

## ANÁLISIS GENÓMICO DE CARACTERES DE CALIDAD Y COMPONENTES DEL RENDIMIENTO EN TRIGO CANDEAL

### OBJETIVOS GENERALES E IMPACTO

Los trigos tetraploides (*Triticum turgidum* L. var. *durum*), destinados a la elaboración de pastas, se comenzaron a cultivar en el país casi simultáneamente con los trigos pan, alrededor de 1870. Según la *Foreign Agricultural Service (FAS)* dependiente del *USDA* (<http://www.fas.usda.gov>) la Argentina incrementó el área dedicada al cultivo de trigo candeal de 22 mil hectáreas (ha) en la cosecha 1989/90 a 83 mil ha en la cosecha 1996/97. Sin embargo, esta misma fuente indica que la superficie estimada del cultivo en la campaña 2005/06 fue en 54 mil ha, un 5% menos que en 2004/05, y se esperan superficies aún menores para las próximas campañas. Este retroceso en el área dedicada a este cultivo se debe básicamente a la preferencia, por parte de los productores, de cultivos de mayor rentabilidad como soja de primera y también girasol. Estos *commodities* han visto favorecida su producción, no sólo por las mejoras genéticas que elevaron su rendimiento, sino también, por su alto valor en el mercado internacional.

La demanda a nivel mundial de calidades específicas ha generado condiciones favorables para el comercio de partidas de trigo de alta calidad. Es necesario entonces, desarrollar variedades que reúnan buena calidad de pasta y elevados rendimientos, combinando ventajas para productores y consumidores. En el caso del candeal los parámetros de calidad tienen que ver con el color amarillo de la pasta, buena fuerza de gluten para dar firmeza al fideo y alta proteína, que garantice su valor nutricional.

En los últimos seis años, nuestro grupo trabajó en la evaluación de una población de líneas recombinantes endogámicas (RIL), derivada del cruzamiento entre la línea UC1113 y el cv. Kofa. Genes de lipoxigenasas y QTLs (*Quantitative Trait Loci*) para color de sémola y pasta fueron posicionados sobre un mapa genético de marcadores microsatélites. Asimismo, trabajó en la identificación de un gen que confiere un mayor contenido de proteína en grano. El objetivo del presente proyecto es avanzar en el conocimiento de los factores determinantes del color de la pasta e iniciar estudios biométricos de rendimiento, cantidad de proteína y fuerza de gluten y el mapeo de regiones genómicas asociadas. Las técnicas biométricas y la metodología de marcadores moleculares son de utilidad en la comprensión de la base genética de los mencionados caracteres. Los marcadores moleculares ligados a los QTL mapeados serán amplificados en variedades y líneas de trigo candeal de distinto origen y genealogía. En base a los antecedentes expuestos, el presente proyecto tiene como objetivo general *i*) caracterizar genética y biométricamente en varios ambientes los caracteres rendimiento y sus componentes, cantidad y calidad de proteínas, fuerza de gluten, pigmentos e *ii*) identificar regiones genómicas (QTLs) asociadas a estos caracteres complejos.

## **OBJETIVOS PARTICULARES E HIPOTESIS**

Evaluaciones preliminares en Davis, (EEUU), mostraron que la línea UC1113 y el cultivar (cv.) Kofa difieren fenotípicamente para los caracteres considerados. En el presente proyecto se propone evaluar una población de 93 RILs (UC113 x Kofa) en cuatro ambientes, para los caracteres mencionados en un diseño en bloques complementemente aleatorizados con tres repeticiones.

Hipótesis 1: Dado que se evaluará una población de RILs en varias localidades será posible detectar la presencia de la interacción genotipo x ambiente (GxA) para los caracteres indicados en el objetivo general. Objetivo 1: Cuantificar y evaluar la significancia de la interacción GxA.

Hipótesis 2: Dado que se estimarán heredabilidades y correlaciones entre los ambientes, se podrá establecer en cual de ellos deberá realizarse la selección fenotípica para obtener un máximo de ganancia genética. Objetivo 2: Determinar el ambiente que permita la identificación de genotipos de máximo rendimiento en la mayoría de los ambientes.

Hipótesis 3: Debido al contraste genético entre los progenitores, será posible identificar y mapear marcadores moleculares que permitan saturar el mapa genético preexistente. Objetivo 3: Saturar un mapa genético usando los marcadores moleculares del tipo SSR, AFLP, RFLP, RAPD, etc.

Hipótesis 4: Considerando el mapa genético mencionado y el desequilibrio de ligamiento entre marcadores moleculares y QTL, será posible posicionar estos QTLs en el mapa. Objetivo 4: Mapear QTLs asociados a rendimiento y sus componentes, fuerza de gluten y contenido de proteína y pigmentos.

Hipótesis 5: El mapeo de QTLs permitirá determinar la arquitectura de los mismos. Objetivo 5: Determinar la arquitectura de los QTLs mapeados e identificar aquellos que sean comunes o ambientes-específicos, para todos los caracteres mencionados.

Hipótesis 6: Si se encuentran marcadores ligados a los caracteres mencionados, los mismos deberán presentar un alto grado de asociación con los valores fenotípicos obtenidos en otras variedades y líneas de trigo candeal. Objetivo 6: Determinar la variabilidad alélica de marcadores de regiones genómicas asociadas a los caracteres en estudio en variedades y líneas de trigo candeal de distinto origen y genealogía y su asociación con valores fenotípicos.

## RELEVANCIA DEL PROBLEMA

**El cultivo:** El trigo candeal (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) o trigo para fideos ocupa una superficie, a nivel mundial, de aproximadamente 14-16 millones de hectáreas (ha) (alrededor del 6-8% del área triguera total), oscilando la producción entre 21-31 millones de toneladas considerando el período 1990-1999 (Troccoli et al., 2000). En Argentina el área cultivada aumentó de 22 mil a 83 mil ha entre las campañas 1989/90 - 1996/97, variando el rendimiento entre 1.760 a 3.540 kg/ha en las campañas 1989/90 – 2000/01, con un promedio de 2.550 kg/ha (<http://www.fas.usda.gov>). En este mismo periodo la producción en toneladas (Tn) tuvo un mínimo de 56.000 y máximo de 286.000, mostrando una media de 129.100 Tn. En la cosecha 2005/06 la producción de trigo candeal en Argentina fue de 160.000 Tn y su rendimiento de 2.960 kg/ha, indicando que la producción y el rendimiento de trigo candeal se mantienen dentro de los márgenes nacionales históricos. FAS-USDA (<http://www.fas.usda.gov>) informó que la superficie de la campaña 2005/06 fue de 54.000 ha, un 5% menos que en 2004/05, y se esperan superficies aún menores para las próximas campañas. La proyección del área a cultivar en el mediano plazo es de 300.000 ha, ampliamente superables en los próximos 15 años (Sosa, 1999). Sin embargo, para alcanzar esta superficie deberá incrementarse la rentabilidad del mismo, con base en su “mayor rendimiento y calidad de la pasta”. De esta manera, el candeal dejará de perder superficie cultivada debido al girasol y soja, como en la última cosecha, que actualmente son los cultivos preferidos de los productores por ofrecer mayor rentabilidad. La “pasta”, es el producto final por excelencia del trigo candeal, debido a que la dureza y vitreosidad del grano permiten la obtención de sémolas de mayor granulometría. Estas características, junto a su contenido de proteína y la fuerza de gluten, lo hacen el cereal más apropiado para la fabricación de pastas secas. La marcada disminución en la producción de candeal evidenciada desde la década del '70 hasta la década de los años '90, intentó contrarrestarse con la introducción de trigos duros semienanos de alto rendimiento, pero su baja calidad de pasta hizo que Argentina perdiera mercados internacionales, en particular del italiano (Sosa, 1999). La adopción de países importadores de un enfoque más orientado al consumidor, dio lugar a una mayor diversidad en cuanto a las especificaciones de calidad. Esto ha generado condiciones ventajosas para el comercio de partidas de trigo de alta calidad, lo que se está reflejando en las cotizaciones. En los últimos años la poca oferta, el alto precio y la baja calidad del trigo candeal derivaron en el agregado de harina de trigo pan en la industria de pasta seca (SAGPyA: <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>). Sin embargo, la incorporación de esta harina genera un producto de menor calidad, menos consistente y de menor resistencia a la cocción. Hace relativamente pocos años, en el marco del vínculo entre empresas y servicios de investigación, los industriales locales definieron más claramente sus exigencias en cuanto a la calidad de la materia prima para sus elaboraciones y el Estado revisó las bases de comercialización, mejorando las relaciones entre las diferentes partes del proceso agroindustrial. Este hecho, sumado a las mejores condiciones internacionales de mercado ya mencionado, debe corresponderse con el desarrollo de variedades de alto rendimiento y alta calidad que signifiquen ventajas relativas que alienten la producción de trigo candeal, y con ello superar las exportaciones actuales del 10% del total de pastas producidas (Carbajo, 2001). Los caracteres más importantes en relación con calidad en trigo candeal son: a) fuerza y extensibilidad del gluten, determinadas por proteínas de reserva, b) color, resultante de la síntesis de pigmentos y actividad degradativa de enzimas y c) contenido de proteína en el grano.

**Rendimiento:** El rendimiento potencial del trigo se define como el rendimiento en grano producido cuando el cultivo no es afectado por deficiencia de agua, de nutrientes y limitantes como plagas, enfermedades y malezas (Fischer, 2001). Los incrementos de rendimiento en trigo candeal han resultado de la manipulación de caracteres como altura de la planta, adaptación al fotoperíodo y hábito de crecimiento. Durante el último siglo no ha cambiado la biomasa aérea, y el principal determinante del aumento en rendimiento ha sido el mayor índice de cosecha (Slafer et al., 1996). Los cambios en la partición de fotoasimilados ha alcanzado el máximo y no se podrá, por esta vía, conseguir mayores ganancias genéticas. Grafius (1964) define rendimiento como el volumen de un paralelepípedo en el cual el número de espigas por unidad de superficie, el número de granos por espiga y el peso de los granos son los principales factores. La importancia de estos componentes del rendimiento también ha sido señalada por Jha Ram (1968). El rendimiento en trigo candeal es altamente influenciado por el ambiente así como la relación entre sus componentes (García del Moral et al., 2003). El estrés hídrico puede afectar a todos los componentes de rendimiento, en articular el número de espigas fértiles por unidad de área y el número de granos por espigas (Giunta et al., 1993; Simane et al., 1993; Abayomiy

Wright, 1999). El peso del grano es influenciado negativamente por altas temperaturas y estrés hídrico durante el llenado del mismo (Chmielewski Kohn, 2000). En un estudio realizado en la región Mediterránea utilizando la técnica de “causa-efecto”, García del Moral et al. (2003), informaron que el rendimiento fue determinado, predominantemente, por el peso de granos en regiones frías y por el número de espigas en regiones templadas, mientras que el número de espigas por unidad de área fue más importante en regiones secas. Moragues et al. (2005) informaron que la distribución geográfica entre el sur y el norte de España de 52 cultivares de trigo candeal, estuvo asociada a la variación de producción y distribución de biomasa. Posteriormente, Moragues et al. (2006) informaron que la distribución de variedades también estaba asociada a la variación fenológica del cultivo, rendimiento y a los componentes de rendimientos. Los trigos de la región norte desarrollaban un mayor número de macollos por unidad de áreas, pero un porcentaje menor de espigas fértiles y menos granos por espigas que los cultivares del sur. La producción de granos en los cultivares del norte estuvo principalmente relacionada con el peso de los 1000 granos, mientras que el número de espigas por metro cuadrado fue el principal componente de producción en los cultivares de la región sur. De lo expuesto se deduce la importancia de identificar los componentes que determinan en mayor medida el rendimiento, pues de ello dependerá, en cierta medida, la estrategia de selección más eficiente. La interacción genotipo x ambiente (GxA) es de gran importancia para el mejoramiento genético del candeal, pues en el caso de su existencia, existe la posibilidad de que el mejor genotipo en un ambiente no lo sea en otro. Este hecho afecta la ganancia genética y dificulta la identificación de cultivares con amplia adaptabilidad. Debido a la importancia de esta interacción, debe evaluarse su magnitud y significancia, cuantificar sus efectos y adoptar métodos de mejoramiento que posibiliten su minimización o aprovechamiento.

**Características del gluten:** El concepto de calidad en trigos candeales está determinado por varios factores. Los criterios evolucionan continuamente en respuesta a adelantos tecnológicos, tales como molienda y procesamientos secundarios. Las características comerciales y tecnológicas más importantes tienen que ver con la calidad del grano, de la sémola – cantidad y calidad de gluten – y de la pasta - el color, resistencia a la cocción, firmeza y pegajosidad - (Blanco et al., 1998). El valor del trigo para un propósito particular depende prioritariamente de su contenido de proteínas y las propiedades reológicas del gluten obtenido. El gluten es la masa viscoelástica, sin almidón, formada durante el proceso de amasado, cuya calidad depende de la cantidad y calidad de las proteínas (principalmente gliadinas y gluteninas). Un buen gluten debe ser firme, elástico y moderadamente extensible, características determinadas por el contenido de gluteninas (Seghezzi y Molfese, 2001). El porcentaje de gluten de una sémola está relacionado con el contenido de proteínas del grano, que oscila entre el 9 y 18%. Los candeales de buena calidad poseen sémola con alta proteína y baja cantidad de partículas de almidón que, al hidratarse de forma pareja durante el mezclado, produce fideos fuertes y elásticos. El contenido total de proteína en el grano posee baja heredabilidad, dificultando su manipulación en programas de mejoramiento, contrariamente a lo que ocurre con la calidad de las mismas. La calidad del gluten depende de los alelos de las proteínas reserva combinadas en un cultivar (Pflüger, 2003). Las sémolas que producen buena pasta - resistentes a la sobrecocción – poseen alto contenido de proteína, fuerza y elasticidad de gluten, estas dos últimas determinadas por las características intrínsecas de esas proteínas (Seghezzi y Molfese, 2001). Esto se debe a que una mayor proporción de proteínas forma, durante la fabricación de la pasta, cadenas de polipéptidos más numerosas que fomentan la formación de una red o trama proteica resistente, capaz de atrapar y retener los gránulos de almidón hidratados y gelatinizados durante la cocción del fideo. De este modo se evita la liberación de carbohidratos al agua de cocción que produce la indeseable pegajosidad de los mismos. Para la industria fideera la calidad está determinada por el comportamiento de la pasta durante su procesamiento y la calidad del producto final - aspecto y textura de la superficie del fideo, firmeza, elasticidad, pegajosidad, tolerancia a la sobrecocción, sabor -. Estas evaluaciones utilizan grandes cantidades de sémola y harina y consumen gran cantidad de tiempo. Las pruebas reológicas evalúan indirectamente la calidad del gluten, ya que miden el comportamiento de una mezcla de sémola y agua durante el amasado. Estas técnicas requieren menor cantidad de grano y poseen buena correlación con la firmeza y elasticidad de la pasta cocida (Peña, 2000). Sin embargo, las mismas no pueden ser aplicadas a la gran cantidad de genotipos existentes en generaciones segregantes, debido al insuficiente volumen de grano, al alto costo y al consumo de tiempo que esas técnicas demandan. Por este motivo, muchas pruebas de calidad se han utilizado en mejoramiento para predecir la fuerza de gluten, tal como sería medida a nivel industrial. Para obtener ganancia genética estos predictores,

utilizados en generaciones tempranas, deben estar fuertemente correlacionados con los análisis de calidad a mayor escala y ser efectivos en la selección de genotipos superiores. La concentración de proteína en el grano es un carácter relativamente fácil de cuantificar con equipos NIR (*near infrared reflectance*), pero tiene la desventaja de poseer una baja heredabilidad. Otros parámetros para la evaluación de la calidad del gluten a pequeña escala son, el contenido e índice de gluten, el test de sedimentación y métodos de evaluación manual del gluten (Peña, 2000). Dentro de los test de predicción de fuerza de gluten el más ventajoso es el de sedimentación en SDS, por requerir menor cantidad de muestra, implementación sencilla y poseer alta correlación con las pruebas reológicas. La heredabilidad de los predictores de la fuerza de gluten como el mixograma y el volumen de sedimentación es de intermedia a alta (Clarke et al., 2000). Nuevos tests de predicción de fuerza de gluten han sido propuestos recientemente, los cuales se basan en el índice de inflado del gluten (Wang y Kovacs, 2000) y en el contenido de gluteninas insolubles (Sapirstein y Hussain, 2000). La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) ha sido utilizada en la evaluación del contenido de gluteninas (Huebner y Bietz, 1985) con la ventaja de permitir la cuantificación de las fracciones proteicas que determinan la fuerza de gluten (Marchylo *et al.*, 1989). Si bien estas técnicas simplifican el fenotipado e identificación de genotipos superiores, la selección con base en marcadores moleculares es más eficiente y rápida pudiéndose analizar un número muy superior de individuos. Así, combinando ciclos de selección de genotipos con base en marcadores moleculares y evaluación fenotípica usando las técnicas reológicas mencionadas, los programas de mejoramiento pueden acelerar sustancialmente la obtención de variedades comerciales.

**Color de la pasta:** El color de la pasta es el resultado de la acumulación de pigmentos carotenoides durante la formación del grano, del contenido residual luego del almacenamiento, la molienda y de la degradación oxidativa por acción de las lipoxigenasas (LOX) durante el procesamiento de la pasta. Los carotenoides se clasifican en carotenos, hidrocarburos insaturados y xantófilas. Son compuestos que reducen el daño oxidativo a las membranas celulares, secuestrando radicales peróxidos tales como aquellos involucrados en ciertas enfermedades humanas, en los procesos de envejecimiento y en la degradación de los alimentos, y contribuyen a un incremento en el valor nutritivo de los productos de la pasta. Los carotenoides se localizan fundamentalmente en las capas externas del grano. Un elevado contenido de los mismos en la sémola no garantiza, sin embargo, un buen color de la pasta debido a que se ve afectado por el nivel de actividad de las lipoxigenasas. Existe un fuerte componente genotípico que afecta todos los parámetros directamente involucrados en la expresión de color como contenido de  $\beta$ -caroteno, índice de amarillez y actividad de LOX (Borrelli et al., 1999). En candeal, los valores de heredabilidad del pigmento amarillo son altos y oscilan entre 0,90 y 0,97 (Elouafi et al., 2001). Previamente, nuestro grupo de trabajo identificó y mapeó los genes de lipoxigenasas en la población de RILs que se propone utilizar en este proyecto (Carrera et al., 2007). Se concluyó que el color de la pasta puede incrementarse hasta un 10% mediante la selección de una combinación de alelos favorables que determinan una baja actividad de lipoxigenasa (LOX), debida a una delección en el gen *LpxB1.1*, y un alto índice de color en la sémola, asociado con el gen *LpxA3*. En cuanto a pigmento carotenoide y color  $b^*$  de harina, hasta el momento fueron identificados diferentes QTL en los cromosomas 2A, 2B, 3A, 5A, 5B, 6A, 7A, 7B, aunque los genes responsables de las diferencias de acumulación de carotenoides en los granos de trigo no han sido aún identificados (Parker et al, 1998; Mares y Campbell, 2001; Hessler et al, 2002; Cenci et al 2004; Somma et al, 2004).

La identificación de marcadores moleculares adicionales ligados a QTLs relacionados con cantidad de pigmentos carotenoides, permitirían una más eficiente manipulación de este carácter en los programas de mejoramiento, facilitando la obtención de pastas amarillo-brillante, con alto contenido de pigmento y baja actividad de lipoxigenasas.

## RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES DEL GRUPO AL ESTUDIO DEL PROBLEMA EN CUESTION

Desde hace 6 años el grupo se encuentra trabajando en el desarrollo de herramientas moleculares para asistir al mejoramiento genético de trigo. Esta línea de trabajo se inició a través de estadías de la Dra. Viviana Echenique y el Dr. Marcelo Helguera en el laboratorio del Dr. Jorge Dubcovsky en la Universidad de California, en Davis a través de la Comisión Fulbright. De esta manera se logró constituir una colaboración entre los tres grupos que persiste hasta la actualidad. A través de la misma han surgido numerosas publicaciones y se han generado marcadores moleculares para asistir a los programas de mejoramiento de la especie. Se trabajó en temas como vernalización (Yan et al., 2003; Yan et al., 2004; Fu et al. 2005), resistencia a enfermedades (Helguera et al. 2000, 2003, 2005) y calidad (Carrera et al. 2007). El grupo de Argentina incorporó temas de genómica en sus proyectos de investigación mediante su participación en UC Davis en el proyecto “*The structure and function of the expressed portion of the wheat genomes*” llevado a cabo por un consorcio internacional de investigadores (ITEC: International Triticeae EST Consortium), en el que participaban 13 laboratorios de EEUU interesados en estudiar el genoma de las *Triticeae* (Echenique et al., 2001, 2002; Zhang et al., 2004). Específicamente en lo referido a trigo candeal se logró un avance hacia el clonado posicional del gen involucrado en la regulación del contenido proteico de grano (Olmos et al., 2003). Esto constituyó el tema central de la tesis doctoral de la Ing. Sofia Olmos (Olmos, 2005) dirigida por la Dra. Viviana Echenique y el Dr. Jorge Dubcovsky a través de una beca mixta del CONICET. En este trabajo se saturó de marcadores la región genómica portadora de un QTL asociado a alto contenido de proteína en grano, denominado *QGpc.ndsu.6Bb*, logrando ubicar el locus *Gpc-6B1* en un intervalo de 0,3-cM flanqueado por los marcadores de PCR *Xucw79* y *Xucw71* (Distelfeld et al., 2004). En ese intervalo se identificaron cinco genes candidatos no relacionados con el metabolismo del nitrógeno. En trabajos posteriores el grupo del Dr. Dubcovsky logró la identificación y el clonado posicional de dicho gen (Uauy et al., 2006). A comienzos de 2003 el grupo de Bahía Blanca comenzó un proyecto denominado Mapeo de caracteres involucrados en calidad de trigo candeal, financiado por un PIP CONICET (02432/01) y a través del PICTO INTA 12948/2002. Se construyó un mapa de trigo candeal a partir de una población segregante para caracteres de calidad y en este momento se encuentran en ejecución tres tesis de doctorado (Ing. Verónica Conti, becaria de INTA, Ing. Aurora Picca e Ing. Pablo Roncallo, becario del CONICET). Este último co-dirigido por el Dr. Helguera). A partir de este trabajo se comenzó a trabajar en la identificación de regiones asociadas a fuerza de gluten (Conti et al., 2005) y color de la pasta (Cervigni et al., 2005). En trabajos posteriores se logró identificar y mapear los genes de lipoxigenasas en trigo candeal y se evaluó su efecto sobre color de la sémola y pasta (Carrera et al., 2007). Para este trabajo se diseñaron primers a partir de los genes ortólogos de cebada *LoxA*, *LoxB* y *LoxC*. Al procurar amplificar por PCR el gen ortólogo a *LoxA* a partir de UC1113 y Kofa se obtuvieron dos bandas en UC1113 y sólo una en Kofa. Una segunda reacción de PCR basada en primers específicos para la banda diferencial de UC1113 mostraron ausencia de producto en Kofa, sugiriendo una delección de ese locus en la variedad Kofa. El análisis utilizando líneas nuli/tetrasómicas derivadas de Chinese Spring permitió establecer que las dos bandas presentes en UC1113 mapean en el cromosoma 4B. La secuenciación de la banda diferencial amplificada en UC1113 mostró mayor homología con *LoxA* que con *LoxB* o *LoxC*, confirmándose que pertenece al locus *Lpx-B1*. La segunda banda amplificada en ambas variedades mostró también mayor homología con *LoxA*. Estos hallazgos nos llevaron a postular la existencia de una duplicación del locus *Lpx-B1*, en UC1113, designándose a las copias *Lpx-B1.1* y *Lpx-B1.2*. En este contexto, Kofa presentaría una delección en el locus *Lpx-B1.1*. Cuando se utilizaron los primers diseñados en base al gen *LoxB* de cebada (*Lpx-2* en trigo), en Kofa y UC1113 se amplificó una banda única de 900 pb. El clonado y secuenciación del producto de PCR mostró una mezcla de dos secuencias (probablemente el mismo locus de los genomas A y B), que diferían en 9 pb. La comparación de la secuencia más corta de Kofa y UC1113 determinó la existencia de tres SNPs, uno de los cuales generó un sitio de corte para la enzima de restricción *HaeII* en UC1113 que fue utilizado para desarrollar un marcador CAPS (Cleavage Amplification Polymorphic Sequence) que se mapeo en el cromosoma 4A. El fragmento más largo no mostró polimorfismos entre ambas variedades por lo que no pudo ser mapeado, aunque por la presencia de un sitio de restricción *AseI* pudo ser asignado al cromosoma 4B utilizando las líneas nuli/tetrasómicas.

Los primers para *LoxC* de cebada amplificaron en ambas variedades parentales una banda de 700 pares de bases en la que se identificaron dos secuencias, sugiriendo que provenían de dos genomas diferentes. La presencia del sitio de restricción *HaeIII* en una de ellas, permitió asignarlas a los cromosomas 5A y 5B, aunque la ausencia de polimorfismos impidió su mapeo.

Paralelamente se abordó el estudio de la relación entre estos genes y actividad lipoxigenasa, color de sémola, pasta cruda y pasta cocida. En todas las determinaciones de actividad LOX UC1113 presentó mayor actividad que Kofa. Se demostró que la actividad LOX en sémola es significativamente afectada por el locus *Lpx-B1.1* y no por el *Lpx-A3*. En la población segregante, el locus *Lpx-B1.1* explicó más del 50% de la variación en actividad de la enzima, demostrándose que las RILs con la delección de Kofa presentaron una actividad 4.5 veces menor que aquellas que poseen en alelo de UC1113.

Utilizando el valor b (CIE-b value) de color en sémola, pasta seca y pasta cocida se encontró una asociación significativa entre el locus *Lpx-A3* y color de sémola, en aquellas RILs que portaban el alelo de UC1113. En pasta seca se observó un efecto combinado de ambos *loci*, que fue explicado por el efecto aditivo de actividad LOX en sémola y menor contenido inicial de carotenoides en el grano. La combinación de los alelos *Lpx-B1.1* de Kofa y *Lpx-A3* de UC1113 resultó en un incremento del 10% en el color respecto de la combinación opuesta de alelos. Resultados análogos se obtuvieron cuando el análisis se realizó en pasta cocida. Se evaluó la distribución de esta delección en un grupo de variedades comerciales de distinta procedencia, y se demostró que existen variedades que portan el alelo de UC1113 (47%) y otras que no (47%), estando la presencia de este alelo correlacionada con los niveles de actividad de las lipoxigenasas (Carrera et al., 2007).

Para evaluar la fuerza del gluten se probaron distintas técnicas en genotipos cultivados en California, USA, durante las campañas 2003-2004. En ambos años, el contenido de proteína y gluten mostraron correlación negativa, con el índice de gluten, y positiva con firmeza de la pasta cocinada, ambas significativas ( $p < 0.01$ ). Estos resultados sugieren una mayor influencia ambiental sobre el índice de gluten y la firmeza de la pasta cocinada, de acuerdo con lo informado por Peña (2000), y un efecto menor del ambiente sobre el volumen de sedimentación en SDS y mixogramas, como fuera observado por Ames et al. (1999). En función de estos resultados se concluyó que el volumen de sedimentación en SDS y los mixogramas son los tests que poseen mayor precisión en la caracterización fenotípica, invaluable para fenotipar una población de mapeo (Conti et al., 2005).

En cuanto al HPLC, la evaluación de la composición proteica de Kofa y UC1113 reveló una relación glu/gli consistentemente más elevada y una mayor proporción de la fracción insoluble en relación al total de proteínas poliméricas en el cv. Kofa.

Ensayos de rendimiento con la colección de RILs en California, USA, mostraron que existe segregación para este carácter, el cual no fue evaluado en las condiciones agro-ecológicas de la Argentina.

## **CONSTRUCCION DE LA HIPOTESIS Y JUSTIFICACION GENERAL DE LA METODOLOGIA DE TRABAJO**

Dado que se dispone de una población de RILs segregante para todos los caracteres considerados en este proyecto (rendimiento, fuerza de gluten y color de pasta), la cual será evaluada en varios ambientes será posible su caracterización genética-biométrica y el mapeo de QTL asociados a los mismos. Los marcadores moleculares identificados, ligados a estas regiones, podrán ser usados en la selección indirecta y en la piramidación de los alelos favorables, para cada carácter, en variedades elite de los programas locales de mejoramiento de trigo candeal.

Evaluar la interacción genotipo x ambiente (GxA) es crucial en mejoramiento vegetal dado que la parte compleja de esta interacción determina la falta de correlación entre genotipos. Este hecho afecta la ganancia genética y dificulta la selección de cultivares con amplia adaptabilidad. Debido a esto es menester evaluar su magnitud y significancia, cuantificar sus efectos y adoptar métodos de mejoramiento que posibiliten su minimización o aprovechamiento. En la actualidad, el mejoramiento vegetal no se limita expresamente al uso de técnicas estadísticas para evaluar y seleccionar genotipos superiores. El fenotipado de genotipos es indispensable, pero su uso como método de selección demanda mucho tiempo, infraestructura, recursos económicos y humanos, generalmente escasos en los programas de mejoramiento. Además, la mayoría de los caracteres son difíciles de medir o poseen baja heredabilidad, tornando la selección fenotípica poco eficiente. Si las características complejas fuesen descompuestas en sus componentes genéticos individuales, ellas podrían ser tratadas como un carácter cualitativo. Los marcadores moleculares brindan la posibilidad de identificar QTLs, estimar sus efectos genéticos, mapear su posición en los mapas genéticos de alta densidad, y especificidad ambiental. La identificación de QTLs a través de marcadores moleculares es conceptualmente muy simple. Del cruzamiento entre dos progenitores que contrasten para las características de interés, se obtienen poblaciones segregantes (comúnmente  $F_2$ , retrocruzas, RIL, entre otras). Estas poblaciones son evaluadas fenotípicamente para las características de interés y para el fenotipo del marcador molecular, los cuales se posicionan a intervalos regulares (5 – 20 cM), a lo largo del genoma. La búsqueda de QTLs se realiza a través de la detección de asociaciones significativas entre marcadores segregantes y valores fenotípicos de las características de interés. La asociación entre marcadores y QTLs puede ser detectada a través de métodos estadísticos simples como chi-cuadrado, análisis de la varianza, regresión lineal, entre otros. Cuando se dispone de un mapa genético de marcadores, el mapeo de QTLs, así como la estimación de sus efectos, puede realizarse a través del método de mapeo por intervalo (Lander y Botstein, 1989) o por métodos mucho más poderosos, como el mapeo por intervalos compuestos (CIM) (Zeng 1993; Zeng 1994; Jansen 1993; Jansen 1994), así denominado por combinar el mapeo por intervalo y la regresión múltiple; mapeo por intervalo múltiples (MIM) (Kao et al, 1999) y mapeo de múltiples características (Jiang y Zeng 1997; Knott y Haley, 2000).

## TIPO DE DISEÑO DE INVESTIGACION Y METODOS

### *Material vegetal*

Se utilizará una población de mapeo obtenida por el método de descendencia de una sola semilla (*single seed descent* - SSD) propuesto por Brim (1966) de 93 líneas endogámicas recombinantes F<sub>9</sub> (RILs) derivadas del cruzamiento entre los trigos candeales Kofa y UC1113. Kofa es una variedad candeal, de bajo rendimiento y alta calidad de pasta, desarrollada por Western Plant Breeders (hoy WestBred) a partir de una población designada como "DICOCCUM ALPHA POP-85 S-1". UC1113, es una línea del programa de mejoramiento de UC Davis seleccionada a partir de la cruce del programa de mejoramiento de CIMMYT CD52600 (KIFS//RSS/BD1419/3/MEXIS-CP/4/WAHAS/5/YAV79). Esta línea, presenta excelente rendimiento en diferentes regiones y en diferentes épocas de siembra y baja calidad de pasta.

### *Siembra*

La siembra de las 93 RIL, sus respectivos progenitores y ocho testigos se realizará en cuatro localidades: Cabildo (Asociación de Cooperativas Argentinas – ACA), Balcarce (EE INTA), Tres Arroyos (Chacra Experimental Barrow- INTA) y Marcos Juárez (EE INTA); y las variedades comerciales (\*) en Tres Arroyos (Chacra Experimental Barrow- INTA), siguiendo el modelo en bloques completos al azar con tres repeticiones. Cada repetición – parcela - estará constituida por tres surcos de 5 metros cada uno espaciados 20 cm. La distancia entre parcela será de 40 cm en todos los ambientes. La densidad de siembra será de 150 plantas por metro cuadrado. La producción, peso de los 1000 granos, espigas por m<sup>2</sup> y peso hectolítrico serán obtenidos por parcela. Los demás componentes de rendimiento serán obtenidos de la evaluación de 10 plantas por RIL por repetición: Altura de Planta a Cosecha (cm), Largo del Ultimo Entrenudo (cm), Peso de Planta (g), Número de Espigas por Planta, Número Espiguillas por Espiga, Número Espiguillas Fértiles por Espiga, Número de Granos por Espiguillas, Número de Granos por Espiga, Peso de Granos por Espiga (g), Peso de Granos por Planta (g).

\* Buck Platino(10173/04), Buck Topacio(M382.05), Buck Esmeralda(M380.05), Buck Cristal(9603/05), Buck Ambar(M383.05), BonINTA Facon(M381.05), BonINTA Carilo(10172/04), BonINTA Cumenay(05/06), Ciccio(M541.04), Adamello(M439.04), Colosseo(M542.04), Duilio(M540.04), Simeto(M543.04), 65-IAT2(M532.04), 66-IAT2(M376.05), 69-IAT2(M377.05), 71-IAT2(M374.05), 73-IAT2(M375.05), 78-IAT2(M537.04), 80-IAT2(M538.04), VF 0154(8846/05), VF 042(10147/04), VF 0113(8843/05), VF 0163(8841/05), VF 003(10150/04), VF 0121(9676/05), VF 0167(8852/05), VF 0136(10154/05), VF 0137(10151/05), B#24, B#25, B#27, ACA 001(M386.05), CBW 0105(19413/05), CBW 0112(19415/05), CBW 0120(19416/05), CBW 0141(19417/05), CBW 0153(19418/05), CBW 0200(19421/05), CBW 0210(19422/05), CBW 0225(19426/05), CBW 0230(19427/05), Cannizzo y Concadoro.

### *Análisis de la varianza*

Para el análisis de la varianza, simple y conjunta, todas las fuentes de variación serán consideradas aleatorias. Para un ambiente se adoptará el modelo estadístico:

$$Y_{ik} = \mu + G_i + \varepsilon_{ik},$$

y para todos los ambientes:

$$Y_{ijk} = \mu + A_j + G_i + GA_{ij} + B/A_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

$\mu$ : media general

$A_j$ : efecto del j-ésimo ambiente ( $j = 1, 2, \dots, a$ );

$G_i$ : efecto del i-ésimo genotipo ( $i = 1, 2, 3, \dots, g$ );

$GA_{ij}$ : efecto de la interacción del i-ésimo genotipo con el j-ésimo ambiente;

$B/A_{jk}$ : efecto del k-ésimo bloque dentro del j-ésimo ambiente ( $k = 1, 2, 3, \dots, r$ );

$\varepsilon_{ijk}$ : error aleatorio.

En las tablas 1 y 2 se muestran las fuentes de variación (FV) y sus respectivas esperanzas de los cuadrados medios, E(CM). Además de la estimación de los componentes de la varianza o

componentes cuadráticos, será testada su significancia, usándose para esto la razón de los CM, según la FV considerada. En la tabla 3 se indican las hipótesis que serán consideradas y el respectivo test F apropiado con sus respectivos grados de libertad.

El componente de la variación atribuido a la interacción genotipo x ambiente, representado por  $\sigma_{ga}^2$  será cuantificado por medio de un sistema en el cual se igualan los cuadrados medios, obtenidos en el análisis de la varianza conjunta, a los respectivos estimadores de los componentes de sus esperanzas matemáticas (Cruz, 1997).

Tabla 1. Esquema del análisis de la varianza para un ambiente, considerando el modelo aleatorio, en bloques completos al azar.

FV	GL	E(CM)	SCM	CM	F
Bloques	(r-1)	$\sigma^2 + g\sigma_b^2$	SCB		
Genotipos	(g-1)	$\sigma^2 + r\sigma_g^2$	SCG	CMG	CMG/CMR
Residuo	g(r-1)	$\sigma^2$	SCR	CMR	
Total	gr-1		SCT	CMT	

Tabla 2. Esperanza de los cuadrados medios para el análisis conjunto de la varianza considerando modelo aleatorio, en bloques completos al azar.

FV	GL	E(CM)	SCM	CM	F
Bloques/Ambientes	a(r-1)	$\sigma^2 + g\sigma_b^2$	SCB	CMB	
Ambientes	(a-1)	$\sigma^2 + r\sigma_{ga}^2 + g\sigma_b^2 + gr\sigma_a^2$	SCA	CMA	CMB/CMA
Genotipos	(g-1)	$\sigma^2 + r\sigma_{ga}^2 + ar\sigma_g^2$	SCG	CMG	CMG/CMGxA
GxA	(a-1)(g-1)	$\sigma^2 + r\sigma_{ga}^2$	SCGxA	CMGxA	CMGxA/CMR
Residuo	a(r-1)(g-1)	$\sigma^2$	SCR	CMR	
Total	agr-1		SCT	CMT	

Tabla 3. Hipótesis a ser evaluadas por el test F y sus respectivos GL

FV	F	Grados de Libertad
$H_{01}: \sigma_a^2 = 0$	$F_{01} = CMA/CMB$	(a-1), a(r-1)
$H_{02}: G_i = 0$ para todo i	$F_{02} = CMG/CMGxA$	(g-1), (a-1)(g-1)
$H_{03}: \sigma_{ga}^2 = 0$	$F_{03} = CMGxA/CMR$	(a-1)(g-1), a(r-1)(g-1)

#### Selección en un ambiente (j) y respuesta en otro (j')

Como los genotipos serán evaluados en un conjunto de ambientes, por lo tanto, puede evaluarse la respuesta indirecta a selección ( $GS_{j(j')}$ ) en un ambiente cuando esta es practicada en otro ambiente cualquiera del conjunto. En este caso la ganancia por selección está dada por:

$$GS_{j(j')} = DS_{j'} r_g h_{j'} \frac{\hat{\sigma}_{gj}}{\hat{\sigma}_{j'j}}$$

donde:

$j'$ : ambiente en que se practica la selección;

$j$ : ambiente en que se evalúa la respuesta indirecta;

$DS_{j'}$ : diferencial de selección practicado en el ambiente  $j'$ .

$r_g$ : correlación genética entre las medias de los genotipos en los ambientes  $j$  y  $j'$ , estimada por:

$$r_g = \sqrt{\frac{DS_{j(j')} DS_{j'(j)}}{DS_j DS_{j'}}}$$

, que relaciona sólo la fracción de genotipo de interés, o sea, aquellos de mejor

desempeño.

$h_{j'}$ : raíz cuadrada de la heredabilidad en el ambiente  $j'$ , expresada por:

$$h_{j'} = \frac{\hat{\sigma}_{g_{j'}}}{\hat{\sigma}_{f_{j'}}$$

#### *Determinación de la actividad de Lipoxigenasas*

Se realizará de acuerdo a la metodología informada por Surrey (1964) con modificaciones propuestas por McDonald (1979), optimizada para nuestros materiales y condiciones experimentales.

#### *Obtención de la sémola*

Los granos serán lavados, escarificados y acondicionados a 17,5% de humedad y molidos hasta sémola usando una moledora experimental Bühler ajustada con dos purificadores a escala de laboratorio Miag (Bühler-Miag, Minneapolis, MN, USA).

#### *Extracción de la enzima*

Dos gramos de sémola serán colocados en un vaso de precipitado con 10 ml de buffer fosfato de sodio 0,1M, pH 7 en frío (3 °C) y mantenidos en estas condiciones utilizando un baño de hielo durante 1 hora, con agitación durante los 2 primeros minutos y luego repitiendo ciclos de agitación de 1 minuto cada 15 minutos con un agitador magnético. El extracto será centrifugado a 14000 rpm a 4 °C por 10 min en una centrífuga Sorvall y el sobrenadante centrifugado a 14000 rpm a 10 °C por 10 min utilizados el mismo día.

#### *Preparación del sustrato*

El sustrato para la reacción será ácido linoleico SIGMA® 99% en buffer borato de sodio 0,1M pH 9,0. Para su preparación 0,5 ml de Tween 20 serán disueltos en 10 ml de buffer borato 0,1M pH 9,0. A continuación se adicionará 0,5 ml de ác. linoleico gota a gota agitando suavemente de manera de dispersar el ácido en una fina emulsión. A continuación se agregará 1,3 ml de NaOH 1N agitando hasta obtener una solución transparente, a la cual se le agregará 90 ml de buffer borato, el volumen final será ajustado a 200 ml con agua destilada, pH de 6,6 con CIH 0,1 N. Alícuotas de esta solución serán almacenadas a -20 °C en atmósfera de N<sub>2</sub> hasta el momento de su utilización.

#### *Ensayo de actividad enzimática*

La reacción se llevará a cabo a 25 °C con burbujeo continuo de oxígeno en la mezcla de reacción. Un ml de extracto enzimático será incubado con 9 ml de sustrato. La reacción transcurrirá durante 8 min (Carrera et al., 2007) y detenida con el agregado de 2 ml de etanol absoluto. El producto de la reacción será cuantificado mediante espectrofotómetro a 234 nm y expresado como la producción de nanomoles de hidroperóxidos (ROOH) por gramo de sémola por min.

#### *Color de sémola*

El color de las sémola será cuantificado (valor b CIE - amarillez) utilizando un colorímetro (Minolta chromameter model CR310, Minolta Corp., Ramsey, NJ). El valor b CIE de cada RIL o variedad se obtendrá de tres mediciones por bloque. Para minimizar el efecto del tamaño de las partículas de sémola, en los valores b CIE, todas las muestras de granos serán molidas en la misma moledora y por el mismo operario.

#### *Cuantificación de pigmentos carotenoides*

La cantidad de pigmentos carotenoides serán medidos en todos los ambientes. El contenido de pigmentos será determinado en las 93 RIL, sus progenitores y testigos en 8 g de sémola, extraída durante toda la noche en 40 ml de agua saturada con alcohol butílico. Luego de filtrar el extracto a través de una membrana Whatman N° 1, la absorbancia será medida en un espectrofotómetro a 440 nm. Los valores se expresarán de acuerdo a la escala de concentración de β-carotenos establecidos por AACC (1976).

### **Parámetros asociados a fuerza de gluten**

#### *Cuantificación de proteínas totales*

El porcentaje total de proteínas se cuantificará en muestras de 200 g de granos completos, mediante el método NIR usando un aparato Infralyzer 400 (Technicon, USA), en el Laboratorio de Calidad Industrial de Granos de la Chacra Experimental Integrada Barrow (Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires- INTA). Se realizarán 5 mediciones por repetición y le media expresada sobre la base de 13,5 % de humedad.

#### *Prueba del volumen de sedimentación en SDS*

La prueba del volumen de sedimentación en SDS se realizará según Dicky Quick, (1983). Aproximadamente 20 gr de semillas serán molidas con un molino tipo Udy y tamizado con malla de 200  $\mu\text{m}$  para obtener harina integral. Un gramo de harina será colocada en un tubo de ensayo agregándosele 4 ml de agua destilada, agitándose por 20 seg y dejándose reposar durante 5min. Este paso se repetirá dos veces. Posteriormente, se adicionará 12 mililitros de una mezcla 1:48 (v/v) de ácido láctico:agua destilada (1:8 v/v) y SDS 2%, mezclándose por 40 seg y luego de reposar 15 min se medirá la altura del sedimento, la cual será expresada en mililitros. Una variedad de trigo candeal se utilizará como control en todas las mediciones.

#### *Cuantificación de fracciones proteicas en HPLC*

Albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas serán cuantificadas en las tres repeticiones experimentales. Las proteínas mencionadas eran extraídas de 15 – 20 semillas por repetición (de esta manera se evita la variabilidad debida a diferencias entre granos por ubicación en la espiga) según (Ciaffi et al., 1996).

#### *Marcadores moleculares y mapeo de QTLs*

El DNA será extraído de los progenitores Kofa, UC1113 y de las 93 RILs según (Dvorak et al., 1988). Los marcadores RAPDs, AFLPs y SSRs polimorficos entre los progenitores serán amplificados en la población según Williams et al. (1990), Vos et al. (1995) y Carrera et al. (2007), respectivamente. Para la identificación de *loci* de lipoxigenasas se utilizarán primers diseñados en Carrera et al. (2007). Otros marcadores ligados a genes de adaptación (por ejemplo vernalización, enanismo, fotoperíodo, etc.) también serán incluidos en el análisis. Las reacciones de amplificación se llevarán a cabo en un termociclador MJ Research modelo PTC 100. Cada reacción consistirá de 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 nM de cada primer, 1 U de Taq polimerasa y 75-150 ng ADN genómico como molde en un volumen final de reacción de 25 $\mu\text{l}$ . Las condiciones de amplificación variarán según cada combinación de primers que se desee evaluar. Los productos de amplificación serán resueltos en geles de agarosa 1,2 % teñidos con bromuro de etidio o, en geles verticales de poliacrilamida 7 – 10 % en condiciones desnaturalizantes, revelados con nitrato de plata.

La segregación esperada (1:1) de los marcadores amplificados en la población será verificada por medio de la técnica FDR considerando una significancia global de 5%. La distancia entre pares de marcadores será estimada usando la función de mapeo de Kosambi (1944) y los grupos de ligamiento obtenidos por mínimos cuadrados, usando el programa GQMol (Shuster y Cruz, 2004) con frecuencia de recombinación máxima 30 % y valor de LOD mínimo igual a 3.

Para la identificación de QTL se considerará como vector fenotípico, la media fenotípica de las tres repeticiones experimentales. Para mapeo de QTL se usará el método de mapeo por intervalo compuesto (Zeng 1993, 1994) con el programa QTL-Cartographer Versión 2.0 (Basten 1999) y GQMol (Shuster y Cruz, 2004). El valor crítico de corte, por encima del cual un QTL se declara real, será determinado por el análisis de 1000 permutaciones ( $\alpha = 0,05$ ) (Churchil y Doerge, 1994).

## **CRONOGRAMA DE TRABAJO**

Actividades	Año 1	Año 2	Año 3
Siembra. Instalación de los ensayos en cada localidad	X	X	
Observación, mantenimiento y evaluación de los materiales a campo.	X	X	
Cosecha de ensayos.	X	X	
Tareas de laboratorios. Registro de marcadores moleculares en la población RIL. (Saturación del mapa genético).	X	X	X
Tareas de laboratorios. Evaluación de rendimiento, sus componentes y parámetros de calidad.		X	X
Análisis de datos. Escritura de tesis y artículos científicos.		X	X

## Bibliografía

- AACC (American Association for Cereal Chemistry). 1976. Cereal laboratory approved methods, 7<sup>th</sup> edition. St. Paul, Minnesota.
- Abayomi, Y., Wright, D., 1999. Effects of water stress on growth and yield of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Trop. Agric.* 76, 120–125.
- Ames, N.P., Clarke, J.M., Marchylo, B.A., Dexter, J.E., Woods, S.M. 1999. Effect of environment and genotype on durum wheat gluten strength and pasta viscoelasticity. *Cereal Chemistry* 76: 582-586.
- Basten, C.J., Weir, B.S., Zeng, Z.B. 1999. QTL cartographer, Version 1.13. Department of Statistics, North Carolina State University: Raleigh, NC.
- Basten, C.J., Weir, B.S., Zeng, Z.B. QTL cartographer, Version 1.13. Department of Statistics, North Carolina State University: Raleigh, NC. 1999.
- Blanco, A., Bellomo, M.P., Cenci, A., De Giovanni, C., D'Ovidio R., Iacono, E., Laddomada, B., Pagnotta, M.A., Porceddu, E., Sciancalepore, A., Simeone, R., Tanzarella, O.A., 1998. Extension of the messapia x dicoccoides A genetic linkage durum map. *Theor Appl Genet.* 97:721-728
- Borrelli, G.M., Troccoli, A., Di Fonzo, N., Fares, C. 1999. Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta color. *Cereal Chem* 76 (3): 335-340
- Brim, C. A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Science, Madison* 6, 220.
- Carbajo, H.L. 2001. Introducción. En: Trigo Candeal, Manual Técnico. Carbajo H.L., Jensen C.A. (eds.). INTA, Chacra Experimental Integrada Barrow.
- Carrera, A., Echenique, V., Zhang, W., Helguera, M., Manthey, F., Schrager, A., Picca, A., Cervigni, G.D.L., Dubcovsky, J. 2007. A deletion at the Lpx-B1 locus is associated with low lipoxygenase activity and improved pasta color in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum). *Journal of Cereal Science.* 45: 67 – 77.
- Cenci, A., Somma, S., Chantret, N., Dubcovsky, J., Blanco, A. 2004. PCR identification of durum wheat BAC clones containing genes coding for carotenoid biosynthesis enzymes and their chromosome localization. *Genome.* 47: 911-917.
- Cervigni, G.D.L, Zhang, W., Picca, A., Carrera, A, Helguera, M, Manthey, F, Miranda, R, Dubcovsky J, Echenique, V. 2005. QTL mapping for lox activity and quality traits in durum wheat *Triticum turgidum* L. var. durum. 7th International Congress of Wheat. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 27 de Noviembre - 02 de Diciembre.
- Chmielewski, F., Kohn, W., 2000. Impact of weather on yield components of winter rye over 30 years. *Agric. Forest Meteorol.* 102, 253–261.
- Churchill, G.A., Doerge, R. W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics.* 138:963-971.
- Churchill, G.A., Doerge, R.W. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics.* 138: 963-971.
- Ciaffi, M., Tozzi, L., Lafiandra, D. 1996. Relationship between flour protein composition determined by Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography and dough rheological parameters. *Cereal Chemistry.* 3: 346-351.
- Clarke, J.M., Clarke, F.R., Ames, N.P., McCaig, T.N., Knox, R.E. 2000. Evaluation of predictors of quality for use in early generation selection. En: Durum Wheat Improvement In The Mediterranean Region: New Challenges. Royo, C., Nachit, M.M., DiFonzo, N. and Araus, J.L. (eds). International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Zaragoza, 439-446.
- Conti, V., Miravalles, M, Cervigni, G.D.L., Manthey, F., Polci, P., Miranda, R., Dubcovsky, J., Echenique, V. 2005. Comparison of methods for the assessment of gluten strength in durum wheat for pasta making. 7th International Congress of Wheat. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. 27 de Noviembre - 02 de Diciembre.
- Cruz, C.D., 1997. Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística. pp. 442. Viçosa: Editora UFV.
- Dick J.W., Quick J.S. 1983. A modified screening test for rapid estimation of gluten strength in early generation durum wheat breeding lines. AACC. Vol. 60, N° 4.

- Distelfeld, A., Uauy, C., Olmos, S., Schlatter, A.R., Dubcovsky, J., T. Fahima. 2004. Microcolinearity between a 2-cM region encompassing the grain protein content locus *Gpc-6B1* on wheat chromosome 6B and a 350-kb region on rice chromosome 2. *Functional and Integrative Genomics*. 4: 59-66.
- Dvorak, J., McGuire, P.E., Cassidy, B., 1988. Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from the polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30, 680–689.
- Eberhart, S.A., Russel, W.A. 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop. Sci.* 6, 36-40
- Echenique, V., Díaz, M., Polci, P., Mroginski, L. 2001. Embryogenic cell suspensions from different explants and cultivars of *Eragrostis curvula* (schrad.) Nees. *Biocell* 25(2): 131-138.
- Echenique V, Stamova, B., Wolters, P., Lazo, G., Dubcovsky, J. 2002. Frequencies of Ty1-*cop* and Ty3-*gypsy* retroelements within the *Triticeae* EST databases. *Theor. Appl. Genet.* 104: 840-844.
- Elouafi I., Nachit MM., Elsaleh, A., Asbati, A., Mather DE. 2001. QTL-mapping of genomic regions controlling gluten strength in durum (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). En: *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges*. Pag. 455-461. Royo, C., Nachit, M.M., DiFonzo, N., Arauz, J.L. (eds.). International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Zaragoza.
- Falconer, D.S., Mackay, T.F.C. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed., Longman Press, England
- Ferreira, M.E., Gratapaglia, D. Clases de marcadores moleculares para análise genética. In: Ferreira, M.E., Gratapaglia, D. 1996. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 2.ed. Brasília: MA/EMBRAPA/CENARGEN, 13-67.
- Finlay, K.W., Wilkinson, G.N. 1963. The analysis of adaptation in a plant breeding programme. *Australian Journal of Agricultural Research* 14: 742-754
- Fischer, R.A. 2001. Selection traits for improving yield potential. p.148-159. In Reynolds, M.P., J.I. Ortiz-Monasterio and A. McNab (eds.). *Application of physiology in wheat breeding*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México D.F.
- Foreign Agricultural Service (<http://www.fas.usda.gov>). Revisado el 22 de febrero de 2007.
- Fu, D., Szûcs, P., Yan, L., Helguera, M., Skinner, J. Vonzitzewitz, J., Hayes, P., Dubcovsky, J. 2005. Large deletions within the *VRN-1* first intron are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Mol Gen Genomics* 273: 54-65.
- García del Moral, L. F., Rharrabti, Y., Villegas, D., Royo, C. 2003. Evaluation of Grain Yield and Its Components in Durum Wheat under Mediterranean Conditions: An Ontogenic Approach. *Agron. J.* 95: 266–274.
- Geldermann, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genet.* v.46, n.1, p.319-330, 1975
- Giunta, F., Motzo, R., Deidda, M., 1993. Effect of drought on yield and yield components of durum wheat and triticale in a Mediterranean environment. *Field Crops Res.* 33, 399–409.
- Grafius, J.E. 1964. A geometry for plant breeding. *Crop Sci.* 4: 241-246.
- Grodzicker, T., Willians, J., Sharp, P., Sambrook, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 439-446, 1974.
- Gupta P, Balyan H, Edwards K, Isaac P, Korzun V, Röder M, Gautier M-F, Joudrier P, Schlatter A, Dubcovsky J, De La Pena R, Khairallah M, Penner G, Hayden M, Sharp P, Keller B, Wang R, Hardouin J, Jack P, Leroy P. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theor Appl Genet* 105:413–422
- Helguera, M., I. A. Khan, J. Kolmer, D. Lijavetzki, L. Zhong-Q.I, Dubcovsky, J. 2003. PCR Assays For The Lr37-Yr17-Sr38 Cluster Of Rust Resistance Genes And Their Use To Develop Isogenic Hard Red Spring Wheat Lines. *Crop Sci.* 43: 1839-1847.
- Helguera, M.; I. A. Khan, Dubcovsky, J. 2000. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene Lr47. *Theoretical and Applied Genetics* 100 (7): 1137-1143.
- Helguera, M.; L. Vanzetti; M. Soria; I. A. Khan; J. Kolmer; J. Dubcovsky. 2005. PCR markers for triticum speltoides leaf rust resistance gene Lr51 and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci.* 45:728–734.

- Hessler, T.G., Thomson, M.J., Benschler, D., Nachit, M.M., Sorrells, M.E. 2002. Association of a lipoxygenase locus, Lpx-B1, with variation in lipoxygenase activity in durum wheat seeds. *Crop Sci.* 42: 1695-1700.
- Huebner, F.R., Bietz, J.A. 1985. Detection of quality differences among wheats by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 327: 333-342.
- Jansen, R. C. 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics.* 135:205-211.
- Jansen, R.C. 1994. Controlling the type I and II errors in mapping quantitative trait loci. *Genetics.* 138:871-881.
- Jha, H.N., Ram, A. 1968. A note on correlation and partial regression studies between yield and yield attributing characters in wheat. *Indian J. Agron.* 13: 200-202.
- Jiang, C., Z-B. Zeng, 1997 Mapping quantitative trait loci with dominant and missing markers. *Genetica* 101: 47-58.
- Kao, C.-H., Z-B. Zeng, Teasdale, R. D. 1999 Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152: 1203-1216.
- Knott, S.A., Haley, C.S. 2000. Multitrait Least Squares for Quantitative Trait Loci Detection. *Genetics* 156: 899-911.
- Kosambi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenics* 12:173:175.
- Lander, E.S., Botstein, D. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics.* 121:185-199.
- Marchylo, B.A., Kruger, J.E., Hatcher, D.W. 1989. Quantitative reverse-phase high-performance liquid chromatographic analysis of wheat storage proteins as a potential quality prediction tool. *Journal of Cereal Science* 9: 113-130.
- Mares, D.J., Campbell, A.W. 2001. Mapping components of flour and noodle colour in Australian wheat. *Aust. J. Agric. Res.*, 52, 1297-1309.
- Mather, K. Variation and selection of polygenic character. *J. Genetics* v.41, n.1, p159-193, 1941.
- McDonald, C.E., 1979. Lipoxygenase and lutein bleaching activity of durum-wheat semolina. *Cereal Chemistry* 56, 84-89.
- Moragues, M., García del Moral, L. F., Moralejo, M., Royo, C. 2006. Yield formation strategies of durum wheat landraces with distinct pattern of dispersal within the Mediterranean basin I: Yield components. *Field Crops Research* 95, 194-205
- Moragues, M., García del Moral, L.F., Moralejo, M., Royo, C., 2006. Yield formation strategies of durum wheat landraces with distinct pattern of dispersal within the Mediterranean basin II. Biomass production and allocation. *Field Crops Res.* 95, 182-193.
- Olmos, S., Distelfeld, A., Chicaiza, O., Schlatter, AR., Fahima, T., Echenique, V., Dubcovsky, J. 2003. Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1243-1251.
- Olmos, S. 2005. Estudios tendientes al clonado posicional de un gen responsable de elevados contenidos de proteína en el grano de trigo tetraploide. Tesis de doctorado, Universidad Nacional del Sur. Dpto. de Agronomía, pp. 159.
- Parker, G.D., Chalmers, K. J., Rathjen, A. J., Langridge, P. 1998. Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor and Applied Genet* 97: 238-245
- Peña, R. J. 2000. Durum wheat for pasta and bread-making. Comparison of methods used in breeding to determine gluten quality-related parameters. En: *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges.* Royo, C., Nachit, M.M., DiFonzo, N. y Arauz, J.L. (eds.). International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies (CIHEAM), Zaragoza, 423-430.
- Pestsova, E., Ganal, M.W., Röder, M.S. 2000. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43:689-697
- Pflüger, L.A. 2003. Wheat storage proteins: their manipulation for quality improvement. *Journal of Basic and Applied Genetics* 15 (1): 19-27.
- Röder, M.S, Korzun, V., Wandehake, K., Planschke, J, Tixier, M.H, Leroy, P., Ganal, M.W.1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023
- Sapirstein, H. D., Hussain, A. 2000. Abstract 165, AACC Annual Meeting, Nov. 5-9, Kansas City, Mo.

- Seghezzo, M.L. y Molfese, E. 1999. Trigo candeal. Criterios para la evaluación de la calidad. Publicación Miscelánea N° 2. Seghezzo, M.L. y Molfese, E. (eds). Chacra Experimental Integrada Barrow, INTA-Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.
- Shuster, I., Cruz, C.D. 2004. Estadística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. pp. 568. Viçosa: Editora UFV.
- Simane, B., Struik, P.C., Nachit, M., Peacock, J.M. 1993. Ontogenic analysis of yield components and yield stability of durum wheat in water-limited environments. *Euphytica* 71, 211–219
- Simane, B., Struik, P.C., Nachit, M.M., Peacock, J.M., 1993. Ontogenic analysis of yield components and yield stability of durum wheat in water-limited environments. *Euphytica* 71, 211-219.
- Slafer, G.A., Calderini, D.F., Miralles, D.J. 1996. Yield components and compensation in wheat: Opportunities for further increasing yield potential. p. 101-133. *In* Reynolds, M.P., S. Rajaram, and A. McNab (eds.). *Increasing yield potential in wheat: Breaking the barriers*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo CIMMYT, México D.F. HSU, P. and W ALTON, P.D. 1971. Relationships between yield and its components and structures above flag leaf node in spring wheat. *Crop Sci.* 11: 190-193.
- Somma, S., Cenci, A., Mangini, G., Blanco, A. 2004. Detection of QTL for carotenoid pigment content in durum wheat. Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics – SIFV – SIGA Joint Meeting Lecce, Italy, 15/18 September.
- Sosa, C., Zecca G., Jensen CA. 1999. Trigo candeal: Producción e industrialización, situación actual y futura. *Agro Barrow* N° 3, p. 6-7. Material de divulgación de la Chacra Exp. Integrada Barrow.
- Surrey, K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiology* 39, 66–70.
- Tanksley, D.S., Young, N.D., Paterson, A.H., Bonierbale, M.W. 1989. Review. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology* 257-264.
- Uauy, C., Distelfeld, A., Fahima, T., Blechl, A., Dubcovsky, J. 2006. A NAC Gene Regulating Senescent Improves Grain Protein, Zinc, and Iron Content in Wheat. *Science*. 314: 1298-1300.
- van Mechelen, J.R., Schuurink, R.C., Smits, M., Graner, A., Douma, A.C., Sedee, N.J.A., Schmitt, N.F., Valk, B.E., 1999. Molecular characterization of two lipoxygenases from barley. *Plant Molecular Biology* 39, 1283–1298.
- Vos, P.R, Hogers, R., Bleeker, M., van de Lee, T., Hornes, M.M, Frjters, A, Pot, J., Peleman, J., Kupier, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res* 23:4407-4414.
- Wang, C., Kovacs, M.I.P. 2000. Abstract 220, AACC Annual Meeting, Nov. 5-9, Kansas City, Mo.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, D.L., Rafalski, J.A, Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids res.* 18:6531-6536.
- Yan, L., Helguera, M., Kato, K., Sherman, J., Dubcovsky, J. 2004. Allelic variation at the Vrn-1 promoter region in polyploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1677-1686
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T., Dubcovsky, J. 2003. Positional Cloning Of Wheat vernalization gene VRN1. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100: 6263-6268.
- Zeng, Z.-B. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci.* 90:10972-10976.
- Zeng, Z.-B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics.* 136: 1457-1468.
- Zhang, D, Choi, D.W., Wanamaker, S., Fenton, R.D., Chin, A., Malatrasi, M., Turuspekoy, Y., Walia, H., Akhunov, E., Kianian, P., Otto, C., Simons, K., Deal, K., Echenique, V., Stamova, B., Ross, K., Butler, E., Doherty, L., Verhey, S., Johnson, R., Altenbach, S., Kothari, K., Tanaka, C., Shah, M.M., Laudencia-Chingcuanco, D., Gitt, M., Pham, J., Han, P., Miller, R.E., Crossman, C.C., Chao, S., Lazo, G.R., Klueva, N., Gustafson, J.P., Kianian, S.F., Dubcovsky, J., Walker-Simmons, M.K., Gill, K.S., Dvorak, J., Anderson, O.D., McGuire, P., Qualset, C.O., Nguyen, H.T., Close, T.J. 2004. Construction and evaluation of cDNA libraries for large scale EST sequencing in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics* 168 (2): 595-608. PMID: 15514038.
- Zobel, R.W., Wright, M.J., Gauch, H.G. 1988. Statistical analysis of yield trial. *Agronomy Journal* 80: 388-393.