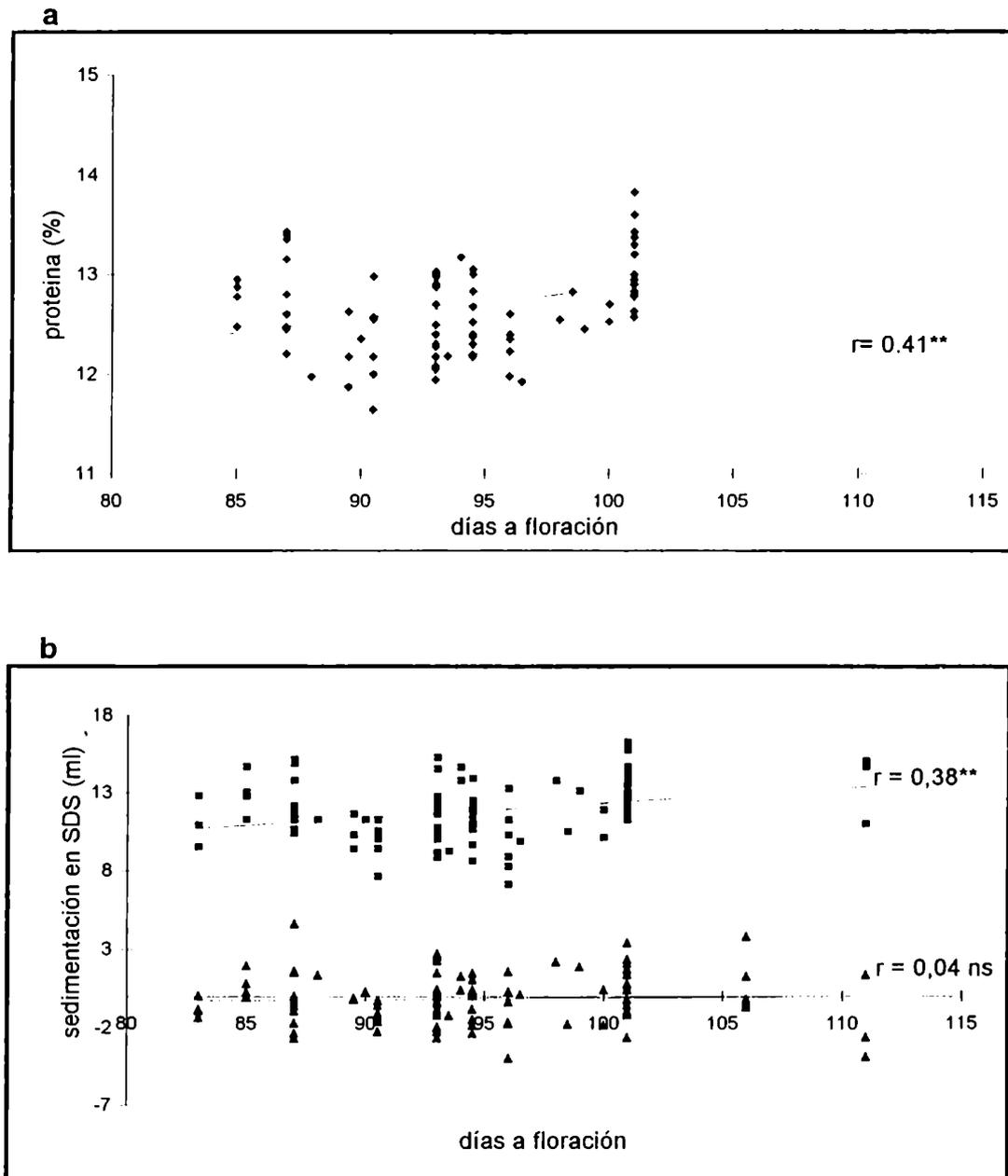
La calidad panadera estimada por la prueba de sedimentación en SDS (SDSS) presentó asociaciones positivas y significativas con la sedimentación en ácido acético (S. Ac.) y la clase y área mixográfica, no así con el tiempo de desarrollo (TD) (tabla 4).

Los valores derivados de SDSS (corregido y residual) presentaron el mismo tipo de asociaciones.

Todos los parámetros de los mixogramas (TD, clase y área) se presentaron asociados significativamente a S. Ac. La clase y el área mixográfica lo hicieron de manera altamente significativa ($p < 0,01$) mientras que TD fue significativo al 5%.

Figura 11: Efecto del período a floración sobre: a.- el contenido proteico (◆), b.- la calidad panadera (■) y la calidad panadera corregida por el contenido proteico (▲).

** , ns; valores de regresión estadísticamente significativos al 1% y no significativos, respectivamente.



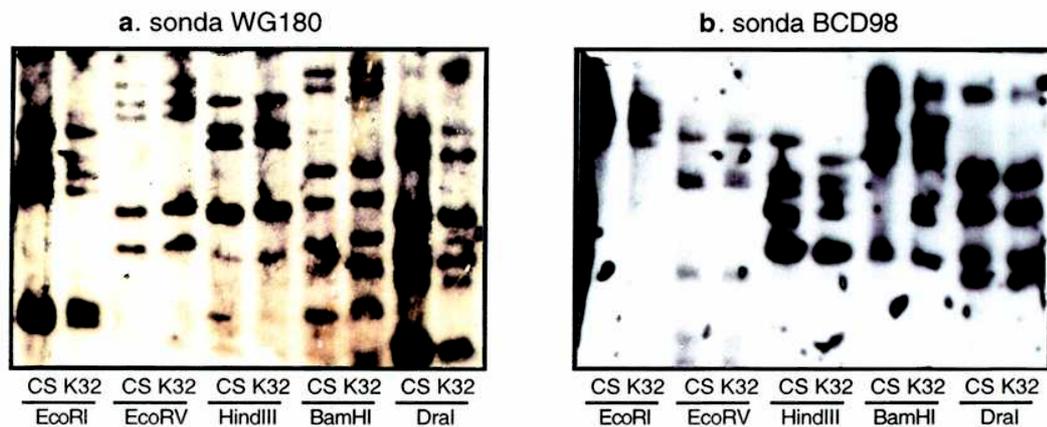
Dentro de los parámetros mixográficos, todos se relacionaron positiva y significativamente con valores de correlación mayores a 0,8 (tabla 4).

Marcadores moleculares

Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Treinta y cinco sondas de RFLP fueron utilizadas para determinar la existencia de polimorfismo entre los genotipos parentales y corroborar la ubicación cromosómica de fragmento polimórfico mediante el uso de líneas ditelosómicas de CS (figura 12).

Figura 12: Evaluación de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) entre Chinese Spring (CS) y Klein 32 (K32) utilizando 5 enzimas de restricción. (a) WG180 monomórfico; (b) BCD98 polimórfico con HindIII y BamHI.

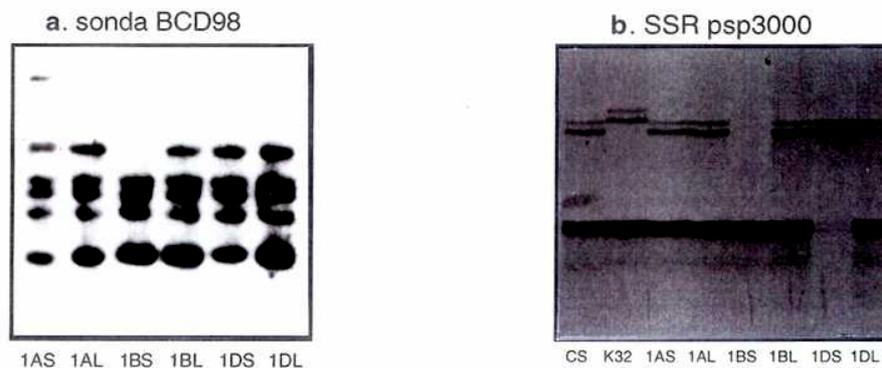


Trece sondas revelaron polimorfismos con al menos una de las cinco enzimas de restricción utilizadas, determinando 15 loci posibles de ser mapeados. La distribución de los mismos estuvo preferentemente concentrada en cromosoma 1B.

De esta manera, 6 sondas revelaron polimorfismos en el 1BS, 3 en el 1BL, 1 en el 1AL y 1DS, y ninguna en 1AS y 1DL. En los cromosomas homeólogos del grupo 6, 3 loci polimórficos se localizaron en el 6AS, 1 en el 6BS y ninguno en el 6DS.

Del total de las sondas que evidenciaron polimorfismos, se mapearon 10 loci, descartando aquellas que hubieren presentado un alto nivel de ligamiento con algun locus mapeado previamente.

Figura 13: Localización de marcadores mediante el uso de aneuploides. Se indican los brazos cromosómicos faltantes en las líneas ditelosómicas de CS. (a) sonda de RFLP BCD98; (b) microsatélite psp3000.



Microsatélites (SSRs)

Siete microsatélites que detectan loci del grupo 1 fueron evaluados para determinar polimorfismo entre CS y K32. De ellos, 5 (3 en el cromosoma 1A y 2 en el 1B) revelaron polimorfismos.

De los 9 microsatélites evaluados para los cromosomas homeólogos del grupo 6, 5 detectaron polimorfismos entre los padres (tres en 6A, uno en

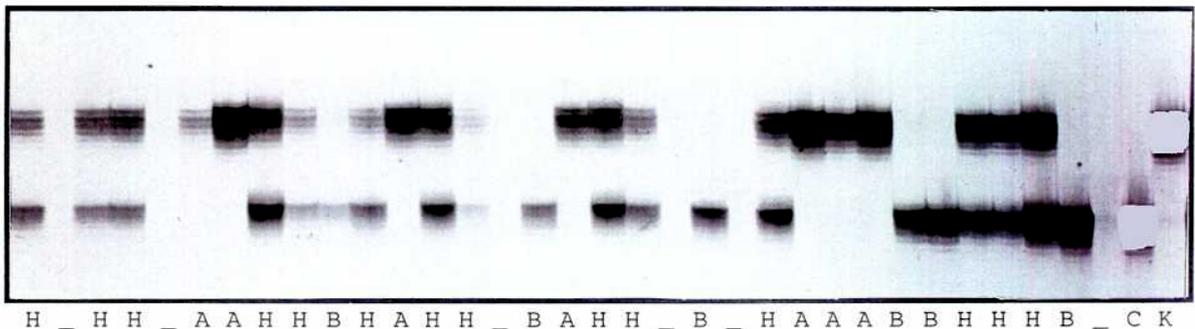
6B y uno en 6D). Los microsatélites polimórficos de los grupos 1 y 6 fueron mapeados en las familias F_{2:3}, confirmando su localización mediante el uso de líneas aneuploides (figura 13)

Mapeo y segregación de los marcadores moleculares

El análisis de segregación de los marcadores en la población F_{2:3} demostró que los mismos presentan una segregación mendeliana, en la gran mayoría de los casos. (tabla 5; figura 14)

De los 19 marcadores ensayados, 15 ajustaron a una segregación mendeliana esperada. (tabla 5). Los marcadores psp3151, psr8-6B y psp3139 no ajustaron a la relación 1:2:1 esperada para marcadores codominantes, mientras que gli2 presentó una distorsión en la segregación 3:1, con menor número de individuos C de los esperados (tabla 5).

Figura 14: Segregación del marcador psp3152 en la población F_{2:3} derivada de Chinese Spring (C) y Klein 32 (K). Se catalogaron los individuos como A (homocigota Klein 32), B (homocigota Chinese Spring) y H (heterocigota). - simboliza dato perdido.



De los marcadores que presentaron una segregación distorsionada, dos de ellos (psp3151 y psp3139) mostraron un menor número de homocigotas del alelo de CS, mientras que el restante (psr8-6B) evidenció un menor número de individuos heterocigotas. Estos casos se correspondieron con

Tabla 5: Segregación de los marcadores ensayados. En negrita aquellos que se apartan de la segregación mendeliana esperada.

marcador	χ -cuadrado	Prob. segregación esperada	n(A) K32	n(H)	n(B) CS	n(C)	n(D)	Total	
bcd98	0,39	0,82	1:2:1	13	21	12	3	10	59
cnl5	3,52	0,17	1:2:1	15	42	12	1	0	70
ksuE19-1B	1,44	0,49	1:2:1	34	54	26	0	0	114
ksuE19-1D	1,65	0,44	1:2:1	29	57	21	6	1	115
pDY10A/KS-	1,80	0,41	1:2:1	20	54	21	16	3	114
psp3000	0,32	0,85	1:2:1	30	58	26	0	0	114
psp3003	3,42	0,18	1:2:1	19	37	10	0	1	67
psp3070	0,61	0,74	1:2:1	22	38	23	0	0	83
psp3071	1,76	0,41	1:2:1	12	25	18	0	0	55
psp3100	1,42	0,49	1:2:1	16	41	15	0	0	72
psp3139	9,23	0,01	1:2:1	19	51	9	0	0	79
psp3151	8,97	0,01	1:2:1	22	43	7	0	0	72
psp3152	1,52	0,47	1:2:1	14	23	17	0	0	54
psp3200	2,77	0,25	1:2:1	19	46	14	0	0	79
psr10	18,36	0,00	3:1	29	0	0	30	0	59
psr8-6A	0,58	0,75	1:2:1	26	61	27	0	0	114
psr8-6B	7,42	0,02	1:2:1	28	29	15	38	0	110
psr8-6B	0,01	0,91	3:1	28	0	0	82	0	110
pTdUCD1	1,20	0,55	1:2:1	30	59	23	0	0	112
wg983	0,66	0,72	1:2:1	31	55	25	0	0	111

la existencia de genotipos evaluados "C" (no A) y "D" (no B) generados por una toma de datos conservadora, que se adoptó para evitar errores. El test de χ^2 -cuadrado fue realizado sin tomar en cuenta tales valores.

Cuando se evaluó al marcador psr8 correspondiente al cromosoma 6B como dominante, este ajustó a la segregación 3:1 esperada.

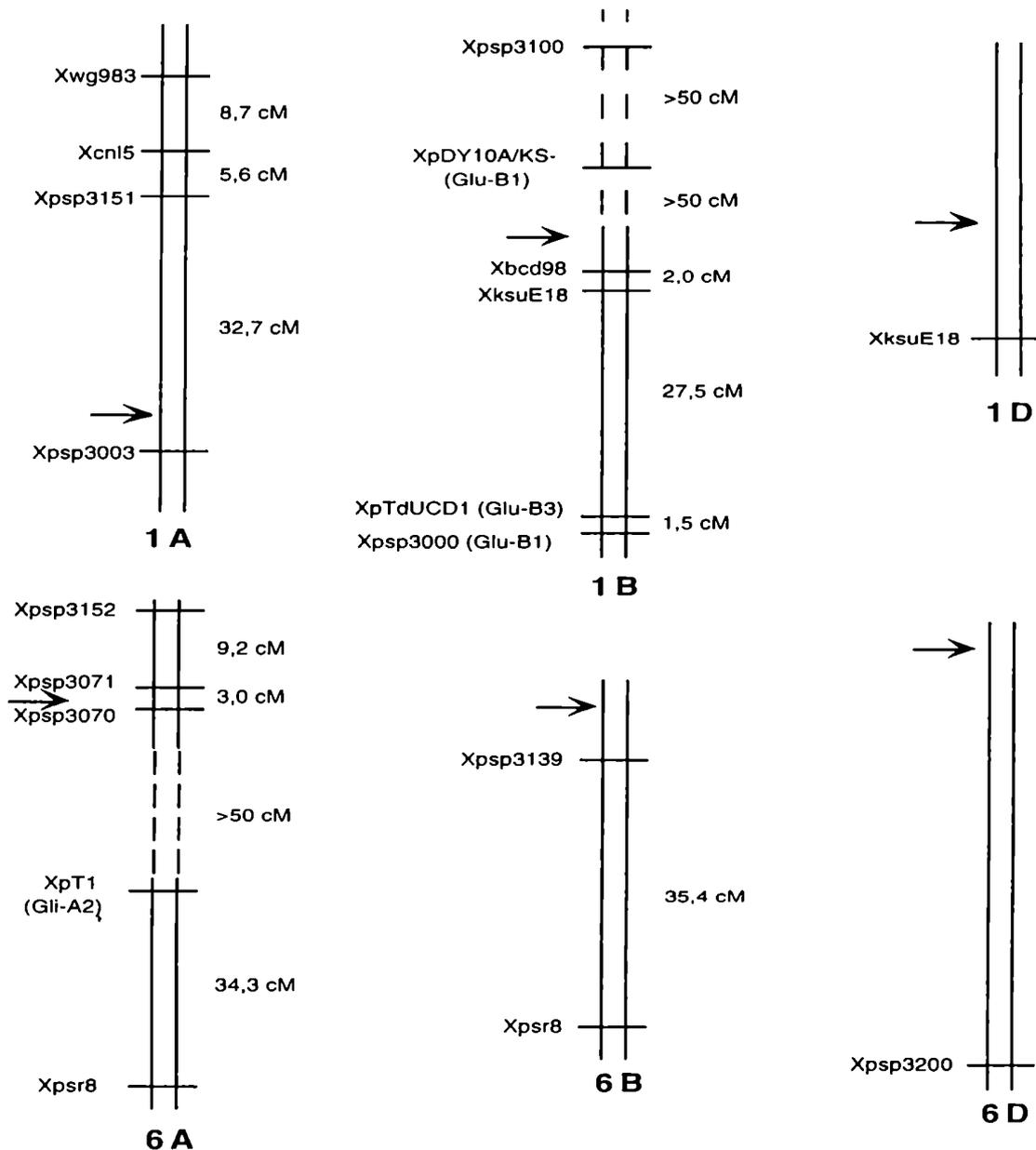
El mapa genético obtenido a partir de los datos de segregación se presenta en la figura 15.

El mapa agrupa a los marcadores en cuatro grupos de ligamiento definidos de 47 cM y de 31 cM localizados en los cromosomas 1A y 1B, respectivamente y de 12,2 cM y 34,3 cM localizados en el cromosoma 6A y no ligados entre sí. Marcadores individuales (no ligados al resto ni entre sí) fueron localizados en los brazos cromosómicos 6BS (psp3139, psr8.2), 6DS (psp3200) 1BL (psp3100 y HMW) y 1DS (KsuE18), en base a la bibliografía existente (Stephenson et al., agregar). Los pares de marcadores psp3100, HMW y psp3139, psr8.2; no se encontraron asociados (LOD 3.00, 50cM) a pesar de encontrarse en el mismo brazo cromosómico. Sin embargo, al realizar el análisis en condiciones menos estrictas, los marcadores del cromosoma 6BS se localizaron a una distancia de 35,4 cM (LOD: 2.84). Sin embargo los marcadores del 1BL no presentaron asociación alguna.

Debido a la falta de polimorfismos, no se localizaron marcadores en la porción distal del brazo corto del cromosoma 1A.

La figura 15 muestra el ordenamiento más probable de los marcadores dentro de cada grupo de ligamiento definidos según los datos de segregación de la población analizada. Sin embargo, existen ordenamientos alternativos que no difieren significativamente del

Figura 15: Mapa de ligamiento de los cromosomas homeólogos del grupo 1 y 6 de la población F_{2:3} proveniente de CS x K32



Los marcadores se indican a la izquierda y las distancias entre ellos a la derecha. Marcadores no ligados se ubicaron sobre líneas punteadas, y ordenados en base a localización mediante líneas ditelosómicas de CS o mapas publicados. Las flechas indican posición aproximada del centrómero. El brazo largo se encuentra por sobre el centrómero y el corto por debajo del mismo.

presentado. Este hecho se evidencia en el grupo de ligamiento correspondiente al 1BS, y está debido a marcadores que se presentan ligados entre si a una corta distancia.

La tabla 6 muestra ordenamientos alternativos del grupo de marcadores del cromosoma 1BS con los respectivos valores del logaritmo de máxima verosimilitud relativo, asignándole valor cero al ordenamiento más probable.

Tabla 6: Los seis ordenamientos más probables de los loci del 1BS con su valor de probabilidad relativa (cociente de los logaritmos de máxima verosimilitud de cada orden relativo al orden de mayor probabilidad) realizado mediante MAPMAKER Exp. 3.0

orden	loci				prob. relativa
1	<i>Gli-B1</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>XksuE18</i>	<i>Xbcd98</i>	0,00
2	<i>Gli-B1</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Xbcd98</i>	<i>XksuE18</i>	-0,30
3	<i>Glu-B3</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>XksuE18</i>	<i>Xbcd98</i>	-1,08
4	<i>Glu-B3</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Xbcd98</i>	<i>XksuE18</i>	-1,37
5	<i>XksuE18</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Xbcd98</i>	-12,67
6	<i>XksuE18</i>	<i>Gli-B1</i>	<i>Glu-B3</i>	<i>Xbcd98</i>	-13,23

Asociación entre marcadores y caracteres fenotípicos

Se analizó la asociación entre los marcadores mapeados y los caracteres fenotípicos evaluados en las familias F_{2:3} mediante análisis de varianza (ANOVA). Estos resultados se presentan en las tablas 7 y 8.

Tabla 7: Análisis de varianza entre las medias de los caracteres fenotípicos evaluados, agrupados según clase genotípica para los loci de los cromosomas homeólogos del grupo 1. Médias estadísticamente diferentes en negrita, con valores de F y proporción de varianza explicada.

locus marcador	días a floración (días)			%proteína			semenación en SDS (ml)			SDS (residual) (ml)			Sedim. Acético (ml)			tiempo de observación (minutos)			Clase (UA)			area (cm ²)					
	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS			
Xwg703	94.9	95.4	93.3	12.8	12.6	12.7	12.4	11.7	11.7	0.82	0.06	0.00	0.15	-0.12	-0.40	31.1	30.1	29.8	2.02	2.01	2.11	3.9	3.6	4.1	22.2	21.0	22.7
Xcr15	93.0	95.1	94.6	12.8	12.7	13.0	11.9	11.8	12.3	0.11	0.07	0.24	-0.41	-0.19	-0.53	29.4	30.6	31.7	1.86	1.98	2.24	3.6	3.7	4.4	20.7	21.0	25.3
Xpsp3151	93.2	95.3	92.4	12.7	12.6	12.9	11.6	11.3	11.8	-0.02	-0.33	0.28	-0.27	-0.56	-0.77	29.2	29.5	30.3	1.95	2.04	1.79	3.7	3.7	3.6	21.6	21.7	19.5
Xpsp3003	92.2	94.4	93.8	12.7	12.6	12.7	11.9	11.4	11.3	0.41	-0.09	-0.60	-0.02	-0.43	-0.74	30.0	29.7	29.8	1.97	2.04	1.79	3.7	3.7	3.6	21.3	22.0	19.6
Xpsp3100	91.9	94.3	95.0	12.5	12.7	12.7	11.5	11.3	11.9	-0.10	-0.30	0.28	0.03	-0.72	-0.26	30.8	29.7	29.5	2.20	1.92	1.94	4.0	3.6	3.7	23.2	20.8	21.2
Glu-81	96.8	95.0	92.5	12.6	12.8	12.6	11.9	12.0	11.4	0.28	0.37	-0.46	0.12	-0.20	-0.32	30.9	29.4	30.5	2.12	1.96	2.09	4.0	3.6	3.7	22.0	21.3	22.6
Xbc098	95.4	95.3	95.8	12.7	12.9	12.9	12.1	12.6	11.0	0.51	0.76	-0.80	0.15	-0.01	-1.51	32.0	31.3	28.2	2.15	2.01	1.93	4.2	3.9	3.6	22.2	23.3	20.9
Glu-81	94.2	94.6	95.3	12.9	12.6	12.7	12.7	11.9	11.0	1.17	0.28	-0.82	0.24	0.14	-1.14	32.7	30.3	27.7	2.17	2.04	1.77	4.1	3.8	3.3	23.5	21.5	19.8
psp3000										F=7.03**;	r ² : 0.13	F=6.43**;	r ² : 0.12	F=5.76**;	r ² : 0.11	F=4.98**;	r ² : 0.11	F=6.42**;	r ² : 0.14	F=3.66**;	r ² : 0.09						
Glu-83	93.9	94.7	95.5	12.8	12.6	12.8	12.5	11.9	11.1	1.01	0.21	-0.67	0.18	0.12	-1.10	32.0	30.1	27.9	2.16	2.02	1.78	4.0	3.8	3.3	23.2	21.2	20.1
p1dUCD1										F=3.80*;	r ² : 0.07	F=4.39*;	r ² : 0.09	F=5.03**;	r ² : 0.10	F=3.57*;	r ² : 0.07	F=4.14*;	r ² : 0.10	F=4.77*;	r ² : 0.11						
XksuE18	94.6	95.0	94.1	12.7	12.7	12.8	12.7	11.8	11.1	1.06	0.17	-0.73	0.66	-0.21	-1.08	32.2	29.2	29.6	2.14	1.95	1.91	4.1	3.6	3.5	22.9	21.2	20.4
XksuE18	93.5	96.1	92.7	12.6	12.8	12.7	11.8	12.0	11.7	0.24	0.22	0.10	-0.04	-0.20	-0.24	29.0	30.8	30.1	2.06	1.95	2.03	3.7	3.7	3.8	21.6	21.2	22.0

Tabla 8: Análisis de varianza entre las medias de los caracteres fenotípicos evaluados, agrupados según clase genotípica para los loci de los cromosomas homeólogos del grupo 6. Medias estadísticamente diferentes en negrita, con valores de F y proporción de varianza explicada.

locus marcador	edad a floración (días)			proteína			sedimentación en SDS (ml)			SDSS (correcto) (ml)			SDSS (residual) (ml)			Seedm. Atetico (ml)			tiempo de desarrollo (minutos)			Clase (UA)			área (cm ²)		
	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS	K32	H	CS
Xpsp3152 6AL	93.0	93.9	96.6	12.6	12.8	12.7	11.3	11.9	11.6	-0.42	0.05	0.01	-0.28	-0.49	-0.36	28.4	31.3	30.1	1.92	2.02	2.01	3.6	3.7	3.9	20.7	22.6	21.4
Xpsp3071 6AL	92.9	93.8	96.3	12.6	12.7	12.8	11.6	11.8	11.5	-0.16	0.01	-0.20	-0.02	-0.27	-0.73	28.8	30.3	30.9	1.91	1.99	1.99	3.7	3.5	3.9	20.5	21.4	21.9
Xpsp3070 6AS	93.0	94.1	95.8	12.5	12.7	12.8	11.4	11.8	11.7	-0.10	0.17	-0.02	0.02	-0.27	-0.71	29.1	29.9	31.3	1.93	2.05	2.00	3.7	3.7	3.9	20.6	21.7	22.4
Glr-A2 psr10	94.3	94.4	94.4	12.6	12.8	12.8	11.5	12.5	12.5	-0.15	0.75		-0.21	0.10		29.5	31.5		1.98	2.01		3.7	3.7		20.7	22.0	
Xpsp6 6AS	94.4	93.7	97.2	12.8	12.6	12.9	11.2	11.7	12.9	-0.57	0.09	1.20	-1.00	0.01	0.26	28.9	29.2	33.4	1.97	1.99	2.10	3.7	3.6	4.1	21.2	20.9	23.6
Xpsp6 6BS	95.2	94.3	94.3	12.6	12.7	12.7	11.4	12.0	12.0	-0.04	0.24		-0.46	-0.10		29.4	30.0		1.91	2.05		3.7	3.8		20.7	21.9	
Xpsp6 6BS	95.2	93.9	94.5	12.6	12.8	12.8	11.4	12.4	12.1	-0.04	0.54	0.39	-0.46	0.22	-0.11	28.1	31.7	31.6	1.91	2.17	1.92	3.7	3.9	3.7	20.7	22.7	21.1
Xpsp3139 6BS	95.8	94.2	89.7	12.7	12.7	12.6	11.3	11.5	11.9	-0.31	0.00	-0.06	-0.69	-0.35	-0.02	28.4	30.0	31.6	1.90	1.98	2.27	3.6	3.6	4.3	21.1	21.0	25.4
Xpsp3200 6DS	93.0	94.2	95.9	12.6	12.7	12.6	11.3	11.7	11.5	-0.35	0.03	0.17	-0.36	-0.40	-0.29	29.8	30.0	29.6	1.98	1.97	2.07	3.7	3.7	3.6	21.6	21.4	21.5

Días a floración y contenido proteico

Ninguno de los marcadores del grupo 1 de cromosomas homeólogos mostraron asociación significativa con el período de siembra a floración. Únicamente el microsatélite psp3139 (del grupo 6) evidenció una asociación significativa ($p \leq 0,05$) con este carácter. La presencia de los alelos de CS determinaron floraciones más tempranas que los alelos de K32.

Ninguno de los marcadores mapeados mostró una asociación significativa con el contenido proteico.

Calidad Panadera

La calidad panadera, estimada por la prueba de sedimentación en SDS (SDSS), resultó asociada significativamente a marcadores correspondientes al brazo corto del cromosoma 1B (psp3000, pTdUCD1 y KsuE18) con probabilidades $\leq 5\%$. Estos marcadores, ligados a los loci *Glu-3B* y *Gli-1B*, presentan mayores valores de SDSS asociados a los alelos de K32. Asimismo, se evidenciaron asociaciones significativas con marcadores del cromosoma 6A (psr8-6A) con una probabilidad menor al 5%. Este marcador está asociado a loci de gliadinas de bajo peso molecular (α y β). Sorpresivamente, los datos indican que en este locus la presencia de los alelos de CS, cultivar de menor calidad que K32, incrementaron los valores de SDSS.

El marcador pTu1 (*Gli-2*) ligado a Xpsr8 evidenció la misma tendencia, aunque esta sólo fue significativa con un valor de rechazo de hipótesis del 8%.

El porcentaje de variación en este carácter explicada por estos

marcadores y calculado mediante el valor de r^2 , fue de 9% y 7%, para los marcadores del cromosoma 1BS y el del 6A, respectivamente (tablas 7 y 8).

Los mismos marcadores mostraron asociación cuando se analizó la calidad panadera evaluada mediante el método de sedimentación en ácido acético. los loci *Gli1*, *Glu3* y *XksuE18* estuvieron significativamente asociados con valores de $p < 0,4\%$; 3,2% y 4,9 %, respectivamente. Los mayores valores de sedimentación en ácido acético estuvieron asociados a los alelos de K32. Los valores de r^2 fueron de 11% para *Gli1*, 7% para LMW y 6% para KsuE19a (tabla 7).

El locus *Xpsr8* del cromosoma 6AS evidenció una asociación significativa ($p < 1\%$) y pudo explicar el 10% de la variación en este parámetro. La mayor calidad estuvo nuevamente asociada a la presencia de los alelos de CS (tabla 8).

Coincidentemente, los valores mixográficos de tiempo de desarrollo y de clase se mostraron asociados a los marcadores de gliadinas y de gluteninas de bajo peso molecular del brazo corto del cromosoma 1B. Asimismo, el locus *XKsuE18* presentó valores de asociación significativos con la clase mixográfica, pero si bien presentó la misma tendencia para el tiempo de desarrollo, el valor de F fue sólo significativo al 6,5% (tabla 7).

Los marcadores pudieron explicar el 11% y 10% (psp3000 y pTdUCD1) de la variación observada en el tiempo de desarrollo, y el 14%, 11% y 10% (psp3000, pTdUCD1 y ksuE18) de la variabilidad en la clase mixográfica. Ninguno de estos parámetros evidenció asociaciones significativas con los marcadores del brazo corto del cromosoma 6A (tabla 8)

De los marcadores asociados previamente, sólo psp3000 (*Gli1*) resultó asociado significativamente al área mixográfica ($p < 0,03$), siendo el efecto alélico el mismo detectado anteriormente. Sorprendentemente, se evidenció la asociación marginal ($p < 0,06$) del marcador psp3139 localizado con el cromosoma 6BS, cuyo efecto no había sido detectado en ninguno de los otros parámetros estimadores de la calidad panadera. La mayor calidad se presenta asociada a los alelos de CS. Sin embargo, esta asociación podría estar relacionada con el bajo número de individuos homocigotas tipo CS (tabla 5).

El contenido de proteínas como cofactor de la calidad panadera

En base a la identificación de la interacción del contenido relativo de proteínas con la calidad panadera, se realizó una transformación de los resultados de SDSS según dos criterios:

1) según la posición de la familia en el ensayo, utilizando como referente a los genotipos parentales más próximos (SDSS corregido, ver M&M).

La modificación de los valores de SDSS, cuando se los hizo relativa a los valores medios de los genotipos parentales de mayor cercanía en el ensayo a campo, mostraron que otros marcadores localizados en el brazo corto del cromosoma 1B se encontraron asociados con mayores valores de F que los datos sin transformar (tabla 7). Los marcadores correspondientes a los loci *Gli1*, *Glu3* y *XKsuE18* presentaron mayores valores de $p \leq 0,1\%$; $1,5\%$ y $0,3\%$, respectivamente. Consecuentemente, aumentó la proporción de variación del carácter fenotípico explicada,

que fue de 13% para psp3000, de 9% para pTdUCD1 y de 12% para KsuE18. Los valores corregidos de SDSS no modificaron sustancialmente la asociación de los marcadores del cromosoma 6A (tabla 8). El locus Xpsr8 presentó valores de F apenas superiores al carácter sin modificar y *Gli2* si bien presentó la misma tendencia, no se asoció significativamente al 5%.

Como era de esperar, el efecto alélico en ambas regiones fue en el mismo sentido que el reportado anteriormente.

2) según la función que relaciona ambas variables en este estudio. Se utilizó un modelo lineal de la siguiente fórmula:

$$SDSS_{dep} = 2,9 (\%proteínas) - 24,6$$

derivado de la recta de ajuste a los datos poblacionales obtenidos en el ensayo a campo (figura 9).

Se calculó el valor de $SDSS_{dep}$ para cada una de las familias y el mismo se sustrajo al valor observado de SDSS. El valor obtenido fue el residual del parámetro de calidad ($SDSS_{res}$).

El análisis de varianza utilizando como valor fenotípico los residuales de calidad sobre el contenido relativo de proteína evidenció asociación de todos los marcadores del 1BS y 6AS previamente asociados pero con mayores valores de F (y consecuentemente menores valores de probabilidad). Del mismo modo, los mayores valores de calidad estuvieron asociados a la presencia de las regiones 1BS de K32 y de 6AS de CS. Los valores de r^2 fueron de 11 a 12% para la región del 1BS y de

9% para la del 6AS (tablas 7 y 8).

Acción e interacción génica

La tabla 9 muestra que los efectos de los loci *Gli-B1* y *Gli-B3* fueron mayoritariamente aditivos para SDSS, SDSSc y SAc. El locus *XksuE19* mostró el mismo tipo de herencia para SDSS y SDSSc, sin embargo evidenció subdominancia casi completa para SAc, ya que el valor medio de de los individuos heterocigotas fue igual al de los homocigotas CS. Los mismos marcadores presentaron dominancia incompleta para los parámetros mixográficos , mientras que *Xpsr8* (6AS) presentó distintos grados de dominancia incompleta para todos los caracteres a los que estuvo asociado, con valores d/a desde 0,25 a 0,86.

Tabla 9: Efectos de aditividad (A) y dominancia (D) de los marcadores asociados a la calidad panadera.

locus	SDSS (ml)		SDSSc (ml)		SDSSres (ml)		Acético (ml)		desarrollo (minutos)		Clase (UA)		area (cm ²)	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
<i>Gli-B1</i> -1BS	0.86	0.07	0.99	0.10	0.69	0.59	2.50	0.10	0.20	0.06	0.42	0.13	1.82	-0.19
<i>Glu-B3</i> -1BS	0.69	0.09	0.84	0.04	0.64	0.59	2.05	0.11	0.19	0.04	0.38	0.10		
<i>XksuE19</i> -1BS	0.78	-0.07	0.89	0.01	0.87	0.00	1.31	-1.72			0.29	-0.15		
<i>Xpsr8</i> -6AS	-0.87	-0.31	-0.88	-0.22	-0.63	0.38	-2.27	-1.95						

El análisis de varianza utilizando a los loci *Gli-1B* y *Xpsr8-6A* como factores demostró la ausencia de interacción entre los mismos para la calidad panadera estimada por SDSS (F=0,42) y sus valores corregidos (F=0,56) y residual (F=0,72).

En conjunto, estas dos regiones pudieron explicar el 20% de la variación de la calidad panadera estimada por SDSS, y más del 60% si se toma en cuenta la proporción de varianza explicada por el contenido proteico relativo.

Mapeo de intervalo

En el brazo corto del cromosoma 1B se evaluó la asociación de los parámetros de calidad panadera mediante el método de mapeo por intervalos. Los marcadores utilizados se muestran en la figura 15. Este segmento evidenció asociaciones significativas con parámetros de calidad panadera mediante análisis de varianza (tabla 7). Los cuatro marcadores abarcan 31 cM, encontrándose dos marcadores cercanos en cada extremo (figura 15).

Los valores de SDSS se encontraron asociados a una región a 18cM de LMW, con valores de LOD apenas superando el umbral ($LOD_{max} = 2,1$) (Figura 16a). La proporción de varianza del carácter explicada por este QTL fue de 13,6% (figura 17).

Cuando se tomaron los valores de SDSS corregidos por localización en el campo, o utilizando el contenido proteico como covariante, se detectaron QTLs con mayores valores de LOD, localizados en la misma región que el anterior (figura 16a). SDSScorr mostró un pico de $LOD = 3,14$ a 16cM, mientras que SDSSres los hizo a 22cM con un valor de $LOD_{max} = 3,9$. Se evidenció, consecuentemente, un aumento en la proporción de varianza explicada, 19% para SDSScorr y de 22% para SDSSres (figura 17).

Figura 16: Localización de QTLs en el brazo corto del cromosoma 1B mediante mapeo de intervalo para los caracteres fenotípicos evaluados en la población F_{2:3} derivada de CS x K32.

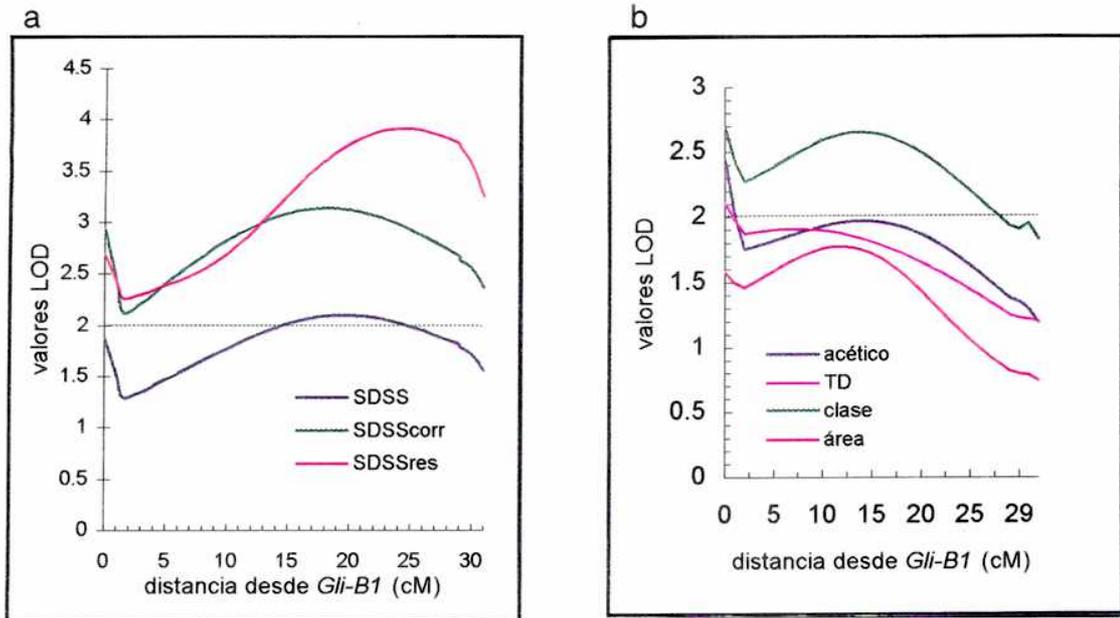
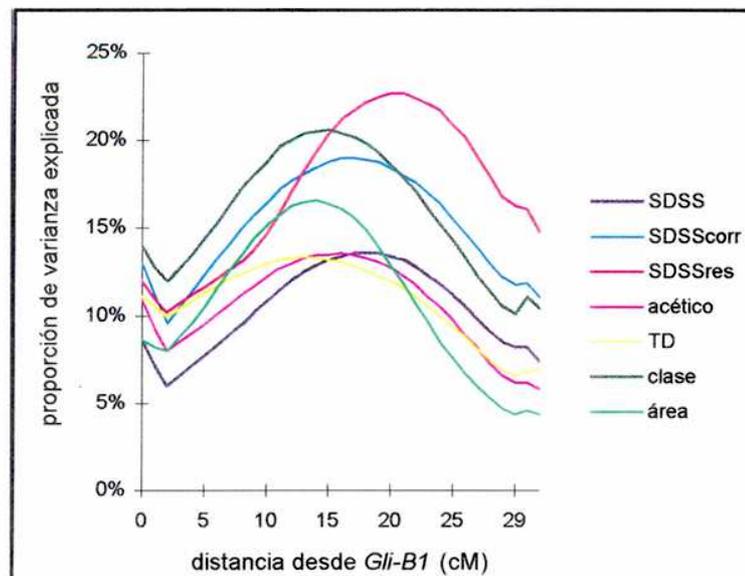


Figura 17: Proporción de varianza explicada por los QTLs del cromosoma 1BS de los caracteres fenotípicos evaluados.



La sedimentación en ácido acético no mostró valores significativos de LOD para el intervalo, con la excepción del locus *Gli-B3* cuyo LOD fue de 2,43 (figura 16b).

La clase derivada de los mixogramas, presentó valores mayores al umbral en casi todo el intervalo, con un pico de LOD de 2,66 a 12 cM de *Glu-B3* (figura 16b). Este QTL explicó un 20,5% de la varianza de este carácter (figura 17).

El tiempo de desarrollo y el área mixográfica no mostraron QTLs significativos dentro del intervalo analizado, y sólo mostraron alguna tendencia en la región de *Gli-3B* (Figura 16b) coincidiendo con los análisis de varianza previos.

Discusión

Factores que influyen sobre la calidad panadera

El contenido proteico

La influencia del contenido proteico en los parámetros de calidad panadera tiene larga data (Finney y Barmore, 1948; Bushuk et al, 1969). La pendiente de la recta de ajuste de la regresión de la calidad sobre el contenido proteico ha sido tomado como un indicador de la calidad intrínseca de las proteínas del gluten de cada variedad (Finney y Barmore, 1948; Bushuk et al, 1969; Simmonds, 1989). La figura 8 muestra que la calidad panadera estimada por SDSS y contenido proteico guarda una relación positiva y significativa, tanto para CS como para K32. Sin embargo, la pendiente que presenta K32 es significativamente mayor que la de CS. Asimismo, la calidad panadera de K32 es siempre mayor que la de CS a igual tenor proteico. Estos hechos estarían determinando que tomadas en conjunto, las proteínas de reserva de K32 presentan mejores propiedades reológicas que las de CS. La variación en el contenido proteico de los genotipos parentales es adjudicable a la posición de las distintas repeticiones en el lote del ensayo, ya que el tiempo a floración para ambos genotipos fue similar. Sin embargo fue detectada mayor variación en la cantidad relativa de proteínas de reserva en CS que en K32 (figura 8). Esto evidenció una marcada interacción genotipo-ambiente. Klein 32 presenta una mayor estabilidad en su contenido proteico con una alta calidad panadera, mientras que CS muestra una mayor influencia del ambiente sobre la acumulación de proteínas, y por consiguiente sobre su calidad panadera.

En el análisis de la población derivada de K32 y CS, pueden observarse también asociaciones positivas y significativas con los métodos de sedimentación en SDS y en ácido acético (tabla 4).

Por otro lado los parámetros mixográficos estudiados, si bien el tiempo de desarrollo presenta una asociación significativa, parecen estar menos influenciados por la concentración de proteínas. Esto puede responder a que en estas determinaciones de mayor complejidad, entren en juego otros factores como la actividad α -amilasa endógena o la textura de los gránulos de almidón dentro de la matriz proteica (Blackman y Payne, 1987)

Khan et al. (1989) y Graybosch et al (1996) reportaron resultados similares. Los primeros encontraron una alta asociación entre el contenido relativo de proteínas y el volumen de pan ($r=0,67$, $p<0,01$) en un grupo de 44 variedades de buena calidad panadera, mientras que los segundos reportaron correlaciones entre el contenido relativo de proteínas y los valores SDSS en un grupo de 30 líneas de $r=0,48$ ($p<0,01$). Ambos trabajos encontraron relaciones negativas entre el contenido proteico y el tiempo de desarrollo ($-0,15$ y $-0,23$, respectivamente) aunque estos valores no fueron estadísticamente significativos, talvez debido al bajo número de muestras analizadas. Sin embargo, Quick y Donnelly (1980) no encontraron asociaciones significativas entre el contenido relativo de proteínas con SDSS y la clase mixográfica en *Triticum durum*.

Días de siembra a floración

El cultivo de trigo incorpora la mayor cantidad de nitrógeno en el período que va de emergencia a floración. La acumulación y depósito de hidratos de carbono en los granos depende altamente de las condiciones durante el llenado de los mismos. De esta manera, condiciones de postfloración que favorezcan un período largo de llenado (i.e. temperaturas moderadas, ausencia de enfermedades foliares y particularmente buena disponibilidad hídrica) determinarán un bajo contenido relativo de proteínas; mientras que condiciones opuestas tendrán como consecuencia un alto tenor proteico (Slafer et al., 1990).

Si bien se ha mencionado que la calidad panadera está relacionada con el tenor proteico, un menor período de llenado de granos (con una mayor contenido relativo de proteínas) no determina *per se* alta calidad.

Estudios pioneros de Mangels (1925) determinaron que las condiciones climáticas que producen trigo de alto contenido proteico, no producen gluten de alta calidad. Esto se debe a que la síntesis de proteínas en los granos de trigo produce en primer orden las proteínas metabólicas (albúminas y globulinas) más simples y luego las más complejas proteínas de reserva (gliadinas y gluteninas) (Gupta et al., 1996) siendo estas últimas las responsables de la calidad panadera.

CS y K32 presentaron igual período a floración lo que determina que las condiciones ambientales para el llenado de los granos fueron las mismas para ambos genotipos. Sin embargo, las familias F2:3 al presentar un rango de variación entre 83 y 111 días, estuvieron sometidas a períodos postfloración de características diversas. Los valores de regresión tanto del contenido proteico como de la calidad estimada por SDSS estuvieron

asociados significativamente con los días a floración ($r=0,41$ $p \leq 0,001$; $r=0,38$ $p \leq 0,001$; para proteínas y SDSS respectivamente). Como era esperado, el contenido de proteínas estuvo positivamente asociado a la cantidad de días a floración (figura 11a), ya que esto determinó que el llenado de los granos se produjera bajo temperaturas mayores. Las altas temperaturas provocaron un acortamiento en el período de acumulación de carbohidratos que resultaron en un mayor contenido proteico relativo. Sin embargo, los valores de calidad panadera estuvieron también positivamente asociados al período a floración. Esto puede deberse a que el acortamiento del período de llenado no fue lo suficientemente severo para alterar o interrumpir la síntesis de proteínas de reserva. El hecho de haber asegurado la disponibilidad de agua mediante riego y que las temperaturas medias y máximas medias de noviembre y diciembre de 1993 (donde se produjo el llenado de grano de la mayoría de las familias F2:3) hayan sido menores al promedio de las series 1971/80 y 1981/90 puede haber influenciado favorablemente en este sentido. (anexo A)

Como ya ha sido mencionado el contenido proteico relativo incide positivamente sobre la calidad panadera. Con el objeto de analizar el efecto de los días a floración sobre la calidad de proteínas independientemente de la cantidad, se realizó un análisis de los residuales de SDSS sobre el contenido proteico en función de los días a floración. La figura 11b muestra las curvas de regresión de SDSS en función al período de desarrollo de los granos. La curva superior indica la relación entre las variables sin modificación, mientras que la inferior representa los valores de SDSS una vez removidos los efectos del tenor de proteínas. La ausencia de una relación definida en la curva de residuales

sugiere que el efecto de los días a floración sobre la calidad panadera está determinada, en este caso, mayoritariamente a través de su efecto en el contenido proteico (figura 11a). Esto refuerza la idea de que las temperaturas que ocurrieron durante los diferentes períodos de llenado de grano, no afectaron de manera sensible la síntesis de proteínas complejas asociadas con la calidad panadera. Estos datos coinciden con lo manifestado por Wrigley et al. (1994) quienes observaron una asociación positiva entre la calidad panadera y la temperatura durante el llenado de grano cuando ésta variaba dentro de límites moderados (15 a 35°C) en ausencia de stresses térmicos severos, mediando en esta asociación el contenido relativo de proteínas.

De esta manera, la variación observada en las familias F2:3 fue independiente del período a floración y estuvo relacionada con el tenor proteico y con el tipo de proteínas de reserva (gliadinas y gluteninas de bajo peso molecular) presentes en CS y K32. El efecto de la cantidad de proteínas sobre la calidad puede ser removido mediante el uso de los residuales de la función que relaciona a ambas variables.

Distintos métodos de evaluación de calidad

Tres métodos de estimación de la calidad panadera fueron utilizados: Sedimentación en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDSS) (Axford et al., 1979); sedimentación en ácido acético (SAc) y mixogramas. Mientras que los métodos de sedimentación producen sólo el valor de volumen sedimentado, los mixogramas permiten un análisis mayor de sus resultados. En este estudio se evaluaron el tiempo de desarrollo, el tipo de curva presentado por los mixogramas y el área debajo de esa curva. El

primer parámetro refleja la resistencia de la masa al amasado mecánico inicial (resistencia a la extensión). La tipo de curva trata de integrar el tiempo de desarrollo con la parte decreciente de la curva (aflojamiento de la masa, o estabilidad) y la altura general de la curva (extensibilidad). El área debajo de la curva es una manera global de analizar los mismos factores que analiza el tipo de curva.

Los valores de calidad panadera estimados mediante SDSS y mixogramas presentaron diferencias significativas entre los genotipos parentales (figura 6). Los datos presentados por las familias segregantes fueron transgresivos con respecto a los de los padres. Por ejemplo, los valores de SDSS fueron de 9,72 ml para CS y de 13,44 ml para K32 (promedio de 36 repeticiones c/u), mientras que las familias F2:3 variaron entre 7,13 y 16,25 ml (figura 6). La consistencia en estos datos sugiere la existencia de factores de CS que pueden mejorar la calidad panadera de K32. La importancia de este hecho se realza ya que las diferencias en calidad entre esos genotipos no pueden ser atribuidas a diferencias en el contenido proteico (CS presenta valores levemente mayores a K32) ni a su composición en gluteninas de alto peso molecular, ya que ambos cultivares poseen la mismas subunidades (Feingold, 1993).

Marcadores moleculares

Polimorfismos y diferencias genéticas

El trigo cultivado (*Triticum aestivum* L.) es una especie alohexaploide que consiste en tres genomas homeólogos: A B y D. La alta homología de secuencia que presentan los cromosomas homeólogos, determina que las sondas de RFLP detecten secuencias complementarias a través de

genomas. Cada sonda, por lo tanto, tiene la posibilidad de detectar diferencias en los cromosomas de los genomas A, B ó D.

Trece de las 35 sondas utilizadas (37%) revelaron polimorfismos entre K32 y CS con al menos una de las enzimas de restricción utilizadas.

Este porcentaje contrasta con el de otros trabajos donde se encontraron menores valores. Liu et al. (1990) encontraron que sólo el 20% de las sondas ensayadas detectaban RFLPs. En el presente trabajo, sólo se utilizaron sondas localizadas en los cromosomas homeólogos de los grupos 1 y 6, y esta preselección puede estar influyendo en el alto nivel de polimorfismos encontrados.

Diez de los 18 SSRs estudiados (56%) detectaron polimorfismos entre K32 y CS. El mayor poder de detección de polimorfismos mediante el uso de microsatélites coincide con el reportado en soja (Akkaya et al., 1992), arroz (Wu y Tanksley, 1993) y trigo (Roder et al., 1995). Roder et al. (1995) encontraron que sólo uno de 15 microsatélites no detectó polimorfismos a través de 12 líneas de trigo, presentando un índice de polimorfismo de 0,54 y un número medio de alelos de 3,2. Las mismas líneas evaluadas con 14 sondas de RFLP presentaron un polimorfismo significativamente menor (índice de polimorfismo menor a 0,30).

De las 6 sondas que revelaron polimorfismos en el brazo corto de los cromosomas homeólogos del grupo 1, sólo una de ellas (Ksu E18) detectó polimorfismo en el genoma D. Ninguna pudo detectarlos en el genoma A y todas ellas lo hicieron en el genoma B. Análogamente, de las cuatro sondas pertenecientes al brazo largo del grupo 1, sólo una detectó diferencias en el 1AL, ninguna en el 1DL y tres en el 1BL. Estos resultados permiten inferir que CS y K32 presentan una alta homología

de secuencia (sitios de corte conservados) tanto en el cromosoma 1A como en el 1D. Sin embargo, mayores diferencias pueden atribuirse a cromosoma 1B.

De los cromosomas homeólogos del grupo 6, un bajo nivel de polimorfismo pudo atribuirse al genoma D, ya que ninguna de las tres sondas que presentaron polimorfismos detectaron RFLPs en el cromosoma 6D. Sin embargo, no ocurrió lo mismo para el cromosoma 6A, que presentó polimorfismos con las tres sondas, mientras que un RFLP pudo ser detectado en el 6B.

Los microsatélites, a diferencia de los RFLPs, son específicos para cada genoma (tabla 3) debido a la variabilidad de las secuencias flanqueantes a los microsatélites. Los tres microsatélites específicos del cromosoma 1B utilizados detectaron polimorfismos en el número de repeticiones. Sólo tres de los cinco microsatélites del 1A presentaron polimorfismos y el único del 1D fue monomórfico.

De la misma manera, todos los microsatélites del cromosoma 6A resultaron polimórficos, mientras que sólo uno fue polimórfico para los cromosomas 6B y 6D.

Estos resultados coinciden con los presentados con RFLPs, ya que evidencian mayores diferencias a nivel secuencia entre K32 y CS en los cromosomas 1B y 6A. Ambos tipos de marcadores exploran un distinto tipo de polimorfismo, ya que los RFLPs evidencian cambios en la distancia entre secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción del ADN, mientras que los microsatélites detectan cambios en la longitud de unidades de repetición de motivos simples. Por lo tanto, las conclusiones derivadas de los resultados son complementarias.

La falta de polimorfismo en el genoma D, ha sido observada también por otros autores (Chao et al., 1989; Liu y Tsunewaki, 1991). Cadalen et al. (1997) encontraron que en un mapa generado a partir de una población de doble haploides proveniente de un cruzamiento de CS por Courtot, sólo el 12% de los marcadores estuvieron localizados en el genoma D, cubriendo el 8% del total del mapa. Por otro lado, datos extraídos de Korzun et al. (1997) sobre 45 microsatélites, evidenciaron que 5 de 13 marcadores correspondientes al genoma D resultaron monomórficos en líneas de sustitución "Capelle-Desprez (Bezostaya 1)", mientras que la proporción de microsatélites monomórficos de los genomas A y B fue sensiblemente menor (1/14 y 4/18, respectivamente). Estos resultados apoyan lo sostenido por Lagudah et al. (1991) que adjudicaron la falta de polimorfismo en el genoma D a la reciente incorporación del mismo (constituyendo al trigo hexaploide) a partir de una fuente de variabilidad restringida (monofilética). Es importante destacar que los genotipos utilizados fueron seleccionados por presentar igual composición en las gluteninas de alto peso molecular (HMW gluteninas). Estas proteínas están codificadas en los brazos largos de los cromosomas homeólogos del grupo 1 (Lawrence y Sheperd, 1981) y la composición alélica de ambos genotipos para las HMW gluteninas es de los siguientes alelos: nulo en el 1A, 7+8 en el 1B y 2+12 en el 1D. Por este motivo no resultó sorprendente no encontrar polimorfismos en el brazo largo del cromosoma 1D. Sin embargo, tanto en el cromosoma 1A como en el 1B, se detectaron variaciones a nivel del ADN en la región de locus *XGlu* (con la sonda pDY10A/KS- en el 1B y la sonda wg983 y el microsatélite cni5 en el 1A). Estos polimorfismos

indican el mayor poder de detección que presentan los marcadores moleculares sobre los proteicos, ya que pueden evidenciar variaciones en la secuencia nucleotídica en la vecindad del gen y que no se ven reflejadas en los productos de traducción génica, o que pueden haber ocurrido a través de variaciones en secuencias no codificantes del gen (intrones, o regiones flanqueantes no reguladoras) o mutaciones neutras a través de cambios en codones redundantes para el mismo aminoácido.

Segregación

Más del 80% de los marcadores polimorficos presentaron la segregación mendeliana esperada (1:2:1 para los codominantes y 3:1 para el dominante).

Cuatro de los marcadores (20%) presentaron segregación distorsionada ($p < 0,02$) (tabla 5). resultados similares han sido reportados en trigo y en otros cultivos. Liu y Tsunewaki (1991) encontraron que un 10% de RFLPs no se ajustaban a una segregación mendeliana, mientras que Brummer et al. (1993) mostraron que el 48% de los marcadores ensayados en un cruzamiento interespecífico de alfalfa se encontraban en las mismas condiciones.

La segregación distorsionada puede responder a errores en el muestreo, a datos perdidos (Heun et al., 1991), o a una selección involuntaria durante la construcción de la población segregante, causada por una selección gamética preferencial (Grant et al., 1975).

Cadalen et al. (1997) encontraron una segregación distorsionada del marcador psr8-6B, en una población de doble haploides derivada de CS y Courtot. Sin embargo, en este trabajo, la causa puede estar dada por el

número de plantas evaluadas con genotipos "C" y "D". El test de χ^2 -cuadrado no toma en cuenta estos valores. Probabilísticamente, del total de las plantas catalogadas como "C" (no A), la proporción esperada de heterocigotas es de 2/3 y de homocigotas "B" es de 1/3. Si se distribuyen los individuos C, utilizando este criterio, en las clases B y H, se reestablece una segregación mendeliana (28:54:28). Como confirmación de esta hipótesis, cuando el marcador se evaluó como dominante (presencia vs. ausencia de la banda de CS) la segregación no se apartó significativamente de la relación 3:1 esperada.

EL marcador del locus *XGli-A2*, presentó una desviación significativa de la segregación esperada. La evaluación de este marcador presentó dificultades y el número total de individuos con genotipo cierto fue bajo (59). Sin embargo, Felix et al. (1996), analizando una población de 206 individuos doble haploides encontraron una segregación distinta a la esperada para este mismo locus, sugiriendo que este marcador proteico estuvo asociado a la eficiencia de producción de embriones durante la androgénesis *in vitro*.

Los marcadores psp3151 y psp 3139 no presentaron genotipos C o D, y la captura de datos no presentó problema alguno. Aunque estos dos marcadores presentan un tipo de distorsión de segregación similar (baja cantidad de genotipos homocigotas CS), no se encuentran ligados entre sí. Otros autores han encontrado regiones cromosómicas con segregación distorsionada en cebada (Heun et al., 1991), *Brassica napus* (Landry et al., 1991) y poroto (Vallejos et al., 1992) entre otros. Estas regiones han sido asociadas a selecciones involuntarias dadas por la presencia de *loci* de autoincompatibilidad (Gebhart et al., 1991; Pillen et al., 1992).

Otra posibilidad es la ocurrencia de una selección en la generación de la población segregante. El avance de la filial 2 fue realizado en verano en un invernáculo refrigerado, donde no es de descartar que se hayan registrado temperaturas mayores a las que ocurren en el período normal de crecimiento del trigo, y bajo un régimen de fotoperíodo distinto. . Aunque tanto CS como K32 aparecen como poco sensibles a la duración del día cuando son cultivados en épocas normales de siembra, y presentan un período a floración similar; se encontró que las familias F2:3 presentaban segregación para este carácter y se evidenciaron familias que debido a su tardía floración no llegaron a producir grano. El mapeo comparativo en cereales (trigo, cebada, centeno) muestra que el orden de los marcadores está conservado a través de segmentos de cromosomas homeólogos (Devos et al., 1993), esto permite construir un mapa de los cereales en los cuales los cromosomas de los tres genomas del trigo (A, B y D) se alinean con los de cebada (H) y centeno (R). Este hecho permite localizar QTLs en cebada (diploide) e inferir su localización en el trigo hexaploide. Bezant et al. (1996) localizaron regiones que afectan significativamente el período a floración en cebada en los cromosomas 1H y 6H entre otros. Anteriormente, Takahashi y Yahuda (1971) identificaron genes de respuesta a la vernalización en cebada en los cromosomas 1H, 4H y 5H. Sin embargo, si bien la localización de genes en los cromosomas 4H y 5H fueron descritas posteriormente en cebada (Laurie et al., 1995; Bezant et al., 1996) y el cromosoma 5A de trigo (Korzun et al., 1997; Galiba et al., 1995) no ocurrió lo mismo para el cromosoma homeólogo 1. Asimismo, regiones que afectan al período a floración independientemente de las condiciones ambientales (genes de precocidad *per se*) fueron identificadas por Laurie et al. (1995) en el cromosoma 6 de cebada. Coincidentemente Bezant et al. (1996) localizaron un QTL afectando días a floración en la misma región.

Por lo tanto, la existencia de genes que regulen tiempo a floración o respuesta a la vernalización en los cromosomas homeólogos 1 y 6 puede ser la causa de la segregación distorsionada de los marcadores psp3151 (1A) y psp3139 (6A).

Esta posibilidad está apoyada por el hecho de que la población F2:3 presentó una gran variación en el carácter de días a floración aunque los padres no difirieron en este carácter. Esto indica que el tiempo a floración de K32 y CS puede estar determinado por distintos genes cuyos alelos al combinarse producen la variación observada en la población segregante y que haya ocurrido una selección en contra de los genotipos más tardíos.

Más aún, el marcador psp3139, localizado en el brazo cromosómico 6BS presentó una asociación altamente significativa ($P < 0,01$) con los días a floración cuando se realizó un análisis de varianza entre todos los marcadores y este carácter fenotípico, concordando con lo encontrado por Bezant et al. (1996) en cebada. La mayor cantidad de días a floración estuvo asociada con la presencia del alelo de K32 (tabla 8)

Este marcador por sí solo pudo explicar el 8% de la varianza total. Sin embargo, la segregación está distorsionada en favor de la presencia de genotipos heterocigotas y en detrimento, principalmente de genotipos homocigotas CS, cuyos alelos estarían asociado a periodos a floración menores. Una explicación posible a esta aparente contradicción sería que CS posee alelos en esa región que determinan requerimientos de vernalización. Estos alelos se habrían seleccionado en contra en la población F2 (realizada fuera de época) al no florecer las plantas homocigotas CS. Esta posibilidad está sustentada por la observación de plantas en estado vegetativo durante la cosecha de las plantas F2.

Estas evidencias sugieren la existencia de regiones de los cromosomas homeólogos 1 y 6 relacionadas con efectos sobre la fenología del cultivo de trigo y permiten suponer la ocurrencia de una selección involuntaria durante la generación de la población causando distorsión en la segregación esperada.

El mapa genético

El mapa logrado a través del análisis de los resultados de segregación de los marcadores polimórficos en la población $F_{2:3}$ proveniente del cruzamiento de CS y K32 abarca 167 cM distribuidos en 5 grupos de ligamiento (considerando el perteneciente a 6BS) más 4 marcadores no ligados, dos localizados en el 1BL, uno en el 1DS y uno en el 6DS.

La utilización de líneas ditelocéntricas de CS (Sears y Sears, 1979) y la localización de algunos marcadores en otros mapas más completos (Stephenson et al., 1998; Dubcovsky et al., 1995; Cadalen et al., 1997 y Marino et al., 1996) han permitido construir la figura 15.

De esta manera se ha intentado cubrir las regiones cromosómicas en las cuales están codificados los genes de proteínas de reserva que han sido asociados previamente a la calidad panadera (Payne et al., 1979; 1981; Campbell et al., 1987; Metakovsky et al., 1990; Gupta et al., 1989)

No se han encontrado polimorfismos para los marcadores ensayados con homología con regiones de los brazos cromosómicos 1AS y 1DL. El brazo 1DL posee los loci que codifican para gluteninas de alto peso molecular (Lawrence y Shepherd, 1981; Payne et al., 1982) y el 1AS posee los loci complejos de gliadinas y LMW gluteninas (Vasil y Anderson, 1997)

La falta de asociación entre los marcadores HMW y psp3100, ambos localizados mediante análisis de líneas aneuploides en el brazo cromosómico 1BL, puede estar explicado por la longitud de este segmento. La longitud del brazo 1BL es de aprox. 100cM (Cadalen et al., 1997). El marcador psp 3100 está localizado en la zona distal del mismo (Stephenson et al., 1997) y el locus de HMW está localizado proximal al

centrómero (Payne et al., 1982), por lo que se deduce que ambos están a una distancia de recombinación mayor a 50cM.

Los loci *Glu-3B* y *Gli-1B* se encontraron ligados a una distancia de 1,5cM, distancia similar a la encontrada por otros autores: 1,7cM (Singh y Shepherd, 1988); 2,6cM (Khelifi y Branlard, 1994); mientras que otros encontraron a estos loci completamente ligados (Cadalen et al., 1997). El orden de los marcadores dentro de los grupos de ligamiento ha sido establecido según la recombinación existente entre los mismos a través de los individuos de la población segregante, y convertida a distancia en centimorgans (cM) mediante la función de Haldane (1919).

Cuando dos marcadores presentan un estrecho grado de ligamiento, el orden relativo de los mismos dentro del grupo de ligamiento no provoca grandes variaciones en valor del logaritmo de máxima verosimilitud. Esto es, los dos órdenes alternativos son igualmente probables estadísticamente para haber generado una población como la de estudio.

Los loci *XksuE18* y *Xbcd98* se encuentran a una distancia de 2,3 cM mientras que 1,5 cM separan a *Glu-3B* de *Gli-1B*. En este caso, dos pares de marcadores estrechamente ligados generan cuatro mapas posibles, a través de la permutación de estos marcadores. (tabla 6)

Los valores de la tabla 6 son relativos al mejor orden de marcadores de manera que los ordenes alternativos siguientes surgen de la resta de éstos con respecto al orden de mayor (menos negativo) logaritmo de verosimilitud. Un valor de verosimilitud de -1, indica que el orden es 10 veces menos probable que el mejor orden, al que se le asigna valor cero (Lincoln et al., 1992a). De esta manera, la inversión del orden entre los loci *XksuE18* y *Xbcd98* en el extremo proximal del 1BS es 3 veces menos

probable que la que figura en el mapa (tabla 6 y figura 15) mientras que el orden alternativo de *Glu-3B* y *Gli-1B* es 10 veces menos probable (tabla 6 y figura 15). En términos estadísticos estas diferencias no son significativas, sin embargo, el orden más probable encontrado en este mapa coincide con otros mapas publicados.

El tamaño de la población analizada influye en estos valores, ya que el orden relativo entre dos marcadores se establece en base a eventos de entrecruzamiento entre ellos, y ésta posibilidad aumenta con el número de individuos analizados.

Asociación entre marcadores y calidad

Contenido relativo de proteínas

Ninguno de los marcadores estudiados presentaron asociación con el contenido proteico relativo. Estudios realizados en trigo duro han reportado QTLs para este carácter localizados en los cromosomas 6AS y 6BS entre otros (Blanco et al., 1996), y cercano al centrómero del 6B (Joppa et al., 1997). Estos trabajos partieron de cruzamientos intervarietales de *durum por dicoccoides*, y el mayor contenido proteico estuvo asociado a los alelos de *dicoccoides*, uno de los progenitores del trigo hexaploide. Krugman et al. (1997) reportaron colinearidad entre los cromosomas 6B de *Triticum aestivum* L. y *T.dicoccoides* Körn, por lo cual es posible inferir la presencia de gen/es (QTLs) que afecten el contenido proteico en esta región del genoma del trigo pan. La falta de asociación de los marcadores del cromosoma 6 puede estar dada por la falta de variabilidad alélica entre K32 y CS.

Calidad panadera

Como se ha mencionado, las subunidades de gluteninas de alto peso molecular de K32 y CS presentaron en trabajos previos idéntico patrón electroforético en una y dos dimensiones (Feingold, 1993). A partir de estos resultados se asumió que ambos genotipos poseen los mismos alelos para estos loci. Sin embargo, se encontraron polimorfismos entre ambos padres con sondas de RFLP y microsatélites de los cromosomas 1AL y 1BL (figura 15), dado el mayor poder de detección de estos marcadores moleculares sobre los proteicos. Ninguno de estas regiones mostró asociación alguna con los parámetros de calidad (tabla 7), lo que permite asegurar que la diferencia en calidad panadera evidenciada por ambos genotipos no se debe a diferencias en su composición de gluteninas de alto peso molecular, las cuales pudieron explicar más de la mitad de la variación en calidad de un conjunto de variedades inglesas (Payne et al., 1987) y alemanas (Rogers et al., 1989).

Existe un marcado efecto de asociación del brazo corto del cromosoma 1B a través de las distintas determinaciones de calidad panadera. Asociaciones estadísticamente significativas fueron encontradas entre marcadores de este brazo cromosómico con los valores de sedimentación por SDS y las modificaciones del mismo ($SDSS_{corr}$ y $SDSS_{res}$). Estas últimas mostraron incrementos en los valores de F del ANOVA (tabla 7), y los mayores valores fueron encontrados con la inclusión del contenido relativo de proteínas con la calidad panadera estimada por SDSS. Entre el 7% y el 9% de la variación observada en los valores de SDSS fueron explicados por los marcadores del cromosoma 1BS. Este porcentaje varió entre el 9% y el 13% cuando se corrigieron los valores de SDSS por la posición en el campo ($SDSS_{corr}$) y entre el 10% y 16% para $SDSS_{res}$.

Esto evidencia que las modificaciones de los valores de SDSS en función de su posición en el ensayo ($SDSS_{corr}$), resulta una aproximación a la utilización del contenido proteico como covariante. La variabilidad en el contenido proteico observada para cada uno de los genotipos parentales según su localización en el lote del ensayo (figura10) refuerza esta idea. Consecuentemente, esta región también resultó asociada a la calidad panadera estimada por la prueba de sedimentación en ácido acético y por los parámetros mixográficos, cuyos valores mayores fueron 11% para TD, 14% para clase y 9% para área. Si se asume que el 10% de varianza de la clase mixográfica explicada por el locus *XksuE19* es independiente al locus complejo *Gli-B1/Glu-B3*, como sugiere el mapeo de intervalo, entonces todo el segmento cromosómico explicaría más del 20% de la variación en este carácter.

En el brazo corto del cromosoma 1B están localizados los genes que codifican para las gluteninas LMW (Shepherd, 1988) y las gliadinas γ y ω (Jackson et al., 1983 ; Lafiandra et al., 1984).

Las primeras evidencias de asociación entre características de calidad y loci de γ gliadinas reportadas por Damidaux et al. (1978) en trigo tetraploide. Posteriormente, sin embargo, este efecto fue adjudicado a las gluteninas de bajo peso molecular ligadas a las gliadinas (Payne et al., 1984a; Pogna et al., 1988 y 1990).

En trigo pan, Nieto-Taladriz et al. (1994) encontraron efectos asociados a la variación alélica en los loci *Gli-B1/ Glu-B3* para los parámetros reológicos de tenacidad (T), extensibilidad (L) y fuerza de la masa (W) de las pruebas alveográficas, explicando el 10%, 3% y 8% de T, L y W, respectivamente. Asimismo, variaciones en los loci homeólogos de los

cromosomas 1A y 1D no tuvieron influencia significativa en estos parámetros. Estos resultados coinciden con lo presentado en este trabajo y con reportes de Sozinov y Popereya (1980). Asimismo, Gupta et al. (1994) encontraron que las proteínas codificadas en el brazo cromosómico 1BS presentaban mayor importancia que las de los brazos cromosómicos 1AS y 1DS.

Un estudio previo independiente a éste (Feingold, 1993), permitió detectar efectos positivos en la sustitución de los cromosomas 1B y 1D de CS por los de K32 en un fondo genético heterogéneo (75% CS; 25% K32), coincidiendo asimismo con los resultados presentados para el cromosoma 1BS. Sin embargo, no pudieron detectarse efectos del 1D en este estudio, posiblemente por la falta de polimorfismo en esa región cromosómica. Por otro lado, Benedetelli et al. (1991) encontraron efectos significativos de la variación alélica en los loci *Gli-B1* y *Gli-D1*, sobre la calidad panadera estimada por SDSS en una población F4 proveniente de un cruzamiento de las variedades Wichita y Cheyenne. Sin embargo, los mayores efectos estuvieron asociados al locus *Gli-D1*. Generalmente, se han identificado a las LMW gluteninas como responsables de los efectos de los loci *Gli-1/Glu-3* sobre la calidad panadera, por la posibilidad de formar puentes disulfuro inter e intramoleculares, mientras que las gliadinas ω y γ carecen de residuos azufrados y su contribución a la calidad panadera está menos clara. El alto grado de ligamiento existente entre los genes codificantes de estos grupos proteicos (Pogna et al., 1990; Metakovsky et al., 1990; este trabajo), y la superposición que presentan sus subunidades en

electroforesis unidimensionales ha influido en la dificultad para estudiar sus efectos por separado (Gupta et al., 1994). Sin embargo, *Gli-B1* pudo explicar mayor proporción de varianza en todos los parámetros de calidad que *Glu-B3* (tabla 7). Coincidentemente, Khelifi y Branlard (1992) encontraron efectos de los loci *Gli-1* y *Glu-3* sobre la calidad panadera, y a partir de la frecuencia de recombinación encontrada entre ambos loci pudieron identificar efectos de las gliadinas independientemente de las LMW gluteninas. El locus *Xpsr8 (Cxp3)*, localizado en el brazo cromosómico 6AS, resultó significativamente asociado a la calidad panadera. Los mayores valores de calidad estuvieron asociados a la presencia de los alelos de CS, y explicaron el 8% y 10% de la variación en SDSS y SAc, respectivamente. Variaciones en la región del 6AS no se presentaron asociadas a los parámetros mixográficos, y la dependencia con el contenido proteico no fue significativa (clase y área) o muy baja (tiempo de desarrollo), evidenciando que en estas pruebas de mayor complejidad tienen influencia otros componentes como lípidos, o hidratos de carbono. Asimismo, la inclusión del contenido relativo de proteínas como covariable aumentó sólo levemente la proporción de varianza explicada de SDSS (tabla 8).

Llama la atención, sin embargo, la asociación marginal del locus *Gli-A2* a los parámetros de calidad panadera. Este locus fue encontrado ligado a *Xpsr8 (Cxp3)* a una distancia de 1,9cM (Cadalen et al., 1997) y de 15cM, Marino et al. (1996), las que son significativamente mayores a la encontrada en este estudio (figura 15). La dificultad en la evaluación de los datos de la sonda pT1 y el consiguiente bajo número de individuos

que pudieron analizarse sugieren que la distancia entre estos loci puede estar afectada por errores en las determinación genotípica de los individuos, y que *Xpsr8 (Cxp3)* (cuya evaluación fue más clara) está evidenciando el efectos de las proteínas coificadas en *Gli-A2*.

La importancia del cromosoma 6A de CS fue evidenciada en el estudio mencionado previamente (Feingold, 1993), donde la presencia del cromosoma 6A de CS, en sustitución del de K32 incrementó los valores de sedimentación en SDS en más de un 50%.

Asimismo, Rogers et al. (1990) usando aneuploides de CS encontraron efectos importantes sobre la calidad panadera estimada por SDSS en los cromosomas del grupo 6 y el mayor efecto fue adjudicado al 6A.

Coincidentemente, Metakovsky et al (1990) encontraron relaciones significativas entre gliadinas del 6A y la resistencia al amasado (R_{max}) utilizando el extensógrafo de Brabender, mientras que la extensibilidad fue asociada a variación alélica en el 6B y 6D.

El rol de las gliadinas en la calidad panadera no está del todo claro. Fido et al.(1997) postularon que la hidrofobicidad de las distintas fracciones de gliadinas podrían influenciar los parámetros reológicos, siendo las más hidrofóbicas, las más beneficiosas. Las gliadinas ω (de mayor hidrofobicidad) poseen secuencias repetidas y son ricas en glutaminas, lo que les permite formar puentes hidrógeno con el agua, otras proteínas, almidón y otros componentes de la masa. Estas características no son compartidas con las otras fracciones de gliadinas (α/β y γ). Sin embargo, no se sabe si existen variantes alélicas para estas proteínas que puedan explicar los efectos del 1BS, y estos

argumentos no sustentarían el efecto del 6AS que posee loci que codifican para las gliadinas α/β .

Existen evidencias que ciertas LMW gluteninas han evolucionado por mutación de gliadinas del brazo corto de los cromosomas homeólogos del grupo 1 (Metakovsky et al., 1997). El alto grado de ligamiento presentado por estos loci y similitudes a nivel de secuencia aminoacídica sustentan esta hipótesis donde la generación de aminoácidos azufrados posibilitó a las LMW gluteninas la formación de enlaces disulfuro (Tao y Kasarda, 1989; Lew et al., 1992).

Ruiz y Carrillo (1993) encontraron en el cromosoma 1B de trigo candeal, un locus no descrito previamente que codifica para una LMW glutenina (denominado posteriormente *Glu-B2*; Liu, 1995) ligado a un locus de gliadinas designado *Gli-B3* a 19 cM del complejo *Gli-B1/Glu-B3*, aunque posteriormente no encontraron efectos de este locus sobre la calidad para hacer pasta (Ruiz y Carrillo, 1996).

Coincidentemente, Metakovsky et al. (1997) encontraron un locus de una gliadina ω en el 1BS a 24cM del complejo *Gli-B1/Glu-B3* en *Triticum aestivum*. Estos autores sugieren nombrar a este locus *Gli-B3* en coincidencia con el locus de *Triticum durum* y postulan que esta proteína guarda identidad con las encontradas por en otros trabajos (B30: Galili y Feldman, 1984; #3; Metakovsky et al., 1986 y N6 Dachkevitch et al., 1993)

Estos resultados permiten inferir que la asociación del locus *XksuE19*, localizado a 27,5cM de *Glu-3* (figura 15), con los parámetros de calidad estudiados (tabla 7) puede deberse a la presencia de un locus que codifique para una gliadina ω o una LMW glutenina, generada por mutación

de la primera, como fuera postulado por Tao y Kasarda (1989) y Lew et al. (1992).

Recientemente, Metakovsky et al. (1997) encontraron una LMW glutenina localizada en el cromosoma 6B controlada por *Gli-2* (o por un locus fuertemente ligado), lo que plantea la duda si el locus *Xpsr8* (*Cxp3*), asociado a parámetros de calidad, no codificará para una LMW glutenina.

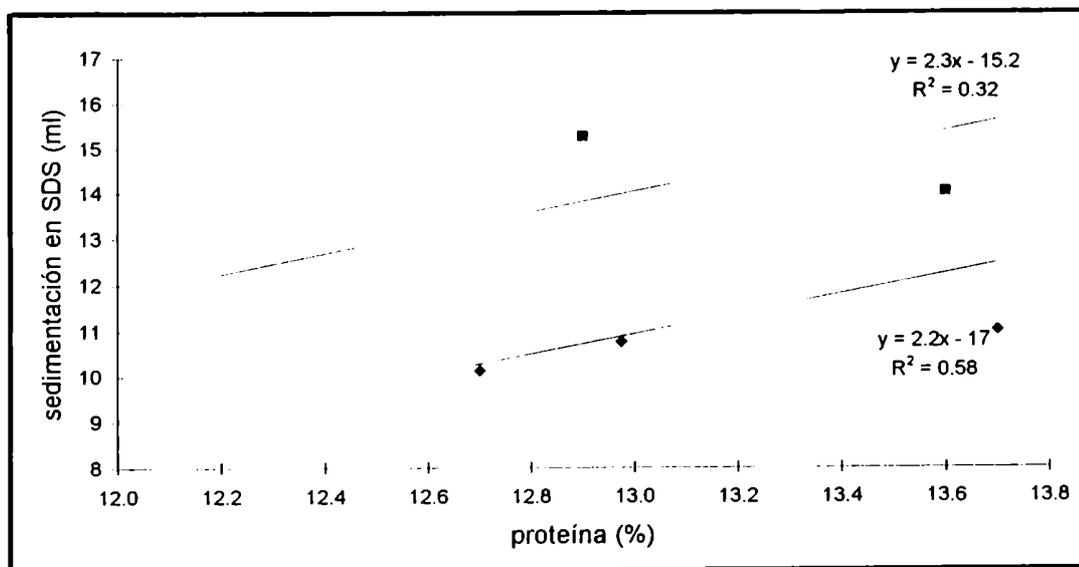
Efectos génicos

Los marcadores moleculares de los cromosomas 1BS y 6AS presentaron efectos alélicos mayoritariamente aditivos sobre la calidad panadera, indicando la ausencia de interacción entre alelos de un mismo locus. Algunos autores han resaltado la importancia de las interacciones entre gliadinas y gluteninas (Benedetelli et al., 1992) Nieto-Taladriz et al. (1994) encontraron que efectos significativos de interacción entre loci de gluteninas de alto peso molecular y el complejo gliadinas/LMW gluteninas. En particular, el 11% de la variación en tenacidad y el 10% de la de extensibilidad de las pruebas alveográficas pudieron ser explicadas por la interacción entre *Gli-B1* y *Gli-A1/Glu-A3*. Sin embargo, en este trabajo no se detectaron efectos de interacción entre las regiones del 1BS y del 6AS, y la variación alélica en estos loci explicó el 17% de la variación fenotípica observada en SDSS y el 22% de SDSSc. Si se toma en cuenta la proporción de varianza atribuida al contenido proteico relativo, el 60% de la varianza en la calidad estimada por SDSS pudo ser explicada conjuntamente por ésta y los marcadores moleculares.

La ocurrencia de efectos principalmente aditivos de los marcadores sobre los factores de calidad y la ausencia de interacción entre los marcadores de los cromosomas 1BS y 6AS permite suponer que la selección de los mejores alelos en ambas regiones es posible.

La figura 18 grafica la relación SDSS sobre el contenido proteico relativo para los individuos que presentaron los alelos más favorables en el 1BS (alelos K32) y 6A (alelos CS). Si bien el número de individuos en cada clase es bajo (responde a la proporción mendeliana esperada de 1/16), las curvas de ajuste presentan similar pendiente y distinta ordenada al origen, sugiriendo que la selección conjunta de estos alelos proporcionará aproximadamente una mejora del 30% en la calidad panadera estimada por SDSS a igualdad de contenido proteico.

Figura 18: Relación entre la calidad panadera estimada por sedimentación en SDS y el contenido proteico para genotipos con combinaciones de alelos favorables (■) y desfavorables (◆) en los cromosomas 1BS y 6AS.



Asimismo, los valores medios de los individuos de “peor” composición alélica fue de 10,6 ml, mientras que en los de “mejor” composición genética fue de 14,1 ml, implicando una mejora del 33%, coincidiendo con el modelo presentado en la figura 18.

Mapeo de intervalo

El análisis de los datos mediante el método de mapeo de intervalo permitió evidenciar mayores efectos sobre el carácter SDSS que los identificados por análisis de varianza, tomando a los marcadores individualmente.

Los valores de SDSS sin transformar presentaron un pico apenas sobre el valor crítico de LOD (LOD: 2) a 18 cM de *XGlu-B3*. Las modificaciones de este carácter, ya sean en función a su posición en el ensayo o al contenido proteico, determinaron una mayor significancia (mayores valores de LOD) en el intervalo descrito, en coincidencia con lo observado en los marcadores tomados por separado. La mayor proporción de varianza explicada por el segmento, confirma la relación del contenido proteico y la calidad panadera y sugiere que el tipo de proteínas codificadas en el mismo explican una proporción de varianza del carácter distinta del contenido proteico

Los mayores picos de LOD no se producen sobre los loci que codifican para las gluteninas de bajo peso molecular (*XGlu-B3*) y gliadinas (*XGli-B1*), sino que se localizan en el extremo izquierdo del gráfico (figura 16). Este efecto evidencia la influencia de *XksuE19* mencionada anteriormente.

Dada la baja densidad de marcadores en el intervalo analizado del cromosoma 1BS, no es posible diferenciar los efectos separados del complejo *Gli-B1/Glu-B3* y de *XksuE19*.

El método de mapeo de intervalo asume la presencia de sólo un QTL por intervalo. La presencia de más de un QTL en el mismo intervalo o de QTLs ligados puede manifestarse como un sólo QTL cuya localización y valor depende del efecto relativo de ambos QTLs y de la distancia de éstos a los marcadores utilizados. Este efecto puede dar lugar a la localización inexacta de un QTL y fue denominado QTL "fantasma" por Martínez y Curnow (1992). Más aún, dos QTLs ligados y de efectos opuestos pueden minimizar o anular la importancia de una región sobre una carácter fenotípico. Pogna et al. (1995) y Metakovsky et al. (1997) postulan que los loci de LMW gluteninas y de gliadinas están interdispersos en los brazos cortos de los cromosomas homeólogos del grupo 1, lo que complica el análisis genético de las LMW gluteninas y su efecto directo sobre la calidad. El trabajo aquí presentado no permite determinar si los efectos del 1BS de K32 sobre la calidad están debidos a las gliadinas o a las LMW gluteninas. Sin embargo, permite delimitar el estudio sobre esta región y la identificación y posterior mapeo de marcadores moleculares posibilitará un mayor entendimiento de las bases bioquímicas y genéticas de la calidad panadera.

Consideraciones finales y perspectivas futuras

Este estudio permitió identificar regiones en los brazos cortos de los cromosomas 1B y 6A de K32 y CS, respectivamente, asociadas positivamente a la calidad panadera. Asimismo, se comprobó la utilidad de los marcadores moleculares para el análisis de caracteres de herencia cuantitativa, permitiendo separar efectos asociados como la fenología del cultivo (tiempo a floración) y el contenido proteico relativo. Más del 60% de la variación observada en la calidad panadera pudo ser explicada a través del contenido proteico y de la variación alélica de las dos regiones mencionadas. De acuerdo a la figura 16, una mejora de aproximadamente 30% sobre la calidad panadera puede ser lograda mediante la selección conjunta de los alelos de efecto positivo de las regiones de los cromosomas 1BS y 6AS, para un mismo nivel de tenor proteico..

Se han propuesto diversas técnicas para ser utilizadas en planes de mejoramiento para seleccionar genotipos de mejor aptitud panadera, como la prueba de SDSS, electroforesis de proteínas de reserva, o técnicas de mayor complejidad como SE-HPLC, electroforesis capilar o ELISA con anticuerpos monoclonales.

Los marcadores moleculares presentaron ventajas sobre estos sistemas, ya que permitieron identificar regiones con efectos positivos en CS (de pobre calidad panadera), característica no detectable mediante SDSS.

Las LMW gluteninas presentan superposición con gliadinas contaminantes en electroforesis unidimensionales, que pueden resolverse mediante electroforesis en dos dimensiones. Mientras que las

gliadinas precisan sistemas especiales de separación en geles ácidos (A-PAGE). En todos estos casos, para detectar el producto de expresión de los genes que se quieren seleccionar, es necesario realizar la selección una vez cosechados los granos.

Los marcadores moleculares permiten la selección en etapas tempranas, ya que la detección de la presencia de las regiones de interés se realiza sobre el ADN. En el caso de los microsatélites, esta selección puede ser aún más temprana ya que la cantidad de ADN necesaria para su determinación es muy baja, al ser una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El alelo de K32 del locus *Gli-1B*, asociado a la calidad panadera, estuvo presente en un 7% de 110 líneas argentinas (Manifesto et al., 1996) y en ninguna de 80 líneas californianas analizadas en un estudio posterior (Dubcovsky et al., no publicado). Este hecho, permite suponer que la incorporación de esta región en nuevas variedades posibilitará un incremento en la calidad de los trigos argentinos actuales. Asimismo, sería interesante evaluar el efecto de esta región en un fondo genético diferente, ya que tanto CS como K32 presentan alelos de HMW gluteninas asociados negativamente con la calidad.

Este trabajo no permitió discernir cuál/es fracciones proteicas del locus complejo *Gli-B1/Glu-B3* son causales de los efectos observados sobre la calidad. Sin embargo, fueron identificados individuos que presentaron eventos de recombinación entre ambos loci. La utilización de tales individuos para generar poblaciones de estudio, podría responder a este interrogante.

Por otro lado, estudios a nivel proteico podrían ser realizados para determinar si el locus *XksuE19* del 1BS evidencia el efecto de una proteína de reserva ligada al mismo y/o si la región del 6AS de CS codifica para una gliadina o una LMW glutenina producida por mutación, como fuera postulado anteriormente.

Finalmente, el estudio de la calidad panadera con el uso de marcadores moleculares ha provisto de una herramienta de aplicación inmediata para la selección en planes de mejoramiento, y ha permitido también un mejor entendimiento de las bases genéticas y ambientales de tan importante y complejo carácter.



DR. H. E. HOPP



S. E. FEINGOLD

Bibliografía

- Akkaya, M., Bhagwat, A., & Cregan, P. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*(132), 1131-1139.
- Altpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V., & Vasil, I. (1996). Integration and expression of the high-molecular-weight subunit 1Ax1 gene into wheat. *Nature Biotechnology*, 14, 1155-1159.
- American Association of Cereal Chemistry (1983). Approved methods of the AACCC-Minneapolis, MN. EEUU No. -citado en Tombetta y Cuniberti, 1994-.
- Anderson, O., Greene, F., Yip, R., Halford, N., Shewry, P., & Malpica-Romero, J. (1989). Nucleotide sequences of the two high-molecular-weight glutenin genes from the D genome of hexaploid wheat, *Triticum aestivum* L. cv. Cheyenne. *Nucleic Acid Research*(17), 461-462.
- Anderson, O., Ogihara, Y., Sorrells, M., & Tanksley, S. (1992). Development of a chromosomal arm map for wheat based on RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*(83), 1035-1043.
- Andrews, J., & Skerritt, J. (1996). Wheat dough extensibility screening using a two-site enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with antibodies to low molecular weight subunits. *Cereal Chemistry*, 73(5), 650-657.
- Axford, D. W., McDermott, E. E., & Redman, D. G. (1979). Note on the sodium dodecyl sulfate test of breadmaking quality: Comparison with Pelshenke and Zeleny tests. *Cereal Chemistry*, 56(6), 582-584.
- Beckmann, J., & Soller, M. (1990). Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *BioTechnology*(8), 930-932.
- Benedettelli, S., Margiotta, B., Porceddu, E., Ciaffi, M., & Lafiandra, D. (1992). Effects of the lack of proteins controlled by genes at the *Gli-D1/Glu-D3* loci on the breadmaking quality of wheat. *Journal of Cereal Science*, 16, 69-79.
- Bezant, J., Laurie, D., Pratchett, N., Chojecki, J., & Kearsey, M. (1996). Marker regression mapping of QTL controlling flowering time and plant height in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Heredity*(77), 64-73.
- Bietz, J. A., & Wall, J. S. (1972). Wheat gluten subunits: Molecular weights determined by sodium dodecylsulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 49, 416-430.
- Blackman, J. A., & Payne, P. I. (1987). Grain Quality. In F. G. H. Lupton (Eds.), *Wheat breeding. Its scientific basis* (pp. 455-485). London: Chapman and Hall Ltd.
- Blanco, A., de Giovanni, C., Laddomada, B., Sciancalepore, A., Simeone, R., Devos, K., & Gale, M. (1996). Quantitative trait loci influencing grain protein content in tetraploid wheats. *Plant Breeding*(115), 310-316.
- Blechl, A., & Anderson, O. (1996). Expression of a novel high molecular weight glutenin subunit gene in transgenic wheat. *Nature Biotechnology*(14), 875-879.

- Blum, A., Bebi Simena, G. G., & Mayer, J. (1987). The grain quality of landraces of wheat as compared with modern cultivars. *Plant Breeding*, 99, 226-233.
- Branlard, G., & Dardevet, M. (1985). Diversity of grain proteins and bread wheat quality. I: Correlation between gliadin bands and flour quality characteristics. *Journal of cereal science*, 3, 329-344.
- Bretting, P., & Widrlechner (1995). Genetic markers and horticultural germplasm management. *HortScience*, 30(7), 1349-1356.
- Brummer, E., Bouton, J., & Kochert, G. (1993). Development of an RFLP map in diploid alfalfa. *Theoretical and Applied Genetics*(86), 329-332.
- Burnouf, T., & Bouriquet, R. (1980). Glutenin subunits of genetically related european hexaploid wheat cultivars: their relation to breadmaking quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 58, 107-111.
- Bushuk, W., Briggs, K., & Shebeski, L. (1969). Protein quality and quantity as factors in the evaluation of bread wheats. *Canadian Journal of of Plant Science*(49), 113-122.
- Cadalen, T., Boeuf, C., bernard, S., & bernard, M. (1997). An intervarietal molecular marker map in *Triticum aestivum* L. Em. Thell. and comparison with a map from a wide cross. *Theoretical and Applied Genetics*(94), 367-377.
- Campbell, W. P., Wrigley, C. W., Cressey, P. J., & Slack, C. R. (1987). Statistical correlations between quality attributes and grain protein composition for 71 hexaploid wheats used as breeding parents. *Cereal Chemistry*, 64(4), 293-299.
- Cassidy, B., & Dvorak, J. (1991). Molecular characterization of a low-molecular-weight glutenin cDNA clone from *Triticum durum*. *Theoretical and Applied Genetics*(81), 653-660.
- Chao, S., Sharp, P., Worland, A., Warham, E., Koebner, R., & Gale, M. (1989). RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*(78), 459-504.
- Chou, P. Y., & Fasman, G. D. (1978). Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. Citado por Flavell et al., 1989.
- Ciaffi, M., Dominici, L., Lafiandra, D., & Proccedu, E. (1992). Seed storage proteins of wild wheat progenitors and their relationships with technological properties. *Hereditas*, 116, 315-322.
- Cox, D., & Hinckley, D. (1974). *Theoretical Statistics* (1era edición ed.). Londres, Reino Unido.: Chapman y Hall.
- D'Ovidio, R., & Anderson, O. (1994). PCR analysis to distinguish alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. *Theoretical and Applied Genetics*(88), 759-763.

- D'Ovidio, R., Anderson, O., Masci, S., Skerritt, J., & Porceddu, E. (1997). Construction of novel wheat high-M_r glutenin subunit gene variability: Modification of the repetitive domain and expression in *E. coli*. *Journal of Cereal Science*(25), 1-8.
- D'Ovidio, R., Tanzarella, O., & Porceddu, E. (1992). Isolation of an alpha-type gliadin gene from *Triticum durum* Desf. and genetic polymorphism at the *Gli-2* loci. *Journal of genetic breeding*(46), 41-48.
- Dachkevitch, T., Redaelli, R., Biancardi, A., Metakovsky, E., & Pogna, N. (1993). Genetics of gliadins coded by the group-1 chromosomes in the high-quality bread wheat cultivar Neepawa. *Theoretical and Applied Genetics*(86), 389-399.
- Damidaux, R., Autran, J., Grignac, P., & Feillet, p. (1978). Evidence of relationships useful for breeding between the electrophoretic patterns of gliadins and the viscoelastic properties of the gluten in *Triticum durum* -citado en Liu et al., 1996-. *C.R.Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. D. Sci. Nat.*, 287, 701-704.
- Damidaux, R., Autran, J. C., & Feillet, P. (1980). Gliadin electrophoregrams and mesurement of gluten viscoelasticity in durum wheats. *Cereals Food World*, 25, 315-318.
- Devos, K., Bryan, G., Collins, A., Stephenson, P., & Gale, M. (1995). Aplication of two microsatellites sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*(90), 247-252.
- Devos, K., Millan, T., & Gale, M. (1993). Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye and barley. *Theoretical and Applied Genetics*(85), 784-792.
- Dimler, R. J. (1965). Exploring the structure of proteins in wheat gluten. *Baker's Dig.*, 39, 35-42.
- du Cros, D. L. (1987). Gluten proteins and gluten strength in durum wheat. *Journal of Cereal Science*, 5, 3-12.
- Dubcovsky, J., Luo, M., & Dvorak, J. (1995). Differentiation between homeologous chromosomes 1A of wheat and 1A^m of *Triticum monococcum* and its recognition by the wheat *Ph1* locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*(92), 6645-6649.
- Edwards, K., Barker, J., Daly, A., Jones, C., & Karp, A. (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellites sequences in plants. *BioTechniques*(20), 758-760.
- Falconer, D. (1989). *Introduction to quantitative genetics* (Third Edition ed.). New York: Wiley and Sons.
- Feingold, S. (1993) *Calidad Panadera en Trigos Argentinos: Su relación con las gluteninas de alto peso molecular y otras fracciones proteicas presentes en los granos. Magister Scientiae, Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires.*
- Felix, I., Martinant, J., Bernard, M., Bernard, S., & Branlard, G. (1996). Genetic characterization of storage protein in a set of F1-derived haploid lines in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*(92), 340-346.

- Fido, R., Békés, F., Gras, P., & Tatham, A. (1997). Effects of α -, β -, γ -, and ω -gliadins on the dough mixing properties of wheat flour. *Journal of Cereal Science*(26), 271-277.
- Finney, K., & Barmore, M. (1948). Loaf volume and protein content of hard winter and spring wheats. *Cereal Chemistry*, XXV(5), 291-312.
- Fischer, R., & Byerlee, D. (1991). Trends of wheat production in the warmer areas: Major issues and economic considerations. In D. Saunders (Ed.), *Wheat for non traditional warm areas*, (pp. 3-27). Foz do Iguacu, Brasil: CIMMYT, Mexico DF.
- Flavell, R., Goldsbrough, A., Robert, L., Schnick, D., & Thompson, R. (1989). Genetic variation in the wheat HMW glutenin subunits and the molecular basis of bread-making quality. *Bio/Technology*, 7, 1281-1285.
- Flavell, R., Payne, P., Thompson, R., & Law, C. (1984). Strategies for the improvement of the wheat grain quality using molecular genetics (Annual Report No. Plant Breeding Institute.
- Forde, B., Kreis, M., Williamson, M., fry, R., Pywell, P., Bunce, N., & Mifflin, B. (1985). Short tandem repeats shared by B- and C-hordein cDNAs suggest a common evolutionary origin for two groups of cereal storage protein genes. *EMBO journal*(4), 9-15.
- Fu, Y., Pizzuti, A., Fenwick, R., King, J. J., Rajnarayan, S., Dunne, P., Dibel, J., Nasser, G., Ashizawa, T., de Jong, P., Wieringa, B., Korneluk, R., Perryman, M., Epstein, H., & Caskey, C. (1992). Un stable triplet repeat in a gene related to miotonic muscular dystrophy. *Science*(255), 1256-1258.
- Gale, M., Atkinson, M., Chinoy, C., Harcourt, R., Jiu, J., Li, Q., & Devos, K. (1995). Genetic maps of hexaploid wheat. In Z. Li & Z. Xin (Ed.), *8th Int. Wheat Symposium*, (pp. 29-40). Beijing, China: China Agricultural Sciencetech Press.
- Galiba, G., Quarrie, S., Sutka, J., Morgunov, A., & Snape, J. (1995). RFLP mapping of the vernalisation (*Vrn1*) and frost resistance (*Fr1*) genes on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*(90), 1174-1179.
- Galili, G., & Feldman, M. (1984). Mapping of glutenin and gliadin genes located on chromosome 1B of common wheat. *Molecular General Genetics*(193), 293-298.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Barone, A., Debener, T., Walkemeier, B., Schachtschabel, U., Kaufmann, H., Thompson, R., Bonierbale, M., Ganai, M., Tanskley, S., & Salamini, F. (1991). RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theoretical and Applied Genetics*(83), 49-57.
- Gepts, P. (1990). citado en Bretting y Widrlechner, 1995. .
- Gill, K., Lubbers, E., Gill, B., Raupp, W., & Cox, T. (1991). A genetic linkage map of *Triticum tauschii* (DD) and its relationship to the D genome of bread wheat. *Genome*(34), 362-374.
- Goldsbrough, A., Bulleid, N., Freedman, R., & Flavell, R. (1989). Conformational differences between two wheat (*Triticum aestivum*) "high-molecular-weight" glutenin subunits are due to a short region containing six aminoacid differences. *Biochem J.*(263), 837-842.

- Grant, V. (1975). Genetics of flowering plants. New York: Columbia University Press.
- Graybosh, R., Paterson, J., Shelton, D., & Baezinger, P. (1996). Genotypic and environmental modification of wheat flour protein composition in relation to end use quality. *Crop Science*(36), 296-300.
- Greene, F., Anderson, O., Yip, R., Halford, N., Malpica-Romero, J., & Shewry, P. (1988). Analysis of possible quality-related sequence variations in 1D glutenin high molecular weight subunit genes of wheat. In T. Miller & K. Koebner (Ed.), 7th International Wheat Genetics Symposium, (pp. 735-740). Cambridge, England:
- Gupta, R., Masci, S., Lafiandra, D., Bariana, H., & MacRitchie, F. (1996). Accumulation of protein subunits and their polymers in developing grains of hexaploid wheats. *Journal of Experimental Botany*, 47(302), 1377-1385.
- Gupta, R., Paul, J., Cornish, G., Palmer, G., Bekes, F., & Rathjen, A. (1994). Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, Glu-1, Glu-3 and Gli-1, of common wheats. I. its additive and interaction effects on dough properties. *Journal of Cereal Science*(19), 9-17.
- Gupta, R., & Shepherd, K. (1988). Low-Molecular-Weight glutenin subunits in wheat: Their variation inheritance and association with bread-making quality. In T. Miller & K. Koebner (Ed.), 7th International Wheat Genetics Symposium, (pp. 943-949). Cambridge, England:
- Gupta, R., Singh, K., & Shepherd, K. (1989). The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheats. *Theoretical and Applied Genetics*, 77, 57-64.
- Haldane, J. (1919). The combination of linkage values and the calculation of distance between linked loci of linked factors -citado en Lander et al., 1987-. *Journal of Genetics*(8), 299-309.
- Halford, N., Forde, J., Anderson, O., Greene, F., & Shewry, P. (1987). The nucleotide and deduced amino acid sequences of an HMW glutenin subunit gene from chromosome 1B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and a comparison with those of genes of chromosome 1A and 1D. *Theoretical, and Applied Genetics*, 75, 117-126.
- Harberd, N., Bartels, D., & Thompson, R. (1986). DNA restriction fragment variation in the gene family encoding high molecular weight (HMW) glutenin subunits of wheat. *Biochem. Genet.*, 24, 579-595.
- Hart, G. (1996). Wheat Isozymes. In P. Jauhar (Eds.), *Methods of genome analysis in plants* Boca Raton, Florida. USA: CRC Press, Inc.
- Haymer, D. (1994). Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: What are they, and can they tell us anything we don't already know? *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87(6), 717-722.
- Helentjaris, T., King, G., Slocum, M., Siedenstrang, C., & Wegman, S. (1985). Restriction fragment polymorphisms as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Molecular Biology*(5), 109-118.

Heun, M., Kennedy, A., Anderson, J., Lapitan, N., Sorrels, M., & Tanskley, S. (1991). Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome*(34), 437-447.

Hoisington, D., Khairallah, M., & González-de-León, D. (1994). *Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory* (2nd ed.). Mexico D.F.: CIMMYT.

Jackson, E., Holt, L., & Payne, P. (1983). Characterisation of high molecular weight gliadin and low molecular weight glutenin subunits of wheat endosperm by two dimensional electrophoresis and the chromosomal location of their controlling genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 66, 29-37.

Jeffreys, A., Wilson, V., & Thein, S. (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*(314), 67-73.

Joppa, L., Du, C., Hart, G., & Hareland, G. (1997). Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Science*(37), 1586-1589.

Kandpal, R., Kandpal, G., & Weissman, S. (1994). Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region-specific markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 88-92.

Karagyozyov, L., Kalcheva, I., & Chapman, V. (1993). Construction of a random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acid Research*, 21(16), 3911-3912.

Keim, P., Beavis, W., Schupp, J., & Freestone, R. (1992). Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*(85), 205-212.

Khan, K., Tamminga, G., & Lukow, O. (1989). The effect of wheat flour proteins on mixing and baking-correlations with protein fractions and high molecular weight glutenin subunit composition by gel electrophoresis. *Cereal Chemistry*, 66(4), 391-396.

Khelifi, D., & Brandlard, G. (1992). The effects of HMW and LMW subunits of glutenin and of gliadins on the technological quality of progeny from four crosses between poor breadmaking quality and strong wheat cultivars. *Journal of Cereal Science*(16), 195-209.

Klein, E. (1953). 35 años de trabajos de cruzamientos de combinación de trigo. *Archivo fitotécnico del Uruguay*(5), 345-372.

Kleinhofs, A., Kilian, A., Saghai Maroof, M., Biyashev, R., Hayes, P., Chen, F., Lapitan, N., Fenwick, A., Blake, T., Kanazin, V., Ananiev, E., Dahleen, L., Kudrna, D., Bollinger, J., Knapp, S., Liu, B., Sorrels, M., Heun, M., Franckowiack, J., Hoffman, D., Skadsen, R., & Steffenson, B. (1993). A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theoretical and Applied Genetics*(86), 705-712.

Korzun, V., Börner, A., Worland, A., Law, C., & Röder, M. (1997). Application of microsatellite markers to distinguish intervarietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*(95), 149-155.

- Korzun, V., Röder, M., Worland, A., & Börner, A. (1997). Intrachromosomal mapping of genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalization response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. *Plant Breeding*(116), 227-232.
- Kosmolak, F., Dexter, J., Matsuo, R., Leisle, L., & Marchylo, B. (1980). A relationship between durum wheat quality and gliadin electrophoregram. *Canadian Journal of Plant Science*, 60, 427-432.
- Kremer, E., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Waren, S., Schlessinger, D., Shuterland, G., & Richards, R. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science*(252), 1711-1714.
- Krugman, T., Levy, O., Snape, J., Rubin, B., Korol, A., & Nevo, E. (1997). Comparative RFLP mapping of the chlorotoluron resistance gene (*Su1*) in cultivated wheat (*Triticum aestivum*) and wild wheat (*Triticum dicoccoides*). *theoretical and Applied Genetics*(94), 46-51.
- Kuspira, J., & Unrau, J. (1957). Genetic analysis of certain characters in common wheat using whole chromosome substitution lines. Citado por Blanco et al., 1996.
- Lafiandra, D., Kasarda, D., & Morris, R. (1984). Chromosomal assignment of genes coding for the wheat gliadin component of the cultivars Cheyenne and Chinese Spring by two-dimensional electrophoresis. *Theoretical and Applied Genetics*, 68, 531-539.
- Lagudah, E., Appels, R., & Brown, A. (1991). The molecular genetic analysis of *Triticum tauschii*, the D genome donor to hexaploid wheat. *Genome*(36), 913-918.
- Lander, E., & Botstein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*(121), 185-199.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E., & Newburg, L. (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*(1), 174-181.
- Landry, B., Hubert, N., Etoh, T., Harada, J., & Lincoln, S. (1991). A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome*(34), 543-552.
- Laurie, D., Pratchett, N., Bezant, J., & Snape, J. (1995). RFLP mapping of five major genes and eight QTL controlling flowering time in a winter x spring (*Hordeum vulgare* L.) cross. *Genome*(38), 575-585.
- Law, C., Young, C., Brown, J., Snape, J., & Wordland, A. (Ed.). (1978). The study of grain protein control in wheat using whole chromosome substitution lines-citado en Blanco et al., 1978-.
- Lawrence, G. (1986). The HMW glutenin subunit composition of Australian wheat cultivars. *Aust. J. Agric. Res.*, 37, 125-133.
- Lawrence, G., & Shepherd, K. (1981). Inheritance of glutenin protein subunits of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 333-337.

- Leclerc, P. (1966). Une sterilité male cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior Plantes*(16), 135-144.
- Lew, E., Kuzmicky, D., & Kasarda, D. (1992). Characterization of low-molecular-weight glutenin subunits by reversed-phase high performance liquid chromatography, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and N-terminal amino-acid sequencing. *Cereal Chemistry*(69), 508-515.
- Lincoln, S., Daly, M., & Lander, E. (1992a). Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0, 3rd ed. technical report. No. Whitehead Institute, Boston, MA.
- Lincoln, S., Daly, M., & Lander, E. (1992b). Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/QTL 1.1. 2nd ed. technical report No. Whitehead Institute, Boston, MA.
- Litt, M., & Luty, J. (1989). citado en Haymer, 1994. .
- Liu, C. (1995). Identification of a new low M_r glutenin subunit locus on chromosome 1B of durum wheat. *Journal of Cereal Science*(21), 209-213.
- Liu, Y., Mori, N., & Tsunewaki, K. (1990). Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis in wheat. I. Genomic DNA library construction and RFLP analysis in common wheat. *Japanese Journal of Genetics*(65), 367-380.
- Liu, Y., & Tsunewaki, K. (1991). Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in wheat. II. Linkage maps of the RFLP sites in common wheat. *Japan Journal of Genetics*(66), 617-633.
- Mangels, C. (1925). Effect of climate and other factors on the protein content of North Dakota wheat-citado en Wrigley et al., 1994-. *Cereal Chemistry*(2), 288-297.
- Marino, C., Nelson, J., Lu, Y., Sorrells, M., Leroy, P., Tuleen, N., Lopes, C., & Hart, G. (1996). Molecular genetic maps of the group 6 chromosomes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Genome*(39), 359-366.
- Markert, C., & Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(45), 753-763.
- Martínez, O., & Curnow, R. (1992). Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theoretical and Applied Genetics*(85), 480-488.
- Maughan, P., Saghai Maroof, M., Buss, G., & Huestis, G. (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near isogenic line analysis. *Theoretical and Applied Genetics*(93), 392-401.
- McMillin, D., Allan, R., & Roberts, D. (1986). Association of an isozyme locus and strawbreaker foot rot disease derived from *Aegilops ventricosa* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*(72), 743-747.

- Metakovsky, E., Akhmedov, M., & Sozinov, A. (1986). Genetic analysis of gliadin-encoding genes reveals gene clusters as well as single remote genes. *Theoretical and Applied Genetics*(69), 31-37.
- Metakovsky, E., Branlard, G., Chernakov, V., Upelnik, V., Redaelli, R., & Pogna, N. (1997). Recombination mapping of some chromosome 1A-, 1B, 1D-, and 6B-controlled gliadins and low-molecular-weight glutenin subunits in common wheat. *Theoretical and Applied Genetics*(94), 788-795.
- Metakovsky, E., Wrigley, C., Bekes, F., & Gupta, R. (1990). Gluten polypeptides as useful genetics markers of dough quality in Australian wheats. *Australian Journal of Agriculture Research*, 41, 289-306.
- Milner, M. (1966). World protein needs. In *McGraw Hill Yearbook of science and technology* (pp. 61-77). New York: McGraw Hill.
- Moonen, J., Scheepstra, A., & Graveland, A. (1982). Use of SDS-Sedimentation test and SDS-polyacrilamide gel electrophoresis for screening breeders' samples of wheat for bread-making quality. *Euphytica*, 31, 677-690.
- Moonen, J., Scheepstra, A., & Graveland, A. (1983). The positive effects of the high molecular weight subunits 3+10 and 2* of glutenin on the bread-making quality of wheat cultivars. *Euphytica*, 32(3), 735-742.
- Morgante, M., & Olivieri, A. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant breeding. *The Plant Journal*, 3(1), 175-182.
- Morris, R., Mattern, P., Schimdt, J., & Johnson, V. (1978). citado en Blanco et al., 1996. In *5th Int. Wheat Genet. Symp.*, . New Delhi:
- Nevo, E., & Payne, P. (1987). Wheat storage proteins: Diversity of HMW glutenin subunits in wild emmer from Israel. 1. Geographical patterns and ecological predictability. *Theoretical and Applied Genetics*, 74, 827-836.
- Nieto-Taladriz, M., Perretant, M., & Rousset, M. (1994). Effect of gliadins and HMW and LMW subunits of glutenin on dough properties in the F₆ recombinant inbred lines from a bread wheat cross. *Theoretical and Applied Genetics*(88), 81-88.
- Nisi, J., & Legasa, A. (1986). Influencia del germoplasma mejicano en los rendimientos de trigo del país. In *AIANBA (Ed.), 1er Congreso Nacional de Trigo*, (pp. 81-95). Pergamino, Pcia de Buenos Aires:
- Odenbach, W., & Mahgoub, E.-S. (1988). Relationship between HMW glutenin subunit composition and the sedimentation value in reciprocal sets of inbred backcross lines derived from two winter wheat crosses. In T. E. a. K. Miller K. M. D. (Ed.), *7th Int. Wheat Symp.*, (pp. 987-991). Cambridge, England:
- Ohno (1972). citado por Haymer, 1994. .

- Osborne, T. (1907). The protein of the wheat kernel-citadeno en Simmonds, 1989-. Carnegie Inst. Washington Publ., 84, 1-119.
- Pardue, M., & Gall, J. (1970). Chromosomal location of mouse satellite DNA. Science (Washington DC)(168), 1356-1358.
- Paterson, A., Tanksley, S., & Sorrells, M. (1991). DNA markers in plant improvement. Advances in Agronomy(46), 39-90.
- Payne, P., Corfield, K., & Blackman, J. (1979). Identification of high molecular weight subunits of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree. Theoretical and applied genetics, 55, 153-159.
- Payne, P., Corfield, K., Holt, L., & Blackman, J. (1981a). Correlation between the inheritance of certain high-molecular weight subunits of glutenin and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat. J Sci. Food Agric., 32, 51-60.
- Payne, P., Holt, L., & Law, C. (1981b). Structural and genetical studies on the high-molecular weight subunits of glutenins. 1. Allelic variation in subunits amongst varieties of wheat (*Triticum aestivum* L.). Theoretical and Applied Genetics, 60, 229-236.
- Payne, P., Holt, L., Worland, A., & Law, C. (1982). Structural and genetical studies on the high-molecular weight subunits of wheat glutenin. 3. Telocentric mapping of the subunit genes on the long arms of the homeologous group 1 chromosomes. Theoretical and Applied Genetics, 63, 129-138.
- Payne, P., Jackson, E., & Holt, L. (1984a). The association between gamma gliadin 45 and gluten strength in durum wheat varieties: A direct causal effect of the result of genetic linkage. Journal of Cereal Science, 2, 73-81.
- Payne, P., Jackson, E., Holt, L., & Law, C. (1984b). Genetic linkage between endosperm protein genes on each of the short arms of chromosome 1A and 1B in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 67, 235-243.
- Payne, P., Nightingale, N., Krattinger, A., & Holt, L. (1987). The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties. Journal of Cereal Science and Food Agriculture, 40, 51-65.
- Peña, R. J., Amaya, A., Rajaram, S., & Mujeeb-Kazi, A. (1990). Variation in quality characteristics associated with some spring 1B/1R translocation wheats. Journal of Cereal Science(12), 105-112.
- Pillen, K., Steinrücken, G., Wricke, G., Herrman, R., & Jung, C. (1992). A linkage map of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Theoretical and Applied Genetics(84), 129-135.
- Pitts, E., Rafalski, J., & Hedgcoth, C. (1988). Nucleotide sequence and encoded amino acid sequence of a genomic gene region for a low-molecular-weight glutenin. Nucleic Acid Research(16), 11376.

- Pogna, N., Autran, J., Mellini, F., Lafiandra, D., & Feillet, P. (1990). Chromosome 1B-encoded gliadins and glutenin subunits in durum wheat: Genetics and relationship to gluten strength. *Journal of Cereal Science*, 11, 15-34.
- Pogna, N., Lafiandra, D., Feillet, P., & Autran, J. (1988). Evidence for a direct causal effect of low molecular weight subunits of glutenins on gluten viscoelasticity in durum wheats. *Journal of Cereal Science*(7), 211-214.
- Pogna, N., Redaelli, R., Vaccino, P., Biancardi, A., Peruffo, A., Curioni, A., Metakovsky, E., & Pagliaricci, S. (1995). Production and genetic characterization of near-isogenic lines in the bread wheat cultivar *Alpe*. *Theoretical and Applied Genetics*(90), 650-658.
- Prochazka, M. (1996). Microsatellite hybrid capture technique for simultaneous isolation of various STR markers. *Genome Research*(6), 646-649.
- Quick, J., & Donnelly, B. (1980). A rapid test for estimating durum wheat gluten quality. *Crop Science*, 20, 816-818.
- Rafalski, J. (1986). Structure of wheat gamma-gliadin genes. *Gene*(43), 221-229.
- Rheikhel, N., & Wilkins, T. (1987). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding a wheat germ agglutinin. *Proceedings of National Academy of Sciences*(84), 6745-6749.
- Roder, M., Plaschke, J., Konig, S., Borner, A., Sorrells, M., Tanksley, S., & Ganai, M. (1995). Abundance, variability and chromosome location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics*(246), 327-333.
- Rogers, W., Miller, T., Payne, P., Seekings, J., Sayers, E., Holt, L., & Law, C. (1997). Introduction to bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and assessment for bread-making quality of alleles from *T. boeoticum* Bois. ssp. thaoudar at *Glu-A1* encoding two high-molecular-weight subunits of glutenin. *Euphytica*(93), 19-29.
- Rogers, W., Payne, P., & Harinder, K. (1989). The HMW glutenin subunit and gliadin compositions of German grown varieties and their relationship with bread-making quality. *Plant Breeding*, 103, 89-100.
- Ruiz, M., & Carrillo, J. (1993). Linkage relationships between prolamin genes on chromosome 1A and 1B in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*(87), 353-360.
- Ruiz, M., & Carrillo, J. (1996). Gli-B3/Glu-B2 encoded prolamins do not affect selected quality properties in the durum wheat cross "Abadía" x "Mexcali 75". *Plant Breeding*(115), 410-412.
- Saghai-Marouf, M., Soliman, K., Jorgensen, R., & Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(81), 8014-8018.
- SAS, I. (1985). SAS user's guide: Statistics. No. SAS Institute. Cary, NC.
- Sax, K. (1923). The associations of size differences with seed coat patterns and pigmentation -citado en Paterson et al., 1991-. *Genetics*(8), 552-560.

- Sears, E. (1954). The aneuploids of common wheat. Missouri Agriculture Experimental Station Research Bulletin-citado en Marino et al., 1996-(572), 1-59.
- Sears, E., & Sears, L. (1979). The telocentric chromosomes of common wheat-citado en Marino et al., 1996-. In Proceedings of the Int. Wheat Genet. Symposium, 5 (pp. 389-407).
- Shepherd, K. (1988). Genetics of wheat endosperm proteins - in retrospect and prospect. In T. Miller & K. Koebner (Ed.), 7th International Wheat Symposium, . Cambridge, England:
- Shewry, P., Halford, N., & Tatham, A. (1992). High-molecular-weight subunits of wheat glutenin. *Journal of Cereal Science*(15), 105-120.
- Simmonds, D. (1989). *Wheat and Wheat Quality in Australia*. CSIRO, Australia: Australian Wheat Board.
- Simpson, S. (1989). Detection of linkage between quantitative traits and restriction fragment length polymorphisms using inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*(77), 815-819.
- Singh, N., & Shepherd, K. (1988). Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arm of group 1 chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics*, 75, 628-641.
- Slafer, G., & Andrade, F. (1989). Genetic improvement in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) yield in Argentina. *Field Crops Research*, 21, 289-296.
- Slafer, G., Andrade, F., & Feingold, S. (1990). Genetic improvement of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) in Argentina: relationships between nitrogen and dry matter. *Euphytica*, 50, 63-71.
- Snape, J., Hyne, V., & Aitken, K. (1995). Citado en Blanco et al., 1996. In 8th Int. Wheat Genet. Symp., . Beijing, China:
- Sorrells, M. (1996). GrainGenes Database. Internet Gopher, greengenes.cit.cornell.edu(Port 70).
- Sozinov, A., & Poperleya, F. (1980). Genetic clasification of prolamines and its use for plant breeding. *Ann. Technol. Agric.*, 29, 229-245.
- Stephenson, P., Bryan, G., Kirby, J., Collins, A., Devos, K., Busso, C., & Gale, M. (1998). Fifty new microsatellites loci for the wheat genetic map. *Theoretical and Applied Genetics*((in press)).
- Sutton, K., & Bietz, J. (1997). Variation among high molecular subunits of glutenin detected by capillary electrophoresis. *Journal of Cereal Science*(25), 9-16.
- Swanson, C., & Working, E. (1933). Testing quality of flour by the recording dough mixer-citado en Tombetta y Cuniberti, 1994-. *Cereal Chemistry*(10), 1.
- Takahashi, R., & Yasuda, S. (1971). Genetics of earliness and growth habit in barley-citado en Bezant et al., 1996-. In R. Nilan (Ed.), *Barley Genetics II: proceedings of the 2nd*

International Barley Genetics Symposium, . Washington State University Press, Pullman, WA:

Tanskley, S. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter*(1), 3-8.

Tanskley, S., Medina-Filho, H., & Rick, C. (1982). Use of naturally occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*(49), 11-25.

Tanskley, S., Young, N., Paterson, A., & Bonierbale, M. (1989). RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *BioTechnology*(7), 257-264.

Tao, H., & Kasarda, D. (1989). Two dimensional gel sequencing of LMW-glutenin subunits. *Jornal of Experimental Botany*(40), 1015-1020.

Tatham, A., Mifflin, B., & Shewry, P. (1985). The β -turn conformation in wheat gluten proteins: Relationship to gluten elasticity. *Cereal Chemistry*, 62, 405-412.

Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research*(17), 6463-6471.

Tombetta, E., & Cuniberti, M. (1994). Utilización del mixógrafo de Swanson para la evaluación de la calidad en los programas de mejoramiento de trigo pan (Informe técnico No. 105). EEA Marcos Juárez-INTA-.

Vallejos, C., Sakiyama, N., & Chase, C. (1992). A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L. *Genetics*(131), 733-740.

Vasil, I., & Anderson, O. (1997). Genetic engineering of wheat gluten. *Trends in Plant Science*, 2(8), 292-297.

Vasil, V., Srivastava, V., Castillo, A., Fromm, M., & Vasil, I. (1993). Rapid production of transgenic plants by direct bombardment of cultured immature embryos. *Bio/technology*(11), 1553-1558.

Weeden, N., & Wendel, J. (1989). citado en Bretting y Widrechner, 1995.

Weeks, J., Anderson, O., & Blechl, A. (1993). Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Physiology*(102), 1077-1084.

Weller, J. (1986). Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetics markers. *Biometrics*(42), 627-640.

Woychik, J., Boundy, J., & Dimler, R. (1961). Starch gel electrophoresis of wheat gluten proteins with concentrated urea. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 94, 477-482.
Wrigley, C., Lawrence, G., & Shepherd, K. (1982a). Association of glutenin subunits with gliadin composition and grain quality in wheat. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9, 15-30.

Wrigley, C., Autran, J., & Bushuk, W. (1982b). Identification of cereal varieties by gel electrophoresis of the grain proteins. *Adv. Cereal Sci. Technol.*, 5, 211-259.

Wu, K.-S., & Tanksley, S. (1993). Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in rice. *Molecular and General Genetics*(245), 225-235.

Zabeau, M., & Vos, P. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European patent Application N° 0534858 A1.

Anexo A: Datos térmicos del año del ensayo comparados con una serie histórica

Período 1971-1981

MESES		OCT	NOV	DIC	ENE
temperatura media	(°C)	16.5	19.2	22.4	23.7
temperatura media máxima	(°C)	21.9	24.8	28.4	29.5
temperatura media mínima	(°C)	11	12.8	16.3	17.8

Período 1981-1990

MESES		OCT	NOV	DIC	ENE
temperatura media	(°C)	16.7	19.6	22	24.4
temperatura media máxima	(°C)	22.2	25.1	28	30.3
temperatura media mínima	(°C)	11.3	14.3	16.6	18.7

año 1993/94		OCT	NOV	DIC	ENE
temperatura media	(°C)	16.5	18.5	21.0	21.9
temperatura media máxima	(°C)	22.2	24.0	27.0	28.2
temperatura media mínima	(°C)	11.5	13.8	15.8	16.5



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Ciencias Biológicas

7 de agosto de 1998

por el Ing. Agr. Sergio
encargado de la redacción del
trabajo encargado


Ing. Agr. Sergio Feingold

Dr. H. Esteban Hopp