

UCH-FC  
MDG-0  
Z583  
C.1

Original

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES  
MOLECULARES TIPO MICROSATÉLITES  
ASOCIADOS A *loci* GENÉTICOS PARA CALIDAD  
PANADERA EN TRIGOS DE PAN**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica

Facultad de Ciencias

por

Mireya Aizize Zerené Zerené

Abril, 2002

Director de Tesis: Dra Liliana Cardemil



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato

Mireya aizize Zerené Zerené

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Botánica , en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de abril de 2002

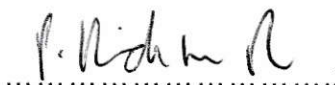
Director de Tesis:

Dra Liliana Cardemil



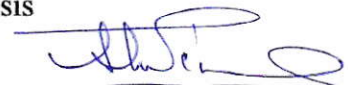
Co Director de Tesis:

Dr Patricio Hinrichsen

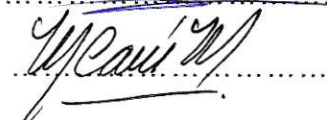


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra Luz María Perez



Dra Margarita Caru



*Dedicado a*  
*René Cortazar S.*  
*Ignacio Ramirez A.*

# INDICE DE MATERIAS

	Página
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUCCION.....	1
Objetivo General.....	18
Objetivos Específicos.....	19
2 MATERIALES Y METODOS.....	20
2.1 Reactivos y solventes.....	20
2.2 Material genético.....	21
2.3 Análisis de calidad panadera.....	21
2.4 Detección de translocaciones con centeno.....	24
2.5 Reacciones de microsatélites.....	24
2.5.1 Extracción de ADN.....	24
2.5.2 Partidores de Microsatélites.....	25
2.5.3 Reacción de PCR.....	25
2.5.4 Ciclo térmico PCR.....	25
2.5.5 Electroforesis de geles de poliacrilamida desnaturante.....	27
2.5.6 Tinción de ADN con plata usando el sistema Silver-Sequence <sup>TM</sup> .....	27
2.5.7 Determinación del tamaño de los amplificados obtenidos por PCR.....	28
2.6 Identificación de subunidades de gluteninas de alta masa molecular.....	29
2.6 Análisis estadístico.....	32
3 RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
3.1 Análisis de calidad panadera.....	33
3.2 Detección de translocaciones con centeno.....	39
3.3 Análisis del germoplasma mediante microsatélites.....	42
3.3.1 Caracterización de los microsatélites en la población experimental.....	42
3.3.2 Correlación de calidad panadera y marcadores SSR.....	58
3.4 Identificación de subunidades de gluteninas de alta masa molecular.....	76
4 CONCLUSIONES.....	81
5 PROYECCIONES.....	86
6 BIBLIOGRAFIA.....	88
ANEXOS.....	93

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de genotipos de trigo de pan, para calidad panadera de acuerdo a sus valores de porcentaje de proteína, volumen de sedimentación, gluten húmedo y gluten seco. Laboratorio de Farinología , INIA.....	7
<b>Tabla 2.</b> Genes que codifican para proteínas de almacenaje en trigo de pan y su ubicación cromosómica.....	9
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de los partidores SSRs con su ubicación cromosomal y Condiciones de PCR utilizados.....	26
<b>Tabla 4.</b> Valores asignados para pares o subunidades simples de gluteninas de HMWG.....	31
<b>Tabla 5.</b> Calidad panadera del germoplasma experimental, determinada mediante el contenido de proteína del grano, sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten index y dureza del grano.....	35
<b>Tabla 6.</b> Coeficiente de correlación de Pearson, entre porcentaje de proteína del grano, Sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten index e índice de dureza.....	38
<b>Tabla 7.</b> Valores de sedimentación ordenadas en forma ascendente, porcentaje de proteína y porcentaje de gluten seco del germoplasma experimental. Las entradas de color rojo indican presencia de ADN de centeno en esos genotipos.....	41
<b>Tabla 8.</b> Prueba de t para comparación de medias entre grupo de partidores SSR que presentaron buen y mal comportamiento como marcadores genéticos. ....	46
<b>Tabla 9.</b> Alelos del microsatélite Xglu A3 presentes en el germoplasma experimental.....	50
<b>Tabla 10.</b> Alelos del microsatélite Xgwm 164 presentes en el germoplasma experimental.....	51
<b>Tabla 11.</b> Alelos del microsatélite Xgwm 135 presentes en el germoplasma experimental.....	52
<b>Tabla 12.</b> Alelos del microsatélite Xgwm 498 presentes en el germoplasma experimental.....	53

<b>Tabla 13.</b> Alelos del microsatélite Xgdm 98 presentes en el germoplasma experimental.....	54
<b>Tabla 14.</b> Alelos del microsatélite Xgdm 19 presentes en el germoplasma experimental.....	55
<b>Tabla 15.</b> Rango en tamaño de pares de base, número de alelos y contenido de información polimorfica de cada microsatélite usado para estudiar la calidad panadera de 80 variedades de trigos de pan.....	57
<b>Tabla 16.</b> Correlación (E2) entre los marcadores; Xglu A3, Xgwm 164, Xgwm 135, Xgwm 498, Xgdm 98 y Xgdm 19 y las pruebas; Porcentaje de proteína, sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten índice e índice de dureza.....	60
<b>Tabla 17.</b> Valores de porcentaje de proteína promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.....	61
<b>Tabla 18.</b> Valores de sedimentación promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.....	62
<b>Tabla 19.</b> Valores de gluten seco promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.....	63
<b>Tabla 20.</b> Valores de gluten índice promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.....	64
<b>Tabla 21.</b> Valores de dureza promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.....	66
<b>Tabla 22.</b> Agrupación por haplotipos, calidad panadera y presencia de translocaciones del germoplasma experimental.....	73
<b>Tabla 23.</b> Subunidades de gluteninas de alto peso molecular de las 80 entradas de trigo de pan en evaluación.....	79
<b>Tabla 24.</b> Agrupación de los genotipos estudiados por tipo de subunidades de glutenina de alto peso molecular y presencia de translocación con centeno.....	80

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Productos de amplificación de cinco marcadores SSR en gel de poliacrilamida desnaturalante.....	45
<b>Figura 2.</b> Productos de amplificación del partidor monomorfo HVM4, en 16 entradas del germoplasma experimental.....	45
<b>Figura 3.</b> Determinación del tamaño de los amplificadores obtenidos con partidores de microsatélite, por comparación de los productos de secuenciación del plasmido pGEM-3Zf(+). Los carriles 7, 8, 9 y 10 corresponden a los productos de secuenciación del plasmido. Los carriles 1 al 6 son alelos del marcador Xglu A3, los carriles 11 al 17 son alelos del marcador Xgwm 164 y los carriles 18 al 21 son alelos del marcador Xgwm 135.....	48
<b>Figura 4.</b> Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xglu A3. En cada alelo se destaca una banda principal acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.....	50
<b>Figura 5.</b> Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgwm 164. En cada alelo se destaca una banda principal acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.....	51
<b>Figura 6.</b> Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgwm 135. En cada alelo se destaca una banda principal acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.....	52
<b>Figura 7.</b> Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgwm 498. En cada alelo se destaca una banda principal acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.....	53
<b>Figura 8.</b> Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgdm 98. En cada alelo se destaca una banda principal acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.....	54

**Figura 9.** Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgdm 19. En cada alelo se destaca una banda principal acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.....55

**Figura 10.** Distribución de las frecuencias genotípicas del marcador Xgdm 19 para niveles de proteína muy alta (15,9 a 13,5%), alta (13,4 a 12,5%) y media (12,4 a 11,2%).....67

**Figura 11.** Distribución de las frecuencias genotípicas del marcador Xgdm 19 en las categorías muy duros (27,3 a 21%) y duros (20,9 a 17%).....67

**Figura 12.** Distribución de las frecuencias genotípicas de los marcadores Xgdm 19, Xglu A3 y Xgwm 164, para niveles de sedimentación altos (14,5 a 9), medios (8,9 a 7,1) y bajos (7,0 a 4,9).....68

**Figura 13.** Distribución de las frecuencias genotípicas de los marcadores Xgdm 19, Xglu A3 y Xgwm 135, para niveles de gluten seco muy altos (18,6 a 13,5%), altos (13,4 a 12,5%) y medios (12,4 a 10,3%).....69

**Figura 14.** Distribución de las frecuencias genotípicas de los marcadores Xgdm 19, Xglu A3, Xgwm 135 y Xgdm 164, para niveles de gluten index muy fuerte (100 a 90), fuerte (89,9 a 80) y suave (79,9 a 39,1).....70

**Figura 15.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 9%. Subunidades de gluteninas de alta masa molecular en siete variedades de trigos de pan, utilizadas como patrón de referencia para el análisis del germoplasma experimental.....78



## LISTA DE ANEXOS

	Página
<b>Anexo 1.</b> Variedad, Cruza y Pedigrí del germoplasma de trigo experimental.....	94
<b>Anexo 2.</b> Grupo de microsatélites con buen comportamiento como marcadores moleculares.....	98
<b>Anexo 3.</b> Grupo de microsatélites con mal comportamiento como marcadores moleculares.....	99

## LISTA DE ABREVIATURAS

A	: Adenosina
ADN	: Acido desoxirribonucleico
APS	: Persulfato de Amonio (Ammonium Persulfate)
BSA	: Seroalbúmina de bovino (Bovine Serum Albumine)
C	: Citidina
CTAB	: Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio
dATP	: 2'-desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	: 2'-desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	: 2'-desoxiguanosina-5'-trifosfato
dTTP	: 2'-desoxitimidina-5'-trifosfato
dNTP	: 2'-desoxirribonucleósido-trifosfato
DTT	: Ditioneitol
EDTA	: Acido etilendiaminotetraacético
G	: Guanosina
mL	: Mililitros
PAA	: Poliacrilamida
PAGE	: Electroresis en geles de poliacrilamida
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PIC	: Contenido de información polimorfica (Polymorphism Information Content)
PVP	: Polivinilpirrolidona
RAPD	: Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente (Random Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	: Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphism)
SDS	: Lauril sulfato de sodio
SSR	: Secuencias de repetición simple (Simple Sequence Repeat)
T	: Timidina
TEMED	: N',N',N',N'-tetrametiléndiamina
T <sub>m</sub>	: Temperatura de desnaturación térmica
Tris-HCl	: Hidrocloruro de tris(hidroximetil)-aminometano

## RESUMEN

Las nuevas herramientas biotecnológicas ofrecen una amplia gama de posibilidades de desarrollo en todas las áreas donde el hombre se desenvuelve. La agricultura no esta ajena a esta posibilidad. El trigo de pan (*Triticum aestivum* L), uno de los alimentos más importantes del mundo, puede beneficiarse significativamente al incorporar el uso de esta nueva tecnología dentro del proceso de creación de nuevas variedades.

Los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats), marcadores genéticos hipervariables, han demostrado ser una de las mejores alternativas para este cultivo. Por este motivo fueron los seleccionados para llevar a cabo el objetivo de la presente investigación, en la cual se busco asociar microsatélites a *loci* genéticos de proteínas de reserva y de dureza del grano, factores determinantes de la calidad panadera de este cereal.

Para llevar a cabo esta investigación se seleccionaron 80 genotipos de trigo de pan, a los cuales se les determinó: porcentaje de proteína del grano, volumen de sedimentación, gluten seco, gluten húmedo, gluten index e índice de dureza. Esta información fue utilizada como base para seleccionar aquellos marcadores genéticos que estuvieran asociados con estos parámetros de calidad.

De los seis microsatélites analizados cuatro estuvieron asociados con diferentes pruebas de calidad. El marcador Xglu A3 presentó correlaciones significativas con volumen de sedimentación (0,385), gluten seco (0,394) y gluten index (0,377). Xgwm 164 se asoció significativamente con sedimentación (0,235) y gluten index

(0,233), el partidador Xgwm 135 presento correlaciones significativas con gluten seco (0,172) y gluten index (0,221) y el SSR Xgdm 19 fue el marcador con mayor número de pruebas asociadas: porcentaje de proteínas (0,447), sedimentación (0,408), gluten seco (0,487), gluten index (0,391) e índice de dureza (0,483). De estos cuatro microsatélites, Xglu A3 y Xgdm 19, son los más informativos con índices de polimorfismos (PIC) de 0,721 y 0,758 respectivamente.

Ninguno de los SSR estudiados presentó asociación con gluten húmedo. Los marcadores Xgwm 498 y Xgdm 98, no se correlacionaron con ninguno de los parámetros de calidad.

Al analizar la distribución de las frecuencia genotipica de los marcadores seleccionados, en los grupos de genotipos de buena, regular y mala calidad panadera, se seleccionó haplotipos promisorios para buena calidad.

A todo el germoplasma analizado se le determinó la presencia de secalina, proteína de centeno, la cual existe en algunas líneas de trigo por efecto de translocaciones cromosomales con este cereal. Treinta y tres genotipos dieron positivo para este análisis. La mayoría de este grupo presentó bajos niveles de volumen de sedimentación. Este resultado indica la necesidad de tener presente este factor cuando se están determinando criterios de selección para calidad panadera.

Paralelamente, en esta investigación se caracterizó las gluteninas de alto peso molecular, de las 80 líneas y variedades en ensayo. Las subunidades permitieron determinar el índice GLU-1, el que demostró ser un buen indicador de calidad panadera, por su buena asociación con volumen de sedimentación.

## SUMMARY

The new biotechnological tools offer a wide range of chances of development in different areas where man copes. Agriculture is not foreign to that possibility. Bread wheat (*Triticum aestivum* L.), one of the most important food in the world, can benefit by adding the use of those tools in the development of new varieties.

The best alternative for this crop has been shown to be the use of microsatellites or SSR (Simple Sequence repeat). This is the reason why these markers have been selected to perform this work, where microsatellites have been looked for their association to genetic *loci* of storage proteins and hardness, determinant factors for bread making quality.

A number of 80 bread wheat genotypes have been selected and used to determine grain protein concentration, sedimentation volume, gluten dry, gluten wet, gluten index and hardness index. This information has been used as a basis to select those genetics markers associated to quality parameters.

Of the six primer pairs analysed, four of them were associated with different quality parameters. The Xglu A3 marker presented significant correlation with sedimentation volume (0,385), gluten dry (0,394) and gluten index (0,377). Xgwm 164 has been associated significantly with sedimentation volume (0,235) and gluten index (0,233). Xgwm 135 has presented significant correlation with gluten dry (0,172) and gluten index (0,221). Xgdm 19 primer had the mayor number of trials associated with it: grain protein concentration (0,447), sedimentation volume (0,408),

gluten dry (0,487), gluten index (0,391) and hardness index (0,483). Xglu A3 and Xgdm 19 was the most informative primers of the four, with a polymorphism index (PIC) of 0,721 and 0,758 respectively.

None of the SSR studied showed association to gluten wet. The marker Xgwm 498 and Xgdm 98 did not give any correlation with any of the quality parameters.

When distribution of the genotype frequencies of the selected markers was studied, in groups of genotypes of good, regular and bread making quality, haplotypes resulted to be preselected as promissory for good quality.

Presence of secalin, rye protein, which exists in several lines of wheat for chromosomal translocation with this cereal, has been analysed in all germoplasm. Thirty- three genotypes have been found positive for that analysis. The majority of this group has presented a low level sedimentation volume. This result has shown the necessity of keeping in mind this factor when criteria for selection of bread making quality are being determined.

On the other hand, high molecular weight glutenin subunits (HMWG) have been characterised in 80 lines and varieties in this work. The HMWG have permitted to determine the index GLU-1, which has shown to be a good indicator of bread making quality for its association with sedimentation volume.

## 1. INTRODUCCION

La demanda mundial de alimentos se duplicará para el año 2025. La oferta deberá duplicarse sobre la misma base de recursos naturales, como la tierra cultivable y los recursos hídricos los cuales se tornan cada vez más escasos. Incrementar la productividad es la única opción y esto requiere aumentar la eficiencia en los trabajos de mejoramiento genético, que son uno de los pilares que sustentan el aumento de la productividad.

El trigo es el alimento más importante del mundo y su calidad influye directamente en la dieta de gran parte de la población mundial. Este cereal provee sobre el 20% de las calorías y proteínas en la nutrición humana, es un alimento de primera necesidad en más de 40 países, lo que implica sobre un 35% de la población mundial. Es el cultivo más amplio para alimento sembrado desde las regiones australes de Sudamérica y Australia a las latitudes boreales de Canadá y China. Este cultivo puede crecer en un amplio rango de alturas, condiciones climáticas y fertilidad de suelo. Es fácilmente transportado y almacenado por largos periodos de tiempo y es consumido por humanos con un mínimo de procesamiento (Bushuk, 1998).

El noventa y cinco por ciento del trigo que se consume actualmente en el mundo es del

tipo alohexaploide (*Triticum aestivum* L.) conocido como trigo común. Su uso principal es para elaborar pan y otros productos horneados. Casi todo el 5% restante es trigo duro (*Triticum turgidum* L.), el cual se usa principalmente para pastas.

Chile presenta una demanda anual de 18 millones de qqm de este cereal. En la temporada 2000/2001 se sembraron 391.580 ha, con una producción de 14.927.099 de qqm de trigo, con esta producción se abasteció un 82,9% del requerimiento nacional importándose la diferencia (Banco Central de Chile, 2001).

El trigo es un cultivo estratégico, por su enorme impacto social y económico sobre la población. Chile debe ser capaz de asegurar el abastecimiento de este cereal, independientemente de lo que suceda en el extranjero.

Una variedad de trigo tiene un promedio de vida de cinco años, debido a la capacidad que presentan los patógenos que la afectan de producir nuevas cepas. Esto implica que constantemente deben estar generándose nuevas variedades que reemplacen a las antiguas.

El Proyecto de Fitomejoramiento de trigo del INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias) desde hace 37 años produce aproximadamente el 70% de las variedades de trigo de pan y el 100% de las variedades de trigo candeal que se utilizan en nuestro país. Entre los objetivos permanentes de dicho proyecto esta la incorporación de nuevas tecnologías que permitan aumentar la eficiencia de sus trabajos de mejoramiento genético. Toda nueva variedad de trigo de pan que se crea, debe cumplir con una amplia gama de requisitos, entre estos, uno fundamental es que la variedad posea una



alta calidad panadera.

### **Factores que determinan calidad panadera**

Los factores principales que determinan la calidad de panificación son: el contenido de proteínas del grano, la composición de las proteínas de reserva en el grano, y la dureza del grano. A pesar de la importancia del contenido de proteína del grano, los progresos en mejoramiento para este carácter han sido lentos y difíciles debido al gran efecto del ambiente y a la fuerte correlación negativa entre el porcentaje de proteínas del grano y el rendimiento. Por estos motivos se trabaja principalmente con la composición de las proteínas de almacenaje en trigo que son más fácilmente manipuladas en los programas de mejoramiento.

### **Mejoramiento genético para calidad panadera**

Tradicionalmente los trabajos de mejoramiento para calidad panadera se han basado en el análisis fenotípico de las líneas experimentales. Mediante una serie de análisis químicos y reológicos se analizan las características más relevantes del grano, la harina, la masa y finalmente del pan que se produce con cada línea experimental.

Los avances científicos de los últimos años, ha permitido desarrollar una serie de herramientas moleculares, las cuales permiten analizar directamente el genotipo de las líneas experimentales. Para incorporar estas tecnologías dentro de los trabajos rutinarios de mejoramiento para calidad panadera, falta investigación en algunos aspectos específicos de esta área.

Algunos de los criterios de evaluación de calidad panadera, utilizados por el Laboratorio de Farinología del INIA, se indican en la Tabla 1.

Uno de los mejores parámetros para evaluar calidad panadera es la prueba de sedimentación. Se ha observado que aunque este carácter es modificado por las condiciones ambientales, las variedades clasificadas como de buena calidad siempre van a presentar valores de sedimentación superiores a las variedades clasificadas como de mala calidad, aunque el rango de los valores varía de un año a otro o de una localidad a otra.

Ortiz-Monasterio y col.,(1997), estudiaron los cambios que se producían en la calidad panadera de diez cultivares de trigo bajo distintas condiciones de fertilización nitrogenada. En esta investigación se encontró que el volumen de pan estuvo consistentemente más correlacionado con sedimentación en todos los niveles de fertilización nitrogenada aplicados, en comparación a los otros parámetros de calidad estudiados (concentración de proteína del grano, concentración de proteína de la harina y alveograma).

Existen otros análisis de calidad como el gluten index y el índice de dureza del grano, en cuyo caso, no se hace referencia a buena o mala calidad, sino a usos distintos. En general si lo que se quiere es un trigo para elaborar pan, se busca un valor de gluten index entre 65 y 85, que es el rango de valores donde se obtiene un gluten equilibrado, lo que implica un equilibrio entre la capacidad de la masa de retener CO<sub>2</sub> por un tiempo largo y su cohesión. Si lo que se busca es la elaboración de galletas, se prefiere un valor de

gluten index entre 65 y 75 lo que produce un gluten suave, es decir un gluten que no retiene por mucho tiempo el CO<sub>2</sub>, por lo que los productos elaborados no resultan esponjosos.

Para la elaboración de pan se busca un trigo duro, lo que corresponde a un índice de dureza de 21 a 25,9% o semi duro 26 a 30,9%. Un trigo muy duro (16 a 20,9%) es un trigo corrector que se utiliza para mezclas con trigos blandos. Para galletas se utiliza trigos semi blandos (31 a 35,9%) o blandos (36 a 40,9%) debido a que al elaborar galleta no se quiere un producto esponjoso como el pan.

### **Proteínas del grano**

El grano de trigo posee alrededor de un 10% de proteína, de la cual un 15% es soluble en agua (albúminas y globulinas) y se encuentran en el embrión y en la capa de aleurona del grano. El 85% restante está constituido por el gluten que representa la porción de proteínas insoluble en agua. El gluten constituye las proteínas de reserva del grano y se ubica fundamentalmente en el endospermo. Las proteínas de reserva del trigo no poseen actividad enzimática, pero tienen la facultad de formar una masa que retiene gas, generándose productos horneados esponjosos. En base a su contenido de sustancia seca, el gluten aislado de la harina contiene un 80% de proteína y 8% de lípidos, con una pequeña fracción de cenizas e hidratos de carbono.

El complejo gluten, está compuesto por dos grupos principales de proteínas; las gluteninas (de la familia de las glutelinas) y las gliadinas (familia de prolaminas) (Hoseney, 1991)

Las gluteninas son moléculas grandes que forman polímeros heterogéneos constituidos por aproximadamente 20 subunidades, las que están unidas por puentes disulfuro. Su masa molecular oscila entre 100.000 Da y varios millones, con un promedio de 3 millones. Estas corresponden aproximadamente a un 50% de las proteínas de la harina. Físicamente, la proteína es elástica, pero no cohesiva. La glutenina confiere a la masa su propiedad de extensibilidad. Las subunidades del polipéptido de glutenina pueden ser fácilmente separadas después de una reducción química de los enlaces disulfuro interpolipéptido por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. Las subunidades de glutenina se separan en dos grupos distintos; las gluteninas de baja masa molecular (LMWG, low molecular weight glutenins) y las de alta masa molecular (HMWG, high molecular weight glutenins) (Payne, 1987a; Hosney, 1991; Bushuk, 1998).

Las gliadinas son un grupo amplio de proteínas monoméricas que constituyen la mayor proporción del gluten, con propiedades similares pero muy heterogéneas en tamaño y punto isoeléctrico. Su masa molecular media es de unos 40.000 Da (moléculas pequeñas), son de cadena simple y extremadamente adherentes cuando están hidratadas. Tienen poca o nula resistencia a la extensión y parecen ser responsables de la cohesión de la masa (Hosney, 1991). Las gliadinas separadas en un gel de electroforesis a bajo pH, se diferencian en cuatro grupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\omega$ . El análisis de las gliadinas separadas en un gel de electroforesis de dos dimensiones, sugiere que cada variedad contiene aproximadamente 45 polipéptidos diferentes (Payne, 1987b).

Tabla 1. Clasificación de genotipos de trigo de pan, para calidad panadera de acuerdo a sus valores de porcentaje de proteína, volumen de sedimentación, gluten húmedo y gluten seco. Laboratorio de Farinología , INIA.

Calidad panadera	% de proteína	Volumen de sedimentación (ml)	Gluten húmedo (%)	Gluten seco (%)
Buena	>11	>7	>30	>11
Regular	10,9 a 9	6,9 a 4	29,9 a 20	10,9 a 9
Mala	<8,9	<3,9	<19,9	<8,9

### **Localización genómica de los genes de gluteninas y gliadinas.**

Se ha realizado mucho esfuerzo para determinar las relaciones de ligamiento entre genes para proteínas de almacenaje del endosperma del trigo y su ubicación en los mapas cromosómicos. En Tabla 2 se presenta un resumen de la información entregada por varios investigadores. Los genes que controlan las bandas de gliadina individuales en esos cromosomas segregan como una unidad (bloque), con ninguna o escasa recombinación. (Singh y Sheperd, 1988; Skerritt y Robson. 1990; Khelifi y Branlard. 1992; Graybosch y col.,1994; Felix y col.,1996).

Cada *loci Glu-1* (*Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*) que codifican para HMW-GS, consisten en dos genes estrechamente ligados designados como; tipo-X y tipo-Y. En los trigos hexaploides los seis genes de HMW-GS están presentes, pero sólo 1Bx, 1Dx y 1Dy, son siempre expresados, mientras que 1Ax y 1By, se expresan algunas veces y el gen 1Ay no se expresa (D'Ovidio y col., 1995).

En las partículas de harina, el polímero de glutenina comprende tres, cuatro o cinco subunidades de alto masa molecular y aproximadamente 15 de bajo peso molecular.

Tabla 2. Genes que codifican para proteínas de almacenaje en trigo de pan y su ubicación cromosómica.

<i>Locus</i>	Proteína	Cromosoma
<i>Glu-A1</i>	HMWG	1AL
<i>Glu-B1</i>	HMWG	1BL
<i>Glu-D1</i>	HMWG	1DL
<i>Glu-A3</i> <i>Gli-A1</i> <i>Gli-A5</i>	LMWG-GS $\omega$ -gliadina $\gamma$ -gliadina	1AS
<i>Glu-B3</i> <i>Gli-B1</i>	LMWG $\omega$ -gliadina	1BS
<i>Glu-D3</i> <i>Gli-D1</i>	LMWG $\omega, \gamma$ -gliadinas	1DS
<i>Gli-A2</i>	$\alpha$ -gliadinas	6AS
<i>Gli-B2</i>	$\beta$ -gliadina	6BS
<i>Gli-D2</i>	$\gamma$ -gliadina	6DS

### **Gluteninas como marcadores moleculares**

Las subunidades de glutenina, de alta y baja masa molecular, han sido informadas como importantes marcadores de las características de la masa de harinas de trigos hexaploides (Gupta y col., 1989; Payne y col., 1988). Los cultivares de trigo varían en la cantidad y tipo de subunidades de gluteninas responsables de la cantidad y distribución del tamaño de los polímeros de glutenina. Por lo tanto la cuantificación de las subunidades de las gluteninas puede proveer de un mejor entendimiento de sus roles en determinar el uso de la harina dependiendo de su calidad.

Más de 30 subunidades diferentes de HMW han sido identificadas en el mundo en colecciones de trigo. El número de diferentes subunidades LMW en trigo de pan aun no ha sido bien determinada (Bushuk, 1998)

Algunas de las formas alélicas más conocidas para HMW-GS son:

Alelos Glu-A1: nul, 1, 2\*.

Alelos Glu-B1: 6 + 8, 20, 7, 7+8, 7+9, 17+18, 13+16

Alelos Glu-D1: 2, 4+12, 3+12, 2+12, 5+10, 2+10, 2+11

205 cultivares de trigos de pan de origen chino fueron fraccionados por SDS-PAGE para determinar su composición de HMWG. 17 alelos fueron identificados y los resultados indicaron que trigos de diferentes regiones difieren en sus frecuencias de HMWG, sin embargo ninguna de las subunidades puede ser relacionada con medio ambientes específicos (Zhong-hu y col., 1992).



Payne y col., (1987), informaron que la proteína del grano de 84 variedades de trigo fueron separadas por SDS-PAGE para determinar la composición de gluteninas de HMW. La relación entre las subunidades HMWG y la calidad panadera se hizo con la prueba de sedimentación SDS. Se obtuvo una escala para calidad sumando cada una de las subunidades, la que fue llamada GLU-1. Los resultados indicaron que un 47-60% de la variación observada para calidad en este set de variedades podía ser debida a la variación en las subunidades de glutenina de HMWG. La presencia o ausencia en las variedades de un cromosoma translocado con centeno, también fue evaluado, aplicando un factor de corrección. La variación por este motivo en el valor GLU-1 se elevó a 55-67%.

A pesar de que las LMW-GS son la porción principal de las gluteninas, ellas han recibido menor atención por dos motivos principales: en SDS-PAGE muchas LMW-GS co-migran con las gliadinas y hasta hace poco tiempo, los métodos de extracción no permitían una separación sin la contaminación de otras proteínas del gluten. Las nuevas metodologías han permitido extracciones más puras de LMW-GS (Graveland y col., 1982) y el desarrollo de SDS-PAGE en dos dimensiones (Singh y Sheperd, 1988), ha permitido el estudio más detallado del control genético y asociación con calidad con esas subunidades.

### **Dureza del grano.**

La dureza o suavidad del grano afecta fuertemente la textura del endosperma, lo que hace que este carácter sea importante como parámetro de calidad. Los trigos duros requieren una mayor energía durante el proceso de molienda para transformar el

endosperma en harina, además durante este proceso un número considerable de gránulos de almidón son dañados físicamente. Los trigos blandos en cambio producen harinas con un bajo nivel de daño de los gránulos de almidón. El hecho que los gránulos de almidón dañados absorban más agua que los gránulos intactos, influye directamente en la cantidad de pan que se produce a partir de una determinada cantidad de harina. La textura del endosperma también influye en la suavidad de la miga y la fuerza de la masa.

Las diferencias en la textura del endospermo son debido a la fuerza de adhesión entre los gránulos de almidón y la matriz proteica que los rodea. Estas fuerzas son mayores en los trigos duros que en los trigos blandos (Hoseney y Seib, 1973).

Greenwell y Schofield (1986), indicaron que las proteínas adheridas a los gránulos de almidón tienen un peso molecular entre 5 y 76 Kda aproximadamente. Existe una pequeña proteína de 15 Kda asociada a la superficie del granulo de almidón, la cual se detecta en bajos niveles en el endospermo de los trigos duros y en altos niveles en los trigos suaves. Esta proteína llamada “friabilina”, podría tener un rol en el tipo de textura del endospermo.

Se cree que el *locus Ha* ubicado en la parte distal del cromosoma 5D controla la textura del endosperma. En este *locus* denominado “dureza”, la suavidad es el carácter dominante. La friabilina esta formada por proteínas relacionadas, entre las que se incluye la puroindolina a (pinA), purindolina b (pinB) y la gran proteína de la suavidad (GPS). GPS, pinA y pinB han sido mapeados en la parte distal del cromosoma 5DS

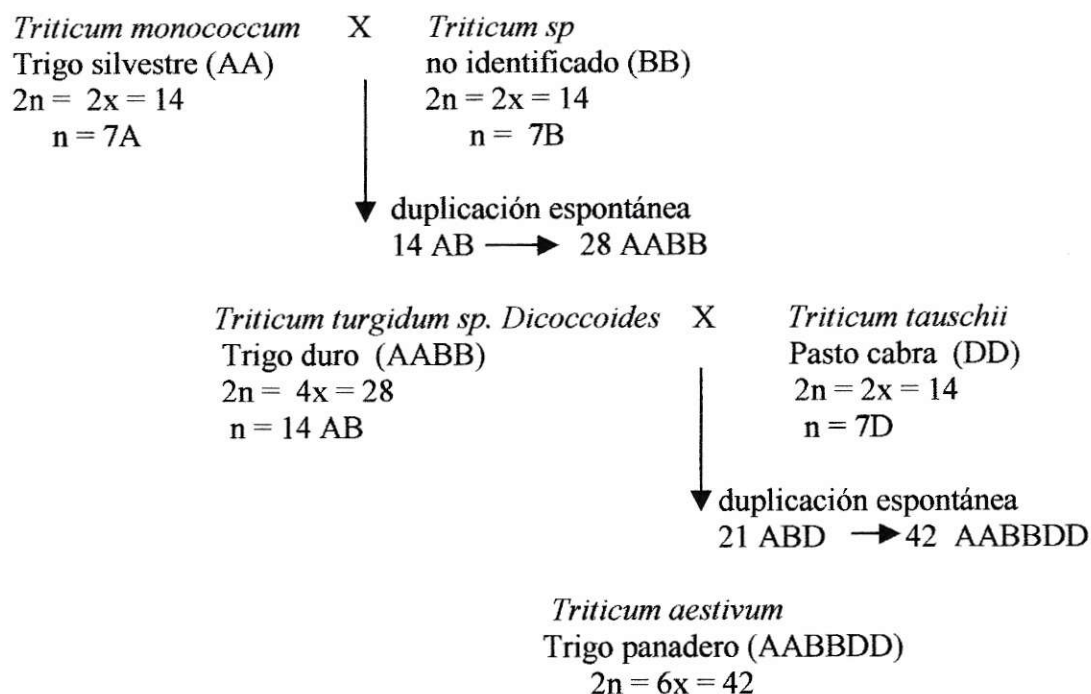
completamente ligados al *locus Ha*. Deleciones en el gen *pinA* o una mutación de glicina por serina en el gen *pinB*, han sido asociadas con dureza.

Resultados recientes han indicado que no existe recombinación entre *Ha* y *pinA*, *pinB* y *GPS*, lo que indica que esos tres genes están estrechamente ligados. Consecuentemente, el polimorfismo de cualquiera de estos genes puede utilizarse como marcador molecular para dureza de grano (Dubcovsky y col., 2000).

La dureza de grano medida a través del índice de tamaño de partícula (PSI) (índice basado en la trituración del grano en un procedimiento de molienda estándar), ha demostrado estar estrechamente relacionado con el contenido de almidón dañado medido por tres métodos químicos. También esta relacionado con la absorción de agua y la capacidad de retención del gas (Williams, 1967).

## Genoma del trigo

El trigo es un aloploiploide (alohexaploide natural), debido a que esta especie posee juegos completos de cromosomas de tres especies ancestrales diferentes.



## Translocaciones 1AL/1RS y 1BL/1RS

En las dos décadas pasadas, los mejoradores del trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.), utilizaron el brazo corto del cromosoma 1R de centeno (*Secale cereale* L.) mediante translocaciones cromosomales, como fuente de genes de resistencia para plagas y enfermedades y para mejorar el comportamiento agronómico de trigos primaverales e invernales. Tanto las translocaciones 1AL/1RS como 1BL/1RS son

ahora comunes en los programas de mejoramiento, produciéndose y liberándose numerosos cultivares de este tipo en el mundo. Desafortunadamente, existen marcados defectos en varios parámetros de calidad que han sido asociados con líneas y variedades que llevan el IRS. La disminución de la calidad panadera en trigos con IRS han sido atribuidos a la disminución de la concentración de gluteninas y al aumento de la concentración de proteínas solubles en solución salina (Johnson y col., 1999).

### **Marcadores moleculares genéticos**

Durante los últimos años, se han desarrollado una serie de herramientas analíticas, basadas en la aplicación de biotecnologías para el estudio directo del ADN del genoma de plantas. Entre estas herramientas, están los denominados marcadores moleculares, cuyo estudio evita la influencia ambiental sobre el carácter estudiado. Los marcadores moleculares están siendo cada vez más importantes en los trabajos de mejoramiento genético, pues su aplicación masiva podría implicar un ahorro importante de tiempo y recursos.

Algunas especies, tales como el trigo hexaploide, se caracterizan por los bajos niveles de polimorfismo intraespecífico detectados por RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) o por RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Devos y col., 1995). Los marcadores basados en RFLP generalmente describen un número limitado de alelos. Los marcadores de RAPD aunque entregan más información generalmente son de carácter dominante, no permitiendo detectar genotipos heterocigotas.

La mayoría de las publicaciones de mapas moleculares de trigo, incluyen sólo unos pocos *loci* mutantes y genes de importancia agronómica. La principal razón para esto es que el uso de RFLPs y marcadores isoenzimáticos para mapeo ha sido ineficiente debido al bajo nivel de variación alelica (< 10%) entre variedades cultivadas (Chao y col., 1989).

En los genomas de plantas y animales existen miles de regiones hipervariables denominadas microsatélites o secuencias de repetición simple (SSR), las cuales se caracterizan por la presencia de 2 a 4 pares de bases repetidas en tandem. Estos loci pueden ser amplificados a través de la reacción de polimeración en cadena (PCR) del ADN, utilizando partidores específicos los cuales reconocen secuencias únicas en los flancos de las regiones hipervariables.

A diferencia de las pruebas de RFLP que requieren una gran cantidad de ADN, que demandan gran cantidad de trabajo y que en la mayoría de los casos los métodos de detección utilizan radioisotopos, los microsatélites sólo requieren para su análisis una pequeña cantidad de ADN genómico (Roder y col., 1998).

El genoma de trigo contiene en promedio un bloque de (GT)<sub>n</sub> cada 704 kb y un bloque (GA)<sub>n</sub> cada 440 kb. El promedio de distancia entre cualquiera de los dos bloques de dinucleótidos es aproximadamente de 271 kb. El trigo, con  $16 \times 10^6$  kb por genoma haploide, tendría entonces un número aproximado de loci (GA)<sub>n</sub> de  $3,6 \times 10^4$  y de  $2,3 \times 10^4$  para (GT)<sub>n</sub> (Roder y col., 1995). Estudios realizados por Plaschke y col., (1995), sugieren que es posible estimar diversidad genética e identificar cultivares elite

de trigo hexaploide utilizando sólo una pequeña fracción de estos numerosos microsatélites. El uso de SSR está aumentando con distintos propósitos, entre otros para el mapeo de genomas de plantas, debido a las siguientes ventajas: primero, los SSR son altamente polimórficos, por lo que permiten detectar una alta variabilidad genética. Segundo, los SSR pueden ser rápidamente analizados por técnicas basadas en PCR. Tercero, los SSR son marcadores codominantes. Finalmente, los SSR están abundante y uniformemente dispersos en el genoma de las plantas. El principal inconveniente sería la dificultad técnica de su identificación y caracterización (preparación de genoteca y secuenciación de los clones seleccionados), así como el requerimiento de técnicas electroforéticas complejas para la resolución de bandas.

Devos y col., (1995), en lugar de aislar fragmentos de ADN que contienen secuencias de microsatélites y de caracterizar por secuenciación sus regiones adyacentes, realizaron la búsqueda de microsatélites en bases de datos de secuencias conocidas, de esta manera identificaron dos microsatélites presentes en genes de proteína de almacenaje en trigo: uno asociado a un pseudogen de  $\gamma$ -gliadina y otro a un gen de glutenina de bajo peso molecular. Los partidores utilizados por ellos fueron genoma específico para ambos genes, 1A para el gen de glutenina LMW y 1B para el gen de  $\gamma$ -gliadina.

Los trabajos para mejorar la calidad de este cereal se han basado hasta la fecha en un antiguo paradigma, "Miren los fenotipos" pero el avance científico de las últimas décadas ha impuesto un nuevo paradigma, "Miren los genes".

## Hipótesis

La expresión de la mayoría de los caracteres de plantas de interés agrícola, está influenciada por condiciones ambientales además de ser regulados genéticamente. Esto dificulta la caracterización del genotipo evaluado, lo que se resuelve parcialmente realizando múltiples ensayos bajo distintas condiciones ambientales, aunque la identificación de estos factores genéticos usualmente no puede ser precisada. Los marcadores genéticos basados en el análisis directo del ADN, presentan la ventaja de no verse afectados por estas variaciones ambientales.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es: **los genes que determinan la calidad panadera pueden ser analizados mediante la caracterización de otros *loci* génicos estrechamente ligados a ellos. De esta manera, determinados alelos de microsatélites, estarían asociados a los alelos de los genes de calidad panadera.**

## Objetivo General

Asociar marcadores moleculares tipo microsatélites a *loci* genéticos de proteínas de reserva y de dureza del grano para complementar los trabajos de mejoramiento genético para calidad panadera.



## **Objetivos Específicos**

1. Determinar la calidad panadera del germoplasma experimental mediante pruebas farinológicas tradicionales (Sedimentación; Gluten índice y gluten seco; Porcentaje de proteína; dureza del grano.
2. Determinar la presencia de proteínas de centeno (secalinas) en trigos con translocaciones 1AL/1RS y 1BL/1RS.
3. Caracterizar los microsatélites elegidos en la población experimental.
4. Determinar los alelos de microsatélites que estén asociados a calidad panadera.
5. Caracterización de las Gluteninas de alto peso molecular mediante PAGE-SDS.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Reactivos y Solventes

De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se usaron los siguientes productos: Trizma-base, CTAB, aceite mineral, agarosa, acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, nitrato de plata, SDS, ácido bórico, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), bromuro de etidio, urea ultrapura y formamida.

De Merck (Darmstadt, Alemania) se usó: EDTA, TEMED, APS, etanol p.a., ácido acético glacial p.a., hidróxido de sodio, urea, cloruro de potasio cloruro de magnesio, cloroformo p.a., alcohol isoamílico p.a., solución de formaldehído al 37% p.a.

De Promega Corp. (Madison, WI, EEUU) se adquirieron los sistemas de tinción con plata y de secuenciación y la Taq polimerasa.

Repel Silane EC, compuesto repelente que no permite que la poliacrilamida se adhiera a los vidrios es de Pharmacia Biotech (Uppsala, Suecia).

Los partidores para las reacciones de PCR se sintetizaron en IDT (Integrated DNA Technologies), Inc. Coralville, IA, EEUU.

## **2.2 Material genético**

El material experimental esta formado por 80 genotipos de trigo de pan adaptadas a la zona Centro Norte de Chile. Este germoplasma provino del Proyecto de Fitomejoramiento Trigo del CRI (Centro Regional de Investigación) La Platina, INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). Las líneas experimentales corresponden a genotipos homocigotos con alta variabilidad para calidad panadera, provenientes de distintos progenitores. En el Anexo 1 se presentan las variedades con sus respectivas cruzas y pedigrí. En el desarrollo de este trabajo se mencionan las líneas experimentales con el número de entrada que se le asigno en el anexo 1. La siembra del cultivo se realizó en Agosto de 1999 y la cosecha en Enero del 2000, en el centro La Platina.

## **2.3 Análisis de calidad panadera**

La evaluación del material experimental con relación a su calidad panadera se efectuó mediante la determinación del contenido de proteína del grano, volumen de sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten índice y dureza del grano, de acuerdo a la siguiente metodología:

- a. Determinación del porcentaje de proteína del grano. Se utilizó el método de Kjeldhal, (método 46-13 de la American Association of Cereal Chemists (AACC), 1998). Este método consta de tres etapas: primero una digestión ácida con ácido sulfúrico

para eliminar la materia orgánica, se utiliza sulfato de potasio y selenio como catalizador, el proceso se realiza a 380°C por 75 min. Segundo se realiza una destilación por arrastre de vapor y tercero la muestra se somete a titulación con ácido sulfúrico diluido. La cantidad de ácido gastado en la titulación permite determinar el porcentaje de proteína de la muestra. Este valor multiplicado por 5,7 corresponde al porcentaje de proteína en el grano.

- b. Prueba de sedimentación SDS en 0,5 g de harina (Granger y col., 1989). Esta prueba permite determinar la calidad del gluten. A medio gramo de harina se le adiciona 10 mL de una solución de azul bromofenol en agua destilada (el colorante permite la posterior lectura del volumen de sedimento logrado), se agita durante 10 s y se deja reposar 5 min. Posteriormente se agrega 6 mL de una solución de ácido láctico más SDS 20% (1:8). El SDS permite que el ácido láctico, actúe sobre el gluten provocando un aumento de volumen del mismo. La muestra se agita durante 1 min y se deja reposar 14 min, finalmente se lee el volumen de sedimento. A mayor volumen mejor gluten.
- c. Gluten húmedo, gluten seco y gluten index. Estas pruebas se basaron en la metodología señalada por la AACC, (1998). 10 g de harina son lavados, eliminándole el almidón y las proteínas solubles. Se colecta el gluten, el cual tiene una consistencia pegajosa. La masa del gluten obtenido corresponde al gluten húmedo. Posteriormente el gluten es sometido a un proceso de centrifugación especial. En un soporte con tamiz se coloca la muestra y durante el proceso de

centrifugación parte del gluten atraviesa el tamiz. El gluten índice corresponde al porcentaje del gluten que no atraviesa el tamiz. El gluten seco corresponde al gluten total secado a 150°C por 4 min.

- d. Dureza de grano. Se calculó por el Método Pearling (AACC, 1998). 20 gramos de trigo son depositados en un perlador, que es un equipo que funciona como un esmeril. Durante un minuto el grano de trigo se va gastando. Se elimina el afrecho producido y se pesa el trigo. El índice de dureza corresponde al porcentaje del trigo que se gastó. A menores valores se consideran trigos más duros.

#### **2.4 Detección de translocaciones con centeno**

Mediante las secuencias de oligonucleótidos, denominadas RIS (rye-specific repetitive element) diseñada por Koebner (1995), las cuales fueron utilizadas como partidores, se detectó la presencia de ADN de centeno. Los trigos que poseen translocaciones con centeno, generan vía PCR un producto simple de aproximadamente 100 pb, el cual no está presente en los trigos donde no existe la translocación. Estos partidores no permiten dilucidar si la translocación detectada corresponde a 1AL/1RS o 1BL/1RS.

La secuencia de RIS es:

Directa 5' taa ttt ctg ctt gct cca tgc 3'

Inversa 5' act ggg gtg cac tgg att ag 3'

Las muestras fueron amplificadas de acuerdo al siguiente perfil térmico: 25 a 35 ciclos de 15 s a 94°C, 45 s a 65°C y 45 s a 75°C seguido por 5 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 1%.

## **2.5 Reacciones de microsatélites.**

### **2.5.1 Extracción de ADN**

Las extracciones de ADN se basaron en el método descrito por Saghai-Marroof y col., (1984) con algunas modificaciones. Se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido foliar juvenil, el que fue macerado con nitrógeno líquido. Se agregaron 700  $\mu$ L de solución amortiguadora de extracción (10 mM EDTA; 50 mM tris-HCl (pH 8,0); 0,7 M NaCl; 1% CTAB y 0,2%  $\beta$ -mercaptoetanol) . Se colocaron las muestras en un baño termostático a 65°C durante 30 min, con agitación suave ocasional. Se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min aproximadamente. Luego, se agregaron 600  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se homogenizaron suavemente por inversión hasta formar una emulsión. Se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min. Se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL y se procedió a precipitar el DNA con 2/3 volumen de isopropanol frío mezclado por inversión. Se dejó precipitar el ADN 1 hora a -20°C o toda la noche a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 700  $\mu$ L de etanol frío al 70%. Se centrifugó a 8.000 rpm por 5 min para rescatar el pellet el cual fue secado al vacío. El pellet se disolvió en 100  $\mu$ L de agua destilada estéril. Se trató con 1  $\mu$ L de RNasa por 100  $\mu$ L de solución de DNA y se incubó a 37 °C por 30 min. Se cuantificó el DNA en un fluorímetro. El DNA se diluyó 50 veces y se almacenó a 4 °C.

### **2.5.2 Partidores de Microsatélites**

Para los análisis de microsatélites se seleccionaron 28 pares de partidores descritos por Devos y col., (1995); Korzun y col., (1997); Roder y col., (1998); Pestova y col., (2000). Estos partidores están mapeados principalmente en los cromosomas 1 y 6, que es donde se ubican los genes que codifican para las proteínas de reserva del trigo.

### **2.5.3 Reacción de PCR**

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador Perkin-Elmer, con 10 ng de ADN templado en 20  $\mu$ L de reacción. La concentración final de los otros reactivos fue la siguiente: 2 mM dNTPs; 8mM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; solución amortiguadora de PCR 1X y 0,5 U de Taq polimerasa en 20  $\mu$ L de volumen final. En la Tabla 3 se indican la concentración de cada partidor de SSRs (directo y reverso), la temperatura de alineamiento y el número de ciclos térmicos.

### **2.5.4 Ciclo térmico PCR**

Después de una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, las muestras fueron amplificadas de acuerdo al siguiente perfil térmico: 30 ciclos de un min a 94°C (desnaturalización), un minuto de unión de partidores a 55°C ó 60°C (dependiendo del partidor) y 2 min de extensión a 72°C. En la Tabla 3 se presentan los partidores analizados y las condiciones de PCR utilizados en cada uno de ellos.

Tabla 3. Secuencias de los partidores SSRs con su ubicación cromosomal y condiciones de PCR utilizados.

Nombre del Partidor y secuencias	Ubicación cromosomal	Concen. del partidor.	Temperatura de Alineamiento	Número de Ciclos	Origen
Xglu A3 F 5'tcccgccatgagtcaatc3' R 5'tgggagacacattggcc3'	1 A	250 nM	60°C	30	Devos y col., (1995)
Xgwm164 F5'acatttctccccatcgtc R 5' ttgtaaacaaatcgcatgcg3'	1 A	250 nM	55°C	40	Roder y col., (1998)
Xgwm 135 F5' tgtcaacatcgtttgaaaagg3' R5' acactgtcaacctggcaatg 3'	1 A	250 nM	60°C	30	Roder y col.,(1998)
Xgwm 498 F5'ggtggtatggactatggacact3' R5'ttgcatggaggcacatact3'	1 B	12,5 nM	55°C	40	Roder y col.,(1998)
Xgdm 98 F5'ccatccatgaaatggcg3' R5' gcccttcactagccttcag3'	6 D	15 nM	55°C	30	Pestova y col.,(2000)
Xgdm 19 F5'gcgttcgagtgacttccaat3' R5' atfgacagcagatggcagtg3'	1 D	15 nM	55°C	30	Pestova y col.,(2000)



### **2.5.5 Electroforesis de geles de poliacrilamida desnaturante**

Los productos del SSR se separaron en un gel de PAA al 6% y 7,5 M de urea del tipo de secuenciación. La solución de poliacrilamida-urea se preparo a partir de una solución acrilamida-bisacrilamida al 40%. El gel de poliacrilamida consta de una solución que contiene 70 mL de acrilamida-urea, 163  $\mu$ L de APS 10% y 88  $\mu$ L de TEMED. A uno de los vidrios se aplica Repel Silane de manera que impida que se adhiera el gel al vidrio. Al otro vidrio se le agrega bind silano (1 mL de etanol 95%, 3  $\mu$ L de BindSilano y 5  $\mu$ L de ácido acético 10%). Una vez polimerizado, el gel se sometió a una diferencia de potencial de 1800 Volt durante 30 min en una cámara de electroforesis con TBE 0,5X como solución amortiguadora, sin las muestras, para que llegar a una temperatura de 50°C. Los productos de PCR se diluyeron a la mitad con solución de carga (95% de formamida, Xilen cianol y Azul de bromofenol 1mg/mL, y EDTA 10 mM) y se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Se colocaron en hielo inmediatamente, hasta que se cargaron en el gel. El gel se sometió a una diferencia de potencial de 1800 Volt durante 1-2 horas a 70-80 W, a 50°C como temperatura óptima. Luego se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata.

### **2.5.6 Tinción de ADN con plata usando el sistema Silver Sequence<sup>TM</sup>**

Se fijaron los productos de PCR al gel dejándolo inmerso en 2 L de ácido acético al 10% durante 30 minutos o hasta que el xilencianol desapareciera. El ácido acético se recuperó para utilizarlo posteriormente en la detención del revelado. Luego se lavó el gel 2

veces con H<sub>2</sub>O destilada durante 5-10 min cada vez. Se transfirió el gel a una bandeja que contenía 2 Litros de solución de nitrato de plata (1g/L) con 3 ml de formaldehído al 37%. Mientras se teñía el gel, se prepararon 2 L de solución de revelado, carbonato de sodio (30g/L), al que se le agregan 3 mL. de formaldehído al 37% y una gragea de tiosulfato de sodio (10 mg/mL). Se mantuvo refrigerado hasta usarse.

Al cabo de 30 min el gel se lavó brevemente con H<sub>2</sub>O destilada e inmediatamente se sumergió el gel en la solución de revelado y se esperó la aparición de las primeras bandas. Se detuvo la reacción con el ácido acético guardado y luego se lavó veces con H<sub>2</sub>O destilada.

### **2.5.7 Determinación del tamaño de los amplificadores obtenidos por PCR**

Para determinar los tamaños de los amplificadores de PCR se utilizó el SILVER SEQUENCE<sup>TM</sup> DNA Sequencing System, de Promega, con el cual se realizó la secuenciación de los fragmentos de interés del plásmido pGEM-3Zf(+).

Para cada reacción de secuenciación (G,A,T,C), en tubos eppendorf de 0,5 ml se adicionó 2 µL de la correspondiente mezcla de d/ddNTP. Se adicionó luego 200 µL aceite mineral vegetal en cada muestra y se dejaron en hielo. Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

4,0 µL	ADN control pGEM-3Zf(+)(4µg)
5,0 µL	Amortiguador (5X) secuenciación ADN
3,6 µL	Partidor directo pGEM -3Zf(+) (4,5 pmol)
1,0 µL	Taq polimerasa
2,4 µL	Agua libre de nucleasa

Esta mezcla se distribuyó en los cuatro tubos de reacción.

El ciclo térmico de amplificación fue el siguiente: desnaturalización inicial de 95°C por 2 min, 45 ciclos de 30 seg a 95°C (desnaturalización), 30 seg de unión de partidores a 42°C y 1 min de extensión a 70°C. Finalmente 4° C por tiempo indefinido.

Los productos de secuenciación del plasmido y amplificados representativos de los marcadores analizados, se separaron en un gel de poli acrilamida al 6%, 7,5M urea del tipo de secuenciación. Esto permitió por comparación, determinar el tamaño en pares de base de los alelos de SSR encontrados.

## **2.6 Identificación de subunidades de gluteninas de alta masa molecular**

Para la extracción de las proteínas se utilizó una modificación de la técnica descrita por Ng y Bushuk (1987). Se molieron cinco granos por variedad, de los cuales se pesaron 12 mg de harina y se disolvieron en 300  $\mu$ L de una solución amortiguadora compuesta por 0,05 M de Tris-HCl (pH 8,0), 5 M de urea, 0,2% de SDS, 3% de 2-mercaptoetanol y 0,003% azul de bromofenol, con agitación vigorosa. Se dejó reposar una o dos horas a temperatura ambiente.

Se analizó las muestras por electroforesis vertical, en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de 9 X 8 X 0,1 cm, según la técnica descrita por Laemmli (1970). Cada gel contenía 10 carriles y se cargaron 10  $\mu$ L de la muestra en cada uno.

Se usó un gel concentrador y un gel separador que contenían 4,5% de acrilamida, 0,06% de bisacrilamida, 0,05% de SDS, 0,125 M de Tris -HCL (pH 6,8) y 9% de acrilamida,

0,12% de bisacrilamida, 0,05% de SDS, 0,38 M de Tris-H Cl (pH 8,8), respectivamente. En ambos casos, la polimerización se comenzó agregando 0,044% de persulfato de amonio y 0,043% de TEMED.

Las electroforesis se efectuó a 15 mA por gel, a temperatura ambiente. La solución amortiguadora de electroforesis usada, contenía 0,191 M de glicina, 24,7 mM de Tris-HCl (pH 8,3) y 0,13% de SDS.

Los geles fueron teñidos durante toda la noche en una solución al 44% de ácido acético y 0,25 g/L de azul de Coomasie R-250, y destañidos en una solución al 20% de metanol y 5% de ácido acético.

Para la identificación de las subunidades se utilizaron variedades de perfil electroforetico conocido como testigos (Hewstone y Hinrichsen, 1994).

En base a la composición de subunidades de HMWG, se determinó el índice de calidad panadera llamado GLU-1. Este índice fue diseñado por Payne y col. (1987) y asigna determinados valores a cada subunidad, Tabla 4. Los valores obtenidos para los distintas subunidades presentes en un genotipo se suman. El máximo valor posible de obtener es 10, el que esta asociado a niveles de calidad superior. Se aplica un factor de corrección en los casos que exista translocación con centeno; con valores de GLU-1 entre 8 y 10 se restan 3 puntos, entre 5 y 7 se restan 2 puntos y entre 3 y 4, 1 punto.

Tabla 4. Valores asignados para pares o subunidades simples de gluteninas de HMWG.

Valor	Cromosoma 1A	Cromosoma 1B	Cromosoma 1D
4	-	-	5+10
3	1	17+18	-
3	2*	7+8	-
2	-	7+9	2+12
2	-	-	3+12
1	Null	7	4+12
1	-	6+8	-

## 2.6 Análisis estadístico

Para analizar las asociaciones existentes entre los marcadores genéticos y los parámetros de calidad evaluados, se utilizó la metodología descrita por Ostle (1963). Esta metodología permite correlacionar variables cualitativas (alelos de microsatélites) con variables cuantitativas (parámetros de calidad).

La fórmula de correlación ( $E^2$ ) es la siguiente:

$$E^2 = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (\bar{Y}_{ij} - \bar{Y})^2}$$

Para cada parámetro de calidad y cada marcador SSR, se realizó un ordenamiento de los datos por tipo de alelo, los que se denominaron arreglos. En este análisis  $\bar{Y}_i$  es el promedio del  $i^{\text{ésimo}}$  grupo consistente en  $n_i$  observaciones (número de observaciones de cada arreglo) e  $\bar{Y}$  es el promedio de todas las observaciones. La tasa de correlación  $E^2$  se compone de un numerador formado por la sumatoria de las diferencias entre el promedio de la variable cuantitativa para una determinada variable cualitativa (alelo) y el promedio general de la variable cuantitativa, multiplicada por el número de individuos que tienen ese determinado alelo. El denominador se obtiene sumando las diferencias entre cada valor individual y el promedio general de la variable cuantitativa que se está analizando. Para determinar la significación estadística de las correlaciones obtenidas, se utilizaron las tablas de Woo (1929).

### **3. RESULTADOS Y DISCUSION**

#### **3.1 Análisis de calidad panadera**

Los análisis de calidad realizados al germoplasma experimental se señalan en la Tabla 5. En dicha Tabla se ordeno el germoplasma por valores descendentes de volumen de sedimentación. El germoplasma experimental presentó un amplio rango para sedimentación, con valores que fluctuaron entre 4,9 y 14,5, lo que permitió disponer de genotipos de mala, regular y buena calidad para sedimentación. En cambio para porcentaje de proteína del grano, gluten seco y gluten húmedo la variabilidad no fue tan alta como para sedimentación, ya que para estos parámetros no hubo variedades que pudieran considerarse de baja calidad, sino que solamente regulares y buenas. Esto sucede porque es muy difícil que una línea de trigo que a recibido un adecuado manejo agronómico presente bajos niveles de proteína en el grano, que es lo que evalúan principalmente estos análisis. El porcentaje de proteína del grano fluctuó entre 11,2 y 15,9%, los valores para gluten seco variaron entre 10,3 y 18,6% y los de gluten húmedo entre 31,7 y 53 %.

Para sedimentación, porcentaje de proteína del grano, gluten seco y gluten húmedo, mayores valores implican mejor calidad. En cambio para gluten índice y dureza esto

es distinto, ya que en estos casos no se puede hablar de buena o mala calidad, sino de usos distintos. El germoplasma experimental presento índices de dureza que clasifican este material como muy duros (16 a 20,9%), duros (21 a 25,9%) o semi duros (26 a 30,9%).



Tabla 5. Calidad panadera del germoplasma experimental, determinada mediante el contenido de proteína del grano, sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten índice y dureza del grano.

Entrada	Sedimentación (mL)	Proteína (%)	Gluten húmedo (%)	Gluten Seco (%)	Gluten índice	Dureza (%)
15	14,5	13,7	37,6	13,1	79,8	24
38	13,9	13,1	39	12,5	94,8	19,4
4	12,5	12,9	38,1	13	99,4	22,2
61	12,1	15	34	14,3	98,1	24
62	12	14,2	42,9	15,2	91,8	21,2
41	12	12,7	36,3	12,4	91,7	17,7
25	11,9	12,1	34,3	11,7	99,7	22
13	11,6	12,7	36,8	12,5	99,4	19,7
3	11,6	12,6	38,3	12,6	99,2	20,2
68	11,4	14,4	37,7	13,4	99,4	19,6
18	11,3	12,4	37,5	13,2	99,7	21,4
60	10,9	15	43,2	14	96,3	19
58	10,7	14,8	42,3	13,7	75,4	20,3
14	10,7	14,5	42,8	14,4	85,3	20,8
2	10,7	12,5	36,7	12,9	99,7	19,3
54	10,4	14,9	43,3	14,5	94,4	20,7
71	10,4	13,1	38,7	13,1	90,9	20
17	10,2	13,3	35,1	12,9	100	19,8
1	10,1	13,7	40	14,2	91,5	18,5
67	10	14,2	45,5	15,1	52,3	23,7
37	10	11,7	34,4	11,3	91,3	20,4
59	9,9	15,9	48,4	16,6	56,4	27,3
64	9,8	13,8	42,8	14,3	92,3	22,8
30	9,7	14,3	43,4	13,4	85,9	21,7
12	9,6	12,4	34,9	11,5	96,2	20,7
52	9,5	15,2	53	18,6	76,9	22,4
57	9,5	14,1	33	14,1	85,1	18,7
76	9,4	12,3	39,3	13,3	84,9	18
26	9,2	14,7	41	13,4	91,4	19,3
78	9,2	12,5	40,8	13,4	80,5	21,2
29	9,1	13,2	39	14,4	99,2	18,1
66	9	14,4	40,4	13	88,8	20,3
75	9	13,5	41,6	13,4	76,2	19,6
80	8,9	12,7	35,7	12,3	90,2	22,8
27	8,8	15,7	43,1	14,2	96,3	19,3
65	8,8	14,1	42	14,2	91,6	21
70	8,8	13,9	37,8	12,8	99,4	21,3
77	8,8	12,4	34,2	11,8	99,4	19,5
40	8,8	12,1	35	12,1	61,7	18,5
79	8,7	14	41,2	14,2	85,9	26,4

Continuación Tabla 5.

Entrada	Sedimentación (mL)	Proteína (%)	Gluten húmedo (%)	Gluten Seco (%)	Gluten index	Dureza (%)
6	8,7	12,5	37,8	12,7	95,2	20,6
55	8,6	14,7	44	14,5	90	17,8
74	8,6	12,6	36,5	12,3	66	26,3
72	8,6	11,8	32	11	93,4	22,2
63	8,5	14,3	41	13,9	86,6	23,6
39	8,5	11,5	28,5	10,3	99,6	22,9
51	8,4	12,4	33,6	11,1	93,4	18,6
28	8,3	14,9	38,4	13,5	99,7	18
11	8,3	13,3	43,4	15,9	62,9	22,2
53	8,3	13,1	41,8	13,6	86,6	17,9
56	8,2	14,7	45,3	14,8	85,6	20,6
33	8,1	12,1	36,5	12,8	81,1	23,8
45	8	13,1	40,4	13,7	76,5	20,4
5	8	12,2	36,1	12,1	97,2	20,2
47	8	12	33,2	11,2	95,5	18
16	7,9	12,7	37,6	13,1	91,8	18
42	7,9	11,5	31,8	10,7	94,3	17,5
69	7,8	13,6	42,2	14	71,8	21,4
43	7,5	11,2	33,8	11	85,2	17
7	7,4	12,4	35,1	11,3	86,6	24,6
50	7,1	13,9	31,7	12,8	99,7	17,5
20	6,7	13,8	39,4	13,4	90,8	18
22	6,7	12,3	39,5	13,2	86,6	18,9
10	6,5	13	40,3	14,1	51,1	20,1
49	6,4	13,1	38,9	12,6	87,1	18,4
36	6,4	11,3	37,9	12,9	73,1	25,5
73	6,2	13,9	41,1	13,2	76,4	19,6
19	6,2	13	39,7	13	77,6	18,5
23	6,1	12,3	34	11,7	96,2	18,7
31	6,1	11,8	39,4	12,8	83,5	18
21	5,9	12,6	38,1	12,5	84,1	19,4
34	5,9	12,2	37,3	13,1	82,3	21,9
48	5,9	11,7	33,9	11,5	91,9	17,5
9	5,8	12,7	40,1	13,5	39,1	22,5
46	5,8	12,2	32,4	11	62	18
32	5,8	11,4	33,2	11,1	87,2	18
35	5,5	12,3	34,7	11,9	88,2	18
44	5,5	11,5	37,7	12,4	80,4	18,9
8	5,3	14	43,8	15,3	46,3	24,3
24	4,9	11,5	31,7	11	78,2	19,3

Al correlacionar las pruebas de calidad realizadas mediante el método de Pearson, Tabla 6, se obtuvo correlaciones estadísticamente significativas entre porcentaje de proteína, sedimentación y gluten seco. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores como Johansson y Svensson (1999), que informaron de la existencia de una correlación significativa entre contenido de proteína y sedimentación para trigos primaverales. Branlard y col., (1991), por su parte señalaron altos niveles de correlación para las pruebas de calidad: contenido de proteína, sedimentación, mixograma y farinograma, en el análisis de 125 trigos de habito invernal. Gluten húmedo no presentó una correlación significativa con sedimentación. En general gluten seco es un mejor parámetro de selección para calidad que gluten húmedo. Esto es reafirmado por el trabajo de Sip y col., (2000), quienes encontraron un bajo efecto del cultivar sobre el contenido de gluten húmedo en comparación al efecto de localidad, año y manejo agronómico.

El índice de correlación de gluten seco con proteína (0,77) es más alto que el índice de correlación de sedimentación con proteína (0,36). Esto ocurre porque el gluten seco es principalmente un indicador de la cantidad de proteína de reserva del grano, y sedimentación señala la calidad de la proteína de reserva del grano. Resultados similares fueron obtenidos por Cygankiewicz (1997), quien estudio 511 trigos de invierno y 711 trigos de primavera. A este germoplasma se les determinó distintos parámetros de calidad (sedimentación, contenido de proteína, resistencia al amasado, decaimiento de la masa, volumen de pan y calidad de pan). Los resultados obtenidos indicaron que los valores de sedimentación fueron los que presentaron las correlaciones más altas con calidad de gluten.

Tabla 6. Coeficiente de correlación de Pearson, entre porcentaje de proteína del grano, Sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten índice e índice de dureza.

	Proteína	Sedimentación	Gluten húmedo	Gluten seco	Gluten índice	Índice de dureza
Proteína	1,0*					
Sedimentación	0,36*	1,0*				
Gluten húmedo	0,71*	0,16	1,0*			
Gluten seco	0,77*	0,22*	0,88*	1,0*		
Gluten índice	-0,05	0,37*	-0,36*	-0,32*	1,0*	
Índice de dureza	0,21	0,21	0,28*	0,33*	-0,35*	1,0*

- Coeficiente de correlación estadísticamente significativo al 5%.

### 3.2 Detección de translocaciones con centeno.

Un alto número de líneas en ensayo (41%), mostraron la presencia de ADN de centeno. Los partidores utilizados amplifican un segmento de ADN específico de centeno, pero no permiten identificar si la translocación existente corresponde a 1AL/1RS o 1BL/1RS.

En Tabla 7 se indican con color rojo las variedades que presentan translocación con centeno. En dicha Tabla las líneas experimentales se ordenaron por valores ascendentes de sedimentación, lo que permite apreciar que los valores más bajos de sedimentación, estuvieron asociados con la presencia de translocaciones. Esto indica una disminución en la calidad de las proteínas de reserva en el grano por efecto del 1RS. El efecto perjudicial de la translocación 1BL/1RS sobre sedimentación fue informado por Bullrich y col.,(1998), quienes señalaron que este efecto fue observado en todos los genotipos estudiados. En este mismo estudio la translocación produjo una disminución del número de espigas por planta y un aumento del peso de los granos.

La presencia de secalinas no tuvo efecto en el porcentaje de proteínas del grano ni en el porcentaje de gluten seco. Estos resultados son coincidentes con Johnson y col., (1999) quienes no detectaron efecto de la translocación 1BL/1RS sobre contenido de proteína en el grano, contenido de humedad del grano, así como tampoco en las propiedades reológicas de la masa.

Las proteínas de centeno, secalinas, provocan en el trigo una disminución en la calidad de las proteínas de reserva del grano, por una disminución de la

concentración de gluteninas. La cantidad total de proteínas no disminuye debido a que se produce un aumento de las proteínas solubles en soluciones salinas. El hecho de que el porcentaje de gluten seco sea una prueba de calidad panadera que esta más correlacionada con la cantidad que con la calidad de la proteína de reserva del grano explica porque no se vio afectada por la presencia de las translocaciones.

En investigaciones como la presente, donde se busca encontrar marcadores genéticos asociados a calidad panadera, es importante considerar la presencia de translocaciones, pues son factores que afectan directamente la calidad panadera. No considerar esta característica induciría a crear patrones de selección errados.

Dentro de los trabajos habituales del Proyecto Trigo del CRI La Platina, no se realizan determinaciones de translocaciones con centeno. El alto número genotipos que mostraron presencia de ADN de centeno en esta investigación planteó la necesidad de realizar este tipo de prueba en forma regular, en los programas de mejoramiento.

Tabla 7. Valores de sedimentación ordenadas en forma ascendente, porcentaje de proteína y porcentaje de gluten seco del germoplasma experimental. Las entradas de color rojo indican presencia de ADN de centeno en esos genotipos.

Entrada	Sedimentación	Proteína (%)	Gluten seco(%)	Entrada	Sedimentación	Proteína (%)	Gluten seco(%)
24	4,9	11,5	11	79	8,7	14	14,2
8	5,3	14	15,3	40	8,8	12,1	12,1
44	5,5	11,5	12,4	77	8,8	12,4	11,8
35	5,5	12,3	11,9	70	8,8	13,9	12,8
32	5,8	11,4	11,1	65	8,8	14,1	14,2
46	5,8	12,2	11	27	8,8	15,7	14,2
9	5,8	12,7	13,5	80	8,9	12,7	12,3
48	5,9	11,7	11,5	75	9	13,5	13,4
34	5,9	12,2	13,1	66	9	14,4	13
21	5,9	12,6	12,5	29	9,1	13,2	14,4
31	6,1	11,8	12,8	78	9,2	12,5	13,4
23	6,1	12,3	11,7	26	9,2	14,7	13,4
19	6,2	13	13	76	9,4	12,3	13,3
73	6,2	13,9	13,2	57	9,5	14,1	14,1
36	6,4	11,3	12,9	52	9,5	15,2	18,6
49	6,4	13,1	12,6	12	9,6	12,4	11,5
10	6,5	13	14,1	30	9,7	14,3	13,4
22	6,7	12,3	13,2	64	9,8	13,8	14,3
20	6,7	13,8	13,4	59	9,9	15,9	16,6
50	7,1	13,9	12,8	37	10	11,7	11,3
7	7,4	12,4	11,3	67	10	14,2	15,1
43	7,5	11,2	11	1	10,1	13,7	14,2
69	7,8	13,6	14	17	10,2	13,3	12,9
42	7,9	11,5	10,7	71	10,4	13,1	13,1
16	7,9	12,7	13,1	54	10,4	14,9	14,5
47	8	12	11,2	2	10,7	12,5	12,9
5	8	12,2	12,1	14	10,7	14,5	14,4
45	8	13,1	13,7	58	10,7	14,8	13,7
33	8,1	12,1	12,8	60	10,9	15	14
56	8,2	14,7	14,8	18	11,3	12,4	13,2
53	8,3	13,1	13,6	68	11,4	14,4	13,4
11	8,3	13,3	15,9	3	11,6	12,6	12,6
28	8,3	14,9	13,5	13	11,6	12,7	12,5
51	8,4	12,4	11,1	25	11,9	12,1	11,7
39	8,5	11,5	10,3	41	12	12,7	12,4
63	8,5	14,3	13,9	62	12	14,2	15,2
72	8,6	11,8	11	61	12,1	15	14,3
74	8,6	12,6	12,3	4	12,5	12,9	13
55	8,6	14,7	14,5	38	13,9	13,1	12,5
6	8,7	12,5	12,7	15	14,5	13,7	13,1

### 3.3 Análisis del germoplasma mediante microsatélites

#### 3.3.1 Caracterización de los microsatélites en la población experimental

Algunos de los marcadores utilizados en este trabajo, fueron obtenidos de la colección de Roder y col., (1998), quienes realizaron la construcción de un mapa genético de alta densidad para trigo de pan, consistente en 279 marcadores SSR.

La totalidad de los marcadores evaluados y sus orígenes se indican en los Anexos 2 y 3. Los marcadores seleccionados para esta investigación, se ubican principalmente en los cromosomas homeólogos 1 y 6, que es donde están ubicados los *loci* para proteínas de reserva del grano.

Inicialmente en esta investigación se había planificado evaluar un alto número de estos partidores, pero al iniciar los trabajos se encontró una seria dificultad; los productos de amplificación obtenidos no eran los esperados. Reiteradamente y con distintos partidores se producían múltiples productos de amplificación no específicos, como los que se ilustran en la Figura 1.

En algunos casos, como con los microsatélites Xgwm 498, Xgdm 98 y Xgdm 19, se logró obtener un buen producto de amplificación reduciendo la concentración de partidores en la mezcla de reacción de PCR en 15 veces aproximadamente (de 250 nM a 15 nM), en relación a la concentración usada frecuentemente. En otros casos, a pesar de múltiples cambios en la metodología utilizada (modificaciones en los ciclos térmicos y en la mezcla de reacción del PCR, cambios de reactivos y de rutina de trabajo) no se obtuvieron resultados positivos.



De 28 marcadores evaluados, sólo siete se comportaron adecuadamente, siendo capaces de amplificar segmentos específicos de ADN. Uno de estos siete, HVM4, resulto completamente monomorfo, (Figura 2), por lo que no tiene utilidad como marcador genético.

Posteriormente se dispuso de información de otros centros de investigación nacionales (Javier Zuñiga, CRI Carillanca, INIA, comunicación personal) y extranjeros (Stephenson *et al.*, 1998), los cuales habían obtenido resultados similares a los nuestros, lo que indicaba que parte de los microsatélites que se encuentran publicados en distintas revistas científicas, no son aptos para ser utilizados como marcadores genéticos, al menos en los genotipos usados en este trabajo.

Se buscó la causa de porque unos marcadores funcionaban bien, es decir amplificaban segmentos específicos ADN y otros en cambio producen múltiples productos de amplificación que no es una característica propia en un SSR. Para esto los marcadores evaluados fueron separados en dos grupos; los que presentan un buen comportamiento como marcadores genéticos, Anexo 2, y los que no, Anexo 3.

Para ambos grupos de partidores, mediante el programa OMIGA 2.0 se les determino el % CG, la  $T_m$  (melting térmico), la  $T_m$  diferencial y la capacidad de que cada partidore se hibride consigo mismo (auto-alineamiento) o con su pareja (alineamiento primer-primer). El resumen de estos análisis se indican en la Tabla 8, y como se observa en dicha Tabla, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

Una explicación probable para los SSRs que producen múltiples productos de amplificación, es que los partidores se estén alineando en secuencias que están repetidas en el genoma, produciendo un alto número de amplificadas.

De acuerdo a lo señalado por Victor Obreque (CRI La Platina, INIA, comunicación personal), quien a trabajado en la elaboración de SSRs específicos para el genoma de camelidos, al confeccionar los partidores para amplificar un determinado microsatélite, las secuencias seleccionadas podrían no ser las más convenientes, si estas no son específicas. Esto quiere decir que los partidores sintetizados tienen la capacidad de alinearse en distintos segmentos del ADN, en los cuales, si bien no existe un cien por ciento complementariedad, igual se producen distintos grados de alineamiento, dependiendo de las condiciones y tipo de reactivos de la mezcla de reacción del PCR y de los ciclos térmicos. Los partidores que presentan el este tipo comportamiento no tienen utilidad y se descartan.

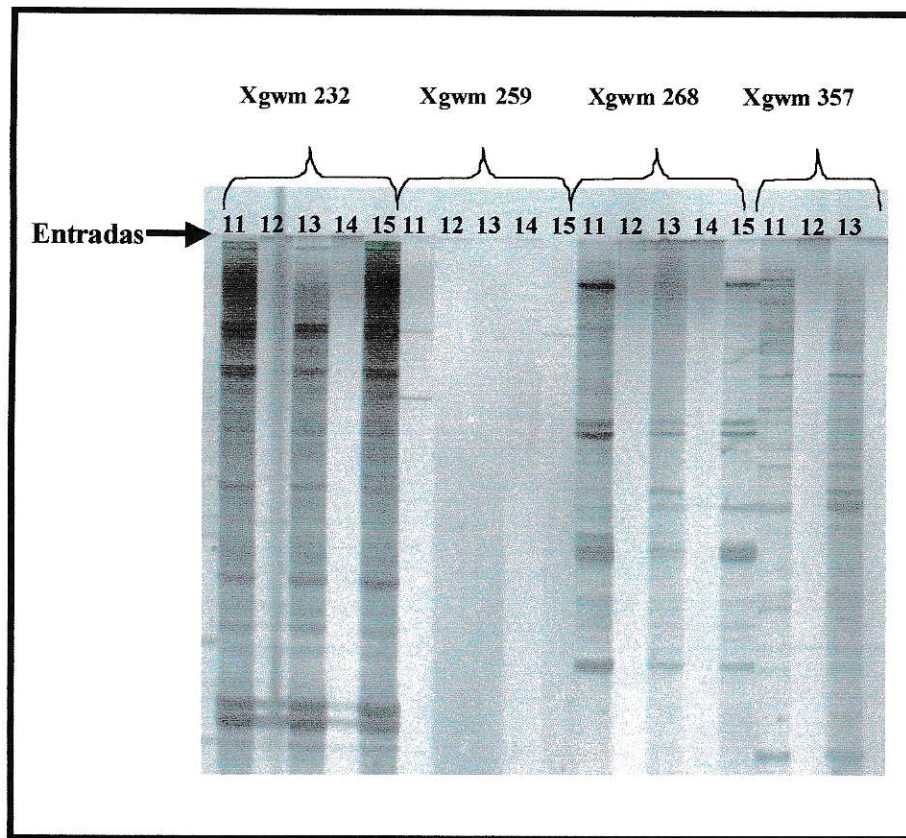


Figura 1. Productos de amplificación de cinco marcadores SSR en gel de poliacrilamida desnaturalante.

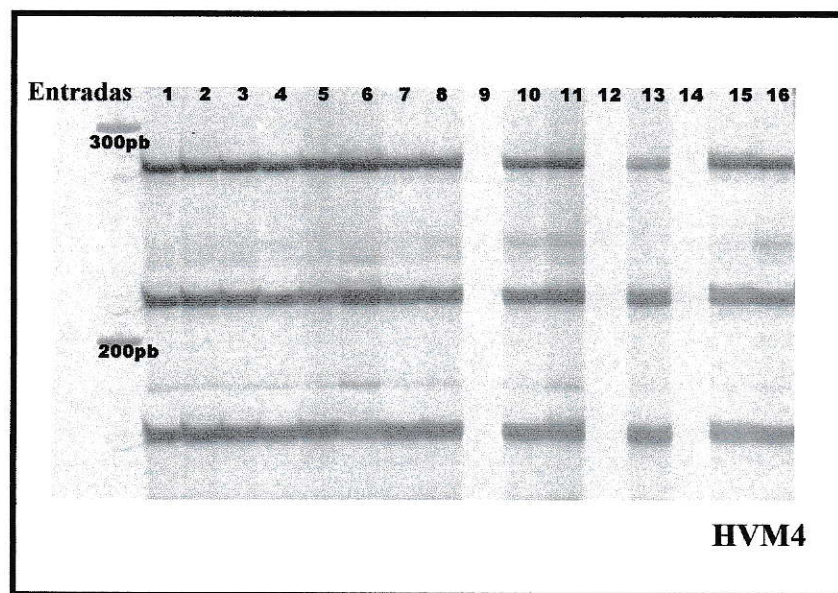


Figura 2. Productos de amplificación del partidor monomorfo HVM4, en 16 entradas del germoplasma experimental.

Tabla 8. Prueba de t para comparación de medias entre grupo de partidores SSR que presentaron buen y mal comportamiento como marcadores genéticos.

Grupo de partidores con distinto comportamiento como marcadores	%CG	Temperatura de desnaturalación térmica (Tm)	Auto-alineamiento. Máxima puntuación	Alineamiento primer-primer Máxima puntuación	Temperatura De desnaturalación Térmica Diferencial (Tm diff)
Buen comportamiento (n = 14)	50,40 a*	55,90 a	11,79 a	11,86 a	1,37 a
Mal comportamiento (n = 42)	50,08 a	56,15 a	12,52 a	11,10 a	1,56 a

\* Promedios con igual letra para cada variable medida, no difieren estadísticamente entre sí. Según Prueba de t ( $p < 0,05$ )

Para los seis microsatélites que fueron capaces de amplificar segmentos específicos ( Xglu A3, Xgwm 164, Xgwm 135, Xgwm 498, Xgdm 98 y Xgdm 19), se les determinó el tamaño de las bandas amplificadas mediante la secuenciación del plasmido pGEM-3Zf(+). Los productos de secuenciación del plasmido se separaron en un gel de PAA al 6% y 7,5 M de urea del tipo de secuenciación (Figura 3). En el mismo gel se cargaron amplicones representativos de todos los alelos de cada marcador, lo que permitió determinar su tamaño por comparación. Cada alelo de cada marcador se denominó de acuerdo a su tamaño en pares de base, considerando la primera banda en los casos de “slippage” muy severo.

Los alelos obtenidos para los microsatélites: Xglu A3, Xgwm 164, Xgwm 135, Xgwm 498, Xgdm 98 y Xgdm 19 en el germoplasma experimental se presentan en Las Tablas 9, 10, 11, 12, 13 y 14 respectivamente. Fotografías de los geles desnaturantes donde se observan las bandas obtenidas por SSR se muestran en las Figuras 4, 5, 6, 7, 8 y 9.

Como se puede observar en las Figuras anteriormente mencionadas, los productos de PCR originan un patrón doble o una escalera de bandas (“DNA slippage”). Esto ocurriría porque la ADN polimerasa agrega dATP en los extremos del producto de PCR, generando hebras del mismo segmento de ADN con movilidad electroforética diferente. También se ha propuesto que estas escaleras se formarían porque la polimerasa no es capaz de reproducir exactamente el número de repeticiones en cada evento replicativo (alta tasa de mutación) (Narváez, 1998).

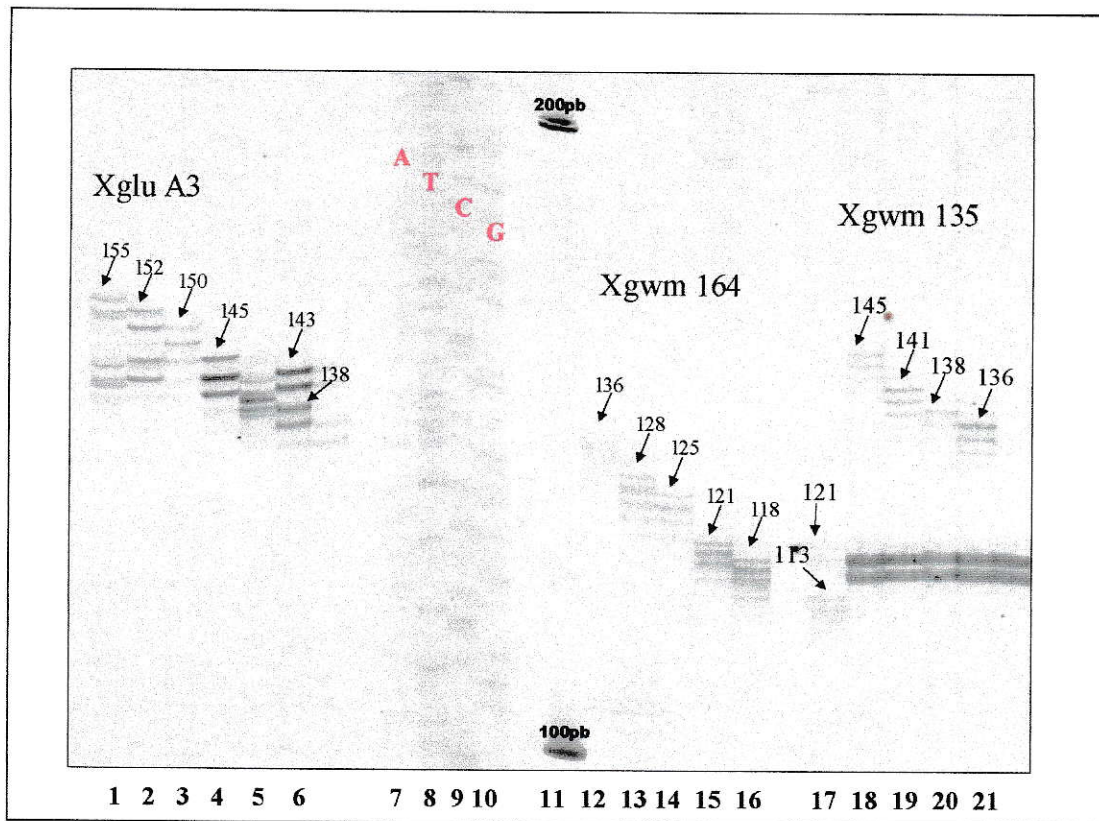


Figura 3. Determinación del tamaño de los amplificandos obtenidos con partidores de microsatélite, por comparación de los productos de secuenciación del plasmido pGEM-3Zf(+). Los carriles 7, 8, 9 y 10 corresponden a los productos de secuenciación del plasmido. Los carriles 1 al 6 son alelos del marcador Xglu A3, los carriles 11 al 17 son alelos del marcador Xgwm 164 y los carriles 18 al 21 son alelos del marcador Xgwm 135.

Hancock (1999), por su parte señala que el fenómeno de “splippage” podría ocurrir por que la hebra naciente de ADN puede disociarse del ADN templado y al rehibridarse ambas hebras, por el alto número de secuencias repetidas, existe una alta probabilidad que el realineamiento ocurra en una zona errada, produciendo amplificadas de mayor o menor tamaño que el ADN templado.

Las variedades y líneas de trigo utilizadas en este trabajo son homocigotas producto de más de 10 años de auto fecundación y los marcadores utilizados están mapeados solamente en un cromosoma. Por estos motivos para cada genotipo se esperaba encontrar sólo una banda o producto de amplificación. Los resultados que se obtuvieron sin embargo fueron diferentes. En una alta proporción se encontró genotipos que presentaron dos o tres productos de amplificación. Este resultado es coincidente con reportes de investigadores del INTA, Argentina (Manifesto y col.,1998).

El fenómeno anterior podría deberse a que el trigo es un alohexaploide, originado a partir de tres especies ancestrales cercanas, las cuales poseen muchos *loci* en común, por lo que no es raro suponer que los partidores estén amplificando regiones de ADN presentes en los tres juegos de cromosomas homeologos. En futuras investigaciones se podría dilucidar esta interrogante analizando poblaciones segregantes con sus respectivos progenitores, o secuenciando cada uno de los de los fragmentos amplificados y verificar su diferente naturaleza nucleotídica.

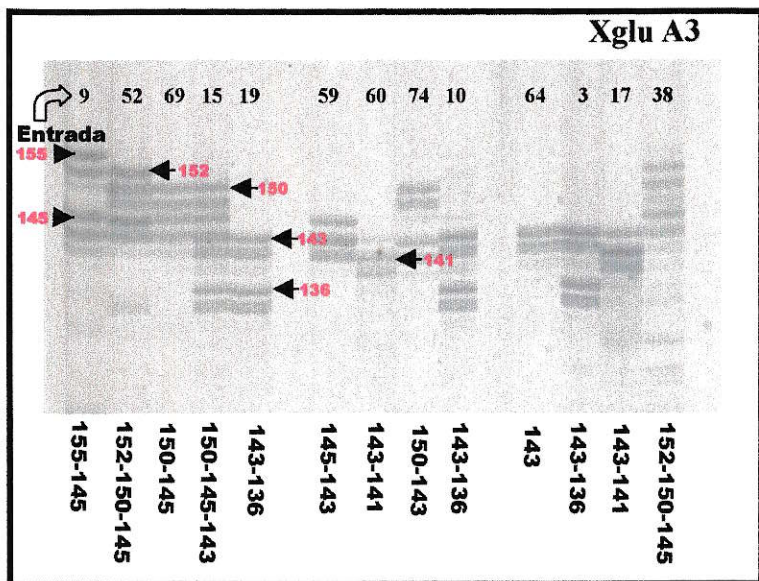


Figura 4. Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xglu A3. En cada alelo se destaca una banda principal acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.

Tabla 9. Alelos del microsatélite Xglu A3 presentes en el germoplasma experimental.

VARIEDAD	Xglu A3	VARIEDAD	Xglu A3
1	150-145	41	143-136
2	143-141	42	143-136
3	143-136	43	150-148-145
4	143	44	143-136
5	143-136	45	148-145
6	143	46	150-145
7	145-143	47	143-136
8	148-145	48	143-136
9	155-145	49	143-136
10	143-136	50	143-136
11	143-136	51	145-143
12	150-145-143	52	152-150-145
13	143-141	53	143-136
14	150-145	54	150-145
15	150-145-143	55	150-145
16	143-136	56	150-145
17	143-141	57	150-145
18	143	58	143-136
19	143-136	59	145-143
20	143-136	60	143-141
21	143-136	61	150-145
22	143-136	62	143-141
23	143-136	63	143-136
24	143-136	64	143
25	143-138	65	148
26	143-141	66	143-136
27	143-141	67	143-136
28	143-136	68	143
29	143-138	69	150-145
30	143-141	70	143
31	143-136	71	150-145
32	143-136	72	145-143
33	150-148	73	150-145
34	143	74	150-143
35	143-136	75	143
36	143-136	76	148-145
37	143-136	77	143-141
38	152-145	78	143
39	143-141-136	79	143-136
40	143-136	80	143-138



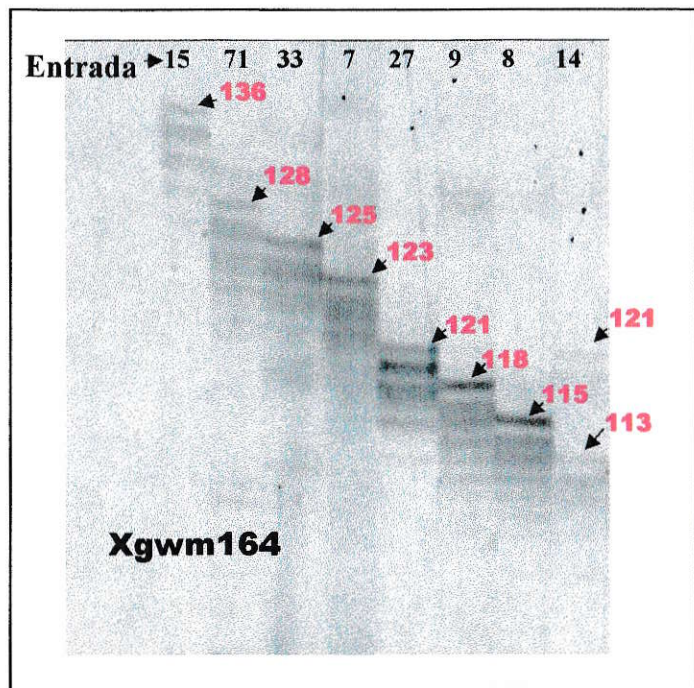


Figura 5. Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgwm 164. En cada alelo se destaca una banda principal, acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.

Tabla 10. Alelos del microsatélite Xgwm 164 presentes en el germoplasma experimental

VARIEDAD	Xgwm 164	VARIEDAD	Xgwm 164
1	118	41	136
2	121	42	121
3	121	43	121
4	121	44	118
5	121	45	121
6	121	46	121
7	123	47	121
8	115	48	121
9	118	49	121
10	118	50	121
11	118	51	118
12	118	52	123
13	121	53	121
14	121-113	54	118
15	136	55	118
16	121	56	118
17	121	57	118
18	121	58	118
19	118	59	118
20	118	60	121
21	118	61	118
22	121	62	118
23	118	63	121
24	121	64	121
25	121	65	118
26	121	66	121
27	121	67	115
28	121	68	121
29	121	69	121
30	121	70	121
31	121	71	128
32	118	72	118
33	125	73	121
34	121	74	121
35	121	75	121
36	121	76	118
37	121	77	118
38	136	78	121
39	121	79	118
40	121	80	121

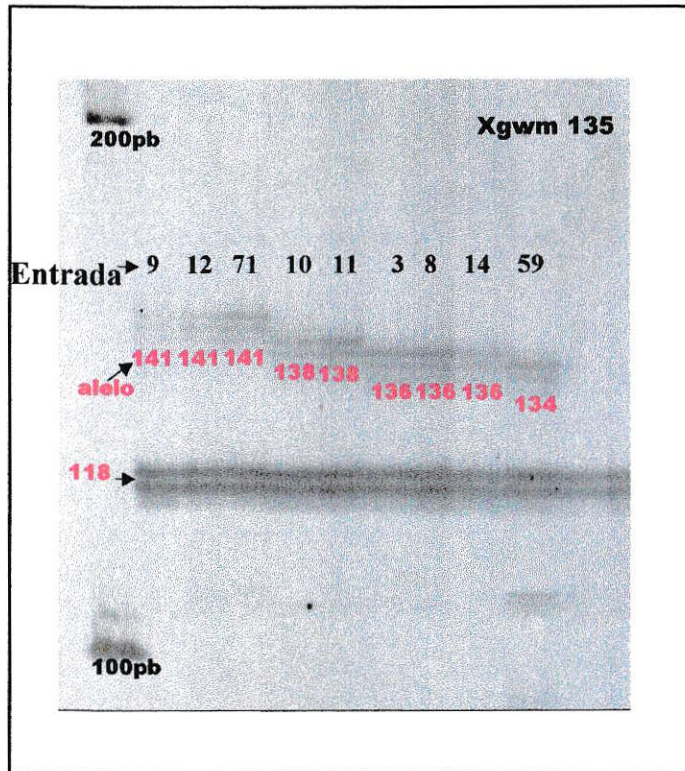


Figura 6. Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgwm 135. En cada alelo se destaca una banda principal, acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.

Tabla 11. Alelos del microsatélite Xgwm 135 presentes en el germoplasma experimental.

VARIEDAD	Xgwm 135	VARIEDAD	Xgwm 135
1	118	41	118
2	118	42	118
3	136-118	43	118
4	118	44	118
5	118	45	145-118
6	118	46	118
7	118	47	118
8	136-118	48	118
9	141-118	49	118
10	138-118	50	118
11	138-118	51	118
12	141-118	52	118
13	118	53	118
14	136-118	54	118
15	118	55	118
16	118	56	118
17	118	57	118
18	118	58	118
19	118	59	134-118
20	118	60	118
21	118	61	118
22	118	62	118
23	118	63	118
24	118	64	145-118
25	118	65	118
26	118	66	145-118
27	118	67	118
28	118	68	145-118
29	118	69	118
30	118	70	145-118
31	118	71	141-118
32	118	72	141-118
33	118	73	118
34	118	74	118
35	118	75	145-118
36	118	76	118
37	118	77	118
38	118	78	145-118
39	118	79	118
40	118	80	145-118

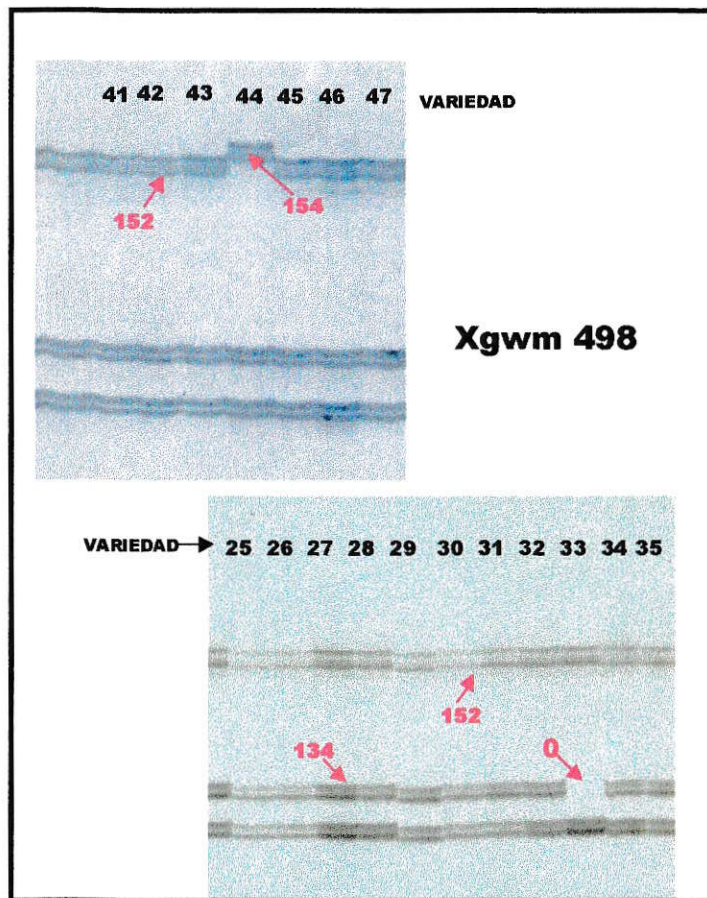


Figura 7. Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgwm 498. En cada alelo se destaca una banda principal, acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.

Tabla 12. Alelos del microsatélite Xgwm 498 presentes en el germoplasma experimental.

VARIEDAD	Xgwm 498	VARIEDAD	Xgwm 498
1	152-134	41	152-134
2	152-134	42	152-134
3	152-134	43	152-134
4	152-134	44	152-134
5	152-134	45	154-134
6	152-134	46	152-134
7	152	47	152-134
8	152-134	48	152-134
9	152-134	49	152-134
10	152-134	50	152-134
11	152-134	51	152-134
12	152-134	52	152-134
13	152-134	53	152-134
14	152-134	54	152-134
15	152-134	55	152-134
16	152-134	56	152-134
17	152-134	57	152-134
18	152-134	58	152-134
19	152-134	59	152-134
20	152-134	60	152-134
21	152-134	61	152-134
22	152-134	62	152-134
23	152-134	63	152-134
24	152-134	64	152-134
25	152-134	65	152-134
26	152-134	66	152-134
27	152-134	67	0
28	152-134	68	152-134
29	152-134	69	152-134
30	152-134	70	152-134
31	152-134	71	152
32	152-134	72	152-134
33	152	73	152-134
34	152-134	74	152-134
35	152-134	75	152-134
36	152-134	76	152-134
37	152-134	77	152-134
38	152-134	78	152-134
39	152-134	79	152-134
40	152-134	80	152-134

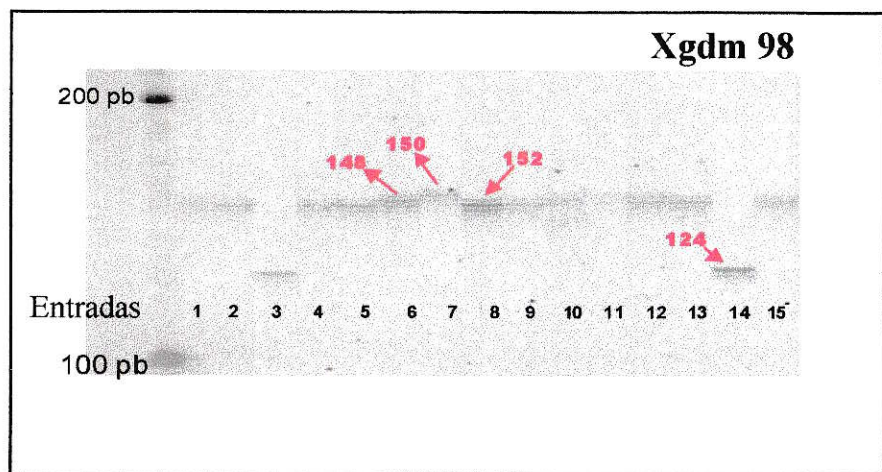


Figura 8. Se ilustra con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgdm 98. En cada alelo se destaca una banda Principal, acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.

Tabla 13. Alelos del microsatélite Xgdm 98 presentes en el germoplasma experimental.

VARIEDAD	Xgdm 98	VARIEDAD	Xgdm 98
1	148	41	148
2	148	42	148
3	124	43	150
4	146	44	148
5	148	45	148
6	150	46	150
7	152	47	150
8	148	48	148
9	148	49	148
10	150	50	148
11	150	51	124
12	150	52	124
13	148	53	148
14	124	54	148
15	148	55	148
16	150	56	152-148
17	148	57	148
18	150	58	148
19	148	59	148
20	148	60	148
21	148	61	148
22	148	62	148
23	148	63	148
24	148	64	150
25	150	65	124
26	124	66	150
27	124	67	148
28	148	68	148
29	148	69	148
30	148	70	150
31	150	71	0
32	148	72	148
33	150	73	150
34	0	74	150
35	148	75	0
36	150	76	148
37	148	77	148
38	150	78	150
39	150	79	148
40	148	80	124

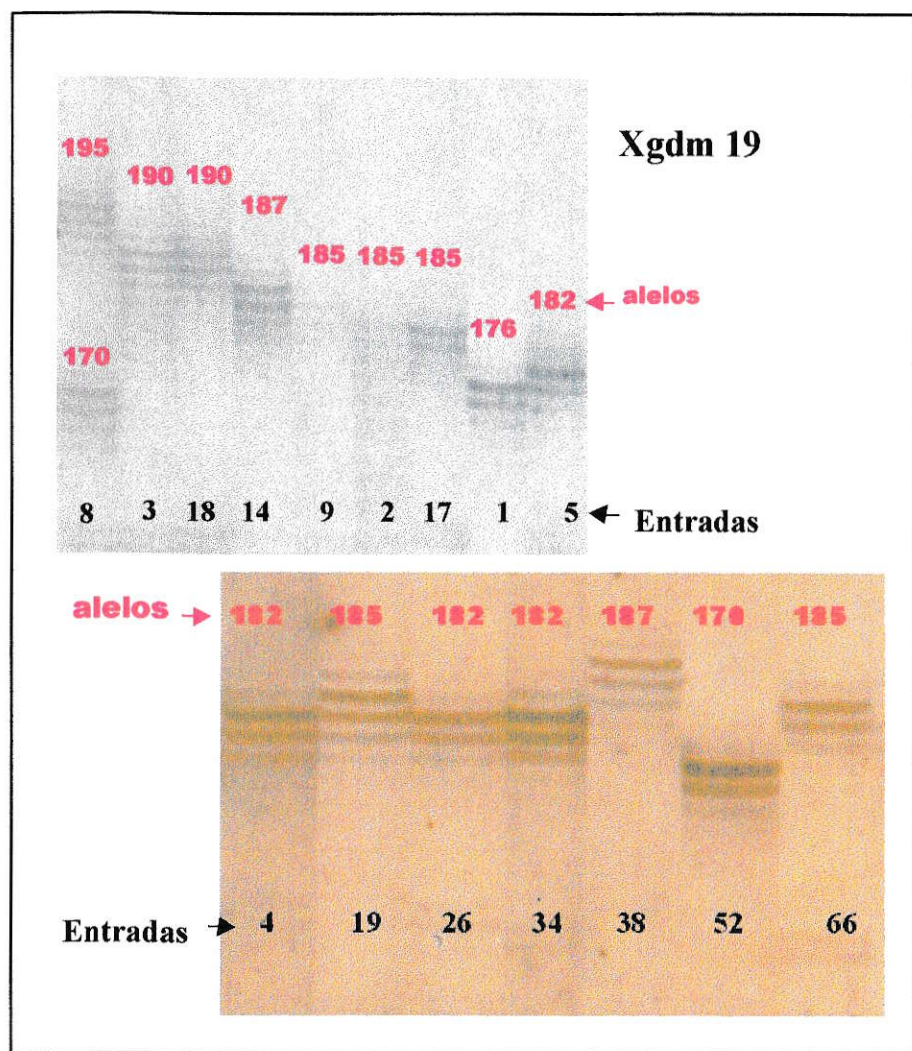


Figura 9. Se ilustran con algunas entradas, los alelos del microsatélite Xgdm 19. En cada alelo se destaca una banda principal, acompañada de bandas adicionales que no son consideradas en el análisis.

Tabla 14. Alelos del microsatélite Xgdm 19 presentes en el germoplasma experimental.

VARIEDAD	XGDM-19	VARIEDAD	XGDM-19
1	176	41	182
2	185-170-166	42	185
3	190	43	182
4	182	44	182-176
5	182	45	182
6	182-176	46	182
7	182-168	47	190
8	195-170	48	185
9	185	49	185
10	176-166	50	185
11	176-163	51	190
12	187-176	52	170
13	182	53	176
14	187	54	176
15	182	55	176
16	182	56	176
17	185	57	176
18	190	58	170-166
19	185	59	185-163
20	182	60	185-168
21	182	61	176-163
22	190	62	170
23	182-176	63	185-170
24	185-182	64	182
25	182-170	65	187
26	182	66	185
27	182	67	182
28	182	68	176
29	176	69	170
30	182-170	70	185
31	182-176	71	190
32	185	72	170
33	182	73	182
34	182	74	182
35	185-176	75	182-163
36	187-182-176	76	187
37	182	77	182
38	187	78	182
39	187-182	79	182
40	182	80	170

La variabilidad de cada *locus* de microsatélite fue evaluada mediante el contenido de información polimorfa (PIC). El PIC fue calculado usando la siguiente fórmula (Anderson y col., 1993):

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

Donde P es la frecuencia del alelo j para el marcador i.

En la Tabla 15 se presentan los PIC obtenidos para cada marcador conjuntamente con el número de alelos por *locus* estudiado y el rango en pares de base en que ellos se encuentran. Los marcadores Xglu A3 y Xgdm 19 fueron los que registraron los niveles más altos de polimorfismo, característica deseable para un buen marcador.

Tabla 15. Rango en tamaño de pares de base, número de alelos y contenido de información polimorfa de cada microsatélite usado para estudiar la calidad panadera de 80 variedades de trigos de pan.

Microsatélite	Rango en tamaño de pares de base	Número de alelos	PIC
Xglu A3	136 a 155	9	0,721
Xgwm 164	113 a 136	10	0,51
Xgwm135	118 a 145	6	0,203
Xgwm 498	134 a 154	3	0,384
Xgdm 98	124 a 152	5	0,504
Xgdm 19	163 a 195	10	0,758

### 3.3.2 Correlación de calidad panadera y marcadores SSR

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se consideró como genotipo (unidad experimental) al alelo o banda única, o bien a la combinación de bandas en su conjunto cuando se obtuvo más de un alelo por línea experimental. Se siguió este procedimiento, porque no existe certeza sobre el origen de más de un alelo por genotipo. A través de la comunicación personal con investigadores que trabajan en esta área (Javier Zuñiga, CRI Carillanca INIA) se nos ha informado que las bandas dobles de algunos marcadores presentan segregación en la progenie en cambio para otros marcadores estas bandas dobles o triples cosegregan en la progenie.

Para determinar cuales microsatélites estaban asociados con calidad panadera, se utilizó la metodología descrita por Ostle (1963). Este análisis permite correlacionar variables cualitativas (alelos) con variables cuantitativas (pruebas de calidad panadera). El nivel de significancia estadística de estas correlaciones se determinó mediante las tablas de Woo (1929) (Tabla 16).

Para porcentaje de proteína e índice de dureza sólo se encontró asociación significativa con el marcador Xgdm 19, la prueba de sedimentación se correlacionó con Xglu A3, Xgwm 164 y Xgdm 19, gluten seco se relacionó con Xglu A3, Xgwm 135 y Xgdm 19, gluten índice fue el parámetro con un mayor número de marcadores asociados; Xglu A3, Xgwm 164, Xgwm 135 y Xgdm 19. No se encontró ningún marcador que estuviera correlacionado con gluten húmedo. Los SSR Xgwm 498 y Xgdm 98 no estuvieron asociados con ningún parámetro de calidad.



Considerando que el objetivo de este trabajo es asociar marcadores moleculares a *loci* genéticos de proteínas de reserva y de dureza del grano, en los análisis posteriores solo se incluyeron aquellos SSRs que están correlacionados significativamente con algunos de los parámetros de calidad estudiados.

Para comparar las combinaciones alélicas dentro de cada marcador, en relación con aquellos parámetros de calidad con los cuales están positivamente asociados, se realizó la prueba de Duncan. Las Tablas 17, 18, 19, 20 y 21 indican las combinaciones alélicas de los distintos marcadores asociados con: Porcentaje de proteína, sedimentación, gluten seco, gluten índice e índice de dureza respectivamente. Estos análisis, para que sean de utilidad en un programa de mejoramiento genético, deben ir acompañados de la distribución de la frecuencia genética que presentan dicha combinación alélica a distintos niveles de cada parámetro de calidad. En las Figuras 10, 11, 12, 13 y 14 se presenta dicha distribución para porcentaje de proteína, índice de dureza, prueba de sedimentación, gluten seco y gluten índice respectivamente.

Para que una combinación alélica sirva como herramienta de selección para calidad panadera debe presentar un buen valor para una determinada prueba de calidad, tomando en cuenta el promedio para dicho parámetro en todas las líneas en que este presente y además su frecuencia genética debe ser significativamente mayor dentro del grupo de líneas consideradas de alta calidad.

Tabla 16. Correlación ( $E^2$ ) entre los marcadores; Xglu A3, Xgwm 164, Xgwm 135, Xgwm 498, Xgdm 98 y Xgdm 19 y las pruebas; Porcentaje de proteína, sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten índice e índice de dureza.

	<b>Xglu A3</b>	<b>Xgwm 164</b>	<b>Xgwm 135</b>	<b>Xgwm 498</b>	<b>Xgdm 98</b>	<b>Xgdm 19</b>
Porcentaje de proteína	0,306NS	0,090NS	0,114NS	0,021NS	0,150NS	0,447**
Sedimentación	0,385**	0,235**	0,023NS	0,006NS	0,064NS	0,408*
Gluten húmedo	0,325NS	0,147NS	0,137NS	0,044NS	0,101NS	0,379NS
Gluten seco	0,394**	0,179NS	0,172*	0,037NS	0,096NS	0,487**
Gluten índice	0,377**	0,233**	0,221**	0,086NS	0,029NS	0,391*
Índice de dureza	0,327NS	0,141NS	0,149NS	0,065NS	0,071NS	0,483**

\*\* = Significativo al 1%, \* = Significativo al 2%, NS = No significativo.

Tabla 17. Valores de porcentaje de proteína promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.

Marcador y combinación alelica	Proteína Promedio	Prueba Duncan 5%	Número de las variedades
<b>Xgdm 19</b>			
185 163	15,9	a	59
185 168	15	ab	60
170 166	14,8	abc	58
185 170	14,3	abcd	63
176 163	14,15	abcde	11 61
176	14,1	abcde	1 29 53 54 55 56 57 68
195 170	14	abcde	8
170	13,5	abcde	52 62 69 72 80
182 163	13,5	abcde	75
187	13,5	abcde	14 38 65 76
182 170	13,2	abcde	25 30
182	13,06	bcde	4 5 13 15 16 20 21 26 27 28 33 34 37 40 41 43 45 46 64 67 73 74 77 78 79
176 166	13	bcde	10
185	12,89	bcde	9 17 19 32 42 48 49 50 66 70
185 170 166	12,5	bcde	2
190	12,46	bcde	3 18 22 47 51 71
182 168	12,4	bcde	7
187 176	12,4	bcde	12
185 176	12,3	bcde	35
182 176	12,02	cde	6 23 31 44
185 182	11,5	de	24
187 182	11,5	de	39
187 182 176	11,3	e	36

Letras distintas indican diferencias significativas, según la Prueba de Duncan ( $P < 0,05$ )

Tabla 18. Valores de sedimentación promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.

Marcador y combinación alelica	Sedimentación Promedio	Prueba Duncan 5%	Número de las variedades
<b>Xgdm 19</b>			
185 168	10,9	a	60
182 170	10,8	a	25 30
187	10,7	ab	14 38 65 76
170 166	10,7	ab	58
185 170 166	10,7	ab	2
176 163	10,2	abc	11 61
185 163	9,9	abc	59
187 176	9,6	abc	12
176	9,45	abc	1 29 53 54 55 56 57 68
190	9,4	abc	3 18 22 47 51 71
170	9,36	abc	52 62 69 72 80
182 163	9	abc	75
			4 5 13 15 16 20 21 26 27 28 33 34 37 40 41 43
182	8,83	abc	45 46 64 67 73 74 76 77 79
187 182	8,5	abc	39
185 170	8,5	abc	63
182 168	7,4	abc	7
185	7,31	abc	9 17 19 32 42 48 49 50 66 70
182 176	6,6	abc	6 23 31 44
176 166	6,5	abc	10
187 182 176	6,4	abc	36
185 176	5,5	abc	35
195 170	5,3	bc	8
185 182	4,9	c	24
<b>Xglu A3</b>			
152 145	13,9	a	38
150 145 143	12,05	ab	12 15
143 141	10,21	abc	2 13 17 26 27 30 60 62 77
143 138	9,96	abc	25 29 80
143	9,62	abc	4 6 18 34 64 68 70 75 78
152 150 145	9,5	abc	52
150 145	9,07	bc	1 14 46 54 55 56 57 61 69 71 73
148	8,8	bc	65
150 143	8,6	bc	74
145 143	8,57	bc	7 51 59 72
143 141 136	8,5	bc	39
150 148	8,1	bc	33
			3 5 10 11 16 19 20 21 22 23 24 28 31 32 35 36
143 136	7,66	bc	37 40 41 42 44 47 48 49 50 53 58 63 66 67 79
148 145	7,56	bc	8 45 76
150 148 145	7,5	bc	43
155 145	5,8	c	9
<b>Xgwm 164</b>			
136	13,46	a	15 38 41
121 113	10,7	ab	14
128	10,4	ab	71
			2 3 4 5 6 13 16 17 18 22 24 25 26 27 28 29 30 31
			34 35 36 37 39 40 42 43 45 46 47 48 49 50 53 60
121	8,56	b	63 64 66 68 69 70 73 74 75 78
123	8,45	b	7 52
			1 9 10 11 12 19 20 21 23 32 44 51 4 55 56 57 58
118	8,42	b	59 61 62 65 72 76 77 79
125	8,1	b	33
115	7,65	b	8 67

Letras distintas indican diferencias significativas, según la Prueba de Duncan ( $P < 0,05$ )

Tabla 19. Valores de gluten seco promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.

Marcador y combinación alelica	Gluten seco Promedio	Prueba Duncan 5%	Número de las variedades
<b>Xgdm 19</b>			
185 163	16,6	a	59
195 170	15,3	ab	8
176 163	15,1	ab	11 61
170	14,22	abc	52 62 69 72 80
176	14,18	abc	1 29 53 54 55 56 57 68
176 166	14,1	abc	10
185 168	14	abc	60
185 170	13,9	abc	63
170 166	13,7	abc	58
187	13,6	abcd	14 38 65 76
182 163	13,4	abcd	75
			4 5 13 15 16 20 21 26 27 28 33 34 37 40 41 43
182	12,9	bcd	45 46 64 67 73 74 77 78 79
187 182 176	12,9	bcd	36
185 170 166	12,9	bcd	2
182 170	12,55	bcd	25 30
182 176	12,4	bcd	6 23 31 44
190	12,4	bcd	3 18 22 47 51 71
185	12,39	bcd	9 17 19 32 42 48 49 50 66 70
185 176	11,9	bcd	35
187 176	11,5	cd	12
182 168	11,3	cd	7
185 182	11	cd	24
187 182	10,3	d	39
<b>Xglu A3</b>			
152 150 145	18,6	a	52
148	14,2	b	65
148 145	14,1	b	8 45 76
150 145	13,82	b	1 14 46 54 55 56 57 61 69 71 73
155 145	13,5	b	9
143 141	13,36	bc	2 13 17 26 27 30 60 62 77
143	13,25	bc	4 6 18 34 64 68 70 75 78
143 138	12,8	bc	25 29 80
150 148	12,8	bc	33
			3 5 10 11 16 19 20 21 22 23 24 28 31 32 35 36
143 136	12,75	bc	37 40 41 42 44 47 48 49 50 53 58 63 66 67 79
145 143	12,5	bc	7 51 59 72
152 145	12,5	bc	38
150 143	12,3	bc	74
150 145 143	12,3	bc	12 15
150 148 145	11	bc	43
143 141 136	10,3	c	39
<b>Xgwm 135</b>			
134 118	16,6	a	59
138 118	15	ab	10 11
136 118	14,1	bc	3 8 14
145 118	13,28	bc	45 64 66 68 70 71 72 75 78 80
			1 2 4 5 6 7 13 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25
			26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
			41 42 43 44 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56
118	12,95	bc	57 58 60 61 62 63 65 67 69 73 74 76 77 79
141 118	12,27	c	9 12 71 72

Letras distintas indican diferencias significativas, según la Prueba de Duncan (P<0,05)

Tabla 20. Valores de gluten índex promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.

Marcador y combinación alelica	Gluten índex Promedio	Prueba Duncan 5%	Número de las variedades
<b>Xgdm19</b>			
185 170 166	99,7	a	2
187 182	99,6	a	39
185 168	96,3	a	60
187 176	96,2	a	12
190	94,22	a	3 18 22 47 51 71
182 170	92,8	a	25 30
176	91,48	ab	1 29 53 54 55 56 57 68
187	89,15	ab	14 38 65 76
182 176	88,83	ab	6 23 31 44
185 176	88,2	ab	35
182 168	86,6	ab	7
185 170	86,6	ab	63
185	86,51	ab	9 17 19 32 42 48 49 50 66 70
170	84,82	abc	52 62 69 72 80
182	84,58	abc	4 5 13 15 16 20 21 26 27 28 33 34 37 40 41 43 45 46 64 67 73 74 77 78 79
176 163	80,5	abc	11 61
185 182	78,2	abcd	24
182 163	76,2	abcd	75
170 166	75,4	abcd	58
187 182 176	73,1	abcd	36
185 163	56,4	bcd	59
176 166	51,1	cd	10
195 170	46,3	d	8
<b>Xglu A3</b>			
143 141 136	99,6	a	39
143 138	96,37	ab	25 29 80
143 141	95,58	ab	2 13 17 26 27 30 60 62 77
152 145	94,8	ab	38
143	91,6	ab	4 6 18 34 64 68 70 75 78
148	91,6	ab	65
150 145 143	88	ab	12 15
150 148 145	85,2	ab	43
150 145	84,65	ab	1 14 46 54 55 56 57 61 69 71 73
143 136	84,41	ab	3 5 10 11 16 19 20 21 22 23 24 28 31 32 35 36 37 40 41 42 44 47 48 49 50 53 58 63 66 67 79
145 143	82,45	ab	7 51 59 72
150 148	81,1	ab	33
152 150 145	76,9	ab	52
148 145	69,23	ab	8 45 76
150 143	66	b	74
155 145	39,1	c	9

Continuación Tabla 20.

Marcador y combinación alelica	Gluten index Promedio	Prueba Duncan 5%	Número de las variedades
<b>Xgdm 135</b>			
145 118	87,91	a	45 64 66 68 70 71 72 75 78 80
118	87,82	a	1 2 4 5 6 7 13 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 60 61 62 63 65 67 69 73 74 76 77 79
141 118	79,9	a	9 12 71 72
136 118	76,93	ab	3 8 14
138 118	57	b	10 11
134 118	56,4	b	59
<b>Xgdm164</b>			
128	90,9	a	71
121	88,91	a	2 3 4 5 6 13 16 17 18 22 24 25 26 27 28 29 30 31 34 35 36 37 39 40 42 43 45 46 47 48 49 50 53 60 63 64 66 68 69 70 73 74 75 78
136	88,77	a	15 38 41
121 113	85,3	a	14
118	83,3	a	1 9 10 11 12 19 20 21 23 32 44 51 4 55 56 57 58 59 61 62 65 72 76 77 79
123	81,75	a	7 52
125	81,1	a	33
115	49,3	b	8 67

Letras distintas indican diferencias significativas, según la Prueba de Duncan ( $P < 0,05$ )

Tabla 21. Valores de dureza promedio de las diferentes combinaciones alelicas asociadas significativamente con este parámetro de calidad.

Marcador y combinación alelica	Dureza Promedio	Prueba Duncan 5%	Número de las variedades
<b>Xgdm 19</b>			
185 163	27,3	a	59
187 182 176	25,5	ab	36
182 168	24,6	abc	7
195 170	24,3	abc	8
185 170	23,6	abcd	63
176 163	23,1	abcd	11 61
187 182	22,9	abcd	39
170	22	abcd	52 62 69 72 80
182 170	21,85	abcd	25 30
187 176	20,7	bcd	35
			4 5 13 15 16 20 21 26 27 28 33 34 37 40 41 43 45 46 64 67 73 74 77 78 79
182	20,61	bcd	
170 166	20,3	bcd	58
176 166	20,1	bcd	10
187	19,8	cd	14 38 65 76
182 163	19,6	cd	75
190	19,51	cd	3 18 22 47 51 71
185 170 166	19,3	cd	2
185 182	19,3	cd	24
185	19,13	cd	9 17 19 32 42 48 49 50 66 70
182 176	19,05	cd	6 23 31 44
185 168	19	cd	60
176	18,98	cd	1 29 53 54 55 56 57 68
185 176	18	d	35

Letras distintas indican diferencias significativas, según la Prueba de Duncan ( $P < 0,05$ )



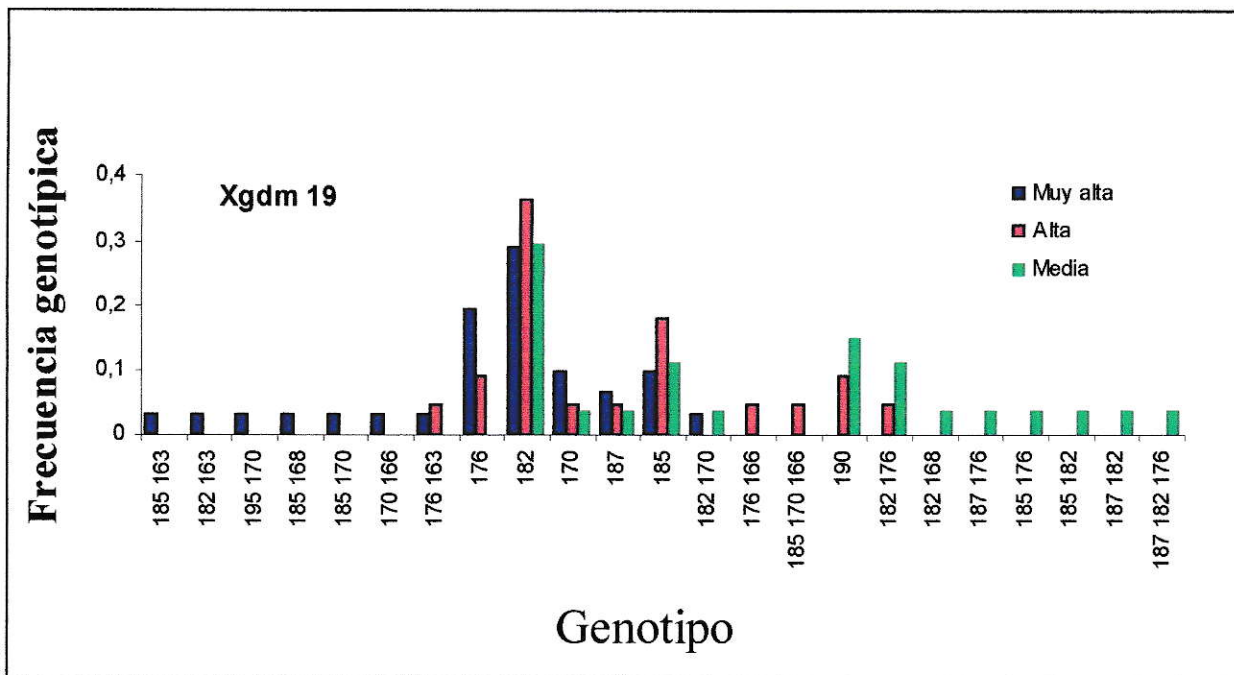


Figura 10. Distribución de las frecuencias genotípicas del marcador Xgdm 19 para niveles de proteína muy alta (15,9 a 13,5%), alta (13,4 a 12,5%) y media (12,4 a 11,2%).

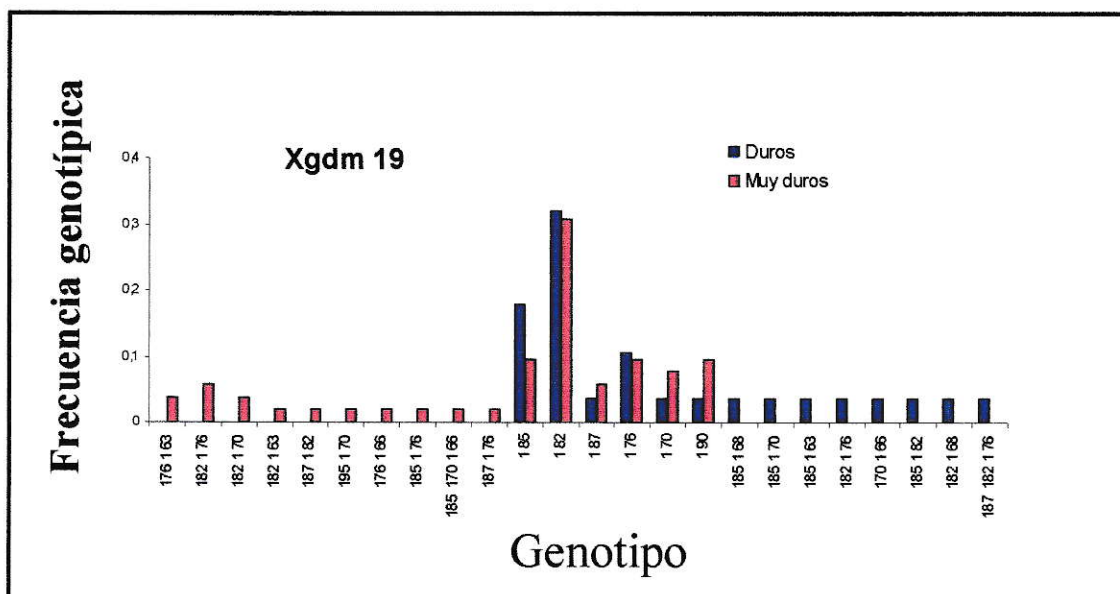


Figura 11. Distribución de las frecuencias genotípicas del marcador Xgdm 19 en las categorías muy duros (27,3 a 21%) y duros (20,9 a 17%).

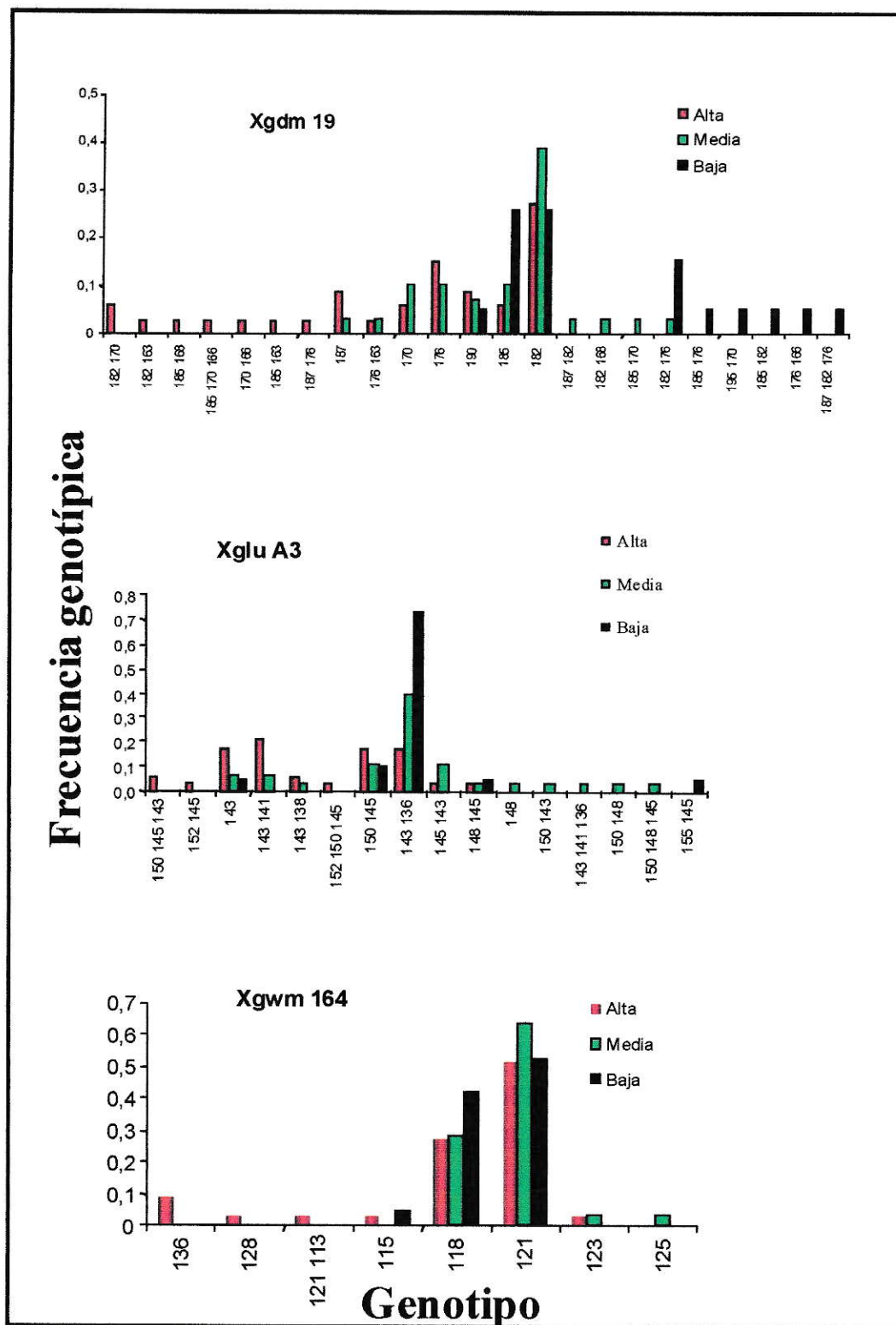


Figura 12. Distribución de las frecuencias genotípicas de los marcadores Xgdm 19, Xglu A3 y Xgwm 164, para niveles de sedimentación altos (14,5 a 9), medios (8,9 a 7,1) y bajos (7,0 a 4,9).

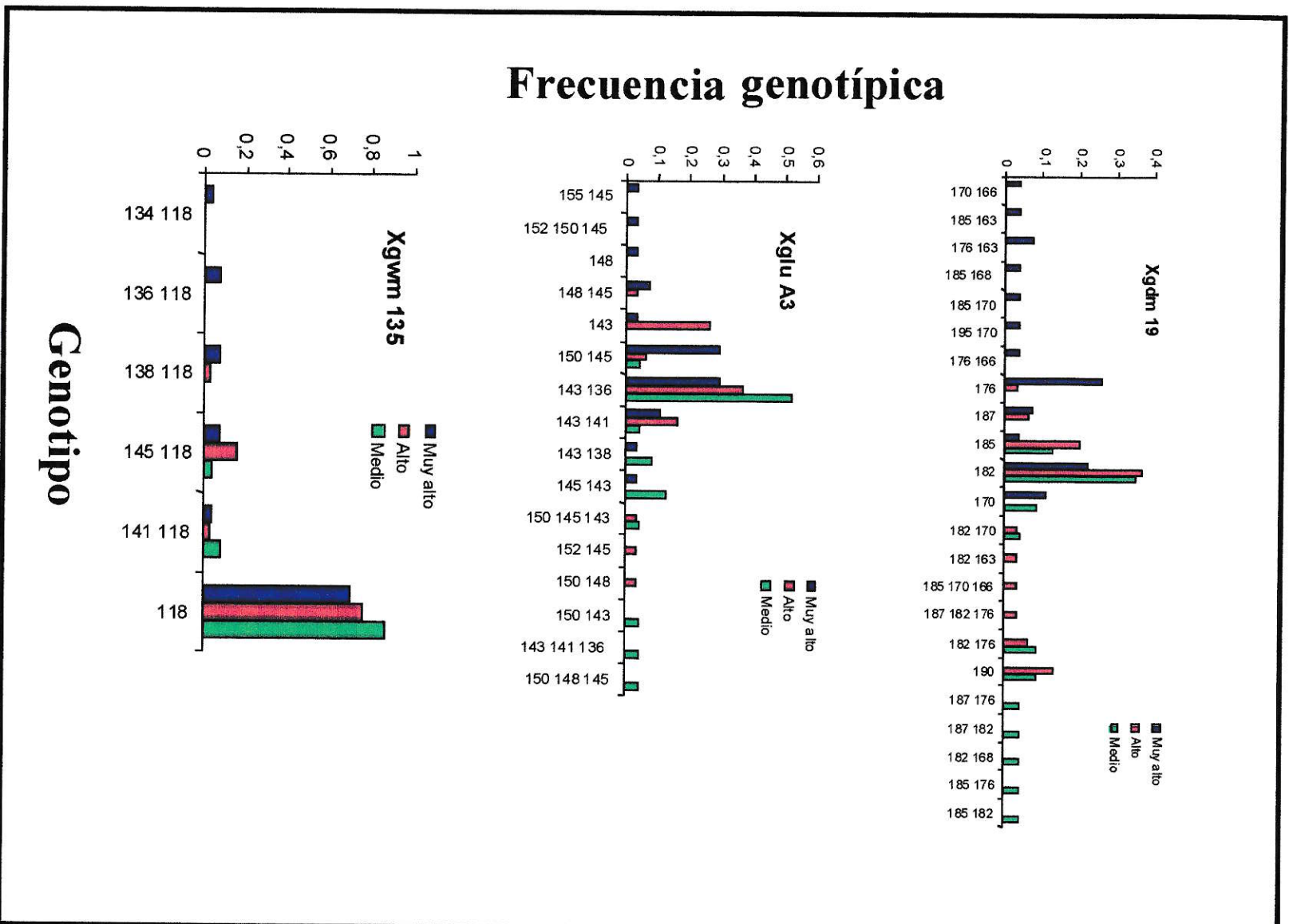


Figura 13. Distribución de las frecuencias genotípicas de los marcadores Xgdm 19, Xglu A3 y Xgwm 135, para niveles de gluten seco muy altos (18,6 a 13,5%), altos (13,4 a 12,5%) y medios (12,4 a 10,3%).

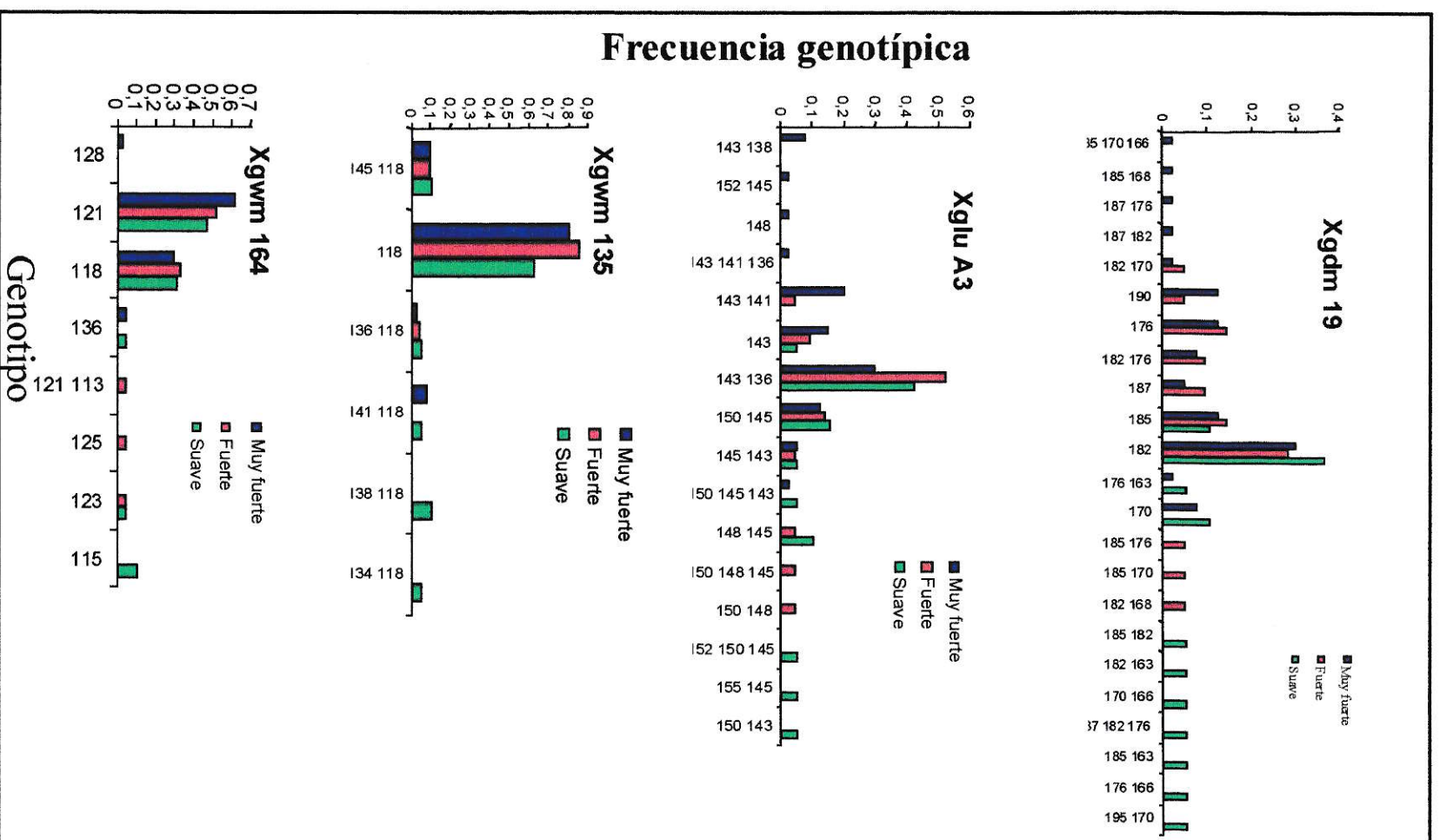


Figura 14. Distribución de las frecuencias genotípicas de los marcadores Xgdm 19, Xglu A3, Xgwm 135 y Xgdm 164, para niveles de gluten índice muy fuerte (100 a 90), fuerte (89,9 a 80) y suave (79,9 a 39,1).

La selección de las combinaciones alélicas dentro de los marcadores asociados a calidad panadera, se realizó considerando el valor promedio de la combinación alélica, para cada parámetro y su distribución de frecuencias genotípicas en los distintos niveles de calidad, para esa prueba.

El análisis de los haplotipo (conjunto de alelos de diferentes *loci* de un genotipo), permite obtener una visión más amplia de la interacción de distintos genes sobre determinadas características. En la Tabla 22 se presentan los haplotipos de las líneas experimentales, junto con su calidad panadera. En esta Tabla, se subrayan las combinaciones alélicas asociadas a buena calidad, las cuales podrían utilizarse como una herramienta de selección en un programa de mejoramiento. Las entradas en las cuales se detecto translocaciones con centeno se señalan con color rojo.

Un haplotipo promisorio para buena calidad, es aquel que tiene al menos una de las combinaciones alelicas preseleccionadas en esta investigación y que además no posee translocaciones con centeno. El efecto adverso de las translocaciones en calidad es fuerte, aunque existen algunos haplotipos como los que poseen los siguientes alelos : 176 del marcador Xgdm 19, 143-141 del marcador Xglu A3, 185-163 del marcador Xgdm 19 y 134-118 del marcador Xgwm 135 que parecen ser capaces de tolerar mejor la presencia de secalinas.

El alelo 136 del marcador Xgwm 164, presente en tres entradas (15, 38, 41), indicó altos niveles de calidad estando presente en tres haplotipos diferentes, por lo que es un marcador interesante de tener en cuenta. En investigaciones posteriores sería importante comprobar el aporte que hace este alelo en un número mayor de líneas.

La presencia de secalinas puede haber provocado la descalificación de algunos genotipos, cuya baja calidad se deba exclusivamente a la presencia de proteínas de centeno. Para poder subsanar esta posible fuente de error habría que analizar un nuevo grupo de germoplasma que poseyera los mismos haplotipos de las líneas cuestionadas pero sin translocaciones.

Tabla 22. Agrupación por haplotipos, calidad panadera y presencia de translocaciones con centeno del germoplasma experimental

Entrada	Proteína (%)	Sedimentación (mL)	Gluten húmedo (%)	Gluten seco (%)	Gluten índice	Índice de Dureza(%)	Xgdm 19	Xglu A3	Xgwm 164	Xgwm 135	Xgdm 98	Xgwm 498
69	13,6	7,8	42,2	14	71,8	21,4	<u>170</u>	150-145	121	118	148	152-134
72	11,8	8,6	32	11	93,4	22,2	<u>170</u>	145-143	118	141-118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>12,70</b>	<b>8,20</b>	<b>37,10</b>	<b>12,50</b>	<b>82,60</b>	<b>21,80</b>						
1	13,7	10,1	40	14,2	91,5	18,5	<u>176</u>	150-145	118	118	148	152-134
53	13,1	8,3	41,8	13,6	86,6	17,9	<u>176</u>	143-136	121	118	148	152-134
54	14,9	10,4	43,3	14,5	94,4	20,7	<u>176</u>	150-145	118	118	148	152-134
55	14,7	8,6	44	14,5	90	17,8	<u>176</u>	150-145	118	118	148	152-134
56	14,7	8,2	45,3	14,8	85,6	20,6	<u>176</u>	150-145	118	118	152-148	152-134
57	14,1	9,5	33	14,1	85,1	18,7	<u>176</u>	150-145	118	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>14,2</b>	<b>9,18</b>	<b>41,23</b>	<b>14,28</b>	<b>88,87</b>	<b>19,03</b>						
65	14,1	8,8	42	14,2	91,6	21	<u>187</u>	148	118	118	124	152-134
76	12,3	9,4	39,3	13,3	84,9	18	<u>187</u>	148-145	118	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>13,2</b>	<b>9,10</b>	<b>40,65</b>	<b>13,75</b>	<b>88,25</b>	<b>19,5</b>						
3	12,6	11,6	38,3	12,6	99,2	20,2	<u>190</u>	143-136	121	136-118	124	152-134
22	12,3	6,7	39,5	13,2	86,6	18,9	<u>190</u>	143-136	121	118	148	152-134
47	12	8	33,2	11,2	95,5	18	<u>190</u>	143-136	121	118	150	152-134
51	12,4	8,4	33,6	11,1	93,40	18,6	<u>190</u>	145-143	118	118	124	152-134
<b>Promedio</b>	<b>12,33</b>	<b>8,68</b>	<b>36,15</b>	<b>12,03</b>	<b>93,68</b>	<b>18,93</b>						
4	12,9	12,5	38,1	13	99,4	22,2	182	<u>143</u>	121	118	146	152-134
6	12,5	8,7	37,8	12,7	95,2	20,6	182-176	<u>143</u>	121	118	150	152-134
34	12,2	5,9	37,3	13,1	82,3	21,9	182	<u>143</u>	121	118	0	152-134
<b>Promedio</b>	<b>12,53</b>	<b>9,03</b>	<b>37,73</b>	<b>12,93</b>	<b>92,30</b>	<b>21,57</b>						
64	13,8	9,8	42,8	14,3	92,3	22,8	182	<u>143</u>	121	<u>145-118</u>	150	152-134
70	13,9	8,8	37,8	12,8	99,4	21,3	185	<u>143</u>	121	<u>145-118</u>	150	152-134
78	12,5	9,2	40,8	13,4	80,5	21,2	182	<u>143</u>	121	<u>145-118</u>	150	152-134
<b>Promedio</b>	<b>13,40</b>	<b>9,27</b>	<b>40,47</b>	<b>13,50</b>	<b>90,73</b>	<b>21,77</b>						
13	12,7	11,6	36,8	12,5	99,4	19,7	182	<u>143-141</u>	121	118	148	152-134
17	13,3	10,2	35,1	12,9	100	19,8	185	<u>143-141</u>	121	118	148	152-134
26	14,7	9,2	41	13,4	91,4	19,3	182	<u>143-141</u>	121	118	124	152-134
27	15,7	8,8	43,1	14,2	96,3	19,3	182	<u>143-141</u>	121	118	124	152-134
77	12,4	8,8	34,2	11,8	99,4	19,5	182	<u>143-141</u>	118	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>13,76</b>	<b>9,72</b>	<b>38,04</b>	<b>12,96</b>	<b>97,3</b>	<b>19,52</b>						

\* Variedades con color rojo indican la presencia de translocaciones con centeno.  
Se subrayan los alelos de microsatélite seleccionados para buena calidad panadera.

Continuación Tabla 22.

Entrada	Proteína (%)	Sedimentación (mL)	Gluten húmedo (%)	Gluten seco (%)	Gluten index	Indice de dureza (%)	Xgdm 19	Xglu A3	Xgwm 164	Xgwm 135	Xgdm 98	Xgwm498
62	14,2	12	42,9	15,2	91,8	21,2	<u>170</u>	<u>143-141</u>	118	118	148	152-134
52	15,2	9,5	53	18,6	76,9	22,4	<u>170</u>	<u>152-150-145</u>	123	118	124	152-134
80	12,7	8,9	35,7	12,3	90,2	22,8	<u>170</u>	<u>143-138</u>	121	<u>145-118</u>	124	152-134
29	13,2	9,1	39	14,4	99,2	18,1	<u>176</u>	<u>143-138</u>	121	118	148	152-134
68	14,4	11,4	37,7	13,4	99,4	19,6	<u>176</u>	<u>143</u>	121	<u>145-118</u>	148	152-134
38	13,1	13,9	39	12,5	94,8	19,4	<u>187</u>	<u>152-145</u>	<u>136</u>	118	150	152-134
14	14,5	10,7	42,8	14,4	85,3	20,8	<u>187</u>	150-145	<u>121-113</u>	136-118	124	152-134
18	12,4	11,3	37,5	13,2	99,7	21,4	<u>190</u>	<u>143</u>	121	118	150	152-134
71	13,1	10,4	38,7	13,1	90,9	20	<u>190</u>	150-145	<u>128</u>	141-118	0	152
58	14,8	10,7	42,3	13,7	75,4	20,3	<u>170-166</u>	143-136	118	118	148	152-134
61	15	12,1	34	14,3	98,1	24	<u>176-163</u>	150-145	118	118	148	152-134
11	13,3	8,3	43,4	15,9	62,9	22,2	<u>176-163</u>	143-136	118	<u>138-118</u>	150	152-134
10	13	6,5	40,3	14,1	51,1	20,1	<u>176-166</u>	143-136	118	<u>138-118</u>	150	152-134
75	13,5	9	41,6	13,4	76,2	19,6	<u>182-163</u>	<u>143</u>	121	<u>145-118</u>	0	152-134
25	12,1	11,9	34,3	11,7	99,7	22	<u>182-170</u>	<u>143-138</u>	121	118	150	152-134
30	14,3	9,7	43,4	13,4	85,9	21,7	<u>182-170</u>	<u>143-141</u>	121	118	148	152-134
59	15,9	9,9	48,4	16,6	56,4	27,3	<u>185-163</u>	145-143	118	<u>134-118</u>	148	152-134
60	15	10,9	43,2	14	96,3	19	<u>185-168</u>	<u>143-141</u>	121	118	148	152-134
12	12,4	9,6	34,9	11,5	96,2	20,7	<u>187-176</u>	<u>150-145-143</u>	118	141-118	150	152-134
2	12,5	10,7	36,7	12,9	99,7	19,3	<u>185-170-166</u>	<u>150-145-143</u>	121	118	148	152-134
15	13,7	14,5	37,6	13,1	79,8	24	182	<u>143-141</u>	<u>136</u>	118	148	152-134
41	12,7	12	36,3	12,4	91,7	17,7	182	143-136	<u>136</u>	118	148	152-134
45	13,1	8	40,4	13,7	76,5	20,4	182	148-145	121	<u>145-118</u>	148	154-134
66	14,4	9	40,4	13	88,8	20,3	185	143-136	121	<u>145-118</u>	150	152-134

\* Variedades con color rojo indican la presencia de translocaciones con centeno.  
Se subrayan los alelos de microsatélite seleccionados para buena calidad panadera.



Continuación Tabla 22.

Entrada	Proteína (%)	Sedimentación (mL)	Gluten húmedo (%)	Gluten seco (%)	Gluten índice	Índice de dureza	Xgdm 19	Xglu A3	Xgwm 164	Xgwm 135	Xgdm 98	Xgwm498
19	13	6,2	39,7	13	77,6	18,5	185	143-136	118	118	148	152-134
32	11,4	5,8	33,2	11,1	87,2	18	185	143-136	118	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>12,20</b>	<b>6,00</b>	<b>36,45</b>	<b>12,05</b>	<b>82,4</b>	<b>18,25</b>						
42	11,5	7,9	31,8	10,7	94,3	17,5	185	143-136	121	118	148	152-134
48	11,7	5,9	33,9	11,5	91,9	17,5	185	143-136	121	118	148	152-134
49	13,1	6,4	38,9	12,6	87,1	18,4	185	143-136	121	118	148	152-134
50	13,9	7,1	31,7	12,8	99,7	17,5	185	143-136	121	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>12,55</b>	<b>6,83</b>	<b>34,08</b>	<b>11,90</b>	<b>93,25</b>	<b>17,73</b>						
23	12,3	6,1	34	11,7	96,2	18,7	182-176	143-136	118	118	148	152-134
44	11,5	5,5	37,7	12,4	80,4	18,9	182-176	143-136	118	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>11,90</b>	<b>5,80</b>	<b>35,85</b>	<b>12,05</b>	<b>88,30</b>	<b>18,80</b>						
5	12,2	8	36,1	12,1	97,2	20,2	182	143-136	121	118	148	152-134
28	14,9	8,3	38,4	13,5	99,7	18	182	143-136	121	118	148	152-134
37	11,7	10	34,4	11,3	91,3	20,4	182	143-136	121	118	148	152-134
40	12,1	8,8	35	12,1	61,7	18,5	182	143-136	121	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>12,73</b>	<b>8,78</b>	<b>35,98</b>	<b>12,25</b>	<b>87,48</b>	<b>19,28</b>						
46	12,2	5,8	32,4	11	62	18	182	150-145	121	118	150	152-134
73	13,9	6,2	41,1	13,2	76,4	19,6	182	150-145	121	118	150	152-134
<b>Promedio</b>	<b>13,05</b>	<b>6</b>	<b>36,75</b>	<b>12,1</b>	<b>69,2</b>	<b>18,8</b>						
20	13,8	6,7	39,4	13,4	90,8	18	182	143-136	118	118	148	152-134
21	12,6	5,9	38,1	12,5	84,1	19,4	182	143-136	118	118	148	152-134
79	14	8,7	41,2	14,2	85,9	26,4	182	143-136	118	118	148	152-134
<b>Promedio</b>	<b>13,47</b>	<b>7,10</b>	<b>39,57</b>	<b>13,37</b>	<b>86,93</b>	<b>21,27</b>						
16	12,7	7,9	37,6	13,1	91,8	18	182	143-136	121	118	150	152-134
43	11,2	7,5	33,8	11	85,2	17	182	150-148-145	121	118	150	152-134
74	12,6	8,6	36,5	12,3	66	26,3	182	150-143	121	118	150	152-134
67	14,2	10	45,5	15,1	52,3	23,7	182	143-136	115	118	148	0
31	11,8	6,1	39,4	12,8	83,5	18	182-176	143-136	121	118	150	152-134
63	14,3	8,5	41	13,9	86,6	23,6	185-170	143-136	121	118	148	152-134
35	12,3	5,5	34,7	11,9	88,2	18	185-176	143-136	121	118	148	152-134
24	11,5	4,9	31,7	11	78,2	19,3	185-182	143-136	121	118	148	152-134
39	11,5	8,5	28,5	10,3	99,6	22,9	187-182	143-141-136	121	118	150	152-134
36	11,3	6,4	37,9	12,9	73,1	25,5	187-182-176	143-136	121	118	150	152-134
9	12,7	5,8	40,1	13,5	39,1	22,5	185	155-145	118	141-118	148	152-134
8	14	5,3	43,8	15,3	46,3	24,3	195-170	148-145	115	136-118	148	152-134
7	12,4	7,4	35,1	11,3	86,6	24,6	182-168	145-143	123	118	152	152
33	12,1	8,1	36,5	12,8	81,1	23,8	182	150-148	125	118	150	152

\* Variedades con color rojo indican la presencia de translocaciones con centeno.  
Se subrayan los alelos de microsatélite seleccionados para buena calidad panadera.

### **3.4 Identificación de subunidades de gluteninas de alta masa molecular.**

Se determinó las subunidades de gluteninas de alta masa molecular al germoplasma en estudio, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 9%. En la Figura 15 es posible visualizar un gel donde se indican las HMWG encontradas en siete variedades de trigo, las que fueron utilizadas como referencia para esta investigación (Hewstone y Hinrichsen, 1994). El análisis completo del germoplasma para estas proteínas es mostrado en la Tabla 23.

Es ampliamente reconocido que la electroforesis en geles de acrilamida de proteínas de almacenaje en cereales provee una poderosa, relativamente barata y rápida metodología para identificar y clasificar variedades.

La composición de las gluteninas de alto peso molecular es específica para cada variedad, éstas se pueden usar como marcadores genéticos moleculares, ya que su expresión génica no está sujeta a variaciones ambientales.

Para realizar una mejor evaluación de estos resultados, se agruparon las entradas por el tipo de HMWG que presentaran y por la presencia o ausencia de translocación con centeno. Paralelamente se utilizó la escala diseñada por Payne y col.,(1987), donde se le asigna un valor a cada subunidad de glutenina de alto peso molecular. La suma de estos valores para cada línea se denomina GLU-1.

En caso de existir translocación al valor GLU-1 se le realizó el siguiente ajuste: con valores de GLU-1 entre 8 y 10 se le restaron 3 puntos, entre 5 y 7 se restan 2 puntos

y entre 3 y 4, 1 punto. Este ajuste se ejecuto de acuerdo a las estimaciones realizadas por Paine y col.,(1987).

Los resultados obtenidos en este ejercicio se indican en Tabla 24. Existe una buena asociación entre sedimentación y los valores Glu-1. Esto confirma que las HMWG son una buena herramienta para la evaluación de calidad panadera.

Resultados similares fueron informados por Martin y col., (2001), quienes estudiaron el efecto de la translocación 1BL/1RS sobre la calidad panadera en trigos hexaploides, con distintas combinaciones de HMWG. Sus resultados indicaron que no hubo efecto de la translocación sobre el contenido de proteína del grano, pero si hubo efecto en el volumen de sedimentación. La magnitud del efecto de la translocación sobre sedimentación fue diferente para el grupo de líneas que poseían la combinación 5+10 en relación al grupo que tenía la combinación 2+12.

Si consideramos que las HMWG, sólo constituyen el 10% de las proteínas de reserva del trigo de pan y aun así son un buen índice de calidad, con investigaciones posteriores que desarrollaran una metodología similar para gluteninas de bajo peso molecular y gliadinas, se podría contar con una herramienta muy poderosa para la evaluación de germoplasma de trigo de pan.

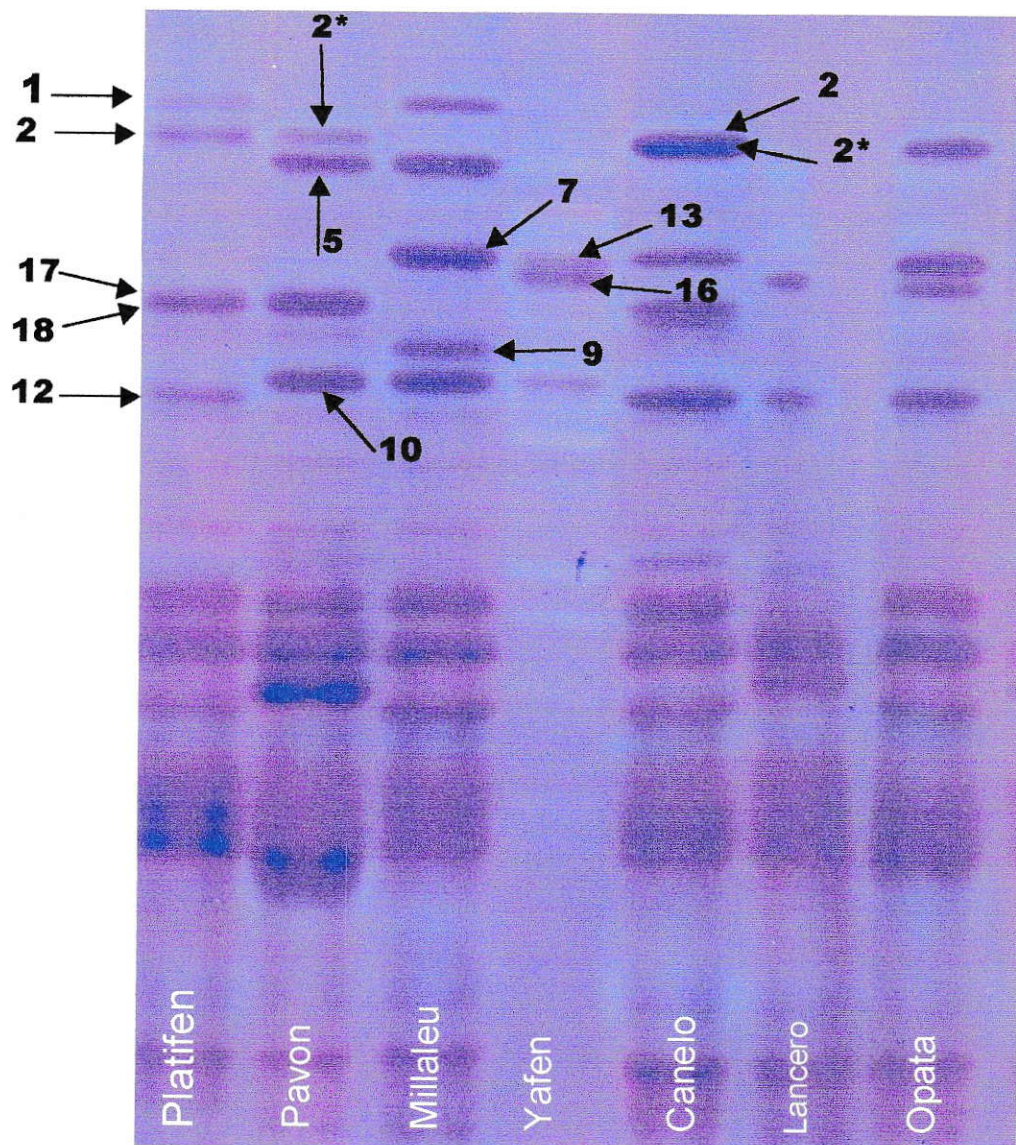


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 9%. Subunidades de gluteninas de alta masa molecular en siete variedades de trigos de pan, utilizadas como patrón de referencia para el análisis del germoplasma experimental.

Tabla 23. Subunidades de gluteninas de alto peso molecular de las 80 entradas de trigo de pan en evaluación.

Entrada	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Entrada	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1
1	2*	7+9	5+10	41	2	17+18	5+10
2	1	7+9	5+10	42	1	7+9	5+10
3	1	7+9	5+10	43	2*	17+18	2+12
4	2*	17+18	5+10	44	2*	7+9	2+12
5	2*	7+9	2+12	45	2*	7+8	2+12
6	1	17+18	2+12	46	2*	7+9	5+10
7	2*	7+8	2+12	47	2*	7+9	5+10
8	0	7	5+10	48	1	7+9	5+10
9	2*	7+9	0	49	1	7+8	5+10
10	0	7+8	2+12	50	1	7+9	5+10
11	0	7+8	2+12	51	2*	7+9	5+10
12	0	7+8	2+12	52	2*	7+8	2+12
13	1	7+8	5+10	53	2*	7+9	5+10
14	2*	7+9	2+12	54	2*	7+9	5+10
15	2*	7+9	5+10	55	2*	7	5+10
16	2*	7+9	5+10	56	2*	7	5+10
17	1	7+8	5+10	57	2*	7	5+10
18	2*	7+9	5+10	58	2*	7+8	2+12
19	2*	7+9	5+10	59	2*	17+18	2+12
20	2*	7+9	5+10	60	1	7+8	5+10
21	2*	7+8	5+10	61	1	7	5+10
22	1	7+9	5+10	62	1	7	5+10
23	2*	7+9	5+10	63	1	7+8	5+10
24	2*	7+9	2+12	64	2*	17+18	2+12
25	2*	17+18	5+10	65	1	7+9	5+10
26	2*	17+18	5+10	66	2*	13+16	2+12
27	2*	17+18	5+10	67	2*	7+8	2+12
28	1	7+9	5+10	68	2*	17+18	5+10
29	2*	13+16	5+10	69	2*	7+9	2+12
30	1	13+16	5+10	70	2*	17+18	5+10
31	2*	7+9	2+12	71	0	7	5+10
32	2*	7+9	5+10	72	0	7+8	2+12
33	0	7+8	2+12	73	2*	7	5+10
34	1	7+9	5+10	74	1	7	2+10
35	2*	7+9	5+10	75	2*	13+16	2+12
36	2*	7+9	2+12	76	0	17+18	2+12
37	2*	7+9	2+12	77	2*	17+18	5+10
38	2*	17+18	5+10	78	2*	17+18	2+12
39	1	17+18	5+10	79	0	7	5+10
40	2*	7	2+12	80	2*	13+16	5+10

Tabla 24. Agrupación de los genotipos estudiados por tipo de subunidades de glutenina de alto peso molecular y presencia de translocación con centeno.

Translocación con Centeno	Valor GLU-1*	Número de entradas	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Promedio Sedimentación	Promedio Proteína (%)	Promedio Gluten seco (%)
No	10	7	<b>2*</b>	<b>17+18</b>	<b>5+10</b>	11,3	13,1	12,5
Si	7(10-3)	2	<b>2*</b>	<b>17+18</b>	<b>5+10</b>	9,0	15,2	13,8
No	10	4	<b>1</b>	<b>7+8</b>	<b>5+10</b>	10,3	13,8	13,3
Si	7(10-3)	1	<b>1</b>	<b>7+8</b>	<b>5+10</b>	6,4	13,1	12,6
No	9	5	<b>2*</b>	<b>7+9</b>	<b>5+10</b>	10,8	13,5	13,6
Si	6(9-3)	9	<b>2*</b>	<b>7+9</b>	<b>5+10</b>	6,8	12,5	12,0
No	9	3	<b>1</b>	<b>7+9</b>	<b>5+10</b>	10,4	13,1	13,2
Si	6(9-3)	6	<b>1</b>	<b>7+9</b>	<b>5+10</b>	7,0	12,8	12,5
No	8	3	<b>2*</b>	<b>7</b>	<b>5+10</b>	8,8	14,5	14,5
Si	5(8-3)	1	<b>2*</b>	<b>7</b>	<b>5+10</b>	6,2	13,9	13,2
No	8	2	<b>2*</b>	<b>17+18</b>	<b>2+12</b>	9,5	13,2	13,9
Si	5(8-3)	2	<b>2*</b>	<b>17+18</b>	<b>2+12</b>	8,7	13,6	13,8
No	8	4	<b>2*</b>	<b>7+8</b>	<b>2+12</b>	9,6	14,3	15,3
Si	5(8-3)	1	<b>2*</b>	<b>7+8</b>	<b>2+12</b>	7,4	12,4	11,3
No	7	4	<b>2*</b>	<b>7+9</b>	<b>2+12</b>	9,1	13,0	13,0
Si	5(7-2)	4	<b>2*</b>	<b>7+9</b>	<b>2+12</b>	5,7	11,5	12,3
No	6	2	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>5+10</b>	9,6	13,6	13,7
Si	4(6-2)	1	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>5+10</b>	5,3	14,0	15,3
No	6	4	<b>0</b>	<b>7+8</b>	<b>2+12</b>	8,7	12,4	12,8
Si	4(6-2)	1	<b>0</b>	<b>7+8</b>	<b>2+12</b>	6,5	13,0	14,1

\*

El valor GLU-1 se determinó de acuerdo a la escala diseñada por Payne y col., (1987).

## 4. CONCLUSIONES

El alto número de genes involucrados en la calidad panadera del trigo de pan, explica la fuerte influencia del medio ambiente sobre este carácter. Este hecho obliga a realizar evaluaciones en distintas condiciones agroecológicas, con un alto número de repeticiones para eliminar la variación ambiental sobre este carácter.

Esto motivó a buscar nuevas alternativas de trabajo que permitan disminuir la variación ambiental que afecta la expresión de este carácter, y aumentar así la eficiencia en los trabajos de mejoramiento genético.

La base para poder realizar la evaluación de nuevas metodologías, fueron algunas de las pruebas que tradicionalmente se han realizado en los programas de mejoramiento; Porcentaje de proteína del grano, volumen de sedimentación, gluten húmedo, gluten seco, gluten índice y dureza del grano. Se seleccionaron estas pruebas por estar más relacionadas con las proteínas de reserva del grano y el índice de dureza.

El germoplasma experimental señaló un amplio rango de valores para volumen de sedimentación, los que fluctuaron entre 4,9 a 14,5. Estos valores abarcan las categorías de mala, regular y buena calidad panadera para este parámetro. Porcentaje de proteína del grano, gluten húmedo y gluten seco no presentaron valores considerables como bajos, si no que solamente regulares y altos, debido a

que es difícil que un genotipo con un manejo agronómico adecuado presente malos niveles para esos parámetros.

El porcentaje de proteína del grano estuvo positivamente correlacionado con volumen de sedimentación, gluten húmedo y gluten seco. Las correlaciones más altas se observaron entre gluten seco y gluten húmedo (0,88), lo que era esperable debido a que la diferencia entre ambos es solo un proceso de secado. El porcentaje de proteína del grano mostró mayor correlación con gluten seco (0,77) que con sedimentación (0,36). Este hecho es explicable debido a que el porcentaje de proteína y el gluten seco están más bien asociados a cantidad de proteína y la sedimentación a la calidad de la proteína.

De los seis microsatélites analizados cuatro estuvieron asociados con diferentes pruebas de calidad. El marcador Xglu A3 presentó correlaciones significativas con volumen de sedimentación (0,385), gluten seco (0,394) y gluten índice (0,377), Xgwm 164 se asoció significativamente con sedimentación (0,235) y gluten índice (0,233), el marcador Xgwm 135 presentó correlaciones significativas con gluten seco (0,172) y gluten índice (0,221) y el SSR Xgdm 19 fue el marcador con mayor número de pruebas asociadas: porcentaje de proteínas (0,447), sedimentación (0,408), gluten seco (0,487), gluten índice (0,391) e índice de dureza (0,483). De estos cuatro microsatélites, Xglu A3 y Xgdm 19, son los más informativos con índices de polimorfismos de 0,721 y 0,758 respectivamente.

Ninguno de los SSR estudiados presentó asociación con gluten húmedo. Los marcadores Xgwm 498 y Xgdm 98, no se correlacionaron con ninguno de los parámetros de calidad.



Las combinaciones alélicas seleccionadas como marcadores genéticos para buena calidad panadera, considerando porcentaje de proteína, sedimentación y gluten seco por marcadores es la siguiente:

**Xgdm 19:** 190; 187; 187-176; 185-170-166; 185-168; 185-163; 182-170; 182-163; 176-163; 176; 170; 170-166.

**Xglu A3:** 152-145; 152-150-145; 150-145-143; 143; 143-141; 143-138.

**Xgm 164:** 136; 121-113; 128.

**Xgwm 135:** 145-118; 138-118; 134-118.

Los valores de gluten índice que interesa que posea una variedad de trigo depende del uso que se le quiere dar a esa variedad. Sin embargo, no es de utilidad una combinación alélica que si bien nos permite obtener una fuerza determinada, esta ligada a características de mala calidad.

Si se quiere seleccionar un trigo como corrector, es decir para mezclar con trigos suaves, habría que seleccionar los siguientes genotipos:

**Xgdm 19:** 185-170-166; 185-168; 187-176.

**Xglu A3:** 143-138; 152-145.

**Xgwm 164:** 128.

Si se busca un trigo fuerte:

**Xgdm 164:** 121-113.

Para un trigo suave:

**Xgdm 19:** 182-163; 170-166; 185-163.

**Xglu A3:** 152-150-145.

**Xgwm 135:** 138-118; 134-118.

Las combinaciones alélicas asociadas a trigos muy duros son las siguientes:

**Xgdm 19:** 176-163; 182-170; 182-163; 185-170-166; 187-176.

Para trigos duros se asocian los siguientes alelos:

**Xgdm 19:** 185-168; 185-163; 170-166.

Los resultados de esta investigación indicaron que la metodología utilizada es adecuada para los objetivos que se plantearon en este trabajo. De hecho fue posible preseleccionar haplotipos promisorios para buena calidad. Esta selección se hizo considerando las distribuciones de las frecuencias genotípicas de las combinaciones alélicas, en los grupos de genotipos de buena, regular y mala calidad panadera.

El 41% de las entradas estudiadas mostraron la presencia de ADN de centeno. Los genotipos con dicha condición vieron disminuida su calidad panadera, lo que se vio reflejado en una disminución del volumen de sedimentación. Estos resultados señalan la necesidad de incluir estas determinaciones de forma rutinaria en los trabajos de mejoramiento.

Se determinó las subunidades de gluteninas de alta masa molecular del germoplasma experimental. Esta información permitió calcular el índice GLU-1, diseñado por Payne y col.,(1987). Este índice fue ajustado de acuerdo a las instrucciones del mismo autor cuando existía translocaciones con centeno. Los valores arrojados por este índice se asociaron claramente con sedimentación, que ha demostrado ser uno de los parámetros más estables para evaluar calidad panadera.

El perfil electroforetico de las gluteninas de alto peso molecular, es una eficiente metodología de trabajo para la evaluación de calidad panadera, la cual podría mejorarse ostensiblemente si se incorporan en dichos análisis a las gluteninas de bajo peso molecular y a las gliadinas.

## 5. PROYECCIONES

La continuación de esta línea de investigación debería contemplar los siguientes aspectos:

- a) Seleccionar un mayor número de marcadores SSR que estén asociados a calidad panadera, dada la alta disponibilidad de estos marcadores.
- b) Incluir en el germoplasma analizado, poblaciones segregantes  $F_2$  con sus respectivos progenitores, para poder dilucidar en aquellos casos que existen más de un producto de amplificación, si estos corresponden a dos *loci* contiguos o a amplificados de distintos cromosomas homeólogos.
- c) Aumentar el número de genotipos analizados, debido a que muchas de las combinaciones alélicas preseleccionadas estaban presentes en un número bajo de líneas. Habría que comprobar si al aumentar la cantidad de genotipos con la combinación alélica de interés esta mantiene su alta frecuencia genotípica dentro del grupo de trigos de buena calidad.
- d) Dado el alto número de microsatélites publicados en revistas científicas que no producen los amplificados esperados, habría que seguir buscando un criterio de evaluación que permita dilucidar a priori la calidad del microsatélite como marcador genético. En este estudio se consideraron varias características de los partidores.

- e) En este trabajo se buscaron alternativas para mejorar la calidad de los productos de amplificación, pero aun quedan otras alternativas que explorar, como por ejemplo el uso del “Opti-Prime™ Optimization Kit” de Stratagene, el cual incluye 12 amortiguadores para reacciones de PCR, los cuales varían el pH, la concentración de  $MgCl_2$  y la concentración de KCl. .

## 6. BIBLIOGRAFIA

American Association of Cereal Chemists.1998. Approved Methods. Vol.1. Método AACC 38-12.

Anderson, J.A.,Churchill, G.A., Autrique,J.E., Tanksley, S.D. y Sorrels, M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* **36**: 181-186.

Banco Central de Chile. Boletín mensual N° 884 octubre 2001. pp 2729.

Branlard, G., Russet, M., Loisel, W. y Autran, J.C. 1991. Comparison of 46 technological parameters used in breeding for bread wheat quality evaluation. *J. Genet. & Breed.* **45**:263-280.

Bullrich, L, Tranquilli,G., Pfluger, L.A., Suarez, E.Y. y Barneix, A.J. 1998. Bread making quality and yield performance of 1BL/1RS wheat isogenic lines. *Plant Breeding* **117**(2):119-122.

Bushuk, W. 1998. Wheat breeding for end-product use. H.-J. Braun et al. (eds.), *En Wheat: Prospects for Global Improvement.* pp 203-211. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Chao, S., Sharp, P.J., Worland, A.J., Warham, E.J.y Koebner y R.M.D. 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* **78**:495-504.

Cygankiewics, A. 1997. Efficacy of preliminary evaluation of grain quality of winter and spring wheat forms and cultivars based on sedimentation value and protein content in comparison to results of complete evaluations. *Biuletyn Instytutu Hodowli Aklimatyzacji Roslin.* N° 204, 237-243.

D'Ovidio R., Masci, S. y Porceddu, E. 1995. Development of a set of oligonucleotide primers specific for genes at the Glu-1complex loci of wheat. *Theor Appl Genet* **91**:189-194.

Devos, K.M., Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P. y Gale, M.D. 1995. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* **90**:247-252.

- Dubcovsky, J., Tranquilli, G., Lijavetzky, D., Khan, I.A., Schlatter, A.R. Manifesto, M.M. y Marcucci-Poltri, S. 2000. Advances in molecular Markers for Bread Making Quality. En Application of Biotechnologies to wheat Breeding. Proceedings of a conference at La Estanzuela, Uruguay, November 19-20, 1998. Montevideo, Uruguay: CIMMYT.
- Felix, Y., Martinant, J.P., Bernard, M., Bernard, S. y Branlard, G. 1996. Genetic characterization of storage proteins in a set of F1- derived haploid lines in bread wheat. *Theor Appl Genet* **92**:340-346.
- Granger, D., Riveros, F. y Cortes, V. 1989. Influencia del grano blanqueado y variedad, sobre algunos parámetros de calidad de *Triticum durum* Desf. *Simiente*. **59**:87.
- Graveland, A., Bosveld, P., Lichtendonk, W.J., Moonen, J.H.E. y Scheepstra, A. 1982. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *J. Sci. Food Agric.* **33**:1117
- Graybosh, R.A., Peterson, C.J., Lee, J-H. y Shelton, D.V. 1994. Effects of Glutenin Protein Polymorphism on Breadmaking Quality of Winter Wheats. *Crop Sci.* **34**:628-635.
- Greenwell, P. y Schofield, J.D. 1986. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal Chem.* **63**:379-380.
- Gupta, R.B., Singh, N.K. y Shepherd, K.W. 1989. The cumulative effect of allelic variation in LMW and HMW glutenin subunits on dough properties in the progeny of two bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* **77**:57-64.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En David B. Golstein y Christian Schlotterer (eds), *Microsatellites, Evolution and Applications*. Oxford, University press. Great Clarendon Street, Oxford OX2 6DP.
- Hewstone, N. y Hinrichsen, P. 1994. Composición de subunidades de gluteninas de alto peso molecular de trigos chilenos de pan (*Triticum aestivum* L.) *Agr.Tec.* **54**:211-218.
- Hoseney, R. 1991. Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Proteínas de los cereales. Gonzáles. (trad.) Zaragoza. España. Editorial Acribia, S.A. 1991. 321p.
- Hoseney, R.C., y Seib, P.A. 1973. Structural differences in hard and soft wheat. *Baker's Dig.* **47**(6):26-28, 56.
- Johansson, E. y Svensson, G. 1999. Relationships among bread making quality parameters in Swedish wheats. *Journal of genetics and Breeding.* **53** (2): 93-98.

Johnson, J.M., Griffey, C.A. y Harris, C.H. 1999. Comparative effects of 1BL/1RS translocation in relation to protein composition and milling and baking quality of Soft Red Winter Wheat. *Cereal Chem.* **76**(4):467-472.

Khelifi, D. y Branlard, 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.

Koebner, R.M.D. 1995. Generation of PCR-based markers for the detection of rye chromatin in a wheat background. *Theor Appl Genet* **90**: 740-745.

Korzun, V., Borner, A., Worland, A.J., Law, C.N. y Roder, M.S. 1997. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* **95**:149-155.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680.

Manifesto, M.M., Schlatter, A.R., Hopp, H.E., Suárez, E.Y. y Dubcovsky, J. 1998. Microsatellites in wheat: An useful tool for variety identification and breeding. In: Kohli, M.M. and M. Francis. 2000. Application of Biotechnologies to wheat Breeding. Proceedings of a conference at La Estanzuela, Uruguay, November 19-20, 1998. Montevideo, Uruguay: CIMMYT.

Martin, P., Gomez, M. y Carrillo, J.M. 2001. Interaction between allelic variation at the Glu-D1 locus and a 1BL.1RS translocation on flour quality in bread wheat. *Crop Science Society of America*. **41** (4):1080-1084.

Narváez, C.A. 1998. Uso de marcadores moleculares para la identificación de variedades de vid. Tesis para optar al título de Bioquímico. Facultad de Ciencias químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile

Ng, P.K.W. y Buhuk, W. 1987. Statistical relationship between high molecular weight subunits of glutenin and breadmaking quality of Canadian-grown wheats. *Cereal Chem.* **65**: 408-413.

Ortiz-Monasterio, J.I., Peña, R.J., Rajaram, S. 1997. CIMMYT's genetic progress in wheat grain quality under four nitrogen rates. *Crop Science Society of America*. **37** (3)892-898.

Ostle, B. 1963. Statistics in research. The Iowa State University Press, Ames, IA, EUA.



- Payne, P.I. 1987 a. Genetics of wheat storage proteins and effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **38**:141-53.
- Payne, P.I. 198 7b. The genetical basis of breadmaking quality in wheat. *Aspect Appl Biol* **15**: 79-90.
- Payne, P.I., Nightingale, M.A., Krattiger, A.F. y Holt, L.M. 1987. The relationship between HMW Glutenin Subunit Composition and the Bread-making Quality of British-grown Wheat Varieties. *J.Sci. Food Agric.* **40**:51-65
- Payne, P.I., Holt, L.M., Krattiger, A.F. y Carrillo, J.M. 1988. Relationships between seed quality characteristics and HMW glutenin subunit composition determined using wheats grown in Spain. *J. Cereal Sci.* **7**:229-235.
- Pestova, E., Ganal, M.W. y Roder, M.S. 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* **43**: 689-697.
- Plaschke, J., M.W. Ganal y Roder, M.S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet* **91**:1001-1007.
- Roder, S.M., Plasche, J., Konig, S.U., Borner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. y Ganal, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol.Gen.Genet* **246**:327-333.
- Roder, S.M., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. y Ganal, M.W. 1998. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* **149**:2007-2023.
- Saghai-Marouf, M.A., Soliman, K.M. Jorgensen, R.A. y Allard, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:8014-8018.
- Singh, N.K. y Sheperd, K.W. 1988. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. *Theor Appl Genet* **75**: 628-641.
- Sip, V., M. Skorpice, Chrpova, J., Scottnikova, V. y Bartova, S. 2000. Effect of cultivar and cultural practices on grain yield and bread making quality of winter wheat. *Rostlinna Vyroba.* **46** (4), 159-167.
- Skerritt, J.H. y Robson, L.G. 1990. Wheat Low Molecular Weight Glutenin Subunits-Structural Relationship to Other Gluten Proteins Analyzed Using Specific Antibodies. *Cereal Chem.* **67**(3):250-257.
- Stephenson, P., Bryan, G., Kirby, J., Collins, A., Devos, K., Busso, C. y Gale, M. 1998. Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. *Theor. Appl Genet* **97**:946-949.

Williams, P.C. 1967. Relation of Starch Damage and Related Characteristics to kernel Hardness in Australian Wheat Varieties. *Cereal Chem.* **44**:383-391.

Woo, T.L. 1929. Tables for ascertaining the significance or nonsignificance of association measured by the correlation ratio. *Biometrika* 21:1.

Zhong-hu H., Peña, R.P. y Rajaram, S. 1992. High molecular weight glutenin subunit composition of Chinese bread wheats. *Euphytica* **64**: 11-20.

## **ANEXOS**

### Anexo 1. Variedad, Cruza y Pedigrí del germoplasma de trigo experimental.

Nº	VARIEDAD, CRUZA Y PEDIGREE
1	THATCHER*6/TRANSFER RL 6010
2	MILAN "S" CM75113-B-5M-1Y-5M-2Y-3B-0Y-0CE-0M
3	KVZ/ODK51//NKT"S" SWM12801-0BW-2BV-2BV-1BV-1BV-1BV
4	PLA21084/3/AZ67/NR 70//CNO"S" A-2379.2P.3P.1P
5	BUC/FLK//MYNA/VUL CM91575.7Y.0M.0Y.1M.0Y
6	HUAÑIL INIA 81-IBWSN-1822/NKT"S" A-21464-6P-3P-1P
7	TRIGO BR 35
8	NING
9	WEBSTER
10	N.LUIG SR 31+LR 26+YR 9
11	ER 5155
12	SA 2199 (PI 262660)
13	CRUZ ALTA/CMH 82.493 CMBW89Y3423 Y-3423-6P-3P-1P
14	PATO/ON//MAYA"S"/3/BB/RON//MAYA"S"/5/AF/MY48/5/W/245/SU51/3/2*FR/FM //Y/4/AA A-25139-0P-5P-1P-4P
15	BUC"S"/FLK"S"/3/AU/UP 301//GLL/SX A-25286-0P-6P-1P-2P
16	DOVE"S"/BUC"S"/VEE"S"/2*CHA A-24693-2P-3P-3P
17	CRUZ ALTA/CMH 82.493 CMBW89Y3423 Y-3423-6P-1P-1P
18	VEE/4/BB/GLL//CJ71/T.AEST./3/KAL/B/5/PLA/6784 A-25075-0P-3P-1P-1P
19	HUAYUN INIA JUPATECO/BLUEJAY"S">//URES CM.67458-4Y-2M-1Y-1M-3Y-0B-12M-0Y
20	PRL"S"/VEE 6//KVZ"S" A-25249-0P-7P-3P-1P

## Continuación Anexo 1.

Nº	VARIEDAD, CRUZA Y PEDIGREE
21	JACUI R P.A.//DWL5023/2*SMB"S" A-26752-0P-1P-2P-1P
22	MILLALEU INIA KVZ/BUHO"S"//KAL/BB CM 33027-F-12M-1Y-6M-0Y
23	KAUZ"S"//BOW"S"/ MILLALEU A-26926-0P-2P-1P-2P
24	PIA
25	PLA21084/3/AZ67/NR70//CON"S" A-23792.3P.1P.3P
26	CZI/3/BNAP//LIB/BB"S" BW2276.0-0-0-0-6/88
27	CZI/3/BNAP//LIB/BB"S" BW2276.0-0-0-0-7/88
28	PROINTA GUAZU
29	R 37/GH 121//KAL/BB SWM4257-41M-1Y-4M-1Y-0M-1P-0P
30	CEP 85126/OPATA CM104593-0Z-0A-1A-0A
31	B-T-121-97
32	L-9121-31
33	ALTAR 84/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/OCI CMBW89Y3516-1Y-010M-010Y-3M-4Y-0M
34	CDR 4/6/KVZ/3/TOB/CTFN//BB/4/BLO"S"/5/TRN CP02510-11E-0E-0Y-7C-1C-0C
35	TIA.2/KAUZ CM103733-23M-030Y-020Y-010M-5Y-010Y-0M
36	KAUZ/CMH77.308//BAU CM108805-0TOPM-2Y-020Y-010M-1Y-010M-8Y-0M
37	BUC/FLK//MYNA/VUL CM.91575-7Y-0M-0Y-1M-0Y
38	CI 14119/2*PF8237 F26562-6F-2F-0R-1F-0R-2F-0F
39	WDR/7C//ALD"S" ABC 5350-2B-3B-1B-0B
40*	CNO79*2/HE1 CM.90313-A-4B-4Y-2B-0Y

## Continuación Anexo 1.

N°	VARIEDAD, CRUZA Y PEDIGREE
41	MILLALEU//CMH 76-1084/FLK"S"/3/ANIVETRSARIO A-25094-0P-4P-1P-2P
42	F12.71/COC//CNO79/3/2*PSN/BOW Y-100205-2P-2P-1P
43	PATO/ON//MAYA"S"/3/BB/RON//MAYA"S"/4/PTM70/ANA A-25155-0P-2P-1P-3P
44	KAUZ/CMH77.308//BAU CM108805-0TOPM-2Y-020Y-010M-1Y-0M
45	CHIL/2*STAR CM112793-0TOPY-22M-020Y-010M-3Y-010M-0Y
46	K134(60)/4/TOB/BMAN//BB/3/CAL/5/BUC"S"PVN"S"/6/BOW"S"/MILLALEU A-26919-0P-2P-4P-2P
47	SERI*3//BUC"S"/BJY"S"/3/TSI/VEE5"S" A-26976-0P-2P-2P-1P
48	KAUS"S"/PLA 387 A-26292-0P-3P-1P-2P-1P
49	DOVE"S"//KLAT/SOREN CM72205-0YA-6J-3J-1J-0J
50	JUP73/ZP"S"//COC75/3/ALDAN"S" CM59185-3J-1B-0J-9J-0J
51	MN 72149/MN 72528 MN 8105
52	TOROPI
53	AGA/5*TI 71//2*GEN 81 CMH 83-2537-B-4B-1Y-2B-3Y-1B-0Y
54	LR 19
55	KLEIN LUCERO/6*THATCHER RL 6008
56	THATCHER*6/RL 5406 RL 6043
57	THATCHER *6/PI 58548 RL 6058
58	JACUI
59	BR 14/CEP 847 B31615-0A-0Z-1A-12A-0A
60	BOW/BUC//BUL"S" CM90526-30M-0Y-0M

**Continuación Anexo 1.**

Nº	VARIEDAD, CRUZA Y PEDIGREE
61	Yafén
62	BOW/KENYA2697-2//URES/PRL A-27016-0P.3P.1P.1P
63	K 6661-21
64	AGENT/6*NAC 76 CM-84421-A-3Y-2B-1Y-2B-0Y
65	KITT/MN7222 MN 7663
66	CANELO INIA 7 C/RABE (H3) T 3044-1T-4T-12T-500H-500H
67	MENFLO
68	JUP/BJY"S" CM.39992-12M-1Y-1M-1Y-0M
69	CON 79*2/PRL "S" CM 90312-C-8B-8Y-1B-0Y
70	AGENT/2* NAC 76 CMH 82-429-6Y-1B-2Y-2B-1Y-3B-0Y
71	SA 463 (PI 294994)
72	SA 1684 (PI 137739)
73	CHOIX M 95 CM90722-22Y-0M-0Y-5M-0Y-0MEX
74	CMH 81A-744/SERI 82 CMH-536-3Y-3B-1Y-1B-0Y
75	CMH.74A.630/SX//2*CNO79/3/CMH.74A.630/SX//TSI CMH.89.3607-C-2B-10Y-2B-0Y
76	SUPER KAUZ"S"//BOW/KENYA 2697-2A-27007-0P-2P-3P-1P
77	ALD"S"/BOW"S"//82.P.C.HARI.61 A-23900-5P-2P-3P
78	MAYA/NAC CM.39424-1M-1M-4Y-1M-2Y-1M-0Y
79	IAN 8/FINK"S" CP3409-1E-0Y-0E-7Y-0E
80	PF 70354/MUS"S"//PHO"S"/TMP CM-81806-6Y-05PZ-1Y-6AL-1Y-0M

## Anexo 2. Grupo de microsatélites con buen comportamiento como marcadores moleculares.

NOMBRE	SECUENCIA	%CG	TM	auto- alineamiento Maxima puntuación	Alineamiento primer-primer Maxima puntuación	Melting Termico Diferencial Tm diff	Origen
Xgdm98(F)	ccatccatgaaatggcg	52,9	51,5	10			Pestova <i>et al.</i> (2000)
Xgdm98(R)	gcccttcactagccttcacg	55	56,4	10	14	0,5	Pestova <i>et al.</i> (2000)
Xgdm19(F)	gcgttcgagtgacttccaat	50	56,4	20			Pestova <i>et al.</i> (2000)
Xgdm19(R)	attgacagcagatggcagtg	50	56,7	8	9	0,4	Pestova <i>et al.</i> (2000)
Xgwm498(F)	ggtggtatggactatggacact	50	57,1	12			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm498(R)	tttgcattggaggacatact	45	55,9	10	13	1,4	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm164(F)	acatttctccccatcgtc	52,6	55,3	6			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm164(R)	ttgtaacaatcgcatcgcg	40	53,6	22	8	0,9	Röder <i>et al.</i> (1998)
HVM4 (F)	agagcaactaccagtccaatggca	50	58,8	8			
HVM4(R)	gtcgaaggagaagcggccctgga	62,5	65,17	12	15	5,9	
Xglu A3(F)	tcccgccatgagtaatc	55,6	51,16	10			Devos <i>et al.</i> (1995)
Xglu A3(R)	ttgggagacacattggcc	55,6	51,1	12	13	0,1	Devos <i>et al.</i> (1995)
Xgwm135(F)	tgtcaacatcgtttgaaaagg	36,4	54,83	14			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm135(R)	acactgtcaactggcaatg	50	58,64	11	11	0,4	Röder <i>et al.</i> (1998)



### Anexo 3. Grupo de microsatélites con mal comportamiento como marcadores moleculares.

NOMBRE	SECUENCIA	%CG	TM	auto- alineamiento Maxima puntuación	Alineamiento primer-primer Maxima puntuación	Melting Termico Diferencial Tm diff	Origen
Xgwm99(F)	aagatggacgtatgcatcaca	42,9	56,79	14			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm99(R)	gccatattgatgacgcata	40	52,26	8	12	1,9	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm124(F)	gccatggctatcaccag	61,1	56,55	22			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm124(R)	actgttcggtgcaattgag	45	56,17	10	11	1,3	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm131(F)	aatccccaccgatctctc	50	55,76	9			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm131(R)	agttcgtgggtctctgatgg	55	58,71	14	14	0,2	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm140(F)	atggagatattggcctacaac	40,9	54,72	14			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm140(R)	cttgactcaaggcgtgaca	50	57,7	12	11	2,9	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm153(F)	gatctcgtcaccgggaattc	55	56,91	14			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm153(R)	tgtagagaaggacggagag	55	56,77	6	12	4,7	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm232(F)	atctcaacggcaagccg	58,8	56,6	12			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm232(R)	ctgatgcaagcaatccacc	52,6	55,53	10	8	0,7	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm259(F)	agggaaaagacatcttttttc	30,4	51,99	18			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm259(R)	cgaccgactcgggttc	64,7	57,04	11	7	3	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm268(F)	aggggatatgtgtcactcca	47,6	57,98	12			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm268(R)	ttatgtgattgcgtacgtacc	45,5	58,2	24	11	0,5	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm274(F)	aacttgcaaaactgttctga	35	53,26	14			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm274(R)	tatttgaagcggttgattt	30	50,05	10	16	1,5	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm357(F)	tatggtcaaaagtggacctcg	47,6	56,97	12			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm357(R)	aggctgcagctcttctctcag	52,2	60,61	24	11	3,8	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm403(F)	cgacattggctcgggtg	58,8	55,14	11			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm403(R)	ataaaacagtgcggctccagg	50	57,67	8	11	0,2	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm413(F)	tgctgtctagattgcttggg	47,6	56,77	16			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm413(R)	gatcgtctcgtccttggca	57,9	58,57	10	9	2	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm458(F)	aatggcaattggaagacatagc	40,9	55,63	14			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm458(R)	ttcgcaatggtgatttggc	42,1	53,71	16	10	0,3	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm497(F)	gtagtgaagacaaggcatt	45	53,5	8			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm497(R)	ccgaaagtgggtgatatac	45	51,4	9	7	0,3	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm642(F)	acggcgagaaggtgctc	64,7	58,89	10			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm642(R)	catgaaaggcaagttcgtca	45	55,44	10	13	0,2	Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm666(F)	gcacccacatcttcgacc	61,1	57,82	10			Röder <i>et al.</i> (1998)
Xgwm666(R)	tgctgctggtctctgtgc	61,1	59,42	10	11	0,2	Röder <i>et al.</i> (1998)
WMS 24(F)	cacacaaggcaccttgc	58,8	56,32	13			Kurzun <i>et al.</i> (1997)
WMS 24(R)	caatggacatagttgtgtcgg	47,6	57,14	22	17	3	Kurzun <i>et al.</i> (1997)
WMS 135(F)	tgtcaacatcgtttgaaaagg	36,4	53,6	14			Kurzun <i>et al.</i> (1997)
WMS 135(R)	acactgtcaacctggcaatg	50	56,8	11	11	0,4	Kurzun <i>et al.</i> (1997)
WMS 232(F)	atctcaacggcaagccg	58,8	56,6	12			Kurzun <i>et al.</i> (1997)
WMS 232(R)	ctgatgcaagcaatccacc	52,6	55,53	10	8	0,7	Kurzun <i>et al.</i> (1997)
WMS 337(F)	cctcttctcctcacttagc	57,1	57,4	6			Kurzun <i>et al.</i> (1997)
WMS 337(R)	tgctaactggccttggcc	55,6	56,5	12	12	0,5	Kurzun <i>et al.</i> (1997)
Dx5(F)	gaaacctgctcggacaag	57,9	58,33	14			
Dx5(F)	gcctagcaaccttcacaatc	50	55,61	10	11	4,5	