



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA, BIOQUÍMICA Y
FARMACIA

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

ASOCIACIÓN DE MARCADORES AFLPs Y CARACTERES
DE CALIDAD Y RENDIMIENTO EN TRIGO CANDEAL

Triticum turgidum L. var. Durum

Lic. Camargo Acosta, Emily Yineth

Bahía Blanca, Argentina

2017

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 01/10/2010 y el 01/12/2015, bajo la dirección de la Dra. Viviana Echenique y la Dra. Ingrid Garbus.

Camargo Acosta, Emily Yineth
Licenciada en Ciencias Biológicas PUJ



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mereciendo la calificación de(.....)

AGRADECIMIENTOS

En esta oportunidad quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que por diversas razones me han ayudado en el desarrollo de esta tesis y por ende en mi formación profesional.

En primer lugar, merecen toda mi gratitud mi directora y co-directora, la Dra. Viviana Echenique y la Dra. Ingrid Garbus, científicas objetivas y siempre dispuestas a colaborar y transmitir conocimiento.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al COLCIENCIAS por otorgarme el sustento económico para la realización de mis estudios de doctorado.

Al CERZOS-CONICET y al Departamento de BIOLOGIA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA de la Universidad Nacional del Sur, por el apoyo y la prestación de las instalaciones para realizar los análisis.

Al INTA Bordenave, Chacra Experimental Barrow y a los semilleros privados (ACA, Buck Semillas), por el germoplasma y conocimiento entregado para realizar este trabajo de investigación. A los Ing. Agr. Dr. Pablo Roncallo, Ing. Agr. Valeria Beaufort, Ing. Agr. Carlos Jensen e Ing. Agr. Adelina Larsen, por los conocimientos compartidos sobre el cultivo y características de los genotipos.

También quisiera agradecer a los integrantes del Laboratorio de Biotecnología y Genética Vegetal, por su apoyo y colaboración durante la realización de la Tesis. A todos mis compañeros del laboratorio por su gran ayuda en los trabajos de mesada, por los gratos momentos compartidos, por alentarme y por brindarme su amistad. También quiero agradecer a Alysson Jalles por compartirme sus conocimientos y colaborar en el análisis estadístico de esta tesis.

Quiero agradecer especialmente al motor de mi vida, Dios, por encausar siempre mi camino, a mis padres Mauricio e Isabel por todo el amor, los valores y disposición infinita para conmigo, nada sería posible sin ellos. A mis hermanos Diego y Hernán que desde la distancia siempre fueron un apoyo. A todos mis familiares que con sus mensajes y amor siempre me dieron mucha fuerza para continuar.

Finalmente quiero agradecer a Cristian, mi amor y compañero, gracias por todo el amor, el compromiso, la contención y la paciencia que me tuviste durante todo el proceso. Y para mis bebés, Valentine y Thiago, por ellos y para ellos. Gracias.

FINANCIAMIENTO

Análisis de la estructura de genoma de trigo candeal para su utilización en programas nacionales de mejoramiento. PGI-TIR 24/A185. SECyT UNS.IR: Viviana Echenique.

Genómica estructural, funcional y comparativa para contribuir a la dilucidación del genoma de trigo y desarrollar marcadores moleculares para asistir al mejoramiento utilizando como modelo el cromosoma 4D. FONCyT – ANPCyT. PICT 2012- 0660. IR: Dra. Viviana Echenique.

Genómica estructural, funcional y comparativa para contribuir a la dilucidación del genoma de trigo y desarrollar marcadores moleculares para asistir al mejoramiento utilizando como modelo el cromosoma 4D. PGI – TIR 142/14 (SECYT, UNS). IR: Dra. Viviana Echenique.

Análisis de la estructura del genoma y mapeo por asociación para caracteres de calidad y rendimiento en trigo candeal. PICT-2015- 1401 (Cat. Raíces). IR: Dra. Viviana Echenique (CERZOS), Dra. Carolina Saint Pierre (CIMMYT, México).

RESUMEN

El mapeo por asociación (MA), fundamentado en el desequilibrio de ligamiento (DL), es una estrategia complementaria al mapeo de *loci* cuantitativo (QTL) tradicional, que constituye una herramienta poderosa para la identificación de *loci* asociados a caracteres de interés. El objetivo de este trabajo de tesis fue realizar un análisis tendiente a implementar la estrategia de mapeo por asociación en trigo candeal de manera de complementar los estudios realizados por mapeo biparental, identificando marcadores asociados a caracteres de color, peso hectolitrico (PH) y peso de mil granos (PMG). Para ello se estudió la diversidad nucleotídica y la estructura poblacional a partir de marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) y se consideraron los caracteres de calidad y rendimiento mencionados en una población de trigo candeal constituida por 133 genotipos de distinta procedencia. Para el carácter color del endosperma se determinó el contenido de pigmentos carotenoides (CPC) y color amarillo (CIE 1976 b*), color rojo (CIE a*) y luminosidad (CIE L*) de la sémola; se registró también el peso de mil granos (PMG), el peso hectolitrico (PH) y el rendimiento de las parcelas (Kg/Ha) durante la campaña 2011/2012 en tres localidades de la Pcia de Buenos Aires, Pieres, Cabildo y Barrow.

Se analizó el potencial del MA para identificar QTLs utilizando la estrategia de exploración amplia del genoma (GWAS). El color amarillo cuantificado por la extracción de los pigmentos con butanol saturado en agua y la medición de la reflectancia de la luz CIE 1976 b* se evaluaron en una colección de 133 variedades de diferentes orígenes geográficos y fueron genotipadas con seis combinaciones de AFLPs que produjeron 116 bandas polimórficas y determinaron que el germoplasma estudiado presenta un 35.8 % de variabilidad genética. La estructura de la población se evaluó mediante la distancia genética y el enfoque basado en el modelo Bayesiano, identificando seis subpoblaciones consistentes con el origen de las variedades y el pedigrí. El análisis de asociación identificó asociaciones significativas entre los marcadores y los caracteres evaluados, los marcadores que explicaron mayores porcentajes de la variación en un carácter fueron, P41M39_715 para el peso de los granos, P41M39_747 para el CIE a*, P41M43_390 para el rendimiento, P41M31_767 para el contenido de pigmentos carotenoides y el color amarillo CIE b* y el marcador P41M43_367 para CIE b*. Los resultados de este estudio indican que el

MA se puede utilizar para complementar las técnicas tradicionales de cartografía de QTL (mapeo biparental), e identificar nuevos QTL para estudios posteriores.

Teniendo en cuenta los modelos lineales mixtos y los lineales generalizados, se seleccionaron genotipos superiores utilizando los métodos REML/BLUP y correlaciones de Pearson, entre los caracteres, encontrándose que para los caracteres de calidad relacionados con el color del grano como el (CPC) y (CIE b*) evaluados en 133 genotipos indicaron que los materiales de trigo candeal Amarillo, CBW 05082, Buck Topacio , Durobonus , Vivadur , Joyau, Exeldur , CBW 0105 , CBW 0225 , VF 0163 y Argeles fueron las variedades que se demostraron estabilidad como genotipos superiores para las localidades de Pieres, Cabildo y Barrow. En relación a los caracteres de PMG y PH las variedades que se comportaron de manera estable en los tres ambientes fueron ACA 1801F, Candeal Durumbuck, Buck Esmeralda, Taganrog Sel. BUCK, Portorico, Catervo, Buck Cristal, CBW 0156, CBW 0230, CBW 0225, Tiziannia, Garic , Buck Granate (B#26) y CBW 0153. Por consiguiente, se considera que estas variedades son genotipos superiores y estas observaciones demuestran la posibilidad de encontrar dentro de estos materiales alelos favorables para estos caracteres.

Dado que la enzima Zds participa en dos pasos críticos de la ruta biosintética de los carotenoides, y también se ha asociado con QTLs en el grupo 2 de cromosomas de trigo pan se planteó como objetivo caracterizar el gen *Zds* de trigo candeal y encontrar variantes alélicas y determinar si estas podrían explicar la variación fenotípica observada en la concentración de pigmentos amarillos entre las distintas variedades que constituyen la población. Este trabajo de tesis permitió determinar que el gen *Zds* presenta dos copias en el genoma A de candeal, que fueron designadas como *TtZds-A1.a* y *TtZds-A1.2*. Las dos copias del gen del genoma A, *TtZds-A1.1a* y *TtZds-A1.2* comparten una identidad del 98% para la región analizada, lo cual sugiere una relativa reciente duplicación. *TtZds-A1.a* tiene una variante alélica, denominada *TtZds-A1.b*, la cual se encontró asociada a variedades con elevados valores de CPC y CIEb*. La variante alélica *TtZds-A1.1b*, identificada en las variedades BonINTACarilo, VF 0113, Amarillo, Gabbiano, Joyau, Karur, Neodur, Garic y Exeldur se encuentra alta y significativamente relacionada con la variación del CPC y CIE b*. Se considera que las variedades que porten el alelo *TtZds-A1.1b* relacionado con mayor color, tienen mayor contenido de pigmentos carotenoides, lo cual

permitió desarrollar un marcador específico para este alelo, que constituirá una buena herramienta para seleccionar variedades de alto color amarillo en trigo candeal.

Este trabajo de tesis constituye el primer antecedente de aplicación de mapeo por asociación en trigo candeal en la Argentina.

ABSTRACT

Association mapping (MA), based on linkage disequilibrium, is a complementary strategy to the traditional quantitative trait loci (QTL) mapping, which is a powerful tool for identify gene loci associated with traits of interest. The aim of this thesis was to implement the strategy of MA in durum wheat in order to complement the studies carried out at CERZOS by biparental mapping, identifying markers associated with traits related with quality and yield in durum wheat, like color, test weight (TW) and thousand grain weight (TGW). For this purpose the nucleotide diversity and the population Structure were studied by using amplified length fragment polymorphisms (AFLPs) and the quality and yield traits were measured in a durum wheat panel composed of 133 genotypes of different geographic origin. For the trait endosperm color the content of carotenoid pigments (CPC), yellow color (CIE 1976 b *), red color (CIE a *) and luminosity (CIE L *) of the semolina were determined; TWG, TW and the yield of the plots (kg / ha) were taken during the period 2011/2012 in three locations of the Buenos Aires province, Pieres, Cabildo and Barrow.

The potential of MA to identify QTLs was analysed by using the genome-wide association strategy (GWAS). The yellow color determined by the extraction of pigments with saturated butanol in water and the measurement of light reflectance CIEb* were evaluated in the association panel that was genotyped with six combinations of AFLPs. These six AFLPs primer combinations produced 116 polymorphic bands showing a genetic variability of 35.8% in the studied germplasm. The population Structure was assessed by using the genetic distance and the Bayesian model based approaches, identifying six sub-populations and showing consistency with varieties origin and pedigree. Association analysis identified significant associations between the markers and the evaluated traits. The AFLP markers that explained the highest percentages of variation by trait were P41M39_715 for grain weight, P41M39_747 for CIEa*, P41M43_390 for yield, P41M31_767 for carotenoid pigment content and CIEb* yellow and P41M43_367 for CIEb*. Although these markers are anonymous and should be mapped to establish the position in the durum wheat genome, the results are promising, indicating that AM can be used to complement traditional QTL mapping techniques and identify novel QTL for further studies.

Considering the mixed linear and generalized linear models, superior genotypes were selected using the REML / BLUP methods and Pearson's correlations considering the studied traits. Related with color the superior genotypes for the three locations were Amarillo, CBW 05082, Buck Topacio, Durobonus, Vivadur, Joyau), Exeldur , CBW 0105, CBW 0225, VF 0163 and Argeles. Taken into account TWG and TW the varieties that behaved in a stable way in the three environments were ACA 1801F, Candéal Durumbuck, Buck Emerald, Taganrog Sel. BUCK, Portorico, Catervo, Buck Cristal, CBW 0156, CBW 0230, CBW 0225, Tiziannia, Garlic, Buck Garnet (B # 26) and CBW 0153. These varieties are therefore considered to be superior genotypes and these observations demonstrate the possibility of finding within these materials favorable alleles for these traits.

Inasmuch as *Zds* enzyme participates in two critical steps of the biosynthetic pathway of carotenoids, and has also been associated with QTLs in the chromosomal group 2 of bread wheat, our aim was to characterize the durum wheat *Zds* gene and to find allelic variants and to determine if these variants could explain the observed phenotypic variation in the concentration of yellow pigments among the different varieties included in the association panel. This thesis work allowed to determine that the *Zds* gene presents two copies in the durum wheat genome A, which were designated as *TtZds-A1.a* and *TtZds-A1.2*. The two copies of the genome A, *Ttds-A1.1a* and *TtZds-A1.2* share 98% identity for the region analyzed, suggesting a relatively recent duplication event. *Ttds-A1.a* has another allelic variant, called *TtZds-A1.b*, which was found associated to varieties with high values of CPC and CIEb *. The allelic variant *TtZds-A1.1b*, identified in the varieties BonINTACarilo, VF 0113, Amarillo, Gabbiano, Joyau, Karur, Neodur, Garlic and Exeldur is highly and significantly related to the variation of CPC and CIEb*. It is considered that varieties bearing the *TtZds-A1.1b* allele associated with higher color have a higher content of carotenoid pigments, allowing the development of a specific marker to amplify this allele that will be a good tool to high yellow varieties selection in durum wheat.

This thesis work constitutes the first antecedent of application of mapping by association in durum wheat in Argentina.

INDICE

PREFACIO.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
FINANCIAMIENTO.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL CULTIVO.....	2
1.1.1 CENTRO DE ORIGEN Y FILOGENIA DEL TRIGO.....	2
1.1.2 BOTÁNICA, CULTIVO DE LA PLANTA Y TIPOS DE TRIGOS.....	6
1.2 EL TRIGO CANDEAL EN LA ARGENTINA.....	11
1.3 ÁREA DE CULTIVO DEL TRIGO CANDEAL EN LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES.....	12
1.3.1 REGIÓN SUDOESTE.....	13
1.3.2 ESTADO ACTUAL DEL CULTIVO EN LA ZONA SEMIÁRIDA BONAERENSE.....	14
1.4 CONSUMO, PRODUCCIÓN Y EXPORTACIÓN.....	14
1.5. PRINCIPALES USOS DEL TRIGO CANDEAL EN EL MUNDO.....	15
1.6 CALIDAD DE LOS GRANOS DEL TRIGO CANDEAL.....	16
1.6.1 ¿QUÉ ES CALIDAD?.....	16
1.6.2 CALIDAD DEL TRIGO CANDEAL.....	16
1.6.3 CONTENIDO DE PIGMENTOS CAROTENOIDES (CPC).....	17
1.6.4 BIOSÍNTESIS DE PIGMENTOS CAROTENOIDES.....	18
1.6.5 DISTRIBUCIÓN DE CAROTENOIDES EN EL GRANO.....	20
1.6.6 VALOR NUTRICIONAL DE LOS PIGMENTOS CAROTENOIDES Y BIOFORTIFICACIÓN.....	21
1.7 CARACTERES ESTUDIADOS.....	22
1.7.1 PESO HECTOLÍTRICO (PH) Y PESO DE MIL GRANOS (PMG).....	23
1.7.2 COLOR AMARILLO DE LA HARINA.....	24
1.7.3 PÉRDIDA DEL COLOR POR DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE PIGMENTOS.....	26
1.7.4 ENZIMAS DE LA VIA DE BIOSÍNTESIS DE PIGMENTOS CAROTENOIDES.....	27
1.7.4.1 LA ENZIMA FITOENEO SINTASA Y SU RELACIÓN CON EL COLOR AMARILLO DEL ENDOSPERMA DEL GRANO DEL TRIGO CANDEAL.....	27
1.7.4.2 (Z)-CAROTENO DESATURASA Y SUS VARIANTES ALÉLICAS ASOCIADAS AL COLOR AMARILLO EN EL ENDOSPERMA DEL GRANO DEL TRIGO CANDEAL.....	28
1.8 MARCADORES MOLECULARES.....	29
1.9 IDENTIFICACIÓN DE <i>LOCi</i> ASOCIADOS A CARACTERES CUANTITATIVOS (QTL) EN POBLACIONES BIPARENTALES.....	31
1.10 MAPEO ASOCIATIVO.....	31
1.10.1 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.....	32
1.10.2. ESTRATEGIAS UTILIZADAS EN EL MAPEO POR ASOCIACIÓN.....	35
1.10.3 VARIACIÓN ALÉLICA.....	37
1.10.4 ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN.....	38
1.10.5 ESTRUCTURA DE LA POBLACIÓN. ¿CON QUÉ METODOLOGÍA IDENTIFICARLA?.....	39
1.10.6 MAPEO ASOCIATIVO EN TRIGO CANDEAL.....	41
1.11 CARACTERES A MAPEAR.....	41
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	43
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	44
	X

OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
2. MATERIALES Y MÉTODOS	46
2.1. MATERIAL VEGETAL	47
2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL, SIEMBRA Y SEGUIMIENTO DE LOS ENSAYOS A CAMPO	47
2.3 ACONDICIONAMIENTO POS COSECHA DE LOS GRANOS	48
2.4 DETERMINACIONES FENOTÍPICAS	48
2.4.1 PESO DE MIL GRANOS (PMG).....	48
2.4.2 PESO HECTOLÍTRICO (PH).....	48
2.4.3 PESO DE GRANOS POR PARCELA (PGP).....	48
2.4.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PIGMENTOS CAROTENOIDES (CPC)	49
2.4.5 MEDICIÓN DEL COLOR (L*A*B*) CON EL COLORÍMETRO MINOLTA.....	50
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS FENOTÍPICOS PARA CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO (CPC, CIEA*, CIEB*, CIE L* PMG, PH, PGP).....	50
2.6 DATOS GENOTÍPICOS.....	52
2.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL	52
2.6.2 CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	52
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS UTILIZANDO UNA MATRIZ DE AFLPS.....	53
2.7.1 REGISTRO DE MARCADORES Y ANÁLISIS DATOS.....	53
2.7.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD ALÉLICA	54
2.7.3 ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL GERMOPLASMA.....	55
2.7.4 ANÁLISIS DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.....	57
2.8 MAPEO POR ASOCIACIÓN	58
2.9 ANÁLISIS DEL GEN <i>ZDS</i>	58
2.9.1 DISEÑO DE CEBADORES	58
2.9.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL GEN <i>Zds</i>	59
2.9.3 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.....	60
2.9.4 CLONADO DE LOS FRAGMENTOS	60
2.9.5 PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES Y TRANSFORMACIÓN DE <i>E. COLI</i> POR CHOQUE TÉRMICO	61
2.9.6 SECUENCIACIÓN.....	62
2.9.7 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LAS SECUENCIAS.....	62
2.10 GENOTIPIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN PARA EL GEN <i>ZDS</i>	63
3. RESULTADOS	64
3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS FENOTÍPICOS PARA CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO (CPC, CIEA*, CIEB, CIE *L PMG, PH, PGP)	65
3.1.1 CONDICIONES AMBIENTALES DE LAS TRES LOCALIDADES.....	65
3.2 CARACTERES INVESTIGADOS.....	67
3.3 ANÁLISIS DE LA VARIANZA INDIVIDUAL Y CONJUNTA	67
3.4 CORRELACIONES DE PEARSON ENTRE AMBIENTES PARA LAS VARIABLES CPC, CIE B*, CIE L*, CIE A*, PMG, PH, PGP	73
3.5 PARÁMETROS GENÉTICOS	77
3.5.1 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS GENÉTICOS	77
3.5.1.1 GENOTIPOS SUPERIORES PARA LOS CARACTERES EVALUADOS EN LAS LOCALIDADES DE PIERES, CABILDO Y BARROW	82
3.6 VARIABILIDAD GENÉTICA OBTENIDA A PARTIR DE MARCADORES AFLP.....	84
3.7 ESTRUCTURA Y RELACIONES GENÉTICAS DE 118 VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL	88

3.7.1 ANÁLISIS DE LAS RELACIONES GENÉTICAS A PARTIR DE LA DISTANCIA GENÉTICA BINARIA	88
3.7.2 ANÁLISIS DE LA VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)	91
3.7.3 ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES	92
3.8 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	93
3.8.1 NÚCLEOS DE POBLACIÓN Y SUBESTRUCTURACIÓN	93
3.8.2 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.....	98
3.9 MAPEO ASOCIATIVO	102
3.10 (z)-CAROTENO DESATURASA: UN INTERESANTE GEN CANDIDATO QUE AFECTA EL COLOR AMARILLO DEL ENDOSPERMA DEL GRANO DEL TRIGO CANDEAL.....	107
3.10.1 VARIANTES ALÉLICAS OBTENIDAS CON LO CEBADORES ZDS3F/3R.....	108
3.10.2 POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS EN LA REGIÓN ALÉLICA ENMARCADA POR LOS CEBADORES ZDS-3F/3R DEL GEN <i>Zds</i> EN LOS GENOMAS A Y B DE OCHO VARIETADES DE TRIGO CANDEAL.....	113
3.10.3 VARIANTES ALÉLICAS OBTENIDAS CON LO CEBADORES ZDS 4F/5R.....	114
3.10.5 ASOCIACIÓN ENTRE LAS VARIANTES ALÉLICAS DEL GEN <i>Zds</i> DEL GENOMA A, EL CONTENIDO DE PIGMENTOS CAROTENOIDES Y EL COLOR AMARILLO CIE B* DE LA SÉMOLA INTEGRAL DEL TRIGO CANDEAL.....	119
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	124
4.1 EL CPC DE LA SÉMOLA INTEGRAL ESTÁ DETERMINADO PRINCIPALMENTE POR FACTORES GENÉTICOS PERO TAMBIÉN SE VE AFECTADO POR EL AMBIENTE.....	125
4.2 CIEL* Y PGP SE DETERMINAN PRINCIPALMENTE POR EL AMBIENTE.....	128
4.3 PESO HECTOLÍTRICO, EL PARÁMETRO QUE MEJOR CONOCE EL PRODUCTOR, DETERMINADO POR UN SIGNIFICATIVO COMPONENTE GENÉTICO.....	131
4.4 CIE A*, UN CARÁCTER POCO ESTUDIADO Y CON ALTO EFECTO GENÉTICO	132
4.5 VARIABILIDAD GENÉTICA OBTENIDA A PARTIR DE MARCADORES AFLPS.....	132
4.6 RELACIONES GENÉTICAS Y ESTRUCTURA POBLACIONAL	136
4.7 ASIGNACIÓN POBLACIONAL.....	138
4.8 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO.	139
4.9 CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO ASOCIADOS CON MARCADORES AFLP	142
4.10 (z)-CAROTENO DESATURASA.....	147
5. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS.....	150
LITERATURA CONSULTADA.....	156
TABLAS SUPLEMENTARIAS	170

Índice de Tablas

TABLA 1 CONSUMO DE PASTAS EN EL MUNDO FUENTE: IPO ANNUAL SURVEY ON WORLD PASTA INDUSTRY (2014).	15
TABLA 2. TIPO DE MARCADORES MOLECULARES FRECUENTEMENTE UTILIZADOS EN VEGETALES.....	30
TABLA 3. SECUENCIAS DE CEBADORES AFLP <i>Pst</i> +3 Y <i>Mse</i> +3 UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL DE DISTINTOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS.	53
TABLA 4. SECUENCIA, TEMPERATURAS ESPECÍFICAS DE ANILLAMIENTO DE CADA CEBADOR (T _M) Y NÚMERO DE PB AMPLIFICADAS CON CADA COMBINACIÓN DE CEBADOR.	60
TABLA 5. ESTIMACIONES DE LA VARIANZA PARA LOS EFECTOS ALEATORIOS Y VALORES F PARA EL EFECTO FIJO (AMB) DEL ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA LOS CARACTERES: PESO DE GRANOS POR PARCELA (PGP), CONTENIDO DE PIGMENTO AMARILLO (CPC), COLOR AMARILLO (CIE B*), PESO DE MIL GRANOS (PMG), PESO HECTOLÍTRITO (PH), BRILLO (CIE L) Y COLOR ROJO (CIE A*). LOS DATOS FUERON ANALIZADOS PARA LOS TRES AMBIENTES BONAERENSES PIERES, CABILDO Y BARROW EN CONJUNTO MEDIANTE REML USANDO PROC MIXED EN SAS. *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001, NS: NO SIGNIFICATIVO.	68
TABLA 6. MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS (MMC) OBTENIDAS MEDIANTE REML EN UN MLM PARA EL FACTOR FIJO AMBIENTE CALCULADAS PARA LAS VARIABLES CPC, CIE B*, CIE L*, CIE A*, PMG, PH Y PGP DE 133 VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EVALUADAS PARA LAS LOCALIDADES DE PIERES, CABILDO Y BARROW. LOS VALORES EN NEGRITA EN LA COLUMNA AMB Y MMC (AMBIENTES Y MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS) FUERON AQUELLOS VALORES QUE PRESERNTARON LA MAYOR MEDIA PARA EL CARÁCTER EVALUADO. *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001, NS: NO SIGNIFICATIVO.....	69
TABLA 7. MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS (MMC), OBTENIDAS EN UN MODELO LINEAL GENERALIZADO PARA EL FACTOR GENOTIPO. LAS MMC FUERON CALCULADAS PARA LAS VARIABLES CPC, CIE B*, CIE L*, CIE A*, PMG, PH Y PGP DE 133 VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EVALUADAS PARA LAS LOCALIDADES DE PIERES, CABILDO Y BARROW. LOS VALORES EN NEGRITA EN LA COLUMNA AMB Y MMC (AMBIENTES Y MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS) FUERON AQUELLOS VALORES QUE PRESENTARON LA MAYOR MEDIA PARA EL CARÁCTER EVALUADO. HSD: VALOR DE DIFERENCIA HONESTAMENTE SIGNIFICATIVA PARA LA PRUEBA DE TUKEY **P<0,01, NS: NO SIGNIFICATIVO.....	73
TABLA 8. CORRELACIONES FENOTÍPICAS Y DE PEARSON PARA CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO DE 133 VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EN LOS AMBIENTES PIERES, CABILDO Y BARROW EVALUADAS EN CONJUNTO. LOS VALORES EN NEGRITA SON VALORES QUE PRESENTARON CORRELACIONES SIGNIFICATIVAS PARA LOS CARÁCTERES EVALUADOS *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, NS: NO SIGNIFICATIVO.....	75
TABLA 9. CORRELACIONES FENOTÍPICAS Y DE PEARSON PARA CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO DE VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EVALUADAS EN EL AMBIENTE PIERES. LOS VALORES EN NEGRITA PRESENTARON CORRELACIONES SIGNIFICATIVAS PARA LOS CARÁCTERES EVALUADOS *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, NS: NO SIGNIFICATIVO.....	75
TABLA 10. CORRELACIONES FENOTÍPICAS Y DE PEARSON PARA CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO DE VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EVALUADAS EN EL AMBIENTE CABILDO. LOS VALORES EN NEGRITA PRESENTARON CORRELACIONES SIGNIFICATIVAS PARA LOS CARÁCTERES EVALUADOS. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, NS: NO SIGNIFICATIVO.....	76
TABLA 11. CORRELACIONES FENOTÍPICAS Y DE PEARSON PARA CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO DE VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EVALUADAS EN EL AMBIENTE BARROW. LOS VALORES EN NEGRITA PRESENTARON CORRELACIONES SIGNIFICATIVAS PARA LOS CARÁCTERES EVALUADOS *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, NS: NO SIGNIFICATIVO *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, NS: NO SIGNIFICATIVO.....	77
TABLA 12. ANÁLISIS DE DESVÍO (ANODEV) IDENTIFICANDO EL VALOR LRT DE APORTE AL MODELO, PARA LOS EFECTOS ALEATORIOS DEL MODELO LINEAL MIXTO, GENOTIPO (GEN) Y LA INTERACCION GENOTIPO*AMBIENTE (GEN*AMB) PARA LOS SIETE CARACTERES FENOTÍPICOS EVALUADOS EN 133 VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EN TRES AMBIENTES DE LA PCIA. DE BS AS. CHI-CUADRADO TABULADO (3,84 Y 6,63) PARA LOS NIVELES DE SIGNIFICACIÓN DE 5% Y 1%, RESPECTIVAMENTE. SI LA PRUEBA LRT (LIKELIHOOD RATIO TEST) A TRAVÉS DE CHI-CUADRADO TIENE UN VALOR DE P <0.05 ES SIGNIFICATIVA PARA GEN Y PARA LA INTERACCIÓN GEN * AMB.+ DESVIACIÓN DEL MODELO AJUSTADO SIN EL EFECTO DEL GENOTIPO. ++ LA DESVIACIÓN DEL MODELO AJUSTADO CON EFECTO DEL GENOTIPO.	78
TABLA 13. HEREDABILIDAD Y PARÁMETROS GENÉTICOS PARA CARACTERES DE CALIDAD Y RENDIMIENTO EN VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EVALUADAS EN TRES AMBIENTES BONAERENSES.	79

TABLA 14. VALORES GENOTÍPICOS PARA LA VARIABLE (CPC) TENIENDO EN CUENTA LOS TRES AMBIENTES DE EVALUACIÓN. BLUP : MEJOR PREDICTOR LINEAL INSEGADO; SEP : ERROR DE PREDICCIÓN DEL BLUP; VALOR T (G) : BLUP/SEP; Pr > T : PROBABILIDAD DEL VALOR DE T; GEM (INT. MEDIA.GEN. AMB) : EFECTO GENOTÍPICO POR AMBIENTE; U+G+GEN : (VALOR GENOTÍPICO) MEDIA DE CADA AMB+BLUP+INTERACION DENTRO DE CADA AMB)	83
TABLA 15. VALORES GENOTÍPICOS PARA LA VARIABLE (CIE B*) TENIENDO EN CUENTA LOS TRES AMBIENTES DE EVALUACIÓN. BLUP : MEJOR PREDICTOR LINEAL INSEGADO; SEP : ERROR DE PREDICCIÓN DEL BLUP; VALOR T (G) : BLUP/SEP; Pr > T : PROBABILIDAD DEL VALOR DE T; GEM (INT. MEDIA.GEN. AMB) : EFECTO GENOTÍPICO POR AMBIENTE; U+G+G : (VALOR GENOTÍPICO) MEDIA DE CADA AMB+BLUP+INTERACION DENTRO DE CADA AMB)	83
TABLA 16. PORCENTAJE DE POLIMORFISMO (%P), ÍNDICE DE CONTENIDO POLIMÓRFICO (PIC) E ÍNDICE DE MARCADOR (MI) PARA DISTINTAS COMBINACIONES DE CEBADORES DE AFLPs AMPLIFICADAS EN 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL DE DIFERENTES ORÍGENES GEOGRÁFICOS.	84
TABLA 17. NÚMERO DE BANDAS TOTALES, PROPORCIÓN DE BANDAS POLIMÓRFICAS Y VALORES DE ÍNDICE DE CONTENIDO POLIMÓRFICO (PIC) E ÍNDICE DE MARCADOR (MI) OBTENIDOS UTILIZANDO DIFERENTES COMBINACIONES DE CEBADORES DE AFLP EN 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL DE ACUERDO A SU ORIGEN GEOGRÁFICO.	85
TABLA 18. PORCENTAJES DE POLIMORFISMO (%P) OBTENIDOS UTILIZANDO DIFERENTES COMBINACIONES DE CEBADORES DE AFLP EN 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL PARA DIFERENTES ORÍGENES GEOGRÁFICOS.	86
TABLA 19. PATRONES TOTALES DE BANDAS DE AFLPs DE 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL AGRUPADAS EN POBLACIONES DE DIFERENTES ORÍGENES GEOGRÁFICOS.	86
TABLA 20. IDENTIDAD GENÉTICA DE NEI Y <i>DISTANCIA GENÉTICA DE NEI</i> PARA POBLACIONES DE DISTINTO ORIGEN DE TRIGO CANDEAL CALCULADA UTILIZANDO BANDAS POLIMÓRFICAS DE AFLPs. SOBRE LA DIAGONAL SE MUESTRAN LOS VALORES OBTENIDOS PARA LA DISTANCIA GENÉTICA DE NEI CALCULADA COMO $= -1 * LN$ (IDENTIDAD NEI) Y DEBAJO DE LA DIAGONAL LOS VALORES DE IDENTIDAD GENÉTICA DE NEI.	88
TABLA 21. AMOVA PARA 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL DE DISTINTOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS UTILIZANDO DATOS DE AFLPs. GL: GRADOS DE LIBERTAD; SC: SUMA DE CUADRADOS; CM: CUADRADO MEDIO; S ² : VARIANZA ESTIMADA Y % PORCENTAJE EXPLICADO DE LA VARIANZA. ENTRE LAS POBLACIONES; DENTRO DE LAS POBLACIONES.	92
TABLA 22. VALORES DE PHIPT ENTRE GENOTIPOS (CONSIDERADOS POR ORIGEN) PARA 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL DE DISTINTOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS UTILIZANDO DATOS DE AFLP.	93
TABLA 23 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE TRIGO CANDEAL CONSISTENTE EN 118 GENOTIPOS DE DISTINTOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS UTILIZANDO EL PROGRAMA STRUCTURE HARVESTER (EARL & VONHOLDT, 2012). EN NEGRITA SE IDENTIFICA EL NUMERO DE POBLACIONES IDENTIFICADOS CON EL MÉTODO DE EVANNO <i>ET AL.</i> , (2005) A PARTIR DE LA ESTIMACIÓN MEDIA DE LA PROBABILIDAD POSTERIOR DE LOS DATOS PARA CADA K ENTREGADA POR EL PROGRAMA STRUCTURE REFERENCIAS: L (K) : PROMEDIO DE 3 REPETICIONES DE LN P (D) PARA CADA K, L'(K) : L(K) _i - L(K) _{i-1} , L''(K) : L'(K) _i - L'(K) _{i-1} , [L''(K)]: VALOR ABSOLUTO DE L''(K), DELTA K : [L''(K)]/STDEV.	94
TABLA 24. PROPORCIÓN DE PERTENENCIA DE CADA UNO DE LOS GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL EN CADA UNO DE LOS SEIS GRUPOS QUE CONFORMAN LA POBLACIÓN DE 118 GENOTIPOS OBTENIDA UTILIZANDO EL PROGRAMA STRUCTURE.	97
TABLA 25. VALORES MEDIOS DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA (FST) ENTRE LOS SEIS GRUPOS QUE CONFORMAN LA POBLACIÓN DE 118 INDIVIDUOS DE TRIGO CANDEAL OBTENIDOS UTILIZANDO EL PROGRAMA STRUCTURE.	97
TABLA 26. CUARENTA Y DOS COMBINACIONES DE AFLPs AMPLIFICADAS EN 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL QUE EXHIBIERON DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO, CON ALTA SIGNIFICANCIA (P<0,0001). EL PROMEDIO DE LOS VALORES DE R ² FUE DE 0,237. EL ESTADO SE REFIERE A LA FORMA ALÉLICA EN LA SE ENCONTRARON LAS COMBINACIONES DE MARCADORES EN DL, A: PRESENCIA DEL MARCADOR Y B LA AUSENCIA DEL MARCADOR. LAS COMBINACIONES EN NEGRITA SON AQUELLAS QUE PRESENTARON LOS MAYORES VALORES DE SIGNIFICANCIA.	99
TABLA 27 ASOCIACIONES SIGNIFICATIVAS ENTRE MARCADORES AFLP Y CARACTERES IDENTIFICADOS EN 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL UTILIZANDO EL PROGRAMA TASSEL. SE CONSIDERÓ UNA ASOCIACIÓN MARCADOR-CARÁCTER SIGNIFICATIVA APLICANDO UNA FDR (FALSE DISCOVERY RATE) < 0.05.	103
TABLA 28. ASOCIACIÓN DE MARCADORES AFLP CON CARACTERES AGRONÓMICOS DE CALIDAD Y RENDIMIENTO DE UNA POBLACIÓN DE 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL CRECIENDO EN TRES LOCALIDADES DE LA PCIA. DE BS.	

AS., OBTENIDOS CON EL PROGRAMA TASSEL. SE CONSIDERA LA FORMA ALÉLICA, PARA LA PRESENCIA DEL ALELO FUE IDENTIFICADA COMO AA, Y LA AUSENCIA COMO BB, EL EFECTO DE LA ASOCIACIÓN ENTRE EL MARCADOR Y EL CARÁCTER Y EL NÚMERO DE GENOTIPOS EN LOS QUE FUE OBSERVADA. MARCADORES SIGNIFICATIVAMENTE ASOCIADOS CON CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS CAROTENOIDES (CPC, PPM), COLOR (CIEa*, CIEb, CIE *L), PESO DE MIL GRANOS (PMG, G) PESO HECTOLÍTRITO (PH, KG/HL) Y PESO DE GRANOS POR PARCELA (PGP9, KG/HA). BA, CA Y BU HACEN REFERENCIA A LA LOCALIDAD EN LA QUE FUE SIGNIFICATIVA LA ASOCIACION, EN DONDE, BA ES LA LOCALIDAD DE BARROW, CA ES LA LOCALIDAD DE CABILDO Y BU ES LA LOCALIDAD DE PIERES. LOS CARACTERES EN NEGRITA E ITALICA CORRESPONDEN A ASOCIACIONES ENTRE CARACTERES Y MARCADORES CON UN EFECTO POSITIVO Y DESEABLE PARA EL CULTIVO.....	105
TABLA 29. CLASIFICACIÓN DE VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL EN FUNCIÓN DE SU CONTENIDO DE PIGMENTOS CAROTENOIDES A FIN DE SER UTILIZADAS PARA AMPLIFICAR ALELOS DEL GEN <i>Zds</i>	107
TABLA 30. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN DEL GEN <i>Zds</i> COMPRENDIDA ENTRE LOS CEBADORES <i>ZDS3F/3R</i> , IDENTIFICADOS EN OCHO VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL. LA REGIÓN AMPLIFICADA SE CORRESPONDE CON LAS BASES 3.629 Y 4.960 DEL GEN <i>TaZds-A1</i> DE TRIGO PAN (HQ703016).	114
TABLA 31. CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN DEL GEN <i>Zds</i> COMPRENDIDA ENTRE LOS CEBADORES <i>ZDS4F/5R</i> , IDENTIFICADOS EN OCHO VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL. LA REGIÓN AMPLIFICADA SE CORRESPONDE CON LA SITUADA ENTRE LAS BASES 5.344 Y 6.710 DEL GEN <i>TaZds-A1</i> DE TRIGO PAN (HQ703016).....	117
TABLA 32 ANOVA UTILIZANDO COMO FUENTE DE VARIACIÓN LA REGIÓN ALÉLICA <i>TtZds-A1.1b</i> Y COMO VARIABLE DEPENDIENTE EL CPC EVALUADO EN TRES AMBIENTES BONAERENSES.	121
TABLA 33. MEDIAS AJUSTADAS (LSMEANS) DEL MODELO CONSIDERANDO A LA REGIÓN ALÉLICA <i>Zds-A1.2</i> COMO FUENTE DE VARIACIÓN Y AL CPC, EVALUADO EN TRES AMBIENTES BONAERENSES, COMO VARIABLE DEPENDIENTE.	121
TABLA 34. ANOVA UTILIZANDO COMO FUENTE DE VARIACIÓN AL CIE B* CUANTIFICADO EN 133 VARIEDADES DE TRIGO CANDEAL CRECIENDO EN TRES AMBIENTES BONAERENSES Y A LA REGIÓN ALÉLICA <i>TtZds-A1.1b</i> Y COMO VARIABLE DEPENDIENTE.	122
TABLA 35. MEDIAS AJUSTADAS (LS-MEANS) DEL MODELO TENIENDO COMO FUENTE DE VARIACIÓN LA REGIÓN ALÉLICA <i>TtZds-A1.1b</i> Y COMO VARIABLE DEPENDIENTE EL CIE B* EVALUADO EN TRES AMBIENTES BONAERENSES.....	123

Índice de Figuras.

FIGURA 1. LA DOMESTICACIÓN DE LOS CEREALES. LA ZONA VERDE SOBRE EL MAPA MUESTRA LA REGIÓN DEL CERCANO ORIENTE (ISRAEL, JORDANIA, TURQUÍA, SIRIA, IRÁN E IRAQ), CONOCIDO COMO MEDIA LUNA FÉRTIL, DONDE SE REALIZARON LOS PRIMEROS HALLAZGOS ARQUEOLÓGICOS DEL CULTIVO DEL TRIGO (FEUILLET ET AL., 2007).	3
FIGURA 2. CLASIFICACIÓN DEL GÉNERO <i>TRITICUM</i> PROPUESTA POR MAC KEY EN 1988.	4
FIGURA 3 EVOLUCIÓN DEL TRIGO DURANTE LA DOMESTICACIÓN (MANGELSDORF, 1953). 1. TRIGO EINKORN, DIPLOIDE CON 14 CROMOSOMAS; 2. PASTOS SILVESTRES DEL GÉNERO <i>AEGILOPS</i> ; 3. TRIGO EMMER, DURO TETRAPLOIDE CON 28 CROMOSOMAS. 4. TRIGO HEXAPLOIDE CON 42 CROMOSOMAS, COMÚNMENTE USADO PARA ELABORAR PAN.	5
FIGURA 4. ESPIGAS Y GRANOS DE TRIGOS EINKORN, EMMER Y SPELT.	6
FIGURA 5. ESPIGAS DE <i>TRITICUM URARTU</i> L. (A); ESPIGAS DE <i>AEGILOPS SPELTOIDES</i> . (B); ESPIGAS DE <i>AEGILOPS TAUSCHII</i> (C).	6
FIGURA 6. ESPIGA DEL TRIGO CANDEAL Y ESTRUCTURA DEL RAQUIS. HTTP://WWW7.UC.CL/SW_EDUC/CULTIVOS/CEREALES/TRIGO/INFLORES.HTM	7
FIGURA 7. ESPIGUILLA DEL TRIGO COMPUESTA POR 5 ANTECIOS. HTTP://WWW7.UC.CL/SW_EDUC/CULTIVOS/CEREALES/TRIGO/INFLORES.HTM .	8
FIGURA 8. COMPONENTES DE UNA ESPIGUILLA DE TRIGO. HTTP://WWW7.UC.CL/SW_EDUC/CULTIVOS/CEREALES/TRIGO/INFLORES.HTM	8
FIGURA 9. ANTECIO DE TRIGO CANDEAL Y SUS PRINCIPALES ESTRUCTURAS. HTTP://WWW7.UC.CL/SW_EDUC/CULTIVOS/CEREALES/TRIGO/INFLORES.HTM .	9
FIGURA 10. ESTRUCTURA DEL GRANO (CARIOPSE) DE TRIGO CANDEAL Y SUS RESPECTIVAS PARTES.	10
FIGURA 11. ESQUEMA DEL CICLO ONTOGÉNICO DEL CULTIVO DE TRIGO CANDEAL (ADAPTADO DE SLAFER & RAWSON, 1994).	10
FIGURA 12. PRODUCCIÓN EN TONELADAS (Tn), OBTENIDO EN LAS ÚLTIMAS 14 CAMPAÑAS EN LA PCIA. DE BUENOS AIRES (HTTP://WWW.SIAA.GOV.AR/)	12
FIGURA 13 LOCALIDADES DE ESTUDIO DEL TRIGO CANDEAL EN LA PCIA DE BUENOS AIRES, ARGENTINA. SE IDENTIFICAN EN LA FIGURA A.C.A CABILDO, CEI INTA BARROW E INTA BALCARCE(PIERES).	13
FIGURA 14. RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES (MODIFICADO DE NAIK <i>ET AL.</i> , 2003; ENFISSI <i>ET AL.</i> , 2006; JIKET <i>AL.</i> , 2009).	20
FIGURA 15. R^2 vs (CM) EXTENSIÓN DEL DL EN TRIGO PAN Y CANDEAL (SOMERS <i>ET AL.</i> , 2007). LA CAÍDA DEL DL SE VISUALIZA MEDIANTE EL TRAZADO DE DL (R^2) FRENTE A LA DISTANCIA GENÉTICA (CM). EL RECUADRO INDICA LA TASA PROMEDIO DE CAÍDA DEL DL PARA EL TRIGO CANDEAL (LÍNEA CONTINUA) Y EL TRIGO PAN (LÍNEA DISCONTINUA).	33
FIGURA 16. NÚMERO DE ALELOS Y GRADO DE RESOLUCIÓN POSIBLE UTILIZANDO DISTINTOS MATERIALES VEGETALES PARA EL MAPEO. EL GRADO DE RESOLUCIÓN DEPENDE DE LA EXTENSIÓN DEL DL (REMINGTON ET AL. 2001) Y SE ESPERA UNA RESOLUCIÓN MÁS ALTA CUANDO EL DL DISMINUYE RÁPIDAMENTE AL AUMENTAR LA DISTANCIA GENÉTICA.	38
FIGURA 17. CONDICIONES CLIMÁTICAS: TEMPERATURA Y PRECIPITACIÓN PARA LOS AMBIENTES PIERES (A), CABILDO (B) BARROW (C) EN EL AÑO EN QUE SE REALIZARON LAS EXPERIENCIAS DE CAMPO (2011).	66
FIGURA 18. INTERACCIÓN DE TIPO NO CRUZADA IDENTIFICADA A PARTIR DE LAS MEDIAS DE MÍNIMOS CUADRADOS DE CADA UNO DE LOS GENOTIPOS OBTENIDAS MEDIANTE UN MODELO LINEAL GENERALIZADO (GML) Y GRAFICADAS EN LOS AMBIENTES: PIERES, CABILDO Y BARROW PARA LOS CARACTERES: (A) CPC, (B) CIE B*, (C) PMG, (D) PH, (E) PGP, (F) CIE L* Y (G) CIE A* EN EL AÑO EN QUE SE REALIZARON LAS EXPERIENCIAS DE CAMPO (2011).	73
FIGURA 19. AGRUPAMIENTO DE 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL DE DISTINTOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS BASADO EN EL ANÁLISIS UPGMA A PARTIR DE LA DISTANCIA GENÉTICA BINARIA OBTENIDA MEDIANTE SEIS COMBINACIONES DE MARCADORES DE AFLPS.	90
FIGURA 20. AGRUPAMIENTO POR ORIGEN BASADO EN EL ANÁLISIS UPGMA DE 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL OBTENIDO A PARTIR DE LA DISTANCIA GENÉTICA BINARIA UTILIZANDO SEIS COMBINACIONES DE AFLPS.	91

FIGURA 21. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA) PARA POBLACIONES DE GENOTIPOS ARGENTINOS, ITALIANOS, FRANCESES, DE LA REGIÓN DE WANA, DE CIMMYT Y DE EE.UU UTILIZANDO DATOS DE AFLPS.....	92
FIGURA 22. NÚMERO DE SUBGRUPOS (K:6) INFERIDOS POR EL PROGRAMA STRUCTURE HARVESTER (EARL Y VONHOLDT, 2012) A TRAVÉS DE LA METODOLOGÍA DE EVANNO <i>ET AL.</i> (2005). EN EL EJE Y SE ENCUENTRAN LOS VALORES DE ΔK OBTENIDOS PARA CADA VALOR K PARA 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL DE DISTINTOS ORÍGENES GEOGRÁFICOS.....	95
FIGURA 23. ESTRUCTURA POBLACIONAL. GRAFICO DE BARRAS DE 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL GENERADO POR STRUCTURE V. 2.3.3. SE MUESTRA LA PROPORCIÓN TOTAL DE MIEMBROS DE LA POBLACIÓN QUE CONSTITUYEN CADA UNO DE LOS SEIS SUBGRUPOS (K=6), EN FUNCIÓN DEL ANÁLISIS BAYESIANO UTILIZANDO EL MODELO ADMIXTURE Y FRECUENCIAS ALÉLICAS CORRELACIONADAS, NO SE INDICÓ GRADO DE PARENTESCO ENTRE GENOTIPOS. LAS AGRUPACIONES (K=6 POBLACIONES) SON IDENTIFICADAS CON COLORES (SUBPOBLACIONES ROJO (1), VERDE (2), AZUL (3), AMARILLO (4), ROSA (5) Y CELESTE (6)), CADA COLUMNA REPRESENTA UN GENOTIPO Y SE DIVIDE EN SEGMENTOS (PROBABILIDADES) QUE INDICAN SU ORIGEN GENÉTICO PROBABLE.....	98
FIGURA 24. MATRIZ DE DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO PARA SITIOS POLIMÓRFICOS. LOS SITIOS POLIMÓRFICOS FUERON GRAFICADOS EN EL EJE-X Y EN EL EJE-Y. EL CÁLCULO DEL DL DE A PARES (R^2) ESTÁ GRAFICADO EN LA PARTE SUPERIOR DE LA DIAGONAL, CON LOS CORRESPONDIENTES VALORES-P PARA LA PRUEBA EXACTA DE FISHER, QUE SE MUESTRA DEBAJO DE LA DIAGONAL. ESTA FIGURA REPRESENTA GRAFICAMENTE LAS 6612 COMBINACIONES GENERADAS POR LOS 116 MARCADORES AFLP. LOS PUNTOS ROJOS REPRESENTAN AQUELLOS MARCADORES QUE SE ENCUENTRAN EN DL(42). ESTE GRÁFICO FUE GENERADO UTILIZANDO EL PROGRAMA TASSEL (BRADBURY ET AL., 2007) PARA 118 GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL.....	101
FIGURA 25. A) ALINEAMIENTO ENTRE GENES <i>ZDS</i> DE <i>TRITICUM AESTIVUM</i> VAR. <i>CHINESE SPRING TAZDS-A-IWGSC</i> Y <i>TAZDS-B-IWGSC</i> Y CV. <i>ZHONGYOU9507 (TAZDS-A HQ703016</i> Y <i>TAZDS-D HQ703014)</i> , EN LA REGIÓN ENMARCADA POR LOS PRIMERS <i>ZDS-3F/3R</i> . SE SEÑALA EN AMARILLO LA DELECIÓN G(C/T)A Y LA INSERCIÓN DE ~300 BP EN LAS SECUENCIAS CORRESPONDIENTES AL GENOMA A DE <i>T. AESTIVUM</i> . LOS GENES DE LOS GENOMAS A, B Y D SE MUESTRAN EN ROJO, VERDE Y NEGRO, RESPECTIVAMENTE; B) REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL ALINEAMIENTO MOSTRADO EN A). LOS NÚMEROS REFIEREN A LA POSICIÓN EN BP EN EL AMPLICÓN.....	110
FIGURA 26. ALINEAMIENTO DE LOS GENES <i>ZDS</i> DE <i>TRITICUM AESTIVUM</i> VAR. <i>CHINESE SPRING (TAZDS-A_IWGSC</i> Y <i>TAZDS-B_IWGSC)</i> Y CV. <i>ZHONGYOU9507 (TAZDS-A HQ703016)</i> , CON LAS SECUENCIAS DEL GENOMA B OBTENIDOS EN <i>T. TURGIDUM</i> , <i>TtZDS-B1.1</i> (EN ROJO) Y <i>TtZDS-B1.2</i> (EN VERDE). SE SEÑALA EN AMARILLO LA DELECIÓN GCA DE <i>TtZDS-B1.2</i> , TAMBIÉN OBSERVADA EN <i>TAZDS-A</i> Y <i>TAZDS-A_IWGSC</i>	110
FIGURA 27. ALINEAMIENTO DE LAS REGIONES POLIMÓRFICAS DEL GEN <i>ZDS</i> IDENTIFICADAS EN LA REGIÓN DELIMITADA POR LOS CEBADORES <i>ZDS-3F/3R</i> ENTRE <i>T. AESTIVUM</i> VAR. <i>CHINESE SPRING (TAZDS-A_IWGSC</i> Y <i>TAZDS-B_IWGSC)</i> Y CV. <i>ZHONGYOU9507 (TAZDS-A)</i> , CON LAS LOS ALELOS DEL GENOMA A DE <i>T. TURGIDUM</i> , <i>TtZDS-A1.1a</i> , <i>TtZDS-A1.1b</i> (EN ROJO) Y <i>TtZDS-A1.2</i> (EN VERDE). SE SEÑALA EN AMARILLO LOS POLIMORFISMOS IDENTIFICADOS ENTRE EL SEXTO AL DÉCIMO EXÓN DEL GEN <i>ZDS</i> DEL GENOMAS A DE TRIGO CANDEAL.	111
FIGURA 28. ÁRBOL FILOGENÉTICO CONSTRUÍDO EN BASE A LA SECUENCIA DE LOS ALELOS IDENTIFICADOS EN LA REGION DEL GEN <i>Zds</i> CON LOS CEBADORES <i>Zds3F/3R</i> EN LOS GENOMAS A Y B DE TRIGO CANDEAL.	114
FIGURA 29. A) ALINEAMIENTO EN LA REGIÓN ENMARCADA POR LOS PRIMERS <i>ZDS-4F/5R</i> ENTRE LOS GENES <i>ZDS</i> DE <i>T. AESTIVUM</i> VAR. <i>CHINESE SPRING TAZDS-A_IWGSC</i> Y <i>TAZDS-B_IWGSC</i> Y CV. <i>ZHONGYOU9507 TAZDS-A1 (HQ703016)</i> Y <i>TAZDS-D1 (HQ703014)</i> , SE SEÑALAN EN AMARILLO LOS POLIMORFISMOS ENTRE LOS GENOMAS A, B Y D. LOS GENES DE LOS GENOMAS A, B Y D SE MUESTRAN EN ROJO, VERDE Y NEGRO, RESPECTIVAMENTE B) REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL ALINEAMIENTO MOSTRADO EN A). LOS NÚMEROS REFIEREN A LA POSICIÓN EN BP EN EL AMPLICÓN.	117
FIGURA 30. ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN POLIMÓRFICA ENTRE LOS GENOMAS A, B Y D DE TRIGO PAN INCLUIDA EN LA REGIÓN ENMARCADA POR LOS CEBADORES <i>Zds-4F/5R</i> JUNTO CON LOS FRAGMENTOS IDENTIFICADOS EN CANDEAL <i>TtZds-A2</i> (GENOMA A, EN ROJO) Y <i>TtZds-B2</i> (GENOMA B, EN VERDE). EL CEBADOR F733, QUE PERMITE AMPLIFICAR SELECTIVAMENTE EL GENOMA B, SE INDICA SOMBREADO EN VERDE.	118
FIGURA 31. ÁRBOL FILOGENÉTICO PARA LAS REGIONES DEL GEN <i>Zds</i> DE LOS GENOMAS A Y B DE TRIGO CANDEAL Y A Y D DE TRIGO PAN COMPREDIDAS ENTRE LOS CEBADORES <i>Zds-4F/5R</i>	119
FIGURA 32. GEL DE ACRILAMIDA DONDE SE MUESTRA EL POLIMORFISMO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE CEBADORES Yp2A-F/Yp2A-R QUE PERMITE DIFERENCIAR LA INSERCIÓN DE 4PB (CCTA) QUE PRESENTA EL	

ALELO *TdZds-A11.2* EN LA VARIEDADES: 1:BONINTACARILO, 5:VF 0113, 10:AMARILLO, 11:GABBIANO,
14:JOYAU, 20: KARUR, 21:NEODUR, 22:GARIC, 23:EXELDUR, M1 Y M2 MARCADORES MOLECULARES. 120

1. INTRODUCCIÓN.

Los cereales son el alimento básico de la humanidad, siendo el trigo el tercero más consumido después del arroz y el maíz. El trigo (*Triticum* spp.) es un cultivo extensivo, que actualmente ocupa más área sembrada que cualquier otro cultivo comercial, con cerca de 16,3 millones de hectáreas sembradas en todo el mundo (International Grains Council 2015). Durante los últimos cincuenta años, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se han centrado en estimar la población mundial que sufre hambre o la llamada malnutrición proteicoenergética. En la última década, la malnutrición debida a deficiencias en micronutrientes ha sido identificada como la principal causa de los numerosos problemas de salud existentes en los países subdesarrollados (Graham *et al.*, 1999; Toenniessen, 2003). En estas zonas geográficas la fortificación de alimentos procesados, algo que en países desarrollados es una práctica habitual, no resulta ser una buena alternativa para combatir dichas carencias nutricionales. El limitado desarrollo de la industria alimentaria e infraestructura en estos países serían las principales causas (Pfeiffer & McClafferty, 2007). Es por esta razón que el desarrollo de marcadores moleculares que puedan ser usados en programas de mejoramiento para obtener variedades que contengan los caracteres deseados para suplir deficiencias nutricionales, como también ambientales, y potenciar el cultivo de trigo candeal como biofábrica, ha experimentado un creciente interés en la comunidad científica.

Los vegetales son considerados como la fuente primaria de obtención de micronutrientes, tanto minerales como orgánicos. Durante las últimas décadas los esfuerzos para la mejora de los alimentos de origen vegetal han sido intensos, en especial en lo relativo a las características agronómicas y a la optimización del contenido en macro y micronutrientes y precursores de vitaminas, como lo son los pigmentos carotenoides (PC) y/o caracteres de calidad, tales como peso hectolítrico (PH), peso de mil granos (PMG), rendimiento (kg/ha), entre otros. El trigo no solo representa una fuente importante de hidratos de carbono, y en menor medida de proteínas, sino que además contiene minerales, vitaminas y antioxidantes. Dentro de estos últimos se encuentran los pigmentos carotenoides, que, además de ser precursores de vitaminas y

antioxidantes, revisten gran interés debido a que dan el color amarillo a los granos de trigo por lo que su alta concentración es requerida en el producto final, la pasta.

1.1 El cultivo.

1.1.1 Centro de origen y filogenia del trigo.

El centro de origen y diversidad del cultivo se ubica en la antigua Mesopotamia Asiática (Figura 1), que actualmente comprende la zona del Cercano Oriente. Las primeras evidencias paleoarqueológicas localizan el cultivo del trigo en las regiones correspondientes a los actuales países Siria, Jordania, Turquía e Iraq. Existen hallazgos de granos de trigo (*Triticum dicoccoides*) y huellas de granos en barro cocido en Jarmo (Iraq septentrional), datados en torno al año 6.700 a.C. Hace unos 10.000 años, el trigo silvestre experimentó una serie de eventos de hibridación natural, dando como resultado una planta con semillas más grandes y difícilmente diseminadas por el viento. El éxito de este vegetal en estado silvestre era limitado, siendo la domesticación por parte del hombre el factor que posibilitó su utilización, provocando una auténtica revolución agrícola en la denominada Media Luna Fértil, región histórica que abarcaba parte de los territorios del Antiguo Egipto, el Levante Mediterráneo y la Mesopotamia (Figura 1).

Desde el punto de vista filogenético, las especies de trigo constituyen una serie clásica de poliploides que tienen como base una dotación de siete cromosomas (Akhunov *et al.*, 2005). En 1753, Carl von Linneo propuso una primera clasificación de los trigos basándose en diferencias fisiológicas y morfológicas. Posteriormente, y como resultado de los trabajos en citogenética de Sakamura en 1918, apareció una nueva clasificación que atendía al número de cromosomas presentes en cada tipo morfológico previamente reconocido. Después de este descubrimiento básico, un gran número de botánicos y genetistas propusieron sus propias clasificaciones.



Figura 1. La domesticación de los cereales. La zona verde sobre el mapa muestra la región del Cercano Oriente (Israel, Jordania, Turquía, Siria, Irán e Iraq), conocido como Media Luna Fértil, donde se realizaron los primeros hallazgos arqueológicos del cultivo del trigo (Feuillet et al., 2007).

Actualmente, la clasificación más aceptada es la de Mac Key (Mac Key, 1988), debido a que es una de las que más respeta las reglas de la nomenclatura botánica y la única que otorga igual importancia a los criterios morfológicos, fisiológicos, citológicos, genéticos, bioquímicos y evolutivos (Figura 2).

En la historia evolutiva del trigo (Figura 3) cobran especial relevancia las especies *Triticum urartu* (trigo Einkorn, con dotación genómica AA), *Aegilops speltoides* (gramínea silvestre, con genoma SS, el cual contribuyó con el genoma B) y *Aegilops tauschii* (Goatgrass, con dotación genómica DD), ya que son respectivamente las fuentes diploides inmediatas o parientes más cercanos, portadores de los genomas A, B y D de los trigos poliploides (Dvorak et al., 1998; Akhunov et al., 2005). La primera sección en la clasificación del género *Triticum* está constituida por los trigos diploides, que presentan la dotación genómica más simple, genoma AA y 14 cromosomas. Este grupo se considera el más ancestral en la evolución del trigo. Existen dos líneas evolutivas de trigos diploides, portadoras de dos genomas A distintos, distinguiéndose el procedente de *T. urartu* (Tumanian ex Gandilyan, Einkorn wheat), y el genoma A de *Triticum boeoticum* (Boiss.), el cual se ha propuesto como el ancestro del genoma A de *Triticum monococcum* L. (Golovnina et al., 2007).

Género *Triticum* L. (Clasificación propuesta por Mac Key, 1988).

Section Monococca Flaksb.

Triticum monococcum L.

subsp. *monococcum*

subsp. *boeoticum* (Boiss.) Á. Löve & D. Löve

var. *aegilopoides* (Link) MacKey

var. *thaoudar* (Reuter in Bourg. ex Hauskn.) Percival

Triticum urartu Tumanian ex Gandilyan

Section Dicoccoidea Flaksb.

Triticum turgidum L.

subsp. *turgidum*

var. *turgidum*

var. *durum* (Desf.) MacKey

var. *turancium* (Jakubz.) MacKey

var. *polonicum* (L.) MacKey

subsp. *carthlicum* (Nevski in Kom.) Á. Löve & D. Löve

subsp. *dicoccum* (Schrank ex Schüler) Thell.

subsp. *georgicum* (Dekapr. & Menabde) MacKey

subsp. *dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebner) Thell.

Triticum timopheevii (Zhuk.) Zhuk.

subsp. *timopheevii*

subsp. *armeniicum* (Jakubz.) MacKey

Section Speltoidea Flaksb.

Triticum aestivum L.

subsp. *aestivum*

subsp. *compactum* (Host) MacKey

subsp. *macha* (Dekapr. & Menabde) MacKey

subsp. *spelta* (L.) Thell.

subsp. *sphaerococcum* (Percival) MacKey

Triticum zhukovskyi Menabde & Ericzjan

Figura 2. Clasificación del género *Triticum* propuesta por Mac Key en 1988.

Los trigos tetraploides comprenden un conjunto de especies de dotación genética AABB y un total de 28 cromosomas. En este grupo destaca *T. turgidum* L., para el cual se pueden citar las siguientes subespecies: subsp. *Turgidum* (trigo duro), subsp. *Carthlicum* (Nevski in Kom.) Á. Löve & D. Löve, subsp. *Dicoccum* (Schrank ex Schüler) Thell, subsp. *georgicum* (Dekapr. & Menabde) Mackey, y subsp. *dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebner).

Se considera que el primer paso en la evolución de los trigos cultivados fue la formación de *T. turgidum subsp. dicoccoides* (Schneider *et al.*, 2008). Estos trigos tetraploides proceden de la hibridación de dos especies diploides silvestres, una probablemente cercana a *A. speltoides* Tausch. (Genoma BB aunque generalmente es designado por SS) y *T. urartu tumanian* (trigo Einkorn, genoma AA) (Akhunov *et al.*, 2005; Jauhar, 2006; Petersen *et al.*, 2006). Estas dos especies habrían hibridado hace aproximadamente medio millón de años y produjeron un híbrido tetraploide ancestral denominada trigo Emmer (Figuras 4 y 5).

El donante del genoma B sigue siendo dudoso, a pesar de los numerosos estudios filogenéticos y el empleo de herramientas genéticas cada vez más precisas y sofisticadas (Schneider *et al.*, 2008). La hipótesis más aceptada actualmente considera el origen del genoma B del trigo de naturaleza polifilética. Esta hipótesis está basada en estudios moleculares realizados con secuencias de ADN no codificantes de bajo número de copias (Liu *et al.*, 2003a; Golovnina *et al.*, 2007).

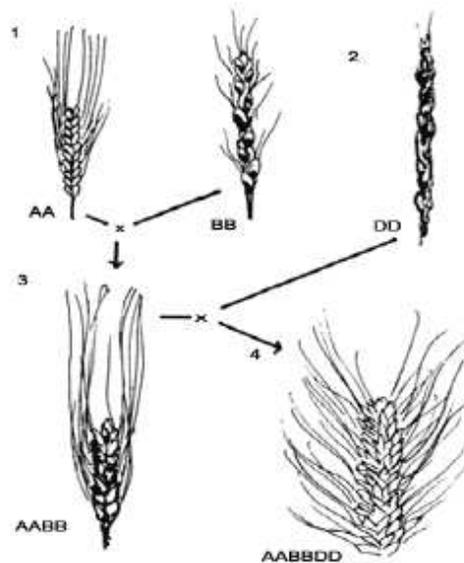


Figura 3 Evolución del trigo durante la domesticación (Mangelsdorf, 1953). 1. Trigo Einkorn, diploide con 14 cromosomas; 2. Pastos silvestres del género *Aegilops*; 3. Trigo Emmer, duro tetraploide con 28 cromosomas. 4. Trigo hexaploide con 42 cromosomas, comúnmente usado para elaborar pan.



Figura 4. Espigas y granos de trigos Einkorn, Emmer y Spelt. (www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/V3-156.html)

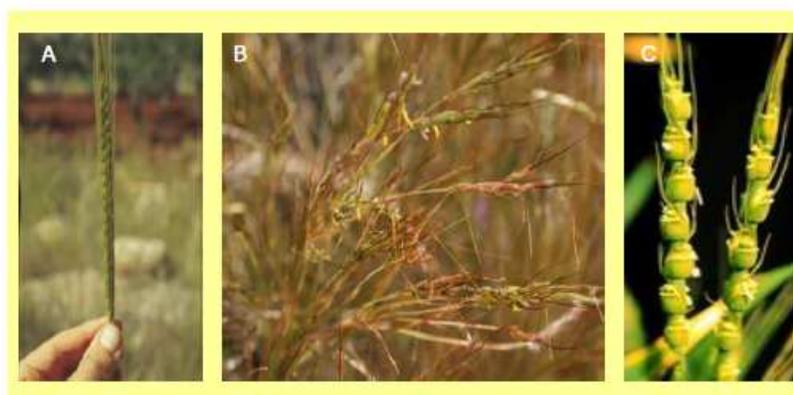


Figura 5. Espigas de *Triticum urartu* L. (A); Espigas de *Aegilops speltoides*. (B); Espigas de *Aegilops tauschii*(C). http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/trigo/inflores.htm.

1.1.2 Botánica, cultivo de la planta y tipos de trigos.

El trigo es una planta anual, herbácea perteneciente al género *Triticum* familia Poaceae y orden Poales dentro de la clase Liliopsida y división Magnoliophyta. La altura de la planta, incluyendo la espiga, puede variar desde los 30 cm hasta los 150 cm, en función de las condiciones de crecimiento y la variedad. El tallo del trigo es una caña hueca, poco ramificada, con seis nudos y entrenudos. El entrenudo superior, denominado pedúnculo, sujeta a la característica espiga (Pallarés *et al.*, 2007). Las espigas son inflorescencias compuestas por 15 a 25 espiguillas sésiles dispuestas en torno a un raquis o eje central (Figura 6). Cada espiguilla presenta externamente dos brácteas denominadas glumas, y contiene tres a cinco antecios dispuestos sobre una raquilla.

Cada uno de los antecios se compone de una lema o glumela inferior, de una pálea o glumela superior y de una flor (Figura 7). Entre la lema y la pálea se situará el grano, desarrollado a partir de la flor. Normalmente uno o dos antecios son estériles, generándose un máximo de dos a tres flores fértiles por espiguilla. Cada flor está compuesta por tres estambres y por dos estigmas plumosos, que nacen directamente del ovario (Figuras 8 y 9); todas las estructuras de la flor se encuentran protegidas por dos brácteas: lema, la más externa y pálea, la más interna. La flor, que se autopoliniza, proyecta sus estambres al exterior del antecio una vez que ha ocurrido la antesis (Kirby, 2002).



Figura 6. Espiga del trigo candeal y estructura del raquis.
http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/trigo/inflores.htm

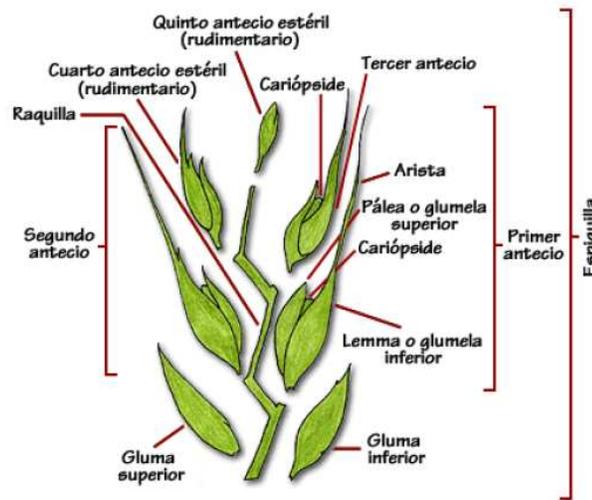


Figura 7. Espiguilla del trigo compuesta por 5 antecios.
http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/trigo/inflores.htm.

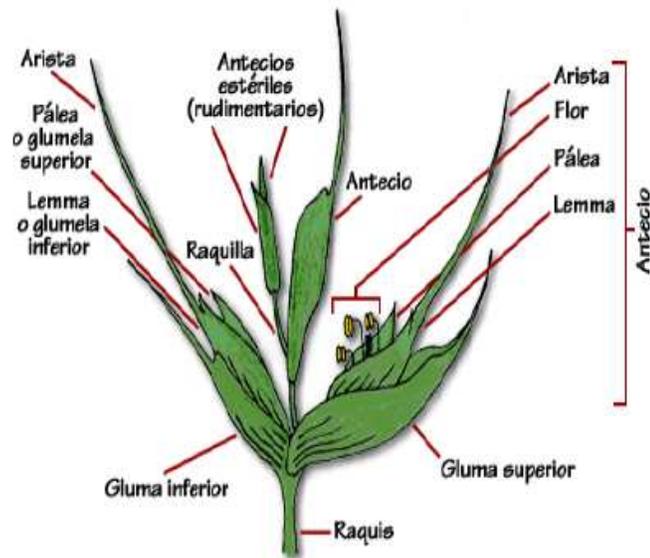


Figura 8. Componentes de una espiguilla de trigo.
http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/trigo/inflores.htm

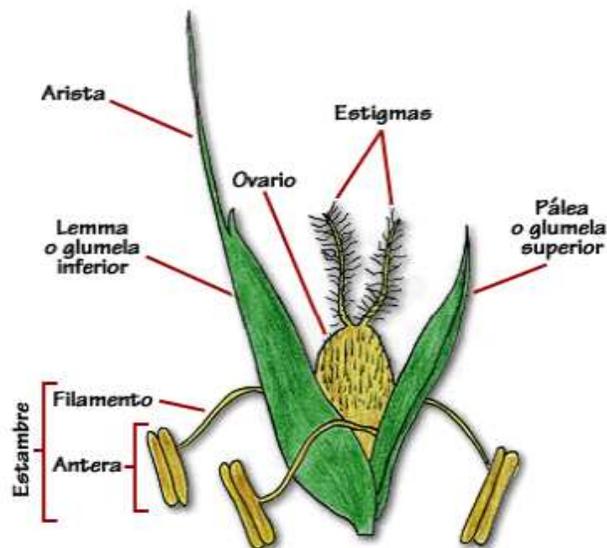


Figura 9. Antecio de trigo candeal y sus principales estructuras.
http://www7.uc.cl/sw_educ/cultivos/cereales/trigo/inflores.htm

Al tratarse de monocotiledóneas, los granos de los cereales tienen un solo cotiledón (Delcour & Hoseney 2010), presentando una testa fundida con el pericarpio por lo que el grano puede ser considerado un fruto de una sola semilla, conocido con el nombre de cariósipide. La forma del grano suele ser ovalada, y en su estructura (Figura10) se pueden diferenciar tres partes principales: el salvado (parte externa), el germen o embrión y el endosperma (parte más interna). El germen es una estructura de pared fina que contiene a la nueva planta, sobresale en uno de los extremos del grano. El resto del grano se denomina endosperma, el cual constituye el alimento para el embrión, representando casi el 85% del peso del grano. El endosperma a su vez se encuentra rodeado por la capa de aleurona conformada por dos o tres capas de células. A lo largo de la cara ventral del grano hay una depresión (surco), generada por una invaginación de la aleurona y resto de cubiertas. En el fondo del surco hay una zona vascular fuertemente pigmentada. Las capas más externas del grano se denominan pericarpio (derivado del ovario) y la testa o abrigo de la semilla. El pericarpio y la testa, junto con la capa de aleurona, conforman el salvado de trigo.

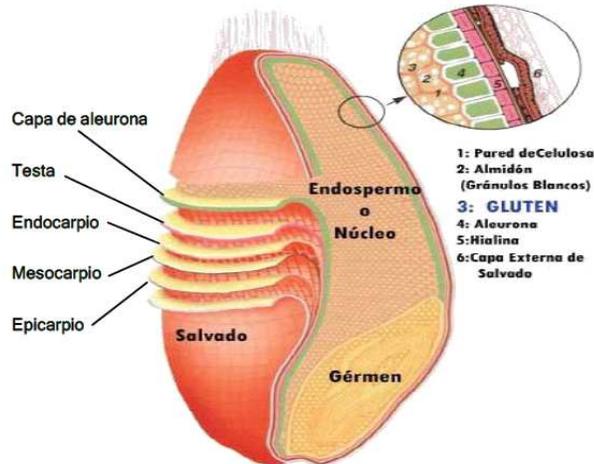


Figura 10. Estructura del grano (cariopse) de trigo candeal y sus respectivas partes.

El ciclo de crecimiento del trigo se divide en tres períodos: vegetativo, que comprende desde la siembra hasta el comienzo del encañado; reproductivo, que va desde el encañado hasta la terminación del espigado y de maduración, que comprende desde el final del espigado hasta el momento de la recolección (Figura. 11).

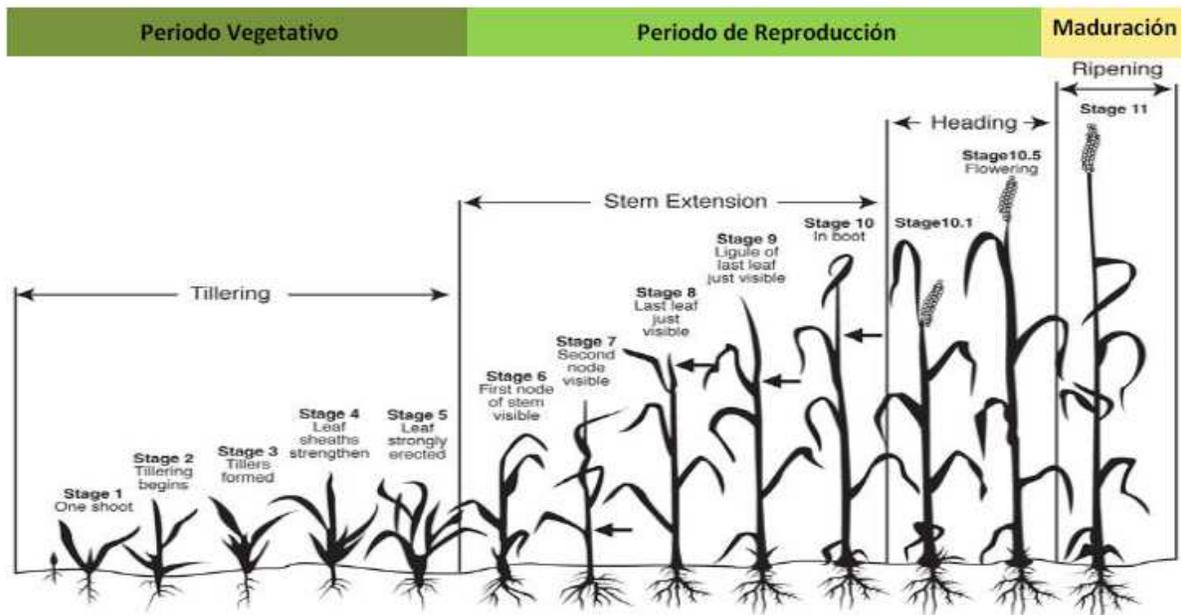


Figura 11. Esquema del ciclo ontogénico del cultivo de trigo candeal (adaptado de Slafer & Rawson, 1994).

El tiempo necesario para que se produzcan los procesos de crecimiento de la planta son muy variables y dependen fundamentalmente de la variedad. En este sentido, se pueden distinguir variedades denominadas de ciclo corto y de ciclo largo. El rendimiento de los cultivos y la calidad del trigo dependerán de múltiples factores, entre los que cabe destacar la variedad, la fertilización, la disponibilidad de agua, el control de malezas y plagas, y el momento de la cosecha.

1.2 El trigo candeal en la Argentina

Las pastas más valoradas por los consumidores se producen a partir de sémolas de trigo candeal o fideo (*Triticum turgidum* L. spp. durum), que es mayoritariamente producido en el sudeste de la provincia de Bs. As. Históricamente, la producción de trigo fideo respecto a la cosecha triguera total ha sido del 1% (<http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>)

En la campaña 2011/12, campaña de la cual se tienen datos fenotípicos y genotipos para este trabajo (Figura 12), se obtuvieron casi 183 mil toneladas de candeal, que se repartieron entre tres provincias, Buenos Aires, Tucumán y San Luis. Durante las últimas campañas, Buenos Aires ha liderado con amplitud la producción de este trigo, considerado a nivel comercial como una especialidad. Desde el año 2010, al sector molinero ingresan anualmente más 200 mil toneladas para su industrialización, observándose en el período 2007 - 2012 una tendencia general creciente (<http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>). La misma guarda relación con importantes inversiones realizadas en estos últimos años.

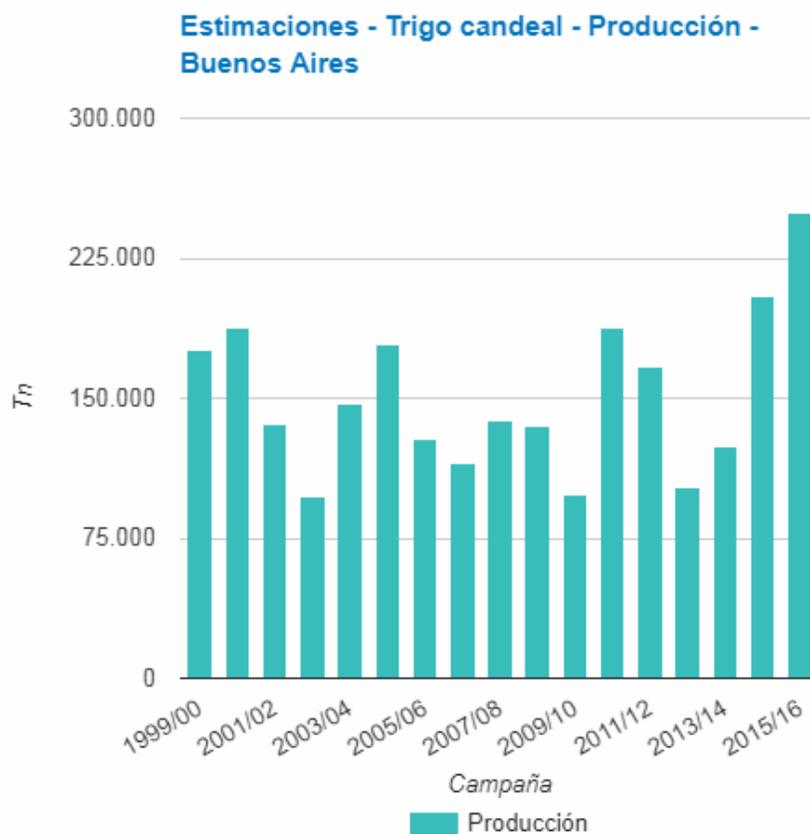


Figura 12. Producción en toneladas (Tn), obtenido en las últimas 14 campañas en la Pcia. de Buenos Aires (<http://www.siiia.gov.ar/>)

Actualmente la producción de trigo candeal en la Argentina se efectúa por contrato entre productores y molineros o empresas fideeras, donde se firma la compra del total de la producción. La producción de granos en los últimos años alcanzó ventas de 37 a 84 millones de tn por año. Como consecuencia de la implementación del nuevo esquema productivo de la zona pampeana, que se centra en una agricultura intensiva, con sistemas de siembra directa continua, la producción nacional alcanzó las 100.000 tn anuales.

1.3 Área de cultivo del trigo candeal en la provincia de Buenos Aires

El área de cultivo del trigo candeal se extiende sobre las subregiones trigueras IV y V sur (sudeste y sudoeste de Buenos Aires y parte de la Pampa). Esta región presenta lluvias fuertes antes o durante el periodo de cosecha, lo cual puede afectar la calidad de los granos por lavado,

provocando frecuentes variaciones en la calidad del trigo cultivado. La región se divide en tres subregiones: sudeste, centro-sur y sudoeste.

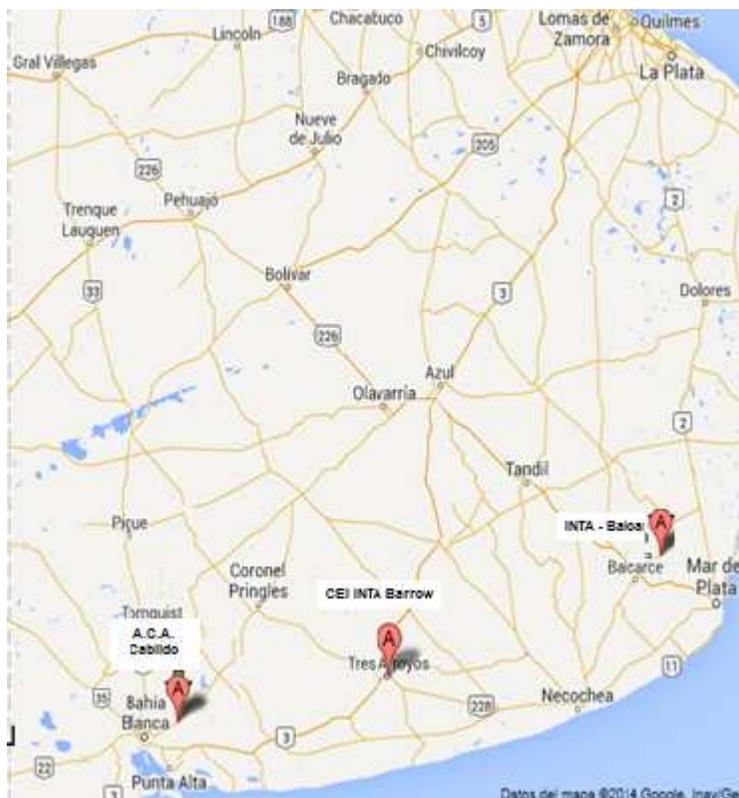


Figura 13 Localidades de estudio del trigo candeal en la Pcia de Buenos Aires, Argentina. Se identifican en la figura A.C.A Cabildo, CEI INTA Barrow e INTA Balcarce(Pieres).

1.3.1 Región Sudoeste

Es una región de características secas y frías. El clima transita de sub-húmedo (N/E) a semiárido (S/O), variando la precipitación media de noroeste a sudoeste, con 750 y 550 mm, con picos en otoño y primavera. Durante los meses de desarrollo del cultivo (julio a diciembre) la precipitación media anual varía entre 250 y 280 mm. La temperatura media anual es de 15°C, con medias en enero de 19°C a 25°C y en julio de 7°C a 9°C. El periodo libre de heladas es de 215 a 275 días, según la zona (Carbajo *et al.*, 2001). En esta región (Figura 13) existe una alternancia permanente de masas de aire de distinta índole, con una gran variabilidad en las condiciones climáticas, hecho que se pone de manifiesto en todas las estaciones del año. En la

última década las zonas trigueras de la provincia de Buenos Aires han sufrido grandes pérdidas en producción debidas a periodos de sequía y heladas tardías (Magra *et al.*, 2005; INTA).

1.3.2 Estado actual del cultivo en la zona semiárida bonaerense

Como se mencionara previamente, el trigo candeal se siembra bajo la modalidad de contrato entre productor e industria fideera. Existen bonificaciones (cuyos valores son específicos para cada modalidad de contrato), entre las cuales se destacan aquellas otorgadas por el contenido porcentual de gluten y proteína y el porcentaje de vitreosidad. Las bonificaciones pueden oscilar entre un 15 y un 40 % sobre el “precio de referencia ó base” de trigo pan. El trigo candeal tiene la ventaja operativa de que se entrega a cosecha, en el lugar pactado (acopio/fábrica), sin necesidad de almacenarlo. Se le descuenta el costo del flete al puerto de referencia, con independencia del lugar de entrega física de la mercadería. Existen actualmente unas 1.500 empresas elaboradoras de pasta, de las cuales el 95% son PYMES, mientras el 5% restante corresponde a grandes empresas (<http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>). Agronómicamente, el cultivo de candeal resulta interesante para complementar al trigo pan dentro de la rotación. Se lo incluye en los mejores ambientes para optimizar el manejo del nitrógeno, ya que el trigo candeal debe tener un alto porcentaje de proteína y de gluten. Los problemas más frecuentes de calidad que se presentan en las subregiones trigueras IV y V sur son la merma en el porcentaje de proteína en grano y el escaso color amarillo de sus sémolas.

1.4 Consumo, producción y exportación

En 2013 la molienda nacional de trigo candeal alcanzó las 267.000 tn (Lezcano, 2014). El consumo anual de pastas es de 8,3 kg por persona por año, aunque esta cifra incluye pastas elaboradas con trigo pan y trigo candeal, ya que no hay datos oficiales disgregados para cada especie (Tabla 1). La empresa Molinos Río de la Plata lidera el mercado interno y triplica la producción de su competidor más cercano. Su marca de fideos Matarazzo representaba el 14,4 % del volumen de ventas en 2011. La aparición de la Cía. Molinera del Sur en Bahía Blanca (Buenos Aires), principal exportadora de sémolas del país y el afianzamiento del Molino Tres Arroyos (que elabora fideos de excelente calidad), colaboran a su estabilidad. Estudios realizados

aseguran que el consumo de pastas puede duplicarse en los próximos años, ya que los consumidores buscan platos saludables, nutritivos, fáciles de cocinar y con buena relación precio-beneficio (Lezcano, 2013).

Tabla 1 Consumo de pastas en el mundo Fuente: IPO Annual Survey on World Pasta Industry (2014).
País/Kg de pasta consumido por habitante por año.

1. Italia	25,3	7. Iran	8,5
2. Túnez	16	8. Chile	8,4
3. Venezuela	12,2	9. Argentina	8,3
4. Grecia	11,5	10. Perú	8,2
5. Suiza	9,2	11. Francia	8,1
6. Estados Unidos	8,8	12. Alemania	8,0

Leyenda: En la Argentina un ciudadano promedio consumio alrededor de 8,3 kg de pasta en el año 2014.

El cultivo de trigo candeal en Argentina tiene toda la potencialidad para volver a difundirse frente a una sostenida demanda mundial por grano y/o sémolas de alta calidad. Es un mercado que se debe recuperar, para convertir a la Argentina en abastecedor de Europa, América Latina y el Norte de África.

1.5. Principales usos del trigo candeal en el mundo.

El trigo candeal se caracteriza por presentar un grano de gran dureza, razón por la cual se obtienen sémolas de una granulometría mayor que las de las que resultan de harinas provenientes de trigo pan. Este tipo de sémolas son destinadas principalmente para la elaboración de pastas “al dente” (pasta al estilo italiano), pastas alimenticias secas, que pueden ser prensadas (pastas largas y cortas, nidos, roscas, etc.) ó laminadas (lasañas, macarrones, spaghetti, vermicelli) y frescas. Estos son los usos que le dan los habitantes de países europeos y de América, mientras que en países orientales y del mediterráneo se usa este tipo de sémola en preparaciones de couscous o trigo burgol y en preparación de pan (Quaglia *et al.*, 1988) y postres (Seghezzo & Molfese, 1999). En Italia, Grecia y Francia se exige por ley usar sémolas de trigo candeal para la elaboración de pastas. Esta medida asegura una serie de propiedades y ventajas relacionadas con la calidad del producto final, tales como sabor, textura y cocción. Como subproducto de la

molienda del candeal se encuentra el semolín, que presenta una granulometría intermedia entre la sémola y la harina y se utiliza para elaborar pastas como los ñoquis, ravioles, sorrentinos y algunos tipos de panes en las regiones mediterráneas. En el Norte de África y en el cercano oriente se consume el grano del candeal entero o partido (couscous) en comidas regionales o étnicas.

1.6 Calidad de los granos del trigo candeal

1.6.1 ¿Qué es calidad?

La palabra calidad proviene del latín “qualitas”, que significa atributo, propiedad o naturaleza básica de un objeto. En la actualidad, es utilizada como sinónimo de “grado de excelencia o superioridad”. Bajo esta definición, un producto es de mejor calidad cuando es superior en uno o varios atributos que son valorados objetiva o subjetivamente. La calidad de los granos esta sujeta a la composición final de los mismos y depende de factores genéticos, ambientales, interacciones genético-ambientales, agronómicos, botánicos, ecofisiológicos, bioquímicos y determinantes de los procesos industriales.

1.6.2 Calidad del trigo candeal.

El uso final que tendrá un lote particular de granos se encuentra asociado a su composición. Por lo tanto, la definición de calidad depende del uso que se dará al producto y se encuentra determinada por los requerimientos específicos de aquellos que desean moler, procesar o ingerir un grano determinado. Los mercados de granos cada vez son más especializados y existirá, en el futuro, mayor presión para obtener granos de calidad elevada y estable.

El genotipo va a condicionar la calidad y cantidad de proteína del grano, las propiedades específicas del almidón, la dureza, el rendimiento molinero, la resistencia al brotado en espiga, el color del pericarpio, la calidad del gluten, el color de las sémolas y la reología de las masas. El ambiente, por su lado, va a tener mayor influencia en la sanidad del cultivo, el ciclo y la madurez del cultivar, el porcentaje de proteína del grano, el dañado del grano a cosecha, la humedad final y el porcentaje de vitreosidad.

La constitución del grano de trigo candeal permite lograr un balance óptimo entre tenacidad y extensibilidad, logrando formar una red fibrosa y elástica, que evita las deformaciones durante el secado de las pastas y también una mayor resistencia a la cocción, minimizando la extracción de almidón y por ende el “pegado” de los productos. Se considera al contenido de proteína en el grano, la fuerza, la elasticidad del gluten, la vitreosidad (Troccoli *et al.*, 2000) y el color como los principales factores involucrados en la calidad de la sémola del candeal que, en definitiva, redundan en las cualidades reológicas de la masa. La industria fideera prefiere los granos vítreos debido a su correlación positiva con el porcentaje de proteína y el rendimiento de sémola.

1.6.3 Contenido de pigmentos carotenoides (CPC).

El color amarillo de la pasta, preferido por los consumidores (Tróccoli *et al.*, 2000), está dado en gran parte por el contenido de pigmentos carotenoides (CPC) presentes en los granos, xantófilas luteína y flavonoides. El color característico de la sémola es la resultante de la combinación de dos procesos: la biosíntesis de los carotenoides y la degradación oxidativa de estos pigmentos por enzimas lipoxigenasas (LOX) durante el amasado. Además, por la acción de las enzimas peroxidasas (POD) y polifenol oxidasas (PPO) presentes en el grano (Roncallo *et al.*, 2009), se produce el amarronamiento de la sémola, siendo este último un proceso que se trata de evitar porque afecta el color amarillo. La oxidación del ácido linoleico en presencia de otras sustancias fácilmente oxidables, tales como betacaroteno, xantófilas y clorofilas, puede dar como resultado la oxidación acoplada de esas sustancias y la subsecuente degradación de dichos pigmentos (Roncallo *et al.*, 2009). La peroxidación de los lípidos insaturados es la reacción primaria, mientras que el blanqueado de los pigmentos es una reacción acoplada, ocasionada por los radicales libres, productos intermedios en la peroxidación (Garbus *et al.*, 2009). En trigo candeal, la expresión de los caracteres que determinan el color, como el contenido de β -caroteno, el índice de amarillez y la actividad de lipoxigenasas, está determinada en gran medida por el genotipo (Borrelli *et al.*, 2008). El color amarillo presente en la sémola y en la pasta es, por tradición, un parámetro de calidad, que era asumido como un carácter no funcional, pero sí de elección de los consumidores, al estar asociado con el uso exclusivo de sémola de trigo candeal. Recientemente, esta idea ha cambiado y no solo se considera importante el color amarillo por su aspecto visual, sino que también es un atributo de importancia a nivel nutricional, que otorga beneficios para la

salud debido a que algunos pigmentos carotenoides tienen actividad pro vitamínica A, vinculada con la prevención de diversas enfermedades degenerativas humanas. El color amarillo en la pasta puede incrementarse a través del mejoramiento genético, seleccionando genotipos portadores de genes para alto CPC y baja actividad de enzimas oxidativas, aunque también puede lograrse por el agregado de otras sustancias.

1.6.4 Biosíntesis de pigmentos carotenoides

El color de las frutas y vegetales está determinado principalmente por tres familias de pigmentos, clorofilas, carotenoides y antocianinas, que son responsables de la coloración verde, roja-amarilla y azul-violeta, respectivamente. Estos pigmentos cumplen una función observable, al actuar en la atracción de vectores que actúan en la diseminación de las semillas y frutos, asegurando así el éxito reproductivo y la perpetuación de la especie. Estos colores llamativos han sido seleccionados en el transcurso de la evolución y han ayudado a la fijación de otros caracteres.

Los carotenoides, después de las clorofilas, son los pigmentos presentes en los seres vivos más ampliamente distribuidos en la naturaleza. Están presentes en el reino vegetal, en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos (siendo responsables del color amarillo, naranja y rojo de la mayoría de los frutos) las bacterias, algas, hongos y animales. Los animales no pueden sintetizarlos y los incorporan a través de la dieta. Los carotenoides son, estructuralmente, los únicos tetraterpenos naturales, derivados de la unión de ocho unidades de isopreno que origina un esqueleto de 40 átomos de carbono. Se les clasifica en dos grandes grupos: carotenos (estrictamente hidrocarburos) y xantofilas, derivadas de los anteriores por incorporaciones de funciones oxigenadas. Los carotenoides pueden presentar estructura acíclica, como el licopeno o cíclica de cinco o seis carbonos en uno o ambos extremos como el β -caroteno. Se presentan en conformaciones *cis/trans*, dado el gran número de dobles enlaces de la cadena polienoica central, siendo la forma *trans* la más estable y presente en la naturaleza.

Los carotenoides se encuentran en las células vegetales en el interior de los cloroplastos y cromoplastos. El gran complejo de dobles enlaces conjugados de la cadena polienoica de los carotenoides conforma un cromóforo, estructura responsable de la absorción de luz visible y por

lo tanto, del color del compuesto, que, al absorber luz da lugar a los llamativos y característicos colores de estos compuestos.

Aunque el esquema general de la biosíntesis de carotenoides se conoce desde hace más de tres décadas (Figura 14), la descripción molecular solo fue posible con la identificación y clonación de los genes de las enzimas involucradas (Hirschberg, 2001). La mayoría de los genes que codifican para enzimas críticas que participan en esta vía en plantas han sido clonados (Fraser & Bramley, 2004). También se los conoce en levaduras, bacterias y algas (Yan *et al.*, 2005). La principal vía metabólica es común para la mayoría de las especies carotenogénicas e involucra más de diez pasos (Yan *et al.*, 2005). La primera enzima involucrada es la fitoeno sintasa (PSY), que une dos moléculas de geranil-geranil pirofosfato para formar fitoeno (Cunningham & Gantt, 1998), seguida por la fitoeno desaturasa (PDS) que produce ζ -caroteno y la ζ -caroteno desaturasa (ZDS), cuyo producto es el licopeno (Colasuonno *et al.*, 2017). El licopeno es el sustrato de dos ciclasas, la licopeno- ϵ -ciclasa (ϵ Lcy) y la licopeno- β -ciclasa (β Lcy), que catalizan la formación de diferentes carotenoides que, a través de subsecuentes modificaciones, dan lugar a la formación de luteína y/o carotenos (Fraser & Bramley, 2004). Este esquema se mantiene en todos los organismos que producen este tipo de pigmentos, con algunas modificaciones (Sun *et al.*, 1998; Arrach *et al.*, 2001; Rosati *et al.*, 2000). La enzima PSY sería el paso limitante de la reacción (Lindgren *et al.*, 2003; Cunningham & Gantt, 2001; Cunningham, 2002; Naik *et al.*, 2003). Dos genes funcionales para esta enzima, *Psy1* y *Psy2*, fueron identificados en arroz (*Oryza sativa L.*), maíz (*Zea mays L.*) y trigo pan (*Triticum aestivum L.*) (Gallagher *et al.* 2004). PSY1 estaría relacionada con la acumulación de carotenoides durante la etapa de llenado de los granos. En el endosperma de maíces amarillos se han detectado mayores niveles de transcriptos de *Psy1* que en el endosperma de arroz blanco (Gallagher *et al.*, 2004). La identificación de los genes involucrados en la síntesis de carotenoides ha posibilitado la manipulación genética de esta vía en plantas (Ye *et al.*, 2000; Dongliang *et al.*, 2007). A pesar de que se han realizado varios ensayos exitosos en la ingeniería metabólica de carotenos en plantas cultivadas, el mayor problema aún sin resolver es cómo incrementar el flujo de precursores metabólicos hacia la síntesis de los carotenoides sin afectar otras vías metabólicas relacionadas (Botella-Pavia *et al.*,

2004). Dentro de la Figura 14, en el recuadro marcado con una flecha, se muestra la enzima ZDS, debido a que el gen que codifica para esta enzima fue objeto de estudio de esta tesis.

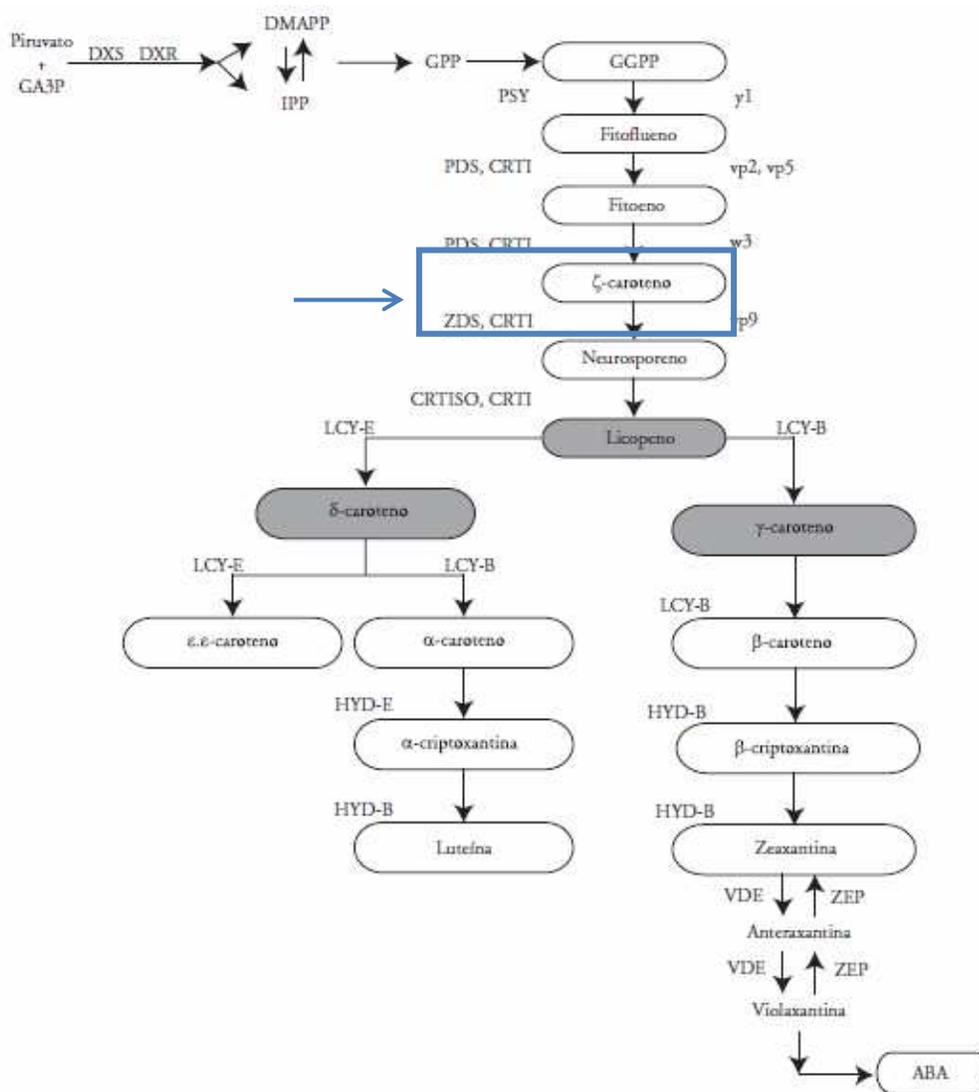


Figura 14. Ruta de biosíntesis de carotenoides (modificado de Naik *et al.*, 2003; Enfissi *et al.*, 2006; Jiket *et al.*, 2009).

1.6.5 Distribución de carotenoides en el grano.

Aunque el embrión es el lugar de mayor concentración de carotenoides en el grano de trigo, éste sólo comprende el 3-5% de la harina integral (Panfili *et al.*, 2004). El endosperma almidonoso

posee una concentración menor de carotenoides pero representa el 80% del grano (Ficco *et al.*, 2014). En consecuencia, la concentración de carotenoides en el endosperma es la que mayormente influye sobre el valor total. El tipo de pigmento también difiere en los distintos sectores del grano. El α - y β - caroteno y la zeaxantina están principalmente localizados en el embrión mientras la luteína, el pigmento más abundante, está igualmente distribuido a través del grano (Panfili *et al.*, 2004). En los países menos desarrollados, la molienda a mano reemplaza a la molienda industrial y esto hace que partes del embrión se incluyan en la harina, incrementando la concentración de carotenoides. Sin embargo, el contenido de aceite de este tejido acelera el enranciamiento e incrementa el contenido de enzimas oxidantes, reduciendo el tiempo potencial de almacenamiento de la harina (Humphries *et al.*, 2003). La distribución de carotenoides entre los distintos grupos de plantas no presenta un patrón único. En verduras, el contenido en carotenoides sigue el modelo general de los cloroplastos de todas las plantas superiores, siendo generalmente luteína, β -caroteno, violaxantina y neoxantina, en este orden, los mayoritarios. En pequeñas cantidades se encuentran zeaxantina, β -caroteno, criptoxantina y anteraxantina. En frutos, las xantofilas suelen encontrarse en mayor proporción, aunque en algunos casos, los pigmentos mayoritarios son carotenos, como es el caso del licopeno del tomate. En los animales, los carotenoides son incorporados a través de la dieta y se almacenan en el tejido adiposo sin transformarse.

1.6.6 Valor nutricional de los pigmentos carotenoides y biofortificación

El trigo es un alimento humano básico que aporta cantidades significativas de proteína y carbohidratos dietarios, y es también un recurso valioso de compuestos antioxidantes (Andlauer & Furst, 1998; Baublis *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2000). La concentración de carotenoides en trigo pan es baja (desde 0,1 a 2,4 mg/g), pero es más abundante en trigo candeal (1,5 a 4,0 mg/g), donde el color amarillo de la sémola y la pasta es percibido como un carácter de calidad (Hidalgo *et al.*, 2006). Por lo tanto, un aumento en la cantidad de estos compuestos en los granos de trigo aumentaría el valor nutricional de sus productos. Como ejemplo, puede citarse la incorporación de tres genes de la síntesis de β -caroteno al arroz, por transgénesis, dando origen al llamado arroz dorado, que cuenta con mejores propiedades nutricionales. En el proceso de biofortificación con

carotenoides de los cultivos, ya sea mediada por mejora vegetal clásica o asistida por ingeniería genética, un paso imprescindible es la caracterización exhaustiva del perfil de estos pigmentos existente en el vegetal. Este conocimiento facilita la exploración del metabolismo de los mismos, siendo este aspecto finalmente lo que se persigue. Los estudios dirigidos a mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de carotenoides en cereales se beneficiarán, sin duda, del conocimiento así generado, facilitando la orientación y recomendaciones al consumidor sobre la adecuación de los hábitos de procesado y consumo de los alimentos básicos.

Desde un punto de vista nutricional, se puede definir un antioxidante como aquella sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de especies reactivas como las del oxígeno y el nitrógeno, en condiciones fisiológicas normales en humanos (Bendich, 2000). Los carotenoides reducen el daño oxidativo sobre las membranas biológicas. Los simples y dobles enlaces repetidos en la cadena poliénica determinan sus propiedades antioxidantes, mientras que la presencia de grupos polares afectan su interacción con las membranas celulares (Carranco *et al.*, 2011). Actúan secuestrando radicales peróxido que están involucrados en ciertas enfermedades humanas y en los procesos de envejecimiento (Olson & Kobayashi, 1992, Rousseau *et al.*, 1992, Van Poppel *et al.*, 1993). La actividad antioxidante de estos pigmentos depende de una serie de factores, como su estructura química, su concentración, la presión parcial de oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E. En un principio estos estudios se llevaron a cabo basándose principalmente en el β -caroteno; el mecanismo de la actividad antioxidante de este compuesto está relacionado con su carácter hidrofóbico y con su capacidad para secuestrar el oxígeno sobrante y desactivar radicales libres.

1.7 Caracteres estudiados

El desarrollo del trabajo experimental que dio lugar a esta tesis, involucró el análisis de los parámetros, peso hectolítrico, peso de mil granos y color de los trigos cultivados, clasificados como caracteres cuantitativos (Moss, 1967). Se entiende por carácter cuantitativo aquel que es consecuencia de una base genética compleja, en la que lo habitual es la acción conjunta de varios genes, modulada por el ambiente en que dichos genes se expresan.

1.7.1 Peso hectolítrico (PH) y peso de mil granos (PMG).

El peso hectolítrico es el peso de un volumen de 100 litros de trigo expresado en kilogramos por hectolitro. Se trata de un factor primordial en la clasificación comercial del trigo candeal, ya que es fácil de medir y se asocia positivamente con la solidez de los granos y atributos de procesamiento tales como el rendimiento de la sémola, el cual está influenciado directamente por el tamaño del grano, la forma y la eficiencia de embalaje, e indirectamente por factores ambientales tales como la resistencia a enfermedades durante la germinación/desarrollo y estrés por agua y/o calor. El PH es, por lo tanto, un importante criterio de selección en los programas de mejoramiento de trigo candeal. Las mediciones usualmente requieren de 250-1000 g de granos limpios. Dado que se refiere a la cantidad de granos que ocupan un hectolitro, es un parámetro para la comercialización de granos, almacenaje y transporte, porque traduce la cantidad de materia seca de grano que hay en un volumen determinado. Cada una de las variedades tiene un PH específico y su uso es muy frecuente en cereales.

Tradicionalmente, un bajo PH está asociado con un bajo rendimiento de harina. Muchos trabajos han informado una elevada y positiva correlación entre un PH alto y un alto rendimiento de sémola (Marshall *et al.*, 1986; Barmore & Bequette 1965). Un PH elevado se asocia comúnmente con granos vitreos. El PH es afectado por el genotipo (forma y tamaño de la semilla) y diversos factores ambientales tales como enfermedades e insectos, que pueden causar rotura de los granos (Roth *et al.*, 1984; Blum *et al.*, 1991; Saadalla *et al.*, 1990). El PH es altamente heredable, con valores que van de 0,48 a 0,98 en trigo pan (Ghaderi & Everson, 1971; Teich *et al.*, 1984; Jalaluddin & Harrison, 1989) y de 0,94 a 0,97 en trigo candeal, (Nachit *et al.*, 1995a).

Con la excepción de una asociación negativa con plantas de baja altura, las correlaciones de PH con otros caracteres favorables suelen ser neutrales o positivas (Wells 1984; McClung 1985; Vallega 1985; Allan 1986; Marshall *et al.* 1986; Jalaluddin & Harrison 1989). Dexter *et al.* (1987), utilizando muestras comerciales de trigo candeal encontraron que el rendimiento de la sémola se asociaba positivamente con el PH (r^2 : 0,47 a 0,53) y el PMG (r^2 : 0,46 a 0,49). Sin embargo, un estudio con 22 cultivares de trigo candeal cosechado en 48 ambientes en Italia, arrojó asociaciones débiles entre el rendimiento de sémola y el PH (r^2 :0,20) y el PMG (r^2 :0,28) (Novaro *et al.*, 2001).

El PMG es un indicador del rendimiento de la harina, ya que el porcentaje de endosperma en granos de trigo de una misma variedad es normalmente mayor en granos más grandes. Dentro de las variedades de trigo candeal, el PMG puede variar entre 20 y más de 60 gramos. Un elevado PMG es un carácter deseable para la molienda y el procesamiento de la sémola. El PMG es afectado por el medio ambiente durante el llenado del grano, y por el número de espigas y de espiguillas fértiles por espiga. Se ha estimado que el número de genes que afectan este carácter varía de 1 a 4 o más en diferentes cruzamientos (Breseghello *et al.*, 2006). Roncallo *et al.*, 2012 estimaron heredabilidades en sentido estricto de intermedias a altas. Esto indica la alta participación del efecto genético en el PMG. Este carácter se ve afectado por enfermedades como royas (Singh *et al.* 2004; Fernández *et al.* 2002) y también por factores ambientales como las precipitaciones, lo que conlleva a la reducción de la calidad comercial y pérdidas económicas a los productores (Gan *et al.* 2000). Elouafi & Nachit (2004) identificaron dos QTL mayores para el PH en un cruzamiento de trigo candeal X *T. dicoccoides*, que explicó el 29% de la variación genética y cinco QTL para el PMG, que representaban el 25% de la variación genética. McCartney *et al.*, (2005) encontraron 10 QTL para el PH y 6 para PMG en trigo pan. Estos estudios confirman que las heredabilidades de PH y PMG en trigo candeal son altas y las diferencias relativas producidas por el genotipo son razonablemente estables sobre los ambientes. Por lo tanto, ambos caracteres pueden seleccionarse en generaciones iniciales con una expectativa de ganancia genética. Ambos caracteres parecen estar controlados o influenciados por un gran número de factores genéticos, lo que complica los esfuerzos para el desarrollo de marcadores de ADN como una herramienta de selección para estos caracteres (Clarke *et al.*, 2009).

1.7.2 Color amarillo de la harina

Existe una gran diversidad genética para el color de la harina, donde las variaciones en el brillo (CIE L*) se deben principalmente a factores ambientales, mientras que el amarillamiento es afectado predominantemente por el genotipo (Schulthess *et al.* 2013). El número y tipo de relación entre los genes involucrados en el CPC no ha sido completamente dilucidado. Uno de los primeros estudios encontró en algunos cruzamientos la participación de más de tres genes (Braaten *et al.*, 1962). Otros, informaron la presencia de uno o dos pares de genes mayores

involucrados en la expresión del CPC en la harina (Bhatt & McMaster, 1976). Más recientemente, Clarke *et al.* (2006) informaron que el número de genes involucrados en el CPC varió entre 3 y 27, según los progenitores usados en los cruzamientos y los ambientes en que se llevó a cabo el análisis. Santra *et al.* (2005) concluyeron que la herencia del contenido de β -caroteno está gobernada por al menos dos genes mayores y dos o tres genes menores con efectos modificatorios, observándose interacciones epistáticas aditiva x aditiva, aditiva x dominante y dominante x dominante en una de las cruzas. Sin embargo, otros autores no encontraron evidencias de efectos génicos epistáticos (Lee *et al.*, 1976; Johnston *et al.*, 1983). Todos estos estudios sugieren que la concentración de pigmentos es controlada en forma poligénica.

Los valores de heredabilidad informados para el CPC y el color amarillo (Minolta CIEb*) son moderados a altos (Braaten *et al.*, 1962; Bhatt & McMaster, 1976; Johnston *et al.*, 1983; Nachit *et al.*, 1995; Parker *et al.*, 1998; Mares & Campbell, 2001; Elouafi *et al.*, 2001; Santra *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006; Schulthess *et al.*, 2013; Colasuonno *et al.*, 2017). Se han hallado evidencias de interacción genotipo x ambiente (Schulthess *et al.*, 2013)). Aunque existe una leve preponderancia de efectos génicos aditivos (Elouafi *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2006), se observaron también efectos no aditivos sobre la concentración de pigmentos (Lee *et al.*, 1976). Algunos estudios sugieren la presencia de genes mayores sobre los cromosomas 2A y 2B (Dong *et al.*, 2007). Por otro lado, un bajo CPC fue heredado como carácter dominante en numerosas cruzas (Santra *et al.*, 2005).

El análisis de la distribución de frecuencias para color amarillo (CIE b*) y CPC en los cruzamientos facilita la identificación de genotipos destacados y es de utilidad en la selección fenotípica. La herencia del CPC y CIE b* demostró ser transgresiva bidireccional en trigo candeal (Bhatt & McMaster, 1976; Johnston *et al.*, 1983; Clarke *et al.*, 2006; Roncallo *et al.*, 2012, Roncallo *et al.*, 2016) y trigo pan (Parker *et al.*, 1998; Mares & Campbell, 2001). También se observó herencia transgresiva negativa en ambientes estresantes (Elouafi *et al.*, 2001; Santra *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006). La segregación transgresiva se explica por la presencia de genes/QTL de efecto antagónico en ambos parentales. Se observó que el número de individuos transgresivos varía entre ambientes (Clarke *et al.*, 2006).

Según informaron Santra *et al.* (2005), la distribución de frecuencias para el CPC en poblaciones F_2 no fue normal y estuvo orientada hacia el parental con menor valor para el carácter. Por otro lado, Clarke *et al.* (2006) identificaron cruzas que exhibieron una distribución normal. En trigo hexaploide, se encontró que la distribución del color de la harina (CIE b^*) en una población de RILs fue bimodal en un ensayo y normal en otros dos (Parker *et al.*, 1998). Esto indicaría que el comportamiento de estos dos caracteres depende de las cruzas y los ambientes evaluados, por lo que será necesario profundizar su estudio para lograr comprender su complejidad. Schulthess *et al.*, (2013) encontraron en una colección de 18 cultivares de trigo candeal analizados en 30 ambientes de Chile que el análisis de varianza sobre los ambientes mostraba efectos altamente significativos para genotipo, ambiente y su interacción sobre los caracteres CPC, CIE b^* , CIE L^* y PMG. Las heredabilidades en sentido estricto (h^2) fueron de 0,82, 0,82, 0,48 y 0,07 para CPC, CIE b^* , CIE L^* y PMG, respectivamente.

Comparaciones entre ambientes regados y sin regar mostraron efectos significativos sobre el peso del grano y al menos en dos de los caracteres de color asociados. El color amarillo de la sémola (determinado por espectrofotometría o colorimetría) tiene una heredabilidad media a alta y es influenciado por el genotipo con valores medios a altos (Nachit *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 2006; Digesu *et al.*, 2009), pero también es influenciado por el ambiente (Bilgin *et al.*, 2010; Roncallo *et al.*, 2012) y por las interacciones genotipo x ambiente ($G \times E$) y los componentes del ambiente (Nachit *et al.*, 1995; Taghouti *et al.*, 2010; Roncallo *et al.*, 2012). Adicionalmente, el amarronamiento o bajo brillo es altamente influenciado por el ambiente (Autran *et al.*, 1986) a nivel de sémola (Roncallo *et al.*, 2012), con un alta significancia de interacción $G \times E$ (Roncallo *et al.*, 2012) y valores medios a altos en la heredabilidad a nivel de sémola (Digesu *et al.*, 2009; Roncallo *et al.*, 2012).

1.7.3 Pérdida del color por degradación enzimática de pigmentos

Un elevado contenido de carotenoides en la sémola no garantiza un buen color de la pasta. Durante el procesamiento se produce la pérdida de pigmentos y, por consiguiente, del color amarillo de la pasta, debido a la acción de enzimas oxidativas como las lipoxigenasas (Gargus *et al.*, 2009), peroxidasas y polifenol oxidasas (Melendez *et al.*, 2004). Otros factores relacionados con la pérdida de color son el contenido de proteína, que produce coloración marrón de la sémola

(Colasuonno *et al.*, 2017) y el contenido de cenizas (Sissons, 2004), aunque su efecto es secundario (Borrelli *et al.*, 1999). Se ha demostrado que existe una distribución desigual en el grano de las enzimas oxidativas que afectan el color de la sémola (Rani *et al.*, 2001). Los procesos tecnológicos de eliminación del salvado tienen un gran impacto sobre las actividades de LPX, POD y PPO, localizadas principalmente en las capas externas del grano (Borrelli *et al.*, 2008).

1.7.4 Enzimas de la vía de biosíntesis de pigmentos carotenoides

1.7.4.1 La enzima fitoeneo sintasa y su relación con el color amarillo del endosperma del grano del trigo candeal

La enzima fitoeneo sintasa (PSY) cataliza la dimerización de dos moléculas de difosfato geranilgeranil (GGDP) en fitoeno (Figura 14), siendo este el primer paso en la síntesis de la provitamina A (Dogbo *et al.*, 1988). Por ello, PSY es considerada la enzima limitante en la acumulación de carotenoides en las semillas (Lindgren *et al.*, 2003). En trigo solo se expresa en el endosperma (Toenniesesen, 2000). PSY introduce un doble enlace central 15-Z durante la eliminación de hidrógeno (Cunningham & Gantt, 1998). El fitoeno pasa luego por cuatro etapas secuenciales de desaturación, produciendo compuestos intermedios como neurosporeno, zetacaroteno (ζ -caroteno), y licopeno (en las plantas y las cianobacterias, estos pasos son catalizados por dos enzimas, la fitoeno desaturasa (PDS) (Bartley *et al.*, 1991) y ζ -caroteno desaturasa (ZDS) (Albrecht *et al.*, 1995), que media dos desaturaciones.

El gen *Psy1* se duplicó durante la evolución de las angiospermas, resultando en dos genes parálogos (*Psy1* y *Psy2*) en las dicotiledóneas, mientras que las monocotiledóneas presentan una copia adicional, resultando en los genes *Psy1*, *Psy2* y *Psy3* presentes en los genomas de las gramíneas (Dibari *et al.*, 2012). El gen *Psy1* contiene 6 exones y 5 intrones en trigo pan, trigo candeal y especies relacionadas como maíz, arroz (Wang *et al.*, 2009), y otras gramíneas (género *Sorghum*, *Tripsacum*, y *Zea*) (Fu *et al.*, 2009). El tamaño de los exones 2, 3, 4 y 5 está conservado en las gramíneas, no así el de los intrones (He *et al.*, 2008; Fu *et al.*, 2009, He *et al.*, 2009a; Singh *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2009).

La magnitud de la influencia del loci de *Psy1* en el endosperma amarillo del trigo es errática (Schulthess, 2013). Según los resultados de Schulthess, (2013) el contexto experimental específico afecta este carácter. Los porcentajes de explicación de la variabilidad para el endosperma amarillo en relación con el locus *Psy1A* han sido bajos (< 10%) (Ravel *et al.*, 2013), medianos (10–30%) (He *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Ravel *et al.*, 2013), altos (30–50%) (Zhang *et al.*, 2009) y muy altos (> 50%) (Howitt *et al.*, 2009) en trigo pan. Paralelamente, los valores para trigo candeal van de medios (10–30%) a altos (30–50%) y muy altos (> 50%) (Blanco *et al.*, 2011). *Psy1b* presenta porcentajes de variabilidad para endosperma amarillo muy altos (> 50%) en trigo pan (Ravel *et al.*, 2013), bajos (< 10%) y medios (10–30%) (Zhang *et al.*, 2008; Roncallo *et al.*, 2012) en trigo candeal.

Con respecto a las variantes alélicas de los loci *Psy1*, la base de datos de recursos genéticos Komugi de trigo (Komugi, 2012) muestra que dieciocho, quince y trece variantes alélicas se han informado hasta la fecha para *Psy1A*, *Psy1B* y *Psy1D*, respectivamente. Adicionalmente, estudios de asociación genotipo-fenotipo han investigado los efectos de algunas variantes alélicas de *Psy2* en el endosperma amarillo usando diferentes germoplasmas de trigo candeal y pan.

1.7.4.2 (ζ)-Caroteno desaturasa y sus variantes alélicas asociadas al color amarillo en el endosperma del grano del trigo candeal

ζ- caroteno desaturasa es una enzima clave en la ruta de biosíntesis de los carotenoides. Esta enzima cataliza la deshidrogenación de ζ-caroteno para producir Neurosporeno en plantas (Park *et al.*, 2002). El gen *ZDS* fue aislado por primera vez de *Anabaena* sp. (Linden *et al.*, 1994) y *Capsicum annuum* L. (Albrecht *et al.*, 1995). El gen *ZDS* de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. fue expresado con éxito en *Escherichia coli* (Bartley *et al.*, 1999), demostrando que *ZDS* es un gen funcional, que codifica la enzima *ZDS* (Dong *et al.*, 2007). Cenci *et al.* (2004) utilizando una librería de BACs de *T. turgidum* L. var. *durum*, localizaron los genes *ZDS* en los cromosomas 2A y 2B. Los genes *ZDS* de maíz y arroz fueron mapeados en el cromosoma 7 (Wong *et al.* 2004; International Rice Genome Sequencing Project 2005). Debido a que en maíz y arroz el cromosoma 7 es colineal con el grupo de cromosomas 2 de trigo (Gale & Devos 1998), los genes

ZDS en trigo fueron asignados al grupo 2 de cromosomas. Zhang *et al.* (2011) clonaron el gen *ZDS* en trigo pan, nombrándolo *TaZds-D1* y, utilizando un set de líneas nulitetrasómicas de Chinese Spring, lo mapearon en el cromosoma 2D. También encontraron un QTL en el cromosoma 2A de trigo pan utilizando una población doble haploide (DH) proveniente de la cruce Zhongyou 9507 X CA9632. El análisis de ligamiento mostró que este QTL co-segregaba con el marcador *YP2A-1*, desarrollado a partir de la secuencia codificante de *TaZds-A1*. Los genotipos *TaZds-A1a* se asociaban con un menor CPC, mientras que *TaZds-A1b* se correlacionaba con un mayor CPC. Hasta el momento para trigo candeal no existen publicaciones acerca de la secuencia codificante de este gen.

1.8 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia notípica controlada genéticamente. Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso sea un marcador. Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio (SIDTA 1999). Para Valadez & Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente. Los marcadores moleculares que detectan variación en el ADN genómico se pueden agrupar según su modo de acción en marcadores de hibridación de secuencias (RFLP), marcadores de amplificación de secuencias utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como RAPD, SSR, AFLP y marcadores basados en secuenciación, tales como los SNPs y Chips de ADN. La selección del marcador molecular a utilizar depende del objetivo del estudio, de las facilidades disponibles en el laboratorio, del costo, y de su poder de discriminación, se consideran herramientas útiles que han servido de base para la identificación de especies, cepas, híbridos, análisis de diversidad genética, construcción de mapas genéticos, mapeo genético, selección asistida, biología evolutiva, ecología molecular, genética de la conservación, determinación de

paternidad, etc. (Hayward *et al.*, 2015). En la Tabla 2 se muestran aquellos más comúnmente usados en plantas.

Tabla 2. Tipo de marcadores moleculares frecuentemente utilizados en vegetales.

Nombre del marcador	Tipo de marcador	Cantidad de ADN requerido	Nivel de polimorfismos	Uso de Enzimas de restricción	Cebadores (Primers)	Producto	Visualización
RFLP	Codominante	Alta	Bajo	Si	No	Fragmentos de distinta longitud	Electroforesis e hibridación de fragmentos con secuencias homologas marcadas radiactivamente
RAPD	Dominante	Baja	Bajo	No	Único, corto (10 bases) y aleatorio	Fragmentos de ADN al azar	Electroforesis en geles de agarosa
AFLP	Dominante	Media	Medio	SI	Adaptadores + par de primers específicos	Subpoblación de fragmentos de distinta longitud	Electroforesis en geles de poliacrilamida / capilaridad
SSR	Codominante	Baja	Alto	No	Par de primers específicos (20-30 bases)	Secuencias repetidas en tandem de diferente longitud	Electroforesis en geles de poliacrilamida / capilaridad
STS	Codominante	Baja	Bajo	No	Alelo específicos basados en secuencias	Fragmentos de distinta longitud	Electroforesis en geles de agarosa
SNP	Codominante	Baja	Alto	No	si	Hebras de cadena simple	Electroforesis en geles de poliacrilamida

Amplificación de Fragmentos polimórficos (AFLP)

Esta técnica combina el corte del ADN con enzimas de restricción usadas en RFLP y la amplificación in vitro usada en PCR (Vos *et al.*, 1995). En el procedimiento general, el ADN de doble cadena es digerido con enzimas de restricción a la cual se agregan adaptadores o cebadores en sus extremos para generar templados de ADN para su amplificación. La secuencia de los adaptadores y el sitio de restricción adyacente sirven de partidador para la siguiente amplificación de los fragmentos de restricción por PCR. Posteriormente, se agregan nucleótidos selectivos al término 3 de los partidadores del PCR. De esta manera, solamente un subgrupo de fragmentos de restricción son reconocidos y selectivamente amplificados. Finalmente, el subgrupo de fragmentos amplificados es analizado en geles de poliacrilamida donde se generan los patrones electroforéticos o “fingerprinting”. Las principales ventajas de los AFLP incluyen un alto a medio número de polimorfismo, buena cobertura del genoma, herencia Mendeliana dominante,

una base molecular de los polimorfismos más compleja (alteración de la secuencia de nucleótidos, mutaciones que alteran los sitios de restricción, inserciones, pérdidas, inversiones entre sitios de restricción), y un número de muestras alto por análisis. Su principal desventaja es que es un procedimiento moderadamente difícil de realizar y relativamente caro.

1.9 Identificación de *loci* asociados a caracteres cuantitativos (QTL) en poblaciones biparentales.

En el camino de la mejora genética para ubicar y potenciar caracteres de interés como el CPC, PH y PMG se trabajó con diferentes marcadores genéticos y se ha concluido que estos caracteres generalmente presentan una herencia poligénica. Durante las últimas décadas se utilizaron diferentes marcadores moleculares, siendo los caracteres morfológicos los primeros en utilizarse como marcadores genéticos y en la construcción de mapas genéticos. El uso extendido de marcadores a nivel de ADN, basados en PCR, permitió obtener mapas genéticos con mayor saturación sobre los cuales identificar *loci* asociados a caracteres cuantitativos (*Quantitative Traits Loci* – QTL) de una manera más precisa. En las plantas, la identificación de QTL, por lo general, se hace en poblaciones segregantes en las que se evalúan marcadores polimórficos, y posteriormente se asocian a caracteres fenotípicos de interés (Kearsey & Farquhar 1998). Este método es eficaz en la identificación de QTL de caracteres para los cuales se han desarrollado poblaciones biparentales, pero la resolución de los QTL por lo general es pobre y entrega un número limitado de alelos. Además, pueden ser necesarias varias poblaciones para el análisis de los caracteres de interés y esto se traduce en generar más trabajo de fenotipado y genotipificación de cada una de estas poblaciones.

1.10 Mapeo Asociativo

El mapeo de asociación (MA) busca identificar marcadores ligados a variaciones fenotípicas en un carácter de interés a partir de una muestra de individuos, sobre la base del desequilibrio de ligamiento observado en poblaciones estructuradas como pueden ser poblaciones naturales, colecciones de germoplasma, líneas o variedades elite de un programa de mejoramiento, etc. En el último caso, la información derivada de estos experimentos debería ser fácilmente aplicable al

mejoramiento de cultivos ya que se trataría de la identificación de QTL de interés agronómico presentes en germoplasma elite.

1.10.1 Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento (DL) puede definirse como el grado de asociación no aleatoria entre alelos de distintos *loci* en poblaciones de individuos no relacionados (Yu & Piresler, 2006). Es la medida de las frecuencias alélicas de un par de alelos en dos sitios polimórficos: en donde los alelos que están altamente correlacionados se dice que están en desequilibrio de ligamiento (Gaut & Long, 2003; Nordborg & Tavaré, 2002). Se corresponde con la proporción de gametos que no segregan al azar y provee información sobre la historia de la población, así como sobre el sistema de selección implementado. Por otro lado, el análisis de desequilibrio de ligamiento es comúnmente utilizado para identificar grupos de asociación entre marcadores (grupos de DL). Estos grupos permiten construir haplotipos o grupos de marcadores que segregan juntos en las líneas de estudio, eliminando del análisis datos redundantes y generando marcadores poli-alélicos (Wall & Pritchard, 2003). Esto es posible debido a que marcadores cercanos en el genoma tienden a segregar juntos durante la meiosis, cuando se dan los procesos de recombinación entre los cromosomas (Flint-García *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005). A nivel genómico, refleja el impacto de fuerzas evolutivas (selección natural, mutación y migración) que causan cambios en las frecuencias génicas (Lynch & Walsh, 1998).

El DL se mide habitualmente usando el coeficiente de desequilibrio estandarizado D' y/o la correlación de frecuencias alélicas al cuadrado R^2 (Lewontin 1964; Weir 1996; Hamblin *et al.* 2004; Gupta *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005; Somers *et al.*, 2007). El DL es graficado en el plano cartesiano, representado el eje Y con la correlación de frecuencias alélicas al cuadrado R^2 frente a la distancia genética en el eje X, lo que permite la visualización de la velocidad de caída del DL sobre la distancia genética. Como se indica en la Figura 15, en promedio, el grado de DL de todo el genoma de trigo pan se extiende aproximadamente de 2 a 3 cM ($r^2 < 0,2$). Sin embargo, poblaciones poco representadas o tamaños de muestra pequeños, tienen un gran efecto sobre D' (Flint-García *et al.*, 2003). Por lo tanto, para MA el estadístico r^2 ofrece ventajas (Brescghello & Sorrells 2006; Rostoks *et al.*, 2006; Agrama *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2007; Crossa *et al.*, 2007; Malosetti *et al.*, 2007; Tommasini *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007) porque permite

determinar la correlación entre los marcadores con el QTL de interés y el poder de resolución aumenta ya que tiene en cuenta las mutaciones, así como el historial de recombinación (Flint-García *et al.*, 2003). En un cultivo con alto desequilibrio de ligamiento como el trigo (Somers *et al.*, 2007) se esperaría que se formaran diversos grupos de ligamiento si se cuenta con un buen número de marcadores moleculares ordenados a lo largo del genoma.

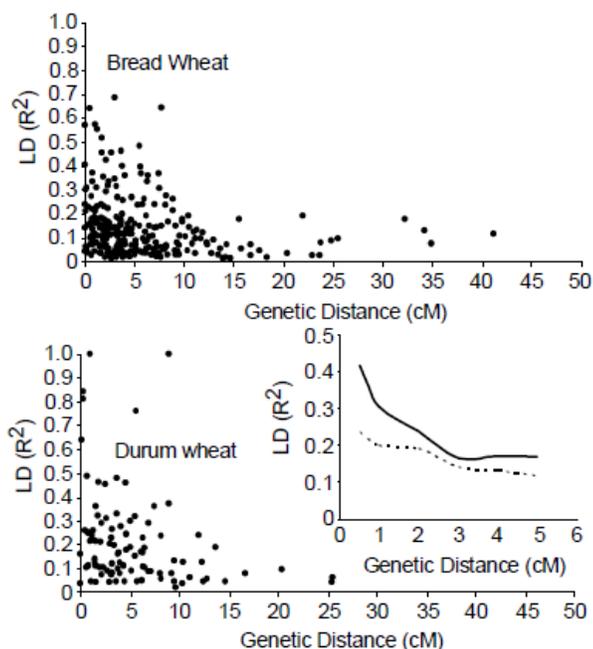


Figura 15. R^2 vs (cM) Extensión del DL en trigo pan y candeal (Somers *et al.*, 2007). La caída del DL se visualiza mediante el trazado de DL (R^2) frente a la distancia genética (cM). El recuadro indica la tasa promedio de caída del DL para el trigo candeal (línea continua) y el trigo pan (línea discontinua).

Varios factores influyen en el DL entre marcadores no asociados. El DL es mayor en las especies autóгамas, debido a la homocigosis y a la recombinación menos eficaz (Nordborg *et al.*, 2002; Morrell *et al.*, 2005; Rostoks *et al.*, 2006; Skot *et al.*, 2007). En genomas como el del trigo, el DL se estimó en menos de 10 cM (pb) en una colección de 43 variedades de trigo de Estados Unidos ($r^2 < 0,2$; Chao *et al.*, 2007). Estimaciones del DL en trigo candeal van en un rango desde 2-3 cM ($r^2 < 0,2$) (Somers *et al.*, 2007) y 20 cM aproximadamente ($r^2 < 0,2$, Maccaferri *et al.* 2005).

La mezcla o flujo de genes entre individuos de poblaciones genéticamente distintas resulta en la introducción de alelos de diferente ascendencia e influirá en las frecuencias de dichos alelos. Esto se traduce en acumulación de DL a lo largo de los cromosomas y entre genes no ligados. Sin embargo, el apareamiento al azar dará lugar rápidamente a la caída del DL, pero este no es el caso de las especies autóгамas, por las razones indicadas anteriormente. Dado el flujo de genes, el DL en bloques puede ocurrir en poblaciones que han experimentado recientemente la presión de selección o cuello de botella genético (Flint - García *et al.*, 2003) debido a la domesticación. Morrell *et al.* (2005) informan en cebada silvestre un DL (*Hordeum vulgare ssp. Spontaneum*) bajo, de tan solo 300 pb. En el trigo hexaploide existen grandes bloques de DL sobre el genoma D (Somers *et al.*, 2007), compatibles con el cuello de botella genético creado por la reciente poliploidización y la adición de este genoma (Caldwell *et al.*, 2004).

Como era de esperar, la presión de selección aumenta el DL y se mide generalmente mediante la comparación de los cultivares élite que tienden a tener mayor DL en relación con las poblaciones lejanamente relacionadas (Andersen *et al.*, 2007). La extensión del DL (y por tanto la resolución de mapeo) no es uniforme a través de genomas y poblaciones (Nordborg y Tavaré 2002; Mather *et al.*, 2007). En el trigo pan y candeal, el DL se extiende de 2 a 3 cM (Figura 15), pero en varias regiones genómicas se observó DL a menos de 0,5 cM y en otras hasta 30 cM (Somers *et al.*, 2007). Las diferencias en DL a lo largo de los cromosomas de trigo podrían ser debidas a la recombinación en "puntos calientes" en el genoma (Faris *et al.*, 2000). En el trigo, la recombinación se produce preferentemente en las regiones distales de los cromosomas, en las regiones de alta densidad "ricas en genes" (Sandhu & Gill 2002). Aunque el DL es variable en el trigo, las altas tasas de recombinación en regiones cromosómicas distales corresponden a los bajos niveles de DL observados en varios de sus cromosomas, incluyendo el extremo distal de los cromosomas del grupo 7 (Somers *et al.*, 2007).

La disponibilidad de marcadores puede ser un factor limitante, en particular si el LD es bajo (Rostoks *et al.*, 2006). El mejor método de genotipificación debe ser elegido sobre la base de los requisitos específicos del proyecto de genotipificación previsto, y los recursos disponibles. Los AFLP pueden ser utilizados en la genotipificación como resultado de su abundancia y su alta densidad para mapear. Actualmente existen tecnologías con la capacidad de determinar el genotipo de miles de sitios al mismo tiempo (por ejemplo, Perlegen Sciences Inc. genotyping

arrays, Affymetrix Inc. GeneChip arrays, and Illumina Inc. BeadArray technology coupled with the GoldenGate genotyping assay), sin embargo, no son necesariamente rentables para la genotipificación de paneles de gran tamaño. El nivel de polimorfismo que proporcionan los AFLP aumenta el poder de detectar DL y facilita la resolución de mapeo.

1.10.2. Estrategias utilizadas en el mapeo por asociación

El MA permite encontrar lugares específicos del genoma relacionados con la variación de un carácter fenotípico en una muestra de individuos no relacionados. Tiene una serie de ventajas sobre otras técnicas de mapeo, incluyendo mayor poder de resolución que el mapeo biparental, reducción de tiempo de trabajo y una mayor variabilidad alélica (Pieresler & Thornsberry 2002; Yu & Pieresler 2006). Sin embargo, la probabilidad de identificar asociaciones espurias entre marcador y carácter es mayor en los estudios de MA en comparación con estudios de mapeo de QTL tradicionales. Las asociaciones espurias son a menudo el resultado de problemas en la estructura de la población y pueden reducirse teniendo en cuenta este factor (Pritchard *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2011). Para superar esto se debería utilizar un modelo lineal mixto (MLM) que tiene en cuenta los múltiples niveles de parentesco simultáneamente (Yu *et al.*, 2006).

Una de las estrategias utilizadas por el MA es el mapeo de genes candidatos, analizando polimorfismos de genes que controlan la variación fenotípica de caracteres específicos. Los estudios de asociación constan de cinco etapas: 1) selección de los genotipos de la población, 2) determinación del nivel e influencia de la estructura de la población, 3) fenotipado de la población para el carácter de interés, 4) genotipado de la población y 5) análisis de las asociaciones entre genotipo y fenotipo (Ersoz *et al.*, 2008).

Dos enfoques se aplican comúnmente en MA: (1) exploraciones de todo el genoma y (2) estudios basados en genes candidatos (Thornsberry *et al.*, 2001; Rafalski 2002; Kraakman *et al.*, 2004; Rostoks *et al.*, 2006). Las exploraciones de todo el genoma se llevan a cabo mediante la saturación del genoma con un marcador que permita una cobertura adecuada y se determina el grado de desequilibrio de ligamiento (DL) con el fin de identificar asociaciones entre los marcadores y los fenotipos de interés (Rafalski 2002). Este enfoque es útil en situaciones donde

la disponibilidad de marcadores es un factor limitante o cuando el DL se extiende a grandes distancias, permitiendo asociar potenciales regiones genómicas o genes candidatos con un carácter de interés para ser indentificados en futuras investigaciones (Remington *et al.* 2001). Un gran número de marcadores estrechamente vinculados a través de todo el genoma hacen de este enfoque más laborioso en comparación con el enfoque de genes candidatos. Por ejemplo, Kraakman *et al.*, (2004) estimaron que el DL en una colección de cultivares de cebada, que se extiende aproximadamente 10 cM, es comparativamente mayor que en otras especies autógamias (Breseghello y Sorrells 2006; Somers *et al.*, 2007). El alto nivel de DL que encontraron en su estudio no era propicio para hacer MA con una buena resolución, pero fue útil para identificar las regiones que pueden ser objetivo de nuevos experimentos (Kraakman *et al.*, 2004). Si el DL decae con demasiada rapidez, el número de marcadores necesarios para llevar a cabo análisis de MA en todo el genoma aumentará de manera significativa. Por ello, el MA focalizado en un gen candidato es un enfoque alternativo para obtener una buena resolución en el mapeo, aunque requiere que el gen candidato para un carácter este identificado, los polimorfismos esten correlacionados con la variación fenotípica y el DL decaiga rápidamente al aumentar la distancia física (Thornsberry *et al.*, 2001).

En los casos en que el DL entre los polimorfismos y el gen decaiga rápidamente, los genes candidatos se pueden utilizar en estudios de MA buscando las variantes alélicas asociadas con la variación fenotípica e identificar el/los polimorfismo(s) o causa(s) moleculares responsables de la diferencia fenotípica del carácter. Sin embargo, la asociación de polimorfismos con un carácter requiere ser verificada, dado que el polimorfismo puede estar en desequilibrio con el factor causal, particularmente si el DL es alto en la región genómica que rodea al gen. Por lo tanto, los enfoques de genes candidatos se utilizan generalmente para eliminar genes candidatos putativos en los estudios funcionales detallados. Por ejemplo, un enfoque de genes candidatos fue útil en la eliminación de tres de ocho candidatos en una región de 70 kb que confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae* (Blair *et al.* 2003).

A pesar de que el DL se extiende varios centimorgans (cM) en cultivos de especies autógamias, el número de estudios de MA que han utilizado poblaciones no estructuradas de cultivares y líneas de mejoramiento está aumentando (Kraakman *et al.*, 2004; Breseghello & Sorrells 2006a;

Kraakman *et al.*, 2006; Agrama *et al.*, 2007; Cockram *et al.*, 2008). El MA ha sido empleado con éxito en diferentes cultivos, entre estos trigo pan, (Breseghello & Sorrells 2006a; Roy *et al.*, 2006; Jing *et al.*, 2007; Tommasini *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008), avena (Kraakman *et al.*, 2004; Kraakman *et al.*, 2006; Rostoks *et al.*, 2006; Cockram *et al.*, 2008), papa (*Solanum tuberosum* L.) (Malosetti *et al.*, 2007), maíz (Remington *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2007), arroz (Agrama *et al.*, 2007) y, también, para el trigo candeal (Sanguineti *et al.*, 2007, Macaferri *et al.*, 2010; 2014, 2015). El trigo candeal es una especie autógena y poliploide, con un genoma grande (13 000 Mbps; Arumuganathan & Earle 1991), y, debido a la complejidad asociada, se requieren más investigaciones para validar el potencial del MA para lograr identificar asociaciones marcador-carácter mediante una exploración de todo el genoma de esta especie. Así mismo, hasta la fecha sólo hay unos pocos estudios que exploran la posibilidad de utilizar el enfoque de genes candidatos en MA para cultivos de especies autógenas.

El mapeo asociativo teóricamente permite mayor resolución que el mapeo de ligamiento, que utiliza cruzamientos biparentales (Gaut & Long, 2003; Remington *et al.*, 2001; Thornsberry *et al.*, 2001; Morgante & Salamini 2003; Sköt *et al.*, 2007; Tommasini *et al.*, 2007, Macaferri *et al.*, 2010; 2014, 2015). El grado de resolución dependerá de la extensión del DL (Remington *et al.*, 2001) y se espera una buena resolución cuando el DL decae rápidamente frente a la distancia genética (Figura 15).

1.10.3 Variación alélica

El mapeo de ligamiento se limita a identificar sólo los alelos que difieren entre los dos parentales. Por el contrario, el MA explota el DL en poblaciones que no poseen estructura de familias, tales como poblaciones naturales, colecciones de germoplasma, líneas o variedades elite usados en los programas de mejoramiento, proporcionando un mayor número de alelos para el muestreo (Remington *et al.*, 2001; Kraakman *et al.*, 2004; Breseghello & Sorrells 2006; Stich *et al.*, 2005; Crossa *et al.*, 2007) (Figura 16). Por ejemplo, en una población de MA de trigo pan el número de alelos promedio por locus es 4,8 por microsatélite (Breseghello & Sorrells 2006a).

Una característica atractiva del MA es que las asociaciones marcador-carácter se pueden estudiar en el pool fenotípico del germoplasma y/o en poblaciones de variedades adaptadas localmente (Breseghello & Sorrells 2006b). Poblaciones de germoplasma diversas, como las encontradas en

MA, ofrecen la posibilidad de encontrar un mayor número de alelos como resultado de más eventos de recombinación y una mayor diversidad genética en comparación con las poblaciones de germoplasma acotado. Comparativamente, las líneas casi isogécicas (NILs) ofrecen mayor resolución que las F₂ o poblaciones de RILs. Sin embargo, están limitadas por el número de alelos (de los parentales) en cualquier locus y el número limitado de eventos de recombinación, resultando en una pobre resolución de los caracteres cuantitativos (Flint-García *et al.*, 2003).

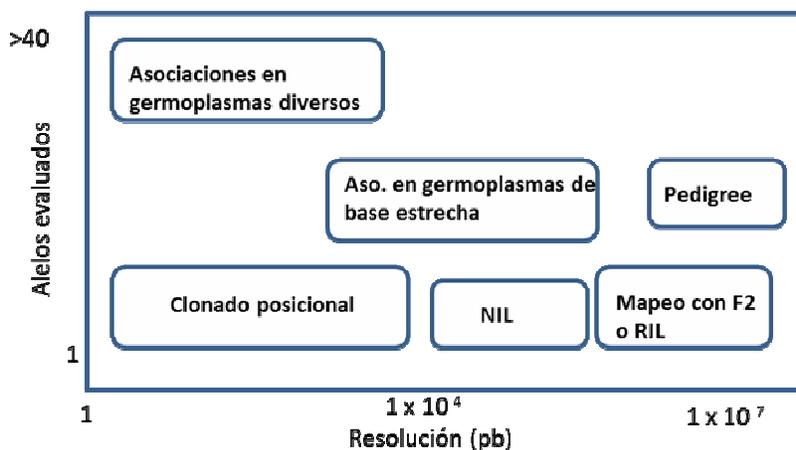


Figura 16. Número de alelos y grado de resolución posible utilizando distintos materiales vegetales para el mapeo. El grado de resolución depende de la extensión del DL (Remington *et al.* 2001) y se espera una resolución más alta cuando el DL disminuye rápidamente al aumentar la distancia genética.

1.10.4 Estructura de la Población

Una población puede ser considerada como una unidad. Sin embargo, en muchas especies y en numerosas circunstancias, las poblaciones se subdividen en unidades de menor tamaño. Dicha subdivisión puede ser el resultado de factores ecológicos (los hábitats no son continuos) o de comportamiento (reubicación consciente o inconsciente). Si una población se subdivide, los vínculos entre sus partes pueden variar según el grado de flujo génico real que exista. Una población se considera estructurada si (1) hay deriva génica en algunas de sus subpoblaciones, (2) Si la migración no se da uniformemente en toda la población, o (3) el apareamiento no ocurre al azar en toda la población. La estructura de una población afecta el grado de variación genética y los patrones de su distribución.

1.10.5 Estructura de la Población. ¿Con qué metodología identificarla?

Antes de iniciar estudios de asociación en colecciones con distintos niveles de desequilibrio de ligamiento, resulta necesario calcular empíricamente la magnitud del mismo y describir la estructura genética poblacional (EGP). Una población estructurada es aquella en la que coexisten subgrupos de individuos que difieren sistemáticamente en sus frecuencias alélicas para los diferentes *loci*. Cuando se lleva a cabo un análisis de asociación basado en estas poblaciones, sin considerar los efectos de la EGP, se aumenta el riesgo de detectar asociaciones espurias entre marcadores - carácter, y el fenotipo de interés.

En las poblaciones estructuradas puede haber una alta proporción de asociaciones significativas, aún cuando muchos marcadores no estén ligados a ningún locus relacionado al carácter de interés, aumentando la probabilidad de error tipo I (falsos positivos) o aumentando la probabilidad de error tipo II (falso negativo) cuando no se encuentran marcadores ligados a un locus y por ende el investigador no rechaza la hipótesis nula siendo ésta falsa en la población. Para conocer la estructura de las poblaciones pueden utilizarse diferentes métodos. Pritchard *et al.* (2000) desarrollaron el que hasta el momento es el método más usado para este objetivo, implementado en el software Structure. El software Structure (Pritchard *et al.*, 2000) se desarrolló para estimar la estructura poblacional (Pritchard *et al.*, 2000) y se ha aplicado en los estudios de MA en diferentes cultivos incluyendo, cebada (Rostoks *et al.*, 2006), trigo (Bresghehlo y Sorrells 2006; Crossa *et al.*, 2007; Tommasini *et al.*, 2007) y arroz (Agrama *et al.*, 2007). Structure utiliza el modelo bayesiano para asignar individuos a subpoblaciones y así minimizar el DL entre los marcadores disociados entre las subpoblaciones. (Yu *et al.*, 2006) propusieron un método de modelo mixto unificado para determinar la relación de las accesiones dentro de las poblaciones, lo que resulta en una reducción tanto del error tipo I como el error tipo II, mediante la combinación de la estructura poblacional (Q) con una matriz de parentesco relativa (K), representando múltiples niveles de parentesco.

Patterson *et al.*, (2006) propusieron otra alternativa basada en la técnica de Análisis de Componentes Principales (ACP), en la que se seleccionan tantas componentes significativas como sugiera el estadístico propuesto por (Tracy & Widom 1994). Estos algoritmos proporcionan matrices en las cuales se puede decir que está contenida la información de estructura que caracteriza a los datos en estudio y estas matrices son usadas como covariables en

distintos modelos estadísticos, con el fin de corregir cualquier posible asociación que se deba a la EGP de los datos.

Según Hartl & Clark (1997), debido a las pocas oportunidades de recombinación que tuvieron algunas poblaciones utilizadas en mejoramiento, el DL presente en ellas no se debería a genes ligados sino a la selección simultánea de combinaciones de alelos de diferentes genes, incluyendo epistasis, y a la estructura de la población (presencia de subgrupos formados por individuos emparentados). El modo preferencial de polinización (autógamas o alógamas), el origen geográfico del genotipo, la selección (artificial o natural), migración, deriva genética o efecto fundador serían responsables de la presencia de subgrupos dentro de una colección de germoplasma (Piereser & Thornsberry 2002; Flint-García *et al.*, 2003).

Los alelos raros (comúnmente definidos como frecuencias ocurrentes <5-10%) (Tenaillon *et al.*, 2001; Barnaud *et al.*, 2006; Caldwell *et al.* 2006; Ravel *et al.* 2006a; Chao *et al.* 2007; Rhône *et al.*, 2007) sobreestiman del DL, lo que reduce el poder estadístico de los estudios de MA (Wilson *et al.*, 2004; Somers *et al.*, 2007; Crossa *et al.*, 2007). La presencia de alelos raros también puede aumentar el DL entre marcadores disociados y aumentar la tasa de error de tipo I en los estudios de MA. Eliminar los alelos raros u organizarlos en su propia clase (Pritchard *et al.*, 2000; Maccaferri *et al.*, 2005; Somers *et al.*, 2007) es una práctica común antes de la ejecución de estudios de MA. Los marcadores estrechamente vinculados pueden resultar en el aumento del DL entre marcadores disociados y es mejor obviarlos a la hora de evaluar la estructura (Falush *et al.*, 2003).

Es necesario entonces, conocer la extensión del DL en el genoma antes de realizar estudios de MA. Asimismo, conocer la estructura de la población es uno de los pasos críticos para identificar e interpretar correctamente la diversidad de marcadores funcionales o neutros (Piereser & Thornsberry 2002). El grado de DL, y por tanto la resolución del mapeo, no es uniforme en el genoma y en las diferentes poblaciones. La selección afecta principalmente el DL de regiones del genoma asociadas a características relevantes para el mejoramiento genético. Por el contrario, la estructura de la población afecta el DL a lo largo de todo el genoma, debiendo ser controlado *a priori* para realizar una correcta interpretación de los datos, ya que la presencia de subgrupos incrementaría la tasa de falsos positivos (Pritchard *et al.*, 2000). En conclusión, la estructura

genética en las poblaciones posibilita el incremento del DL entre marcadores no asociados como resultado de frecuencias alélicas distintas en cada una de las poblaciones «puras» y no de la proximidad entre marcadores (Nordborg y Tavaré 2002; Cardon y Palmer 2003; Farnir *et al.*, 2000; Rostoks *et al.*, 2006).

1.10.6 Mapeo asociativo en trigo candeal

En trigo candeal se han realizado varios estudios de MA (Maccaferri *et al.*, 2008a; Sanguinetti *et al.* 2007; Pozniak *et al.*, 2008; Reimer SO, 2009; Clarke *et al.*, 2008, Maccaferri *et al.* 2011, Maccaferri *et al.*, 2015, Yu *et al.*, 2011). Existen evidencias que durante el proceso de mejoramiento genético el germoplasma de trigo candeal ha sido sometido a una fuerte presión de selección (Pecetti & Annicchiarico 1998). En la Argentina el germoplasma elite de trigo durum se generó a partir de pocos cultivares llegados de países del Mediterráneo a principios del siglo XX, o, más recientemente, del CIMMYT. Sin embargo, existe gran cantidad de variedades argentinas históricas y extranjeras mantenidas en instituciones como el INTA dedicadas al estudio y mejoramiento del cultivo. Actualmente, un estudio de diversidad genética se ha desarrollado en nuestro laboratorio sobre una colección de germoplasma de candeal y es parte de la tesis doctoral de la Ing. Valeria Beaufort (Becaria de la ANPCyT). Esta información es de gran utilidad para revelar la extensión del DL y la estructura genética del germoplasma y se complementa con los objetivos planteados en el presente trabajo doctoral.

Los estudios del color en trigo y sus productos derivados han crecido en complejidad en los últimos años. El uso de marcadores moleculares y estrategias de mapeo de QTL han facilitado el estudio de la herencia y la forma en que el ambiente influye sobre estos caracteres.

1.11 Caracteres a mapear.

Uno de los parámetros de calidad considerados en granos de trigo candeal es el contenido de pigmento carotenóide (CPC). Como ya se mencionó, estos pigmentos confieren el color amarillo a la harina, sémola y las diferentes clases de pasta elaboradas a partir de esta materia prima. Algunas enzimas de la vía metabólica sintética de los carotenoides, como la fitoeno desaturasa (*Pds*) y licopeno β -ciclase (*LCY*), han sido asociadas a incrementos del CPC (Pozniak *et al.*, 2007, Howitt *et al.*, 2009). Se han desarrollado marcadores génicos sobre estas enzimas. Sin

embargo, el número de QTL identificados para el carácter es mayor y sería posible que correspondiesen a otras enzimas pertenecientes a la vía de los carotenoides. La información de secuencias de trigo y otras gramíneas depositadas en bancos de genes permitiría la identificación de marcadores moleculares para validar esta hipótesis.

En el CERZOS se han realizado estudios de mapeo de QTL asociados al contenido de pigmentos carotenoides y rendimiento y sus componentes utilizando poblaciones bi-parentales estabilizadas (RILs) (Roncallo *et al.*, 2012; Akkiraju *et al.*, 2012). Más recientemente se están realizando estudios de MA para estos caracteres y esta tesis es parte de esos estudios. Esta técnica tiene la potencialidad de identificar un número mucho más elevado de alelos por locus. Trabajar directamente sobre una colección de germoplasma, permite la transferencia directa de los QTL identificados y la utilización de aquellos alelos cuya asociación al carácter es más fuerte en programas de selección asistida por marcadores. Aunque han sido publicados algunos estudios de MA en trigo (Ravel *et al.*, 2006b; Breseghello y Sorrells 2006; Roy *et al.*, 2006; Crossa *et al.*, 2007; Sanguineti *et al.*, 2007; Tommasini *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008), varios de estos estudios se han focalizado en cromosomas individuales, donde los QTL han sido identificado previamente (Breseghello & Sorrells 2006) o en caracteres controlados por uno o más genes mayores (Ravel *et al.*, 2006b, Tommasini *et al.*, 2007). Un único estudio en trigo candeal se ha informado en relación con caracteres de raíces y brotes (Sanguineti *et al.*, 2007) y se requieren más investigaciones para validar el potencial del MA para identificar asociaciones marcador-carácter utilizando el enfoque que incluye la exploración de todo el genoma. Es por estas razones que se considera como objetivo de esta tesis buscar y desarrollar marcadores moleculares asociados a caracteres de calidad y rendimiento en trigo candeal que faciliten la selección asistida en programas locales de mejoramiento como también determinar el tipo de correlaciones fenotípicas entre los caracteres evaluados.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis de trabajo

En esta tesis, la hipótesis principal es la siguiente:

El mapeo por asociación permitirá complementar los análisis realizados utilizando mapeo biparental y lograr mayor precisión en la identificación de regiones genómicas asociadas a calidad y rendimiento en trigo candeal.

En función de la misma se plantean las siguientes hipótesis parciales:

- Si bien los caracteres relacionados con calidad y rendimiento son de herencia compleja e influenciada por el ambiente, tienen un componente genético por lo cual será factible encontrar marcadores moleculares asociados. El análisis en varios ambientes permitirá determinar su efecto y seleccionar genotipos que se adapten mejor a cada ambiente.
- Dado que el CPC es un carácter cuantitativo, comprobado por la identificación de un elevado número de regiones genómicas (QTL) asociadas, es posible que muchas de ellas correspondan a genes de las enzimas de la vía de los carotenoides.
- Existen diferentes alelos del/de los genes que codifican para la enzima Z-caroteno desaturasa (Zds) involucrada en la biosíntesis de carotenoides. Las distintas variantes alélicas afectarían diferencialmente el color del grano.
- Si bien los marcadores AFLPs son anónimos y no han sido mapeados en trigo candeal, permitirán realizar asociaciones que, una vez identificadas, podrán ser mapeadas *in silico* en el genoma de trigo pan y/o candeal, y secuenciados.
- Dada la fuerte presión de selección impuesta al trigo candeal por generaciones de mejoramiento, las regiones genómicas asociadas al CPC, PMG y PH deberían presentar un alto grado de desequilibrio de ligamiento.

Objetivo general

- Realizar un análisis preliminar tendiente a implementar la estrategia de mapeo por asociación en trigo candeal de manera de complementar los estudios realizados por mapeo biparental, identificando marcadores asociados a caracteres de color, peso hectolitrico (PH) y peso de mil granos (PMG).

Objetivos particulares

- Realizar determinaciones fenotípicas sobre 133 variedades de trigo candeal en tres ambientes de la región candealera argentina para los siguientes caracteres: contenido de pigmentos carotenoides (CPC), color amarillo (CIE b*), rojo (CIE a*) y luminosidad (CIE L*) de la sémola, peso de mil granos (PMG), peso hectolítrico (PH) y rendimiento de parcela (Kg/ha)
- Obtener parámetros genéticos tales como heredabilidad en sentido amplio a partir de los valores fenotípicos determinados sobre la colección de germoplasma en estudio.
- Identificar genotipos superiores que resulten útiles para incorporar en programas locales de mejoramiento.
- Analizar la estructura de la población utilizando marcadores AFLPs amplificados en la población de trigo candeal por la Ing. Agr. Valeria Beaufort como parte de su tesis doctoral.
- Asociar los caracteres fenotípicos analizados con los AFLPs amplificados como se mencionara en el punto anterior.
- Determinar la utilidad de los marcadores asociados para la selección indirecta.
- Diseñar y caracterizar marcadores moleculares para el gen de la enzima *Zds*, involucrada en la vía de biosíntesis de pigmentos carotenoides.
- Realizar estudios de asociación entre los marcadores para *Zds*, con los caracteres fenotípicos relacionados con color.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

En la elaboración de esta tesis se utilizó una colección de 133 cultivares y líneas avanzadas de trigo candeal (*Triticum turgidum* L. cv. durum) de origen argentino, del CIMMYT, italianos, franceses, norteamericanos, húngaros y de otros países como Siria, Argelia, Etiopía, Líbano, Israel, Sudán y Chile aportados por empresas privadas (ACA SA, Buck Semillas) e instituciones estatales (CEI-Barrow e INTA Marcos Juárez). De los 133 materiales, 118 fueron seleccionados para hacer análisis de estructura poblacional y mapeo por asociación (Tabla Suplementaria 1).

2.2 Diseño experimental, siembra y seguimiento de los ensayos a campo

La población fue evaluada durante la campaña 2011/2012 en las localidades de Cabildo (39°36' S 61°64' O), Tres Arroyos (38°20' S 60°13' O) y Pieres (37° 45' S 58° 18' O), que se denominaran de aquí en más Cabildo, Barrow y Pieres, respectivamente. Se utilizó un diseño experimental alfa lattice (8 bloques con 17 parcelas cada uno) (Patterson & William; 1976), con dos repeticiones. Para cada genotipo, se sembraron los gramos de semilla necesarios teniendo en cuenta: el peso de mil granos, los metros por parcela sembrados, la densidad de siembra deseada, el poder germinativo y el coeficiente de logro de cada genotipo para obtener una densidad de siembra de 300 pl/m². El área de parcela sembrada fue de 1,26 m x 5.5 m, lo que resume un área total de 6,93 m² para las localidades de Cabildo y Barrow. El área de parcela sembrada para Pieres fue de 1,40 m x 4,2 m, lo que resume un área total de 5,85 m². El área de parcela cosechada fue de 5 m² para Cabildo y Barrow y de 4,20 m² para Pieres. El método de siembra fue tipo chorrillo (sembradora de cono). El total de las parcelas sembradas y cosechadas en cada localidad fue de 272. Cada experimento recibió condiciones particulares de manejo y fertilización adecuadas a la zona y criterios del campo experimental. En general, antes de sembrar el ensayo se fertilizó el terreno con fosfato diamónico (PDA). En los periodos adecuados también se agregaron herbicidas. El periodo del cultivo se extendió entre julio y enero, con siembras realizadas principalmente a mediados de julio. La cosecha se realizó entre mediados de diciembre y mediados de enero. El cultivo emergió aproximadamente en los 20 días posteriores a la

siembra. La cosecha se realizó con cosechadora experimental autopropulsada marca Weiteteiger.

2.3 Acondicionamiento pos cosecha de los granos

Una vez cosechados los granos, la producción de cada parcela experimental fue acondicionada de manera de obtener granos sanos, limpios y curados, los cuales fueron conservados a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

2.4 Determinaciones fenotípicas

Luego de la cosecha se registró el peso de las parcelas (Kg/ha), el peso de 1000 granos (PMG), el peso hectolítrico (PH), el contenido de pigmentos carotenoides (CPC) y los componentes del color (CIE L*a* y b*). En todos los casos, fueron determinados utilizando una muestra de trigo representativa de cada parcela, a la cual se le extrajeron impurezas (malezas, terrones, piedras, pajas, etc.).

2.4.1 Peso de mil granos (PMG)

Se obtuvo pesando 100 granos completos y sanos tomados al azar a partir de muestras limpias de cada parcela experimental. El PMG se calculó multiplicando 1000 x el peso de la muestra / N° total de granos contados. Se realizaron tres repeticiones de cada muestra.

2.4.2 Peso hectolítrico (PH)

La balanza oficial para medir el PH en la Argentina corresponde a la balanza Shopper de ¼ litro de capacidad. Con este instrumento se pesa la cantidad de granos contenidos en ¼ litro. Con ese valor se busca en una tabla de conversión el peso del hectolitro, que corresponde a 100 litros. El valor fue expresado en kg/hl.

2.4.3 Peso de granos por parcela (PGP)

Los granos totales trillados, limpios y curados de cada parcela fueron pesados para obtener el peso por parcela y fueron expresados en (en kg/ha).

2.4.4 Determinación del contenido de pigmentos carotenoides (CPC)

Las muestras de sémola integral de cada genotipo se obtuvieron utilizando un molino experimental Brabender Junior (Laboratorio de Calidad Industrial de Granos de la Chacra Experimental Integrada Barrow) sobre 100 g de granos por parcela y fueron conservadas a 4°C hasta el momento de realizar las determinaciones. El CPC en las variedades se determinó utilizando el micrométodo informado por Fares *et al.* (1991). En cada caso, se realizó una extracción de pigmento por parcela experimental.

Micrométodo de Fares *et al.* (1991)

La extracción de los pigmentos carotenoides se realizó sobre muestras de 1,00 g de sémola, utilizando 5 ml de n-butanol saturado en agua, con agitación continua durante 3 horas a 170 rpm. El extracto fue filtrado a través de un filtro Whatman N° 1 y posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro (METROLAB 1600 PLUS, 49 versión 3.06 b) a una longitud de onda de 448 nm. Para calcular el contenido de pigmentos, expresado como partes por millón (ppm) de β -caroteno, se utilizó la fórmula:

$$\text{ppm de } \beta\text{-caroteno} = (E \times V \times 1000) / (251 \times g \times s)$$

Donde E= absorbancia de la muestra

V= volumen de solvente

g = peso de la muestra en gramos

s = longitud óptica de la cubeta (1)

251= coeficiente de extinción del β -caroteno a 448 nm

Para los datos obtenidos de cada parcela donde se observaron diferencias en el CPC y color que cuyos desvíos superaban el 5% se realizaron 2 ó 3 repeticiones. Si la repetición se mantenía dentro del rango de la primera medición se confirmaba el valor y se promediaba o se tomaba el nuevo valor. La confiabilidad y precisión del micrométodo fue previamente evaluada sobre la colección núcleo en la tesis doctoral del Ing. Agrónomo Pablo Roncallo (2006/07), donde se midió el CPC en sémola y harina integral (total de fracciones combinadas referidas como “harina integral”, que incluyen la harina, el salvado y el

germen) utilizando el método estándar AACC 14-50 y el CPC en harina integral según el micrométodo.

Los valores de CPC obtenidos en las variedades usando el micrométodo no fueron corregidos en función del grado de humedad de la harina. Esto se debe a que como fuera determinado previamente por el Ing. Roncallo en su tesis doctoral en ocho testigos comerciales y en la colección núcleo (2006/07), los valores de CPC en muestras corregidas por humedad y muestras sin corregir se encuentran altamente correlacionadas ($r=0,999$, $p \leq 0,0001$). Este autor encontró que la variación de humedad entre muestras fue mínima.

2.4.5 Medición del color ($L^*a^*b^*$) con el colorímetro Minolta

El color de la sémola integral de cada variedad se obtuvo sobre una muestra de 15g de cada parcela experimental, utilizando un colorímetro Minolta Chromameter CR-310 (CIE $L^*a^*b^*$, 1976). Para las coordenadas de color tri-dimensional (CIE L^* , CIE a^* y CIE b^*), CIE L^* representa brillo, sobre una escala de unidades que va desde 0 (negro puro) a 100 (blanco puro), CIE a^* varía desde - 60 (verde puro) a + 60 (rojo puro), y CIE b^* varía desde - 60 (azul puro) a + 60 (amarillo puro). En todos los casos, las muestras fueron homogeneizadas previamente a la medición, la cual fue realizada dentro de las 48 hs. posteriores a la molienda.

2.5 Análisis estadísticos de los datos fenotípicos para caracteres de calidad y rendimiento (CPC, CIE a^* , CIE b^* , CIE L^* PMG, PH, PGP)

A fin de seleccionar genotipos superiores se utilizaron los métodos REML/BLUP, (Máxima Verosimilitud Restringida / Mejor Predictor Lineal Insesgado) que permitieron generar un ranking de los mismos en función de los caracteres de calidad y rendimiento considerados. Los datos correspondientes a la concentración de pigmentos carotenoides (CPC, ppm), color (CIE a^* , CIE b^* , CIE L^*), peso de mil granos (PMG, g), peso hectolítrito (PH, Kg/hl) y peso de granos por parcela (PGP, kg/ha) se analizaron por separado para cada ambiente y en conjunto utilizando PROC MIXED en SAS (Littell et al., 1996) donde los ambientes se clasificaron como efectos fijos para obtener el valor de significancia de p mediante la prueba F. Los genotipos, las interacciones, las repeticiones y los bloques se clasificaron como factores aleatorios.

Se estimaron los componentes de la varianza por el método de máxima verosimilitud restringida. Con las estimaciones de los componentes de las varianzas se estimó la heredabilidad en sentido estricto de los caracteres evaluados y otros parámetros genéticos. La estimación de la heredabilidad en sentido estricto (h^2) permite estimar y evaluar la repetibilidad del carácter, la heredabilidad de cada carácter se calculó como la proporción de la varianza genética y fenotípica (σ^2_g / σ^2_p), con los genotipos considerados como factores aleatorios. Para cada uno de los ambientes, la varianza fenotípica (σ^2_p) se estimó como $[\sigma^2_g + \sigma^2_e]$ donde σ^2_g es la varianza genética, σ^2_e es la varianza residual. Para el análisis combinado, las varianzas fenotípicas (σ^2_p) de cada carácter se estimaron como $[\sigma^2_g + \sigma^2_e + \sigma^2_{\text{gen} \times \text{amb}}]$ donde σ^2_g es la varianza genética, σ^2_e es la varianza residual y $\sigma^2_{\text{gen} \times \text{amb}}$ es la varianza de la interacción.

Los coeficientes de correlación de Pearson para las medias de mínimos cuadrados a partir del análisis de la varianza utilizando PROC GLM de cada variable se estimaron mediante PROC CORR en SAS. Se obtuvieron los valores genéticos a través de la mejor predicción lineal no sesgada (BLUP) del efecto aleatorio genotipo, para la selección de genotipos superiores y para obtener los valores genotípicos ($u + g + \text{gem}$) donde u : es media de cada amb, g : representa el valor BLUP y gem : el valor de la interacción dentro de cada amb para los genotipos evaluados en Pieres, Cabildo y Barrow, en el análisis REML/BLUP se empleó el procedimiento de modelos lineales mixtos PROC MIXED de SAS.

En el análisis de modelos mixtos con datos desequilibrados los efectos aleatorios del modelo no se ponen a prueba a través de la prueba F, como se hace en el análisis de la varianza. En este caso, para los efectos aleatorios, la prueba recomendada es la prueba de verosimilitud (LRT, Likelihood ratio test) (Resende, 2007b). La prueba LRT se utilizó para evaluar la significancia de los factores aleatorios, genotipo (gen) y las interacciones genotipo por ambiente (gen*amb) para cada uno de los caracteres dentro del modelo. Estos factores fueron testeados mediante el estadístico chi-cuadrado entre el (1% y 5%) de probabilidad con un grado de libertad (Nelder & Wedderburn, 1972). Si la prueba LRT vía chi-cuadrado presentaba un p-valor <0.05 significaba que existe significancia del factor

(gen) y/o de la interacción (gen*amb) para el carácter evaluado dentro del modelo lineal mixto.

El análisis de desvío (ANODEV: siglas en inglés “Analysis of deviance”) permite evaluar el impacto de una covariable comparando la desviación explicada por la covariable contra la desviación no explicada por la misma, empleando la “devianza” como medida de variación. Este análisis fue ejecutado en SaS.9.4 a partir de los modelos lineales mixtos y permitió detectar diferencias significativas utilizando LRT al 1% de probabilidad para los factores aleatorios genotipo (gen) y la interacción genotipo por ambiente (gen*amb) para los caracteres peso de mil granos (PMG), peso hectolítrico (PH), contenido de pigmentos carotenoides (CPC), los componentes del color (CIE b*, CIE a* y CIE L*) y el carácter relacionado con rendimiento y peso de grano por parcela (PGP) .

2.6 Datos genotípicos

Los marcadores AFLPs utilizados en esta tesis fueron amplificados previamente en la tesis de la Ing. Agr. Valeria Beaufort. En esta sección se describen las condiciones de amplificación para la enzima de la vía de biosíntesis de carotenoides Zds.

2.6.1 Extracción de ADN genómico total

El ADN genómico total de los 133 individuos analizados fue extraído de hojas jóvenes no lesionadas por agentes patógenos ni insectos. Las hojas fueron liofilizadas luego del muestreo y se almacenaron en cámara a 4°C. La extracción del ADN de cada variedad se realizó según protocolos del laboratorio del CIMMYT. (2006), empleando como agente extractivo el bromuro de cetil-trimotor amonio (CTAB).

2.6.2 Cuantificación del ADN

El ADN genómico se cuantificó empleando un espectrofotómetro Merck (PHaro 300 Spectroquant, Alemania) a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. La relación A260/A280 y la concentración de ADN se calculó utilizando la siguiente fórmula: [ADN] (µg/ml) = A260 x factor de dilución x 50 µg/ml. Para determinar la calidad del ADN genómico obtenido se empleó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% (p/v) y

tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml), utilizando como referencia concentraciones conocidas de ADN. Se sembró un volumen de muestra de 5 µl constituidos por 3 µl de ADN y 2 µl de buffer de siembra. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 1X a un voltaje constante de 100 Volts/cm durante 30 min. La visualización del ADN se realizó por transiluminación con luz UV.

2.7 Análisis estadísticos utilizando una matriz de AFLPs

Los marcadores AFLPs utilizados en esta tesis fueron amplificados previamente en la tesis de la Ing. Agr. Valeria Beaufort. Registrada esta información se elaboraron matrices con los pares de loci de AFLP informativos de acuerdo con los parámetros y supuestos para cada uno de los análisis que se ejecutaron. En total se utilizaron 6 combinaciones de los cebadores: P40-M38, P40-M43, P41-M31, P41-M39, P41-M43 y P41-45 (Tabla 3). Los productos de amplificación se resolvieron en geles de acrilamida al 6%, en una cuba Biorad. Se estableció una pre corrida de 30 minutos a 60 Watts para templar el buffer, y posteriormente 1000 Voltios constantes durante 3 h 30 minutos. El revelado del gel se realizó con nitrato de plata. Se dejó a secar 24 hs para luego registrar las bandas.

Tabla 3. Secuencias de cebadores AFLP *Pst*+3 y *Mse*+3 utilizados para el análisis de 118 genotipos de trigo candeal de distintos orígenes geográficos.

Cebador	Código	Secuencia
MseAAA	M31	5' GATGAGTCCTGAGTAAAAA 3'
MseACT	M38	5' GATGAGTCCTGAGTAAACT 3'
MseAGA	M39	5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA 3'
MseATA	M43	5' GATGAGTCCTGAGTAAATA 3'
MseATG	M45	5' GATGAGTCCTGAGTAAATG 3'
PstAGC	P40	5' GACTGCGTAGGTGCAGAGC 3'
PstAGG	P41	5' GACTGCGTAGGTGCAGAGG 3'

2.7.1 Registro de marcadores y análisis datos

Los productos de PCR fueron identificados visualmente de los geles de poliacrilamida previamente escaneados, codificándose como 0: la ausencia, 1: la presencia y -1 dato perdido (banda ilegible, borrosa, indefinida) de una determinada banda. Con este registro se

creó una matriz binaria de datos con la que se realizaron los siguientes análisis de variabilidad.

2.7.2 Análisis de la variabilidad alélica

El poder de discriminación de los marcadores AFLP fue evaluado mediante los parámetros: porcentaje de *loci* polimórficos (%P), índice de contenido polimórfico (PIC) e índice de marcador (MI) que fueron calculados a partir de resultados obtenidos con el programa GenAEx 6.4 (Peakall & Smouse, 2006). Para efectuar estos análisis previamente se eliminaron aquellos loci con más de 10% de datos perdidos y alelos raros o en baja frecuencia, dato que fue entregado por el programa. El parámetro %P se calculó según Pamidimarri *et al.* (2009), como el cociente entre el número total de bandas polimórficas/número total de bandas x 100. El índice de contenido polimórfico (PIC) de cada marcador se utilizó para evaluar la capacidad de los cebadores en detectar locus polimórficos y su frecuencia en los genotipos estudiados (Anderson *et al.*, 1993); el mismo se calculó de acuerdo a Roldan-Ruiz *et al.* (2000), mediante la fórmula:

$$PIC = 2 \sum f_i (1 - f_i)$$

Donde: f_i = frecuencia de las bandas donde está presente el marcador; $(1 - f_i)$ = frecuencia de las bandas ausentes del marcador. El MI se calculó a través de la fórmula sugerida por Powell *et al.* (1996) como $MI = PIC * \eta * \beta$, donde η es el número total de bandas y β es la proporción de bandas polimórficas.

2.7.3 Distancia genética

A partir de la matriz binaria de datos se calculó la distancia genética entre genotipos usando la Distancia Genética Binaria (DG) (Huff *et al.*, 1993), calculada como:

$$GD = n \left[1 - \frac{2n_{xy}}{2n} \right]$$

Donde, n es el número total de bandas polimórficas y $2n_{xy}$ es el número de marcadores compartidos por dos individuos. La DG es una distancia Euclídea que considera tanto la

presencia como ausencia de bandas. Las distancias genéticas también fueron analizadas mediante la técnica multivariada Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), para así obtener una representación gráfica de la relación entre genotipos y grupos de origen. La distribución de la variación genética se estudió mediante el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992). Como medida de diferenciación genética entre accesiones se usó el estadístico PhiPT o ϕ PT (análogo al Fst), cuyo valor de significancia se estableció mediante la realización de 1000 permutaciones. La ventaja de este método en relación a los estadísticos clásicos de Wright (Fst) es que no utiliza frecuencias alélicas y por tanto evita asumir equilibrio de Hardy-Weinberg manteniendo el supuesto de independencia entre loci. Todos estos análisis estadísticos se realizaron con los programas GenAlEx 6.4 (Sneath & Sokal, 1973) e InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2008).

2.7.3 Estructura poblacional del germoplasma

Para estimar la estructura de la población se utilizaron dos enfoques. En uno de ellos se desarrolló una matriz de similitud genética a partir de la distancia binaria genética (Huff *et al.*, 1993), que se utilizó para construir un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA. Para el segundo enfoque, análisis bayesiano, se seleccionaron 6 combinaciones de AFLPs con valores medios a altos de PIC. Los marcadores con una alta frecuencia de alelos raros y datos perdidos mayor o igual al 10% se evitaron debido a que los alelos raros sobrestiman el DL (Gaut & Long 2003; Somers *et al.*, 2007). Las 118 accesiones fueron agrupadas de acuerdo al método heurístico basado en el algoritmo Bayesiano MCMC (Markov Chain Monte Carlo), implementado en el programa Structure (Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003; Falush *et al.* 2007; Hubisz *et al.* 2009).

El proceso de MCMC comienza asignando aleatoriamente los individuos a un número predeterminado de grupos, donde las frecuencias alélicas se estiman en cada grupo y los individuos son reasignados basándose en las estimaciones de las frecuencias alélicas. Esto se repite muchas veces, y es el denominado proceso burnin, que comprende normalmente 100.000 iteraciones, que resultan en la convergencia progresiva hacia estimaciones confiables de las frecuencias alélicas en cada población y en la determinación según probabilidades de pertenencia de los individuos a una población.

La medición o determinación del supuesto número de poblaciones (K), utiliza la estimación de las MCMC y se realiza por separado de la primera etapa denominada burnin. Structure realiza análisis individuales para cada uno de los números de poblaciones asumidos, de uno a un número razonablemente apropiado para el régimen de muestreo. Structure aplica un modelo a los datos de K poblaciones asumidas o grupos genéticos, cada uno caracterizado por un subconjunto de frecuencias alelicas identificadas en los datos. Comúnmente K no es definido fácilmente por el usuario para el conjunto de genotipos, aunque este parámetro debe ser preseleccionado. Por lo tanto, un primer paso apropiado es calcular la probabilidad de los datos para una gama de valores de K creando probabilidades posteriores de K , denominadas X y escritas: $X | K$. Puesto que K no es un valor absoluto, los valores definidos por el usuario deben considerarse cuidadosamente, teniendo en cuenta las características de las poblaciones muestreadas. La ejecución de una serie de valores de K prescritos para obtener sus valores de X normalmente crea probabilidades menores que las del valor de K más apropiado, estas probabilidades tienden a ser muy similares para valores de K más altos. Por lo tanto, los gráficos de valores de X progresan típicamente a una meseta para niveles de K más allá del número más aplicable de poblaciones detectadas, por lo que el valor K más pequeño estable, representa el valor óptimo. Kalinowski (2011) señala que se crean mejores clusters aplicando los valores de K más realistas, por lo que es prudente obtener el valor más pequeño de K que maximiza la probabilidad global de los datos, este enfoque captura la principal estructura de la población subyacente en los datos sin sobreestimarla .

Durante cada análisis, los coeficientes de pertenencia permiten asignar los individuos a cada grupo. La matriz de coeficientes de pertenencia, denominada matriz Q , se genera con filas para el número de individuos analizados y columnas para los grupos K . Los coeficientes medios de pertenencia individuales para cada población forman la matriz Q de la población. Si la mezcla no es un factor para las muestras de las poblaciones analizadas, las probabilidades posteriores de pertenecer a cada uno de los grupos K se calculan para cada individuo y un genotipo puede considerarse un miembro del grupo con mayor probabilidad. Si se considera la mezcla, los coeficientes de pertenencia se hacen a través de múltiples grupos.

Este enfoque bayesiano se utilizó para inferir el número de subpoblaciones (K) y para asignar los individuos a cada una de las subpoblaciones en base a la proporción de miembros en cada sub-población y coeficiente de pertenencia (matriz Q) calculada por el software Structure V.2 (Pritchard *et al.* 2000). Para esta tesis el número potencial de grupos considerado varió de $K=1$ a 10, y se realizaron 3 corridas independientes de cada valor K . El valor óptimo de K se estableció evaluando el estadístico ΔK y $L(K)$ de acuerdo a (Evanno *et al.* 2005). La medida ΔK provee una mejor estimación del valor real de K que el máximo valor $L(K)$ devuelto por el programa Structure. Para establecer el valor K del germoplasma el programa Structure realizó 100.000 repeticiones iniciales o *iteration burn-in* (*iteration burn-in*: se refiere a la práctica de descartar una porción inicial de una muestra de cadena de Markov, de manera que se minimice el efecto de estos valores iniciales en la inferencia *a posteriori* del parámetro) y 1.000.000 iteraciones finales (Pritchard y Wen, 2004). El modelo estadístico indicado en el programa fue el de mezcla de genomas con alelos correlacionados y no se indicó grado de parentesco entre las accesiones. La matriz Q , se estimó como el promedio de tres corridas para $K=6$ según el resultado de (Evanno *et al.* 2005).

2.7.4 Análisis de desequilibrio de ligamiento

Del total de *loci* polimórficos de la matriz binaria utilizada en el análisis de variabilidad alélica, se eliminaron aquellos *loci* con más de 10% de datos perdidos y alelos raros o en baja frecuencia Este análisis se realizó previamente en el análisis de variabilidad genética en el programa GenAEx 6.4. Se generó una matriz codificándose como BB la ausencia de banda, AA la presencia de banda y NA dato perdido (banda ilegible, borrosa, indefinida). El DL se estimó entre todos los pares posibles de marcadores polimórficos de AFLP, y usando el cuadrado de la correlación (r^2) como parámetro (Weir 1996). Los *loci* se consideraron en DL con alta significancia cuando el valor de $P < 0,0001$. El resto de los valores de r^2 no se consideraron informativos. Los valores de r^2 y su valor crítico de significancia, estimado mediante la realización de 1000 permutaciones, se calcularon utilizando el programa TASSEL (Bradbury *et al.*, 2007).

2.8 Mapeo por asociación

Para identificar y mapear variantes alélicas de genes relacionados al CPC, CIEa*, CIE b*, CIEL*, PMG, PH y PGP se utilizó el método de mapeo asociativo. Para ello primero se seleccionaron 118 genotipos de un total de 133 de los cuales se tenía información genética producida por la genotipificación con AFLP. La estructura poblacional fue inferida a partir de análisis bayesianos con el software Structure como se explicó anteriormente. Se utilizaron los datos fenotípicos colectados y determinados como se explicó mas arriba en la sección 2.4. La genotipificación de la población se logró a partir de los resultados obtenidos de las combinaciones de cebadores de AFLPs mencionados previamente. Para el mapeo asociativo a nivel de todo el genoma, se utilizó el siguiente modelo lineal mixto:

$$y = X\beta + Qv + Ku + e$$

Donde X es la matriz de marcadores moleculares, β es el vector de parámetros relacionados con la regresión simple de los marcadores en el fenotipo, Q es la matriz de estructura explicada como probabilidad de pertenencia de cada individuo en una subpoblación, v es el vector de efectos de cada grupo o subgrupo, K es la matriz de identidad, u es la vector de efectos poligénicos, e es el vector de los errores aleatorios. Previo al análisis los alelos raros (frecuencia meno al 10%) no fueron considerados. El análisis se realizó mediante el programa TASSEL, versión 2.0.1 (Bradbury *et al.*, 2007). El modelo utilizado fue el modelo lineal mixto (MLM, Q + K) (Yu *et al.*, 2006). Se consideró la existencia de asociación significativa entre un marcador y un carácter con una tasa de falso descubrimiento (FDR False Discovery Rate) de $p < 0,05$ (Benjamini y & Hochberg 1995).

2.9 Análisis del gen ZDS

2.9.1 Diseño de cebadores

Para diseñar cebadores que lograran amplificar la secuencia del gen *ZDS* se utilizo mRNA de *ZDS* de trigo pan (número de accesión FJ169496.1) proveniente de la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) (Tabla 4). El mRNA se alineó con ADN genómico

y en relación a eso se diseñaron pares de cebadores localizados a aproximadamente 1000 pares de bases (pb), utilizando el programa PrimerQuest (<http://www.idtdna.com>). Los cebadores tuvieron una longitud de entre 21 y 24 nucleótidos maximizando su especificidad. Las temperaturas de anillamiento del par de cebadores fueron similares o próximas y el contenido de guanina y citosina varió entre 40 y 60% para tener una óptima estabilidad de los cebadores y disminuir posibles dimerizaciones.

2.9.2 Amplificación por PCR del gen *Zds*

La amplificación por PCR de los marcadores se realizó en un volumen final de 25 μ l conteniendo 0,25 μ M de cada cebador, 0,2 mM de cada deoxinucleótido, 1,5 mM MgCl₂, 1U de *Taq* polimerasa (Invitrogen, EE.UU.) y 150 ng de ADN genómico. Las reacciones se llevaron a cabo en ciclador térmico (MyCycler Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.), realizando la desnaturalización inicial durante 5 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos que consistieron en 45 seg de desnaturalización a 94 °C, 1 min de *annealing* a temperatura específica de cada cebador (Tabla 4) y 1 min de extensión a 72 °C. Finalizados los ciclos se realizó una extensión final durante 10 min a 72 °C. Todas las reacciones preparadas para la amplificación incluyeron controles realizados con ADN de genotipo conocido para algunos de los marcadores utilizados y un control negativo (sin adición de ADN). Cuando no se logró amplificación con este protocolo, se empleó un protocolo que incluía etapas iniciales de touchdown. También se probaron programas con temperaturas de hibridación específicas (T_m: melting temperature) para cada par de cebadores en base a su contenido de CG y AT. Los valores de T_m básica (en solución acuosa) y de T_m ajustada en solución salina fueron obtenidos desde sitios públicos on-line (http://www.promega.com/biomatch/calc11.htm#melt_results).

Tabla 4. Secuencia, temperaturas específicas de anillamiento de cada cebador (T_m) y número de pb amplificadas con cada combinación de cebador.

Cebador	Secuencia	T_m °C	Pares de bases obtenidas con PCR	Genoma
ZDS 3-3F/ ZDS 3-3R	AAGCCCAGTTGTTTCGAGCTCTTCT	58	1000	A y B
ZDS 3-3R	TTTGATCCCTGGGACATCACAAGC	58		A y B
ZDS 4-5 F/ ZDS4-5R	TTGCACTGTCATCTCCTGCTGACT	58	1500	A y B
ZDS 4-5 R	GCTTGTGATGTCCCAGGGATCAAA	58		A y B
ZDS 733-F/ ZDS4-5R	TGTCGAGTCAAGCCAAAGGAGAT	58	900	B
GCA-F/ YP2A-1R	TGTCAGTGTGTCATTAGCACTGTGCA	58	1050	A
YP2A-1F/ YP2A-1R	CCCTAAGGAAGCCGAGCAAAT	58	179 / 195	A
YP2A-1R	GTGAGAGTACTAATGTTATGACCG	58		A

F: Forward R: Reverse.

2.9.3 Visualización de los productos de amplificación

La presencia de producto de amplificación luego de la reacción de PCR fue verificada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE (Tris-acético-EDTA) 1X, y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (Productos Biológicos, Universidad de Quilmes). Las corridas electroforéticas se realizaron a 80 V durante aproximadamente 1 hora. Para la visualización del ADN se utilizó el colorante SYBR Safe 10,000X (INVITROGEN) con un transiluminador de luz azul Clare Chemical Research Dark Reader.

2.9.4 Clonado de los fragmentos

Los amplicones obtenidos fueron cortados del gel de agarosa eluidos y purificados mediante el kit comercial AxyPrepTM DNA gel extracción (AXYGEN Biosciences), siguiendo el protocolo recomendado. Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega, EE.UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se realizó la ligación con 0,5 µl de vector pGEM-T Easy, 1,5 µl

del producto de PCR purificado, 1,5 U de ligasa T4 y *buffer* 2X. La reacción de ligado tuvo lugar durante toda la noche a 6°C.

2.9.5 Preparación de células competentes y transformación de *E. coli* por choque térmico

Las células competentes se prepararon utilizando el método de Sambrook y col. (1989), con algunas modificaciones. Se inoculó 1 ml de un precultivo de la cepa de *Escherichia coli* DH5 α F' en 100 ml de medio LB (Luria-Bertani) y se incubó hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 600 nm. Las células se colectaron mediante centrifugación a 4.000 rpm a 4°C durante 7 min. El sobrenadante se desechó y la biomasa bacteriana se resuspendió en 20 ml de una solución 10 mM MOPS y 10 mM ClK, previamente colocada sobre hielo. Las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 4.000 rpm a 4°C durante 7 min. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado celular se resuspendió en 15 ml de una solución fría de 100 mM MOPS, 50 mM CaCl₂ y 10 mM ClK. La suspensión se dispuso en hielo durante 15 min y las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 4.000 rpm durante 7 min. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en 100 mM MOPS, 50 mM Cl₂Ca, 10 mM ClK y 15% v/v de glicerol. Finalmente, alícuotas de 300 μ l de células se conservaron a -80°C. Para la transformación, se descongelaron las bacterias competentes en hielo y se colocaron 100 μ l en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se le agregaron 2,5 μ l de la mezcla de ligación y se agitó suavemente, incubando luego en hielo durante 30 min. El pulso de calor se realizó colocando el tubo con las células y plásmidos en un baño de agua a 42°C durante 30 s, permitiendo el ingreso del ADN plasmídico a las células de *E. coli* competentes, luego de lo cual se sumergió inmediatamente en hielo, donde se lo mantuvo durante 2 min. Transcurrido ese tiempo se agregó 1 ml de medio LB y se incubó en agitación (150 rpm) durante 1 h 30 min a 37°C. Alícuotas de 50 - 100 μ l de bacterias provenientes de la mezcla de transformación se sembraron en placas con medio LB - agar (1,5%) con el antibiótico de selección ampicilina (100 mg/ml), isopropil tio- β -galactósido (IPTG, 40 mg/l) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (XGAL, 50 mg/l) y fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Se preparó previamente soluciones stock de 10 mg/ml de ampicilina, 200 mg/ml de IPTG y 50 mg/ml de X-gal en dimetil

formamida. La incorporación de IPTG y X-gal en las placas posibilitó la selección de colonias recombinantes por el método α -complementación, en el cual se utilizan vectores que contienen las secuencias regulatorias y la secuencia codificante para los primeros 146 aminoácidos del gen de la β -galactosidasa (*lacZ*) de *E. coli*. Las colonias bacterianas portadoras del vector no recombinante en presencia del sustrato cromogénico para la β -galactosidasa (X-gal) son de color azul. La inserción de un fragmento de ADN en el sitio de clonado múltiple resulta en la síntesis de un fragmento amino terminal que no es capaz de complementarse. Por lo tanto, aquellas bacterias que tengan un fragmento insertado en el sitio de clonado múltiple darán colonias blancas en presencia del sustrato (X-gal). Las colonias blancas seleccionadas se repicaron individualmente en 4 ml de medio LB líquido con el antibiótico ampicilina (100 mg/ml) y se cultivaron durante 16 h a 37°C, luego se los centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min. El plásmido se purificó con el kit comercial *Wizard®Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, EE.UU.), siguiendo las especificaciones del fabricante. Para verificar la presencia de inserto en los vectores se llevó a cabo una digestión con la enzima *EcoRI* y los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1%.

2.9.6 Secuenciación

La secuenciación de los clones de ADN se realizó en el Instituto SIGYSA (INTA Castelar, Argentina). La interface VecScreen (www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html) fue utilizada para eliminar las secuencias procedentes del vector del producto de la secuenciación. A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron nuevos cebadores (Tabla 4) utilizando el programa Primerquest (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>), que fueron sintetizados por IDT (EE.UU.).

2.9.7 Análisis bioinformático de las secuencias

Con el fin de realizar la anotación de las secuencias, se realizó un análisis de homología utilizando los algoritmos BLASTn y BLASTx 2.2.20 (Altschul y col., 1997; Zhang y col., 2000) que se encuentran disponibles en la página web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La predicción de las

proteínas codificadas fue realizada mediante el programa FGENESH y las proteínas predichas fueron comparadas con las secuencias disponibles en las bases de datos de las mismas enzimas obtenidas de trigo pan, sorgo, arroz y avena. La finalidad de este análisis fue detectar la presencia de cambios estructurales en las regiones codificantes que pudieran significar cambios funcionales de la enzima.

2.10 Genotipificación de la población para el gen *Zds*

Una vez diseñados los cebadores que permiten caracterizar la variabilidad alélica del gen que codifica la enzima Zeta caroteno desaturasa correspondientes a los genomas A y B del trigo candeal (Tabla 4), los mismos se utilizaron para amplificar las secuencias correspondientes en ADN genómico proveniente de cada una de las variedades mencionadas en el apartado correspondiente. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5% p/v y en acrilamida al 6%. Para determinar el tamaño de las bandas fueron utilizados como marcadores de peso molecular PCR ladder de Biolabs (agarosa) y PCR ladder y 1Kb ladder (acrilamida). Las bandas se registraron de acuerdo a las diferencias específicas, para luego indagar si correspondían a más de un alelo.

3. RESULTADOS

3.1 Análisis estadísticos de los datos fenotípicos para caracteres de calidad y rendimiento (CPC, CIEa*, CIEb, CIE *L PMG, PH, PGP)

3.1.1 Condiciones ambientales de las tres localidades.

A continuación se muestra un detalle de las condiciones ambientales de las localidades de Pieres, Cabildo y Barrow para el año en el que se realizaron los ensayos a campo (Figura 17, A, B y C). Con temperatura y humedad adecuadas en el suelo, el cultivo de trigo se desarrolló en forma normal, con buen macollaje y sin heladas que redujeran la superficie foliar. Si bien se presentaron algunas heladas tardías a fines de octubre, en general no produjeron daños de importancia. En el mes de octubre, las temperaturas fueron normales, pero las escasas lluvias afectaron al cultivo hacia finales del mes. A partir del 4 de noviembre, las lluvias fueron abundantes, recuperando la humedad del perfil (190 mm en noviembre) en el centro a oeste de la subregión IV. Toda la subregión mostró una precipitación superior en el mes de noviembre, permitiendo un llenado de grano muy bueno, lo cual se vio reflejado en valores de PMG por encima de la media histórica.

Las lluvias totales desde junio a diciembre fueron un 8% superiores a lo normal, y un 110% mayores en la etapa de llenado de grano (mes de noviembre). La duración del período espigazón-madurez fue normal, permitiendo que la cosecha se realizara en la última semana de diciembre. En noviembre, las temperaturas medias fueron inferiores a la media de los últimos 10 años ($\approx 1,4^{\circ}$ C inferiores) y con solo dos días de más de 30° C. Las lluvias abundantes condujeron a un aumento importante en el PMG y en el PH, que contribuyó a buenos rendimientos y a una buena calidad comercial. Las enfermedades foliares no fueron importantes por no darse las condiciones predisponentes y sólo las variedades muy susceptibles tuvieron efectos importantes de roya de la hoja como para mostrar depresión del rendimiento y de la calidad comercial. Los rendimientos en la zona, producto de las buenas condiciones climáticas en Pieres y Barrow, fluctuaron entre 3000 y 6000 kg/ha.

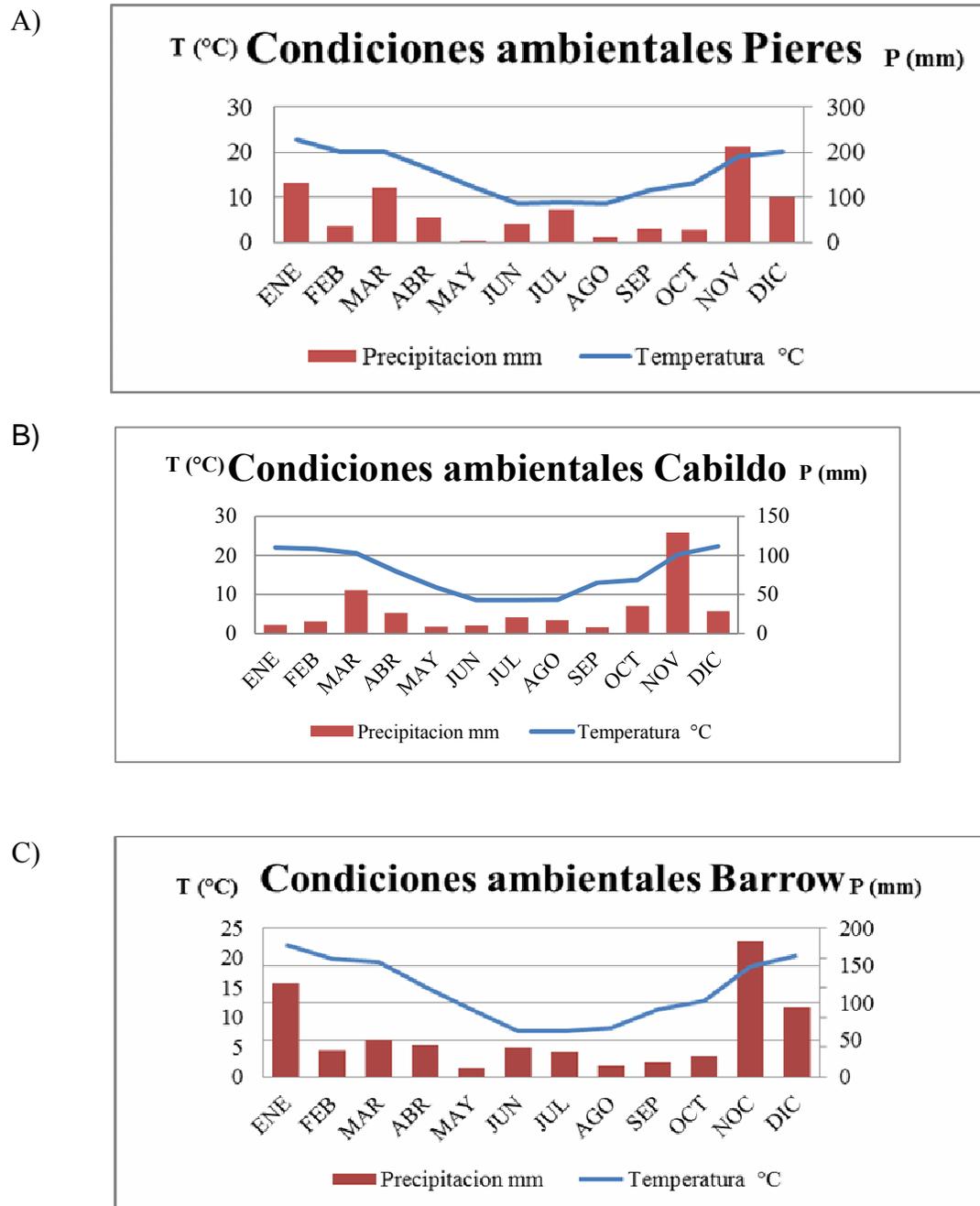


Figura 17. Condiciones climáticas: temperatura y precipitación para los ambientes Pieres (A), Cabildo (B) Barrow (C) en el año en que se realizaron las experiencias de campo (2011).

3.2 Caracteres investigados.

Las determinaciones fenotípicas se realizaron en 133 genotipos, 118 de los cuales se corresponden con aquellos genotipos con información molecular disponible. Los caracteres investigados fueron peso de mil granos (PMG, g), peso hectolítrico (PH, Kg/hl), contenido de pigmentos carotenoides (CPC, ppm), componentes del color: (CIE b*), (CIE a*), (CIE L*) y rendimiento de parcela (PGP, kg/ha). Teniendo en cuenta los modelos lineales mixtos y los lineales generalizados, se trató de seleccionar genotipos superiores utilizando los métodos REML/BLUP, correlaciones de Pearson entre los caracteres y parámetros genéticos.

3.3 Análisis de la varianza individual y conjunta.

El PMG, PH, CPC, los componentes del color CIE b*, CIE a* y CIE L* y el PGP se evaluaron en los tres ambientes bonaerenses, Pieres, Cabildo y Barrow, en ensayos realizados en la campaña 2011/2012. El análisis de la varianza de CPC y demás variables para ambientes individuales permitió detectar efectos altamente significativos ($p < 0,01$) debidos a los genotipos. Para la localidad de Barrow se evidenciaron efectos significativos sobre los bloques (Tabla Suplementaria 2).

El análisis de varianza conjunto indicó efectos altamente significativos ($p < 0,001$) para los factores ambiente, genotipo y la interacción $G \times A$ sobre los siete caracteres (Tabla 5). En términos de las estimaciones de parámetros de covarianza via REML, la mayor proporción de la varianza en relación a color amarillo (CPC y CIE b*) fue debida al factor genotipo, seguido del factor ambiente y por el componente de la interacción $G \times A$, aunque en menor magnitud. Por el contrario, la mayor parte de la variación en el brillo (CIE L*) fue explicada por el factor ambiental, seguido por el componente genotípico, que tuvo una igual contribución que el factor $G \times A$ en relación con la variación total. La mayor parte de la variación en el rojo (CIE a*) fue explicada por los genotipos, seguido por el componente $G \times A$ y, en una magnitud mucho menor, por el factor ambiental.

En cuanto al carácter PMG, la mayor parte de la variación fue debida al genotipo, seguida por el componente de interacción $G \times A$, y por último y en menor medida, por el ambiente.

En el caso del PH, la mayor parte de la variación fue explicada por el factor genotipo, seguido por el componente de interacción G×A y, por último, por el factor ambiente, siendo la contribución de estos dos últimos factores similar. En cuanto al rendimiento, la mayor parte de la variación relacionada con el PGP fue explicada por el ambiente, seguida por el componente de interacción G×A y, por último, por el factor genotipo, siendo la contribución de estos dos últimos factores limitada en comparación con la variación atribuida al factor ambiental.

Tabla 5. Estimaciones de la varianza para los efectos aleatorios y valores F para el efecto fijo (AMB) del análisis de la varianza (ANOVA) para los caracteres: peso de granos por parcela (PGP), contenido de pigmento amarillo (CPC), color amarillo (CIE b*), peso de mil granos (PMG), peso hectolítrito (PH), brillo (CIE L) y color rojo (CIE a*). Los datos fueron analizados para los tres ambientes bonaerenses Pieres, Cabildo y Barrow en conjunto mediante REML usando PROC MIXED en SAS. *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001, ns: no significativo.

Fuente de variación	PGP	CPC	CIE b*	PMG	PH	CIE L*	CIE a*
Genotipo	2538,3	0,39 ***	0,883 ***	11,049 ***	2,96 ***	0,165 ***	0,062 ***
Amb*Gen	160957 ***	0,168 ***	0,1210 ***	5,7 ***	1,439 ***	0,209 ***	0,016 ***
Repetición(Bloque)	0,0	0,007	0,0150	0	0	0,021	0,002
Bloque (Amb * Rep.)	3187 **	0,012 **	0,0230 **	1,643 **	0,0084 *	0,051 **	0,005 **
Residual	140699 ***	0,09 ***	0,1620 ***	8,890 ***	0,125 ***	0,268 ***	0,030 ***

Test F para efectos fijos	PGP	CPC	CIE b*	PMG	PH	CIE L*	CIE a*
Efecto AMB	Amb						
Núm., DF	2	2	2	2	2	2	2
Den DF	30	30	30	30	30	30	30
Valor F	1047,40	73,71	78,03	23,68	75,82	107,04	13,61
Pr > F	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Teniendo en cuenta la elevada proporción relativa de la variación total proporcionada por el factor genotípico, no es sorprendente encontrar valores altos de heredabilidad en sentido estricto ($h^2 = 84,5\%$, $92,8\%$, $85,5\%$, $76,5\%$ y $85,54\%$), para los caracteres CPC, CIEb*, CIEa*, PMG y PH respectivamente. El carácter CIEL*, obtuvo un valor de heredabilidad medios ($h^2 = 59,1\%$, respectivamente). Por otro lado, el carácter de rendimiento PGP, obtuvo un valor de heredabilidad relativamente bajo ($h^2 = 3,19\%$).

Cuando se consideraron las medias de mínimos cuadrados obtenidas mediante el análisis de la varianza via REML para el factor fijo ambiente (Tabla 6) se encontró que los valores de PMG, oscilaron entre 44,2 y 48,3 g, presentando granos más pesados la localidad de Barrow. En cuanto a los valores de PH, oscilaron entre 75,8 y 77,7 Kg/hl logrando los mayores valores la localidad de Cabildo, aunque para las tres localidades la variación fue menor para este parámetro. Los valores de CPC oscilaron entre 4,5 a 5,3 ppm siendo los materiales cosechados en la localidad de Cabildo los que presentaron mayor contenido de pigmentos carotenoides. Los valores de CIEb*, oscilaron entre 13,1 y 14,1, presentando mayores valores de color amarillo los materiales cosechados en la localidad de Cabildo. Con respecto al brillo los valores de CIEL* fluctuaron entre 81,5 y 83,1 registrándose en la localidad de Cabildo los mayores valores. En Barrow fue donde se obtuvieron mayores valores de color rojo (CIEa* entre -0,04 y 0,11).

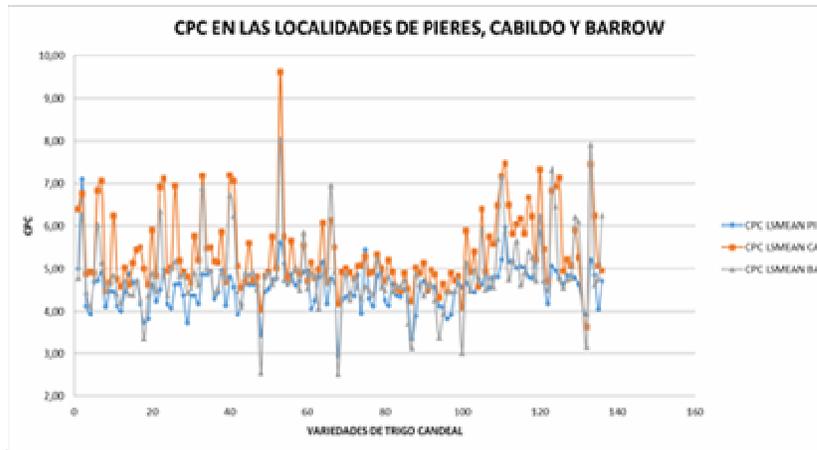
Tabla 6. Medias de mínimos cuadrados (MMC) obtenidas mediante REML en un MLM para el factor fijo ambiente calculadas para las variables CPC, CIE b*, CIE L*, CIE a*, PMG, PH y PGP de 133 variedades de trigo candeal evaluadas para las localidades de Pieres, Cabildo y Barrow. Los valores en negrita en la columna AMB y MMC (ambientes y medias de mínimos cuadrados) fueron aquellos valores que presentaron la mayor media para el carácter evaluado. *P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001, ns: no significativo.

Carácter	Efecto	AMB	MMC	Error estándar	gl	t Valor	Pr > t
PGP	AMB	PIERES	4735,25	610,867	30	77,52	<0,0001
	AMB	CABILDO	872,82	610,867	30	14,29	<0,0001
	AMB	BARROW	3495,09	610,867	30	57,22	<0,0001
CPC	AMB	PIERES	4,5706	0,07525	30	60,74	<0,0001
	AMB	CABILDO	5,3868	0,07525	30	71,58	<0,0001
	AMB	BARROW	4,8557	0,07525	30	64,53	<0,0001
CIE b*	AMB	PIERES	13,565	0,1024	30	132,47	<0,0001

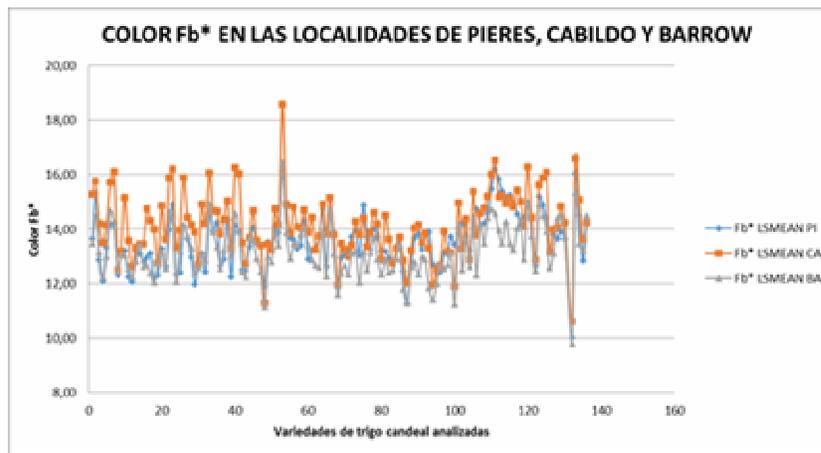
Carácter	Efecto	AMB	MMC	Error estándar	gl	t Valor	Pr > t
	AMB	CABILDO	14,144	0,1024	30	138,12	<0,0001
	AMB	BARROW	13,191	0,1024	30	128,82	<0,0001
PMG	AMB	PIERES	46,2599	0,5098	30	90,73	<0,0001
	AMB	CABILDO	44,2722	0,5098	30	86,84	<0,0001
	AMB	BARROW	48,3782	0,5098	30	94,89	<0,0001
PH	AMB	PIERES	77,0215	0,1833	30	420,19	<0,0001
	AMB	CABILDO	77,7193	0,1833	30	424	<0,0001
	AMB	BARROW	75,8586	0,1833	30	413,84	<0,0001
CIE L*	AMB	PIERES	82,5631	0,09126	30	904,7	<0,0001
	AMB	CABILDO	83,1315	0,09126	30	910,93	<0,0001
	AMB	BARROW	81,5817	0,09129	30	893,64	<0,0001
CIE a*	AMB	PIERES	-0,04568	0,03391	30	-1,35	0,188 ns
	AMB	CABILDO	-0,02503	0,03391	30	-0,74	0,4661 ns
	AMB	BARROW	0,1113	0,03392	30	3,28	0,0026 ns

Las correlaciones entre las medias de mínimos cuadrados para CPC entre los ambientes variaron de 0,83 a 0,95 ($p < 0,001$), indicando una consistencia o patrón entre los genotipos y los ambientes, sugiriendo que la interacción genotipo – ambiente observada es de tipo no cruzada (Figura 18 A-G)

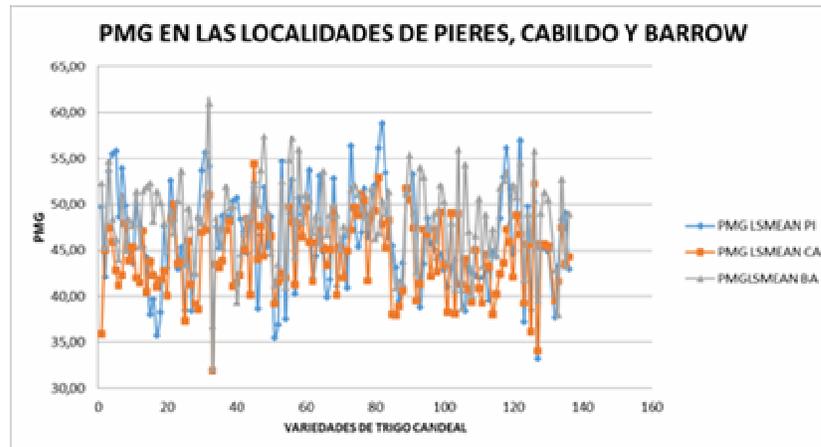
A



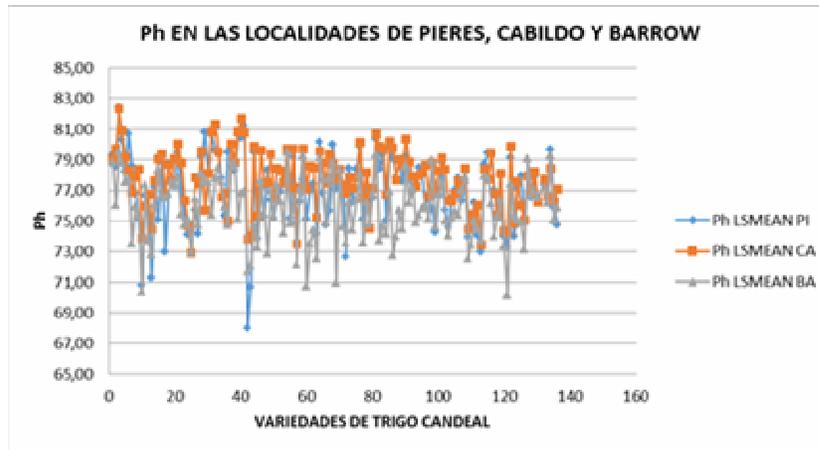
B



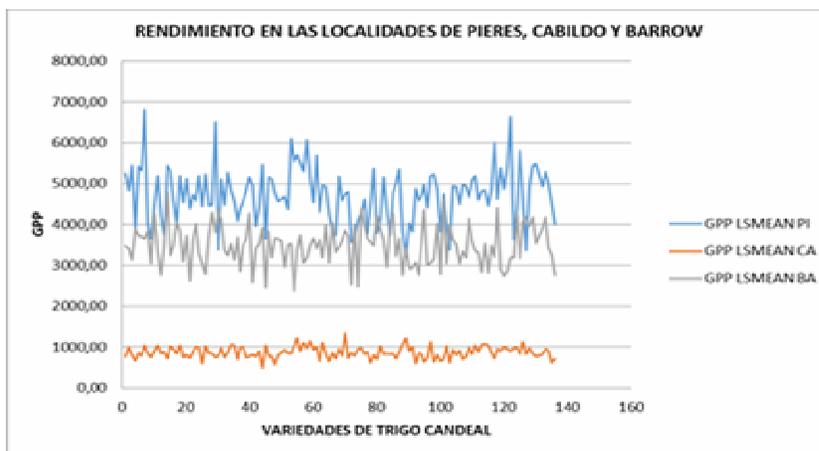
C



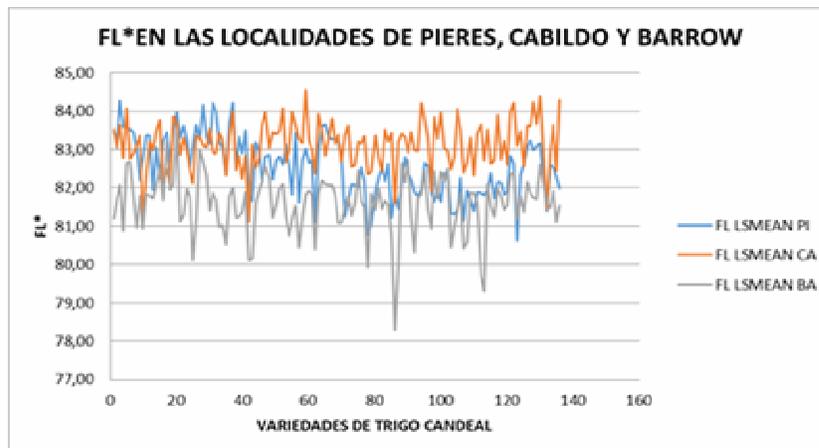
D



E



F



G

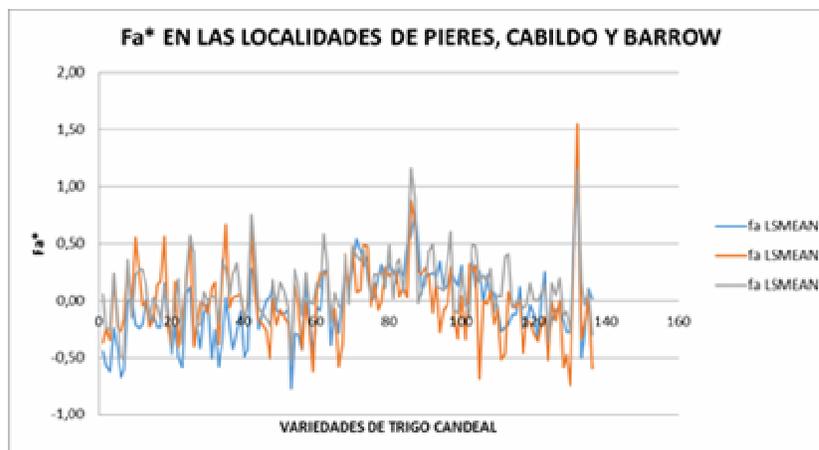


Figura 18. Interacción de tipo no cruzada identificada a partir de las medias de mínimos cuadrados de cada uno de los genotipos obtenidas mediante un modelo lineal generalizado (GML) y graficadas en los ambientes: Pieres, Cabildo y Barrow para los caracteres: (A) CPC, (B) CIE b*, (C) PMG, (D) Ph, (E) PGP, (F) CIE L* y (G) CIE a* en el año en que se realizaron las experiencias de campo (2011).

3.4 Correlaciones de Pearson entre ambientes para las variables CPC, CIE b*, CIE L*, CIE a*, PMG, PH, PGP

Los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados mediante PRO CORR en SaS para las medias de mínimos cuadrados de cada uno de los genotipos obtenidas via GML y fueron comparadas mediante el test de Tukey, encontrándose diferencias significativas ($p > 0.01$) para las medias de los genotipos de todos los caracteres exceptuando a el carácter color rojo o CIE a* en las localidades de Pieres y Cabildo (Tabla 7 y Tabla suplementaria 1.1)

Tabla 7. Medias de mínimos cuadrados (MMC), obtenidas en un modelo lineal generalizado para el factor genotipo. Las MMC fueron calculadas para las variables CPC, CIE b*, CIE L*, CIE a*, PMG, PH y PGP de 133 variedades de trigo candeal evaluadas para las localidades de Pieres, Cabildo y Barrow. Los valores en negrita en la columna AMB y MMC (ambientes y medias de mínimos cuadrados) fueron aquellos valores que presentaron la mayor media para el carácter evaluado. HSD: valor de diferencia honestamente significativa para la prueba de Tukey $**P < 0,01$, ns: no significativo.

Carácter	Efecto	AMB	MMC	Error estándar	HSD. V.Tukey	Pr > t
PGP	GEN	PIERES	4733,42	42,03	172,95 (A)	**
	GEN	CABILDO	870,88	42,03	172,95 (B)	**

Carácter	Efecto	AMB	MMC	Error estándar	HSD. V. Tukey	Pr > t
CPC	GEN	BARROW	3493,82	42,03	172,9 (C)	**
	GEN	PIERES	4,57	0,04	0,28 (A)	**
	GEN	CABILDO	5,39	0,04	0,28 (B)	**
CIE b*	GEN	BARROW	4,86	0,04	0,28 (C)	**
	GEN	PIERES	13,57	0,04	0,37 (A)	**
	GEN	CABILDO	14,14	0,04	0,37 (B)	**
PMG	GEN	BARROW	13,19	0,04	0,37 (C)	**
	GEN	PIERES	46,23	0,28	1,66 (A)	**
	GEN	CABILDO	44,22	0,28	1,66 (B)	**
PH	GEN	BARROW	48,38	0,280	1,66 (C)	**
	GEN	PIERES	77,00	0,11	0,74 (A)	**
	GEN	CABILDO	77,70	0,11	0,74 (B)	**
CIE L*	GEN	BARROW	75,86	0,11	0,74 (C)	**
	GEN	PIERES	82,56	0,05	0,26 (A)	**
	GEN	CABILDO	83,13	0,05	0,26 (B)	**
CIE a*	GEN	BARROW	81,58	0,05	0,26 (C)	**
	GEN	PIERES	-0,04	0,02	0,11 (A)	ns
	GEN	CABILDO	-0,02	0,02	0,11 (B)	ns
	GEN	BARROW	0,11	0,02	0,11(B)	**

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

Los caracteres CPC y CIEb* mostraron una correlación significativa ($r = 0,95$) (Tabla 8). Estos caracteres también se correlacionaron significativamente, pero de manera negativa, con el PMG ($r = -0,20$ y $r = -0,17$ respectivamente). Es decir que los materiales de granos más grandes presentaron menores valores de color amarillo y pigmento debido fundamentalmente a un efecto de dilución. El PMG también se correlacionó significativamente y positivamente con el componente de color CIEL* ($r = 0,24$), presentando mayor brillo aquellos materiales de granos más pesados. El PH mostró correlaciones significativas con el PGP, CIEL* y CIEa* ($r = 0,15$, $r = 0,36$ y con $r = -0,17$, respectivamente). El PGP correlacionó significativamente y positivamente con (CPC) y con los componentes del color CIE b* y CIE L* y con el PH ($r = 0,22$, $r = 0,20$, $r = 0,15$ y $r = 0,15$) y negativamente con CIE a* ($r = -0,28$).

Tabla 8. Correlaciones fenotípicas y de Pearson para caracteres de calidad y rendimiento de 133 variedades de trigo candeal en los ambientes Pieres, Cabildo y Barrow evaluadas en conjunto. Los valores en negrita son valores que presentaron correlaciones significativas para los caracteres evaluados *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, ns: no significativo.

Carácter	CPC	CIE b*	PMG	PH	PGP	CIE L*	CIE a*
CPC	1	0,95 ***	- 0,20*	- 0,05 ns	0,22 *	0,015 ns	-0,60 ***
CIE b*		1	- 0,17*	- 0,04 ns	0,20 *	0,02 ns	-0,63***
PMG			1	0,075 ns	0,07 ns	0,24 **	-0,12 ns
PH				1	0,15 *	0,36 ***	-0,17*
PGP					1	0,15 *	-0,28 **
CIE L*						1	-0,64 ***
CIE a*							1

En el ambiente Pieres (Tabla 9) el CPC y el componente de color CIEb* también correlacionaron positiva y significativamente (Tabla 9), presentando los valores más bajos, teniendo en cuenta valores observados en los tres ambientes. La correlación entre los componentes del color y el PMG fue significativa pero negativa, con valores de -0,14 y -0,15, respectivamente. El PH y el PMG presentaron una correlación del 34%. Este factor de calidad también correlacionó con el PGP en un 26%. El color rojo de la sémola integral (CIE a*) correlacionó significativa y negativamente con todas las variables evaluadas. Para esta localidad el brillo y el color b*, asociado con el amarillo de las sémolas integrales, correlacionaron negativa pero significativamente, con un valor de -0,17

Tabla 9. Correlaciones fenotípicas y de Pearson para caracteres de calidad y rendimiento de variedades de trigo candeal evaluadas en el ambiente Pieres. Los valores en negrita presentaron correlaciones significativas para los caracteres evaluados *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, ns: no significativo.

Carácter	CPC	CIE b*	PMG	PH	PGP	CIE L*	CIE a*
CPC	1	0,83***	- 0,14 *	- 0,05 ns	0,12 ns	- 0,09 ns	- 0,43***
CIE b*		1	- 0,15*	- 0,08 ns	0,088 ns	-0,17 *	-0,44 ***
PMG			1	0,34***	0,12 ns	0,26 **	- 0,18 *
PH				1	0,26**	0,36 ***	- 0,19 *
PGP					1	0,13 ns	- 0,32 **
CIE L*						1	-0,67 **
CIE a*							1

La correlación más elevada entre el CPC y el CIEb* se observó en el ambiente Cabildo, con un valor de 0,94 (Tabla 10). Es conocido que en esta localidad el candeal rinde menos, pero las observaciones indican que los granos concentran valores más elevados de pigmento amarillo. Esto también se desprende de la correlación entre el PMG y los componentes del color, que fue significativa pero negativa y mayor que en el ambiente Pieres. En este ambiente el PH y el PGP se correlacionaron significativa y negativamente, con un valor de -0,15.

Tabla 10. Correlaciones fenotípicas y de Pearson para caracteres de calidad y rendimiento de variedades de trigo candeal evaluadas en el ambiente Cabildo. Los valores en negrita presentaron correlaciones significativas para los caracteres evaluados. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, ns: no significativo.

Carácter	CPC	CIE b*	PMG	PH	PGP	CIE L*	CIE a*
CPC	1	0,94***	-0,23**	-0,10	0,21**	-0,09	-0,45***
CIE b*		1	-0,19*	-0,06	0,25**	-0,08	-0,46***
PMG			1	0,038	0,27**	0,14	-0,00092
PH				1	-0,15*	0,16*	-0,037
PGP					1	0,05	0,05
CIE L*						1	-0,66***
CIE a*							1

En la localidad de Barrow la correlación entre el CPC y el CIE b* fue del orden de 0,87, (Tabla 11). Estos caracteres no se correlacionaron con el componente de color relacionado con el amarronamiento o bajo brillo de las sémolas integrales, pero si lo hicieron significativa y negativamente con el rojo de las sémola con un valor de -0,43 y -0,50 para CPC y CIEb*, respectivamente. El color amarillo de la sémola también se correlacionó significativa pero negativamente con el peso de los granos ($r=0,22$). Este resultado no es sorprendente dado que en esta localidad suelen observarse valores de CIEb* y CPC medios a altos y por lo general rindes con comportamientos similares, lo cual concuerda con la idea de que a mayor tamaño de grano posiblemente se de una dilución de los pigmentos amarillos.

Tabla 11. Correlaciones fenotípicas y de Pearson para caracteres de calidad y rendimiento de variedades de trigo candeal evaluadas en el ambiente Barrow. Los valores en negrita presentaron correlaciones significativas para los caracteres evaluados *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, ns: no significativo *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,0001, ns: no significativo.

Carácter	CPC	CIE b*	PMG	PH	PGP	CIE L*	CIE a*
CPC	1	0,87**	-0,28*	-0,0038	0,074	-0,004	-0,43***
CIE b*		1	-0,22**	0,024	0,082	-0,026	-0,50***
PMG			1	-0,098	-0,038	0,29**	-0,19*
PH				1	0,040	0,25**	-0,18*
PGP					1	0,13	-0,13
CIE L*						1	-0,63***
CIE a*							1

3.5 Parámetros genéticos

3.5.1 Estimación de parámetros genéticos

Los parámetros genéticos fueron estimados mediante los estimadores de los componentes de la varianza REML (Restricted maximum likelihood) mediante los modelos lineales mixtos. En el análisis de los modelos mixtos, los efectos del modelo no se ponen a prueba a través de pruebas F, como se hace en el análisis de la varianza. En este caso, para los efectos aleatorios, la prueba recomendada es la prueba de razón de verosimilitud

(likelihood ratio test, LRT). Este estadístico sigue una distribución χ^2 con grados de

libertad igual a la diferencia del número de parámetros entre los dos modelos analizados. El estadístico LRT permitió evaluar la importancia de caracteres de calidad y rendimiento y fueron testeados entre el 1 y 5% de probabilidad, con un grado de libertad.

El análisis de desvío (ANODEV) proporciona una forma de evaluar el impacto de una covariable comparando la desviación explicada por la covariable contra la desviación no explicada por la misma. Este análisis fue ejecutado en SaS.9.01 a partir de los modelos lineales mixtos (Tabla 12) y permitió detectar diferencias significativas utilizando LRT al

1% de probabilidad para los factores aleatorios genotipo (gen) y la interacción genotipo por ambiente (gen*amb) para los caracteres peso de mil granos (PMG), peso hectolítrico (PH), contenido de pigmentos carotenoides (CPC) y los componentes del color (CIE b*, CIE a* y CIE L*). En relación al rendimiento por parcela (PGP) el factor aleatorio genotipo no fue significativo, pero si la interacción (gen*amb).

Los factores fijos (ambiente/localidad) testeados con la prueba F fueron significativos ($p < .0001$) para todos los caracteres. Estos valores de LRT indican qué tan importante es o cuál es el aporte para el modelo estadístico del factor aleatorio (genotipo) o la interacción entre el genotipo y el ambiente. Este análisis, entonces, permitió ratificar los resultados obtenidos con el análisis anterior. Es decir, que los caracteres CPC, CIE b*, CIE a*, PMG y PH mostraron las mayores variaciones atribuidas al genotipo (con valores de LRT = 165, LRT = 314, LRT = 175, LRT = 98 y LRT = 178, respectivamente), indicando que los materiales dentro de la colección presentan un rango amplio de variación fenotípica, atribuible en gran medida al genotipo. Esto podría explicarse por la presencia de diferentes alelos para cada uno de estos caracteres, lo que permite incrementar el potencial para identificar asociaciones entre marcadores polimórficos y el/los QTL que controlan el carácter. Con respecto al PGP, al no ser significativo en el modelo, indicaría que el factor genotipo no aporta información para este carácter como variable al modelo, pero si la interacción con el ambiente.

Tabla 12. Análisis de desvío (ANODEV) identificando el valor LRT de aporte al modelo, para los efectos aleatorios del modelo lineal mixto, genotipo (GEN) y la interacción genotipo*ambiente (GEN*AMB) para los siete caracteres fenotípicos evaluados en 133 variedades de trigo candeal en tres ambientes de la Pcia. de Bs As. Chi-cuadrado tabulado (3,84 y 6,63) para los niveles de significación de 5% y 1%, respectivamente. Si la prueba LRT (likelihood ratio test) a través de chi-cuadrado tiene un valor de $p < 0.05$ es significativa para GEN y para la interacción GEN * AMB.+ Desviación del modelo ajustado sin el efecto del genotipo. ++ La desviación del modelo ajustado con efecto del genotipo.

Factor	Carácter	Desviación sin efecto aleatorio +	Desviación con efecto aleatorio++	Valor LRT	P-valor chi-cuadrado
GEN	PGP	12413,6	12413,5	0,046	0,8302
GEN*AMB	PGP	12521,7	12413,5	108,120	<0,0001
GEN	CPC	1453,0	1288,0	165,009	<0,0001
GEN*AMB	CPC	1467,3	1288,0	179,329	<0,0001

Factor	Carácter	Desviación sin efecto aleatorio +	Desviación con efecto aleatorio++	Valor LRT	P-valor chi-cuadrado
GEN	CIE b*	1931,9	1617,5	314,43	<0,0001
GEN*AMB	CIE b*	1680,6	1617,5	63,081	<0,0001
GEN	PMG	4747,4	4648,5	98,8303	<0,0001
GEN*AMB	PMG	4701,2	4648,5	52,6513	<0,0001
GEN	PH	2368	2189,4	178,567	<0,0001
GEN*AMB	PH	2881,5	2189,4	692,142	<0,0001
GEN	CIE L*	1840,5	1803,4	37,0756	<0,0001
GEN*AMB	CIE L*	1871	1803,4	67,5879	<0,0001
GEN	CIE a*	271,8	96,3	175,492	<0,0001
GEN*AMB	CIE a*	137,4	96,3	41,174	<0,0001

El análisis de los estimadores de los componentes de la varianza utilizando REML, permitió determinar coeficientes de variación genética (CVg) altos, intermedios y bajos (Tabla 13) para los caracteres evaluados. El coeficiente de variación es un indicador del grado de variabilidad debido al genotipo (expresa la magnitud de la contribución genética del total de la variación del carácter y cuantifica la magnitud de la variación genética disponible para la selección y, por tanto, son deseables valores altos). Los caracteres rendimiento y brillo de la sémola presentan valores muy bajos (0,49 y 1,66, respectivamente), el peso hectolítrico y el color rojo presentaron valores intermedios (2,24 y 2,44, respectivamente), el contenido de pigmentos carotenoides, color b* y el peso del grano presentaron los valores más altos (12,63; 6,90 y 7,18, respectivamente). Esto indica que todavía existe un amplio margen, en términos de selección, en los últimos tres caracteres mencionados. No sucede lo mismo para CIE L*, peso hectolítrico y color rojo. No obstante, se puede esperar respuesta debido al alto grado de heredabilidad encontrado en estos caracteres.

Tabla 13. Heredabilidad y parámetros genéticos para caracteres de calidad y rendimiento en variedades de trigo candeal evaluadas en tres ambientes bonaerenses.

Parámetros Genéticos	CPC	CIE b*	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	PGP
Vf	0,65	1,17	25,67	4,53	0,64	0,11	304194,23
Vg	0,39	0,88	11,05	2,96	0,17	0,06	2538,28
Vga	0,17	0,12	5,73	1,44	0,21	0,02	160956,98
c ² int	0,26	0,10	0,22	0,32	0,33	0,15	0,53

Parámetros Genéticos	CPC	CIE b*	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	PGP
Ve	0,09	0,16	8,89	0,13	0,27	0,03	140698,97
h²mgen	84,58	92,89	76,52	85,54	59,15	85,59	3,19
Acgen	91,97	96,38	87,47	92,49	76,91	92,51	17,85
Cvg	12,63	6,90	7,18	2,24	0,49	2,44	1,66
Cve	6,08	2,96	6,44	0,46	0,63	1,73	12,36
Cvg/Cve	2,08	2,33	1,11	4,86	0,79	1,44	0,13
rgloc	0,70	0,88	0,66	0,67	0,44	0,79	0,02
PEV	0,06	0,06	2,59	0,43	0,07	0,01	2,457
SEP	0,24	0,25	1,61	0,65	0,26	0,10	49,57
X	4,94	13,63	46,30	76,87	82,43	0,01	3034,39

: $V_f = V_g + V_{ga} + V_e$: Varianza Fenotípica (GEN);

V_g : Varianza Genotípica;

V_{ga} : Varianza de interacción GEN X AMB;

$c^2_{int} = V_{ga}/V_f$: Coeficiente de determinación de los efectos de interacción GEN X AMB; V_e : Varianza ambiental (Residual)

$h^2_{mg} = (V_g / (V_g + V_{ga} / \text{num.amb} + V_e / (\text{num.amb} * \text{num.rep})))$: Herdabilidad media (genotipos);

$AcGen = \text{raiz.cuadrada}(h^2_{mg})$: Exactitud en la selección de los genotipos;

$CV_g = \text{raiz.cuadrada}(V_g / \text{media. General})$: Coeficiente de variación genético;

$Ve = \text{raiz. Cuadrada}(V_e / \text{media. General})$: Coeficiente de variación ambiental; $CV_g/Cve = CV_g/Cve$: coeficiente de variación relativo;

$rgloc = V_g / (V_g + V_{ga})$: Corr. Genotípica del rendimiento de los genotipos en varios entornos;

$PEV = (1 - AcGen^2) * V_g$: varianza del error de predicción de los valores genotípicos;

$SEP = \text{raiz.cuadrada}(PEV)$: desviación estándar de valor genotípico;

\bar{X} : Media. General.

El coeficiente de variación ambiental (Cve) para el rendimiento fue elevado (12,36), indicando un efecto importante del ambiente sobre este carácter (Tabla 13). En cambio, el contenido de pigmentos carotenoides (6,08), el color amarillo de la sémola (2,96) y el peso del grano (6,44) presentaron valores intermedios, indicando un efecto ambiental moderado que debe tenerse en cuenta para la selección de genotipos. El peso hectolítrico (0,46), el componente brillo (0,63) y color rojo de la sémola (1,73) presentaron valores bajos. Este coeficiente cuantifica la magnitud de la variación ambiental sobre la expresión total del carácter. En términos de selección son deseables valores bajos.

La relación entre el coeficiente de variación genético ambiental CV_g/Cve o índice de variación fue mayor para los caracteres PH, CPC, CIEb* y menor para PGP (0,13) (Tabla 13). Este índice de variación cuantifica la proporción de variabilidad genética en relación a la variabilidad ambiental. La relación CV_g/Cve es determinada para obtener valores de ganancia por selección, y, cuando tiende a uno o es superior a uno, la variación genética es

mayor que la variación ambiental, lo que indica que la selección para estos caracteres tiene las mejores condiciones en términos de ganancia genética inmediata. En la población evaluada, mayores respuestas a la selección podrán ser obtenidas para las características PH, CPC, CIEb*, CIEa y PMG, que presentaron valores de 4,86, 2,08, 2,33, 1,44 y 1,11 , respectivamente.

Los valores de heredabilidad (h^2), en general, fueron medios a altos para los caracteres evaluados (Tabla 13 y Tabla suplementaria 2 a). De acuerdo con Stanfi *et al* (1971), los caracteres se consideran de heredabilidad alta cuando esta es mayor a 0,50, de heredabilidad media entre 0,20 y 0,50, y de heredabilidad baja si esta fue menor a 0,20. Los caracteres CPC, CIE b*, PMG, PH y CIEa* presentaron valores de heredabilidad altos (84,58% 92,8%, 76,52%, 85,54 % y 85,59%, respectivamente), mientras que se obtuvieron valores medios para CIEL* (59,15%) y bajos para PGP (3,19%).

En general, los caracteres evaluados en este análisis presentaron valores altos de variabilidad, (Tabla, 13) lo cual es esperable al tratarse de una colección de germoplasma con variedades de diferentes orígenes y con estructura poblacional. Las correlaciones genotípicas (r_{gloc}) para las variables CPC, CIEb* y CIEa fueron elevadas en las tres localidades, con valores de 0,70, 0,88 y 0,79, respectivamente. Lo que sugiere un alto componente genético y en ese sentido una alta variabilidad alélica predominando sobre el factor ambiental.

En función del mayor o menor grado de adaptabilidad y estabilidad genética de los genotipos, la varianza de la interacción genotipo por ambiente (V_{ga}), puede sobreestimar la expresión de un carácter fenotípico (Bastos *et al.*, 2007). Esta medida cuantifica la fracción de la variación total debido a la interacción $G \times A$. Un valor de estimación de V_{ga} de pequeña magnitud indica que la interacción $G \times A$ tiene poca influencia sobre el valor fenotípico (Maia *et al.* 2009). En ese contexto, un genotipo con una buena productividad en un ambiente tiende a mantener parámetros similares en ambientes diversos, una vez que ese genotipo responde favorablemente a las influencias ambientales (correlación entre valores genotípicos, a través de las localidades), además de poseer predictibilidad considerable frente a las variaciones ambientales

3.5.1.1 Genotipos superiores para los caracteres evaluados en las localidades de Pieres, Cabildo y Barrow.

En esta sección de la tesis se trató toda la información volcada en los puntos precedentes para seleccionar genotipos superiores para los caracteres de interés. De acuerdo con Cruz *et al.* (2004), el desempeño fenotípico por sí solo no es la manera más adecuada de estimar los componentes de la varianza. Una alternativa complementaria es predecir el mérito genético (Robinson, 1991) por medio del predictor lineal e insesgado (BLUP) (Resende, 2002) que permite predecir valores genéticos sin las influencias del ambiente (Chiorato *et al.*, 2008). Según Bhering *et al.* (2012), el uso de criterios de selección que permitan la predicción de las ganancias genéticas orienta, de manera eficaz, el proceso de mejoramiento porque posibilita la previsión de los resultados de los esquemas adoptados y la toma de decisión con base en datos científicos.

Con la inferencia genotípica ($m + BLUP$) es posible observar cuales genotipos presentan valores positivos en relación a la media para las características deseadas. Si el interés del mejorador es el de plantas con bajo CIE L*, se pueden escoger genotipos con predicción negativa, pero si el objetivo es de plantas de mayor CPC, los genotipos con predicción positiva tienen prioridad. Además, el mejorador puede cruzar la información de los valores fenotípicos y genotípicos para perfeccionar la inferencia y selección o descarte de genotipos.

Los resultados obtenidos con la metodología REML/BLUP para los caracteres relacionados con el color del grano, como el CPC (Tabla 14) y CIEb* (Tabla 15), evaluados en 133 genotipos indicaron que los materiales Amarillo (53), CBW 05082 (133), Buck Topacio (2), Durobonus (110), Vivadur (120), Joyau (111), Exeldur (123), CBW 0105 (33), CBW 0225 (40), VF 0163 (23) y Argeles (124) fueron los que se obtuvieron las primeras posiciones en la escala de genotipos superiores para las localidades de Pieres, Cabildo y Barrow. Se evidencia que los valores (g, mejor predictor lineal insesgado) que hacen referencia al valor BLUP están en un rango de 2,36 a 1,38. La interacción con el ambiente varió entre 0,3 y 0,143. Estos últimos se consideran valores bajos de influencia ambiental,

que pueden ser soportados por la plasticidad genotípica de los materiales, indicando que los genotipos mencionados mostraron una mayor capacidad de adaptación y estabilidad para ser seleccionados en los ambientes evaluados. El parámetro o atributo ganancia genética se describe como la magnitud de la ganancia genética ganada corregida por la heredabilidad de cada carácter.

Tabla 14. Valores genotípicos para la variable (CPC) teniendo en cuenta los tres ambientes de evaluación. **Blup**: mejor predictor lineal insesgado; **SEP**: error de predicción del Blup; **Valor t (g)**: Blup/SEP; **Pr > |t|**: probabilidad del valor de t; **gem (int. media.gen. amb)**: efecto genotípico por ambiente; **u+g+gem**: (Valor Genotípico) Media de cada AMB+BLUP+interacion dentro de cada AMB)

Ranq uin	GEN	g (BLUPS)	SEPg	valor t (g)	Pr > t (g)	gem (int. media.gen. amb)	u+g+gem	Ganancia	Nueva Media
1	53	2,36	0,25	9,39	<0,0001	0,3391	7,63793	2,36115	7,299
2	133	1,61	0,25	6,44	<0,0001	0,2325	6,78943	1,99017	6,928
3	2	1,501	0,25	5,97	<0,0001	0,2156	6,65438	1,82715	6,765
4	110	1,33	0,25	5,31	<0,0001	0,1917	6,46430	1,70408	6,642
5	120	1,29	0,25	5,16	<0,0001	0,1861	6,41980	1,62246	6,560
6	111	1,26	0,25	5,03	<0,0001	0,1816	6,38422	1,56287	6,501
7	123	1,22	0,25	4,87	<0,0001	0,1758	6,33756	1,51447	6,452
8	33	1,14	0,25	4,55	<0,0001	0,1643	6,24627	1,46819	6,406
9	40	1,09	0,25	4,36	<0,0001	0,1575	6,19189	1,42691	6,365
10	124	1,00	0,25	3,98	<0,0001	0,1437	6,08181	1,38426	6,322

Tabla 15. Valores genotípicos para la variable (CIE b*) teniendo en cuenta los tres ambientes de evaluación. **Blup**: mejor predictor lineal insesgado; **SEP**: error de predicción del Blup; **Valor t (g)**: Blup/SEP; **Pr > |t|**: probabilidad del valor de t; **gem (int. media.gen. amb)**: efecto genotípico por ambiente; **u+g+g**: (Valor Genotípico) Media de cada AMB+BLUP+interacion dentro de cada AMB).

Rango	GEN	g (BLUPS)	SEPg	valor t (g)	Pr > t (g)	gem (int. media).	u+g+gem	Ganancia	Nueva Media
1	53	3,1338	0.2660	11.78	<.0001	0.1436	16.9107	3.1338	16.7671
2	133	2,1770	0.2660	8.18	<.0001	0.09977	15.9101	2.65539	16.2887
3	111	1,9473	0.2660	7.32	<.0001	0.08925	15.6699	2.41938	16.0527
4	110	1,6416	0.2660	6.17	<.0001	0.07523	15.3501	2.22493	15.8582
5	120	1,6400	0.2660	6.17	<.0001	0.07516	15.3485	2.10794	15.7412
6	123	1,4894	0.2662	5.60	<.0001	0.06826	15.1909	2.00485	15.6381
7	2	1,4210	0.2662	5.34	<.0001	0.06512	15.1194	1.92144	15.5547
8	33	1,3972	0.2660	5.25	<.0001	0.06404	15.0946	1.85591	15.4892
9	23	1,3726	0.2661	5.16	<.0001	0.06291	15.0688	1.80221	15.4355
10	124	1,3606	0.2663	5.11	<.0001	0.06236	15.0562	1.75804	15.3913

Rango	GEN	g (BLUPS)	SEPg	valor t (g)	Pr > t (g)	gem (int. media).	u+g+gem	Ganancia	Nueva Media
11	112	1,2828	0.2660	4.82	<.0001	0.05879	14.9749	1.71484	15.3481

En relación a los caracteres de PMG y PH, las variedades que se comportaron similarmente en los tres ambientes fueron ACA 1801F (32), Candeal Durumbuck (81), Buck Esmeralda (3), Taganrog Sel. BUCK (90), Portorico (126), Catervo (45), Buck Cristal (4), CBW 0156 (56), CBW 0230 (41), CBW 0225(40), Tiziannia (122), Garic (118), Buck Granate (B#26) (64) y CBW 0153 (37). Por ello se considera que estos genotipos son superiores y que es posible encontrar dentro de estos materiales alelos favorables para los mencionados caracteres (Tabla suplementaria 3 y 4).

3.6 Variabilidad genética obtenida a partir de marcadores AFLP

El genotipado realizado a través de seis combinaciones de AFLP, permitió obtener 324 bandas totales siendo 116 (35.8 %) bandas polimórficas, las cuales fueron seleccionadas bajo el criterio de no contener más de 10% de datos perdidos por locus. Con estos datos se obtuvo (i) el índice de contenido polimórfico (PIC), (ii) la proporción de bandas polimórficas y (iii) el índice de marcador (MI). Teniendo en cuenta el total de bandas polimórficas y monomórficas obtenidas, se realizó un análisis de frecuencias alélicas según el origen geográfico de las accesiones utilizando el programa GenAlEx 6.4 (Peakall & Smouse, 2006).

Este estudio determinó que las accesiones con origen geográfico argentino e italiano son las que presentan los mayores valores de polimorfismo y de heterocigosidad esperada. El rango de polimorfismo por combinación de cebador varió entre 79,3% y 27,6% para las combinaciones P41M39 y P41M45, respectivamente (Tabla 16).

Tabla 16. Porcentaje de polimorfismo (%P), índice de contenido polimórfico (PIC) e índice de marcador (MI) para distintas combinaciones de cebadores de AFLPs amplificadas en 118 genotipos de trigo candeal de diferentes orígenes geográficos.

Combinación	Nº bandas polimórficas	Nº bandas totales	% P	PIC	MI
P40M38	10	38	32,8	0,19	1,90
P40M43	22	62	53,4	0,30	6,59
P41M31	28	92	79,3	0,31	8,37
P41M39	28	61	52,6	0,38	10,6

Combinación	N° bandas polimórficas	N° bandas totales	% P	PIC	MI
P41M43	17	39	33,6	0,32	4,48
P41M45	11	32	27,6	0,27	2,7
Total/ Promedio	116	324	35,8		

Los valores de PIC para cada una de las combinaciones de cebadores (Tabla 16) variaron entre 0,38 (combinación P41M39) y 0,19 (combinación P40M38). Los valores de PIC por origen geográfico variaron muy poco, entre 0,293 para los originarios de EE.UU a 0,307 en los materiales Italianos (Tabla 17). El valor de PIC para los marcadores AFLP tiene un máximo de 0,5, debido a la herencia dominante de este tipo de marcador (Martos *et al.*, 2005). Considerando el origen de las accesiones, los materiales argentinos e italianos presentaron el mayor porcentaje de polimorfismo promedio, 32,32% y 31,71%, respectivamente, seguido de los materiales de CIMMyT y Francia con 25,96%, y de los originados en EE.UU, que fueron los que presentaron menor variabilidad, 15,82% (Tabla 18).

Tabla 17. Número de bandas totales, proporción de bandas polimórficas y valores de índice de contenido polimórfico (PIC) e índice de marcador (MI) obtenidos utilizando diferentes combinaciones de cebadores de AFLP en 118 genotipos de trigo candeal de acuerdo a su origen geográfico.

Origen	PIC	Bandas totales	Proporción de bandas polimórficas	MI
Argentina	0,301	324	0,3232	31,52
Italia	0,307	324	0,3251	32,34
CIMMyT	0,302	324	0,2677	26,19
Francia	0,305	324	0,2650	26,19
WANA	0,310	324	0,2523	25,26
EE.UU	0,293	324	0,1636	15,53

También se calculó como un parámetro de variabilidad genética, para todas las combinaciones de cebadores, el índice de marcador (MI). El rango de MI para las combinaciones de cada uno de los cebadores de AFLP analizados varió entre 1,9 y 10,6 para las combinaciones P41M39 y P40M38, respectivamente, con un promedio de 5,7 (Tabla 16). Cuando se consideraron los materiales por origen, el mayor valor de MI se

obtuvo para genotipos italianos (32,34), seguido del correspondiente valor para los provenientes de Argentina (31,52), de Francia (26,19) y del CIMMyT (26,19). El menor valor correspondió a los materiales de EE.UU (15,53) (Tabla 17). El bajo valor de PIC y MI de estos últimos genotipos se debe fundamentalmente al bajo número de genotipos representados.

Tabla 18. Porcentajes de polimorfismo (%P) obtenidos utilizando diferentes combinaciones de cebadores de AFLP en 118 genotipos de trigo candeal para diferentes orígenes geográficos.

Población	%P P40M38	%P P40M43	%P P41M31	%P P41M43	%P P41M45	%P P41M39	%P promedio
ARG	23,68	33,87	28,26	35,90	31,25	40,98	32,32
CIM	18,42	27,42	22,83	23,08	31,25	32,79	25,96
EE.UU	15,79	14,52	14,13	10,26	15,63	24,59	15,82
FRA	23,68	24,19	21,74	28,21	21,88	36,07	25,96
ITA	23,68	27,42	26,09	35,90	31,25	45,90	31,71
WAN	18,42	25,81	22,83	23,08	21,88	40,98	25,50

Teniendo en cuenta las matrices con las 324 bandas (mono y polimórficas) y las 116 bandas polimórficas, se calculó el índice de Shannon (I), la heterocigocidad esperada (He), la heterocigocidad esperada imparcial (uHe), la distancia genética de Nei y la identidad genética de Nei (Tablas 19 y 20). Los patrones totales de bandas por poblaciones para las dos matrices presentaron resultados similares, siendo las poblaciones argentinas e italianas las que presentaron una única banda privada.

Tabla 19. Patrones totales de bandas de AFLPs de 118 genotipos de trigo candeal agrupadas en poblaciones de diferentes orígenes geográficos.

Población	ARGENTINA	CIMMyT	EE.UU	FRANCIA	ITALIA	WANA
No. Bandas	115	107	90	107	115	107
No. Bandas Freq. $\geq 5\%$	113	107	90	107	113	107
No. Bandas Privadas	1	0	0	0	1	0
No. Bandas Com ($\leq 25\%$)	0	0	0	0	0	0
No. Bandas Com ($\leq 50\%$)	4	1	1	0	4	2
Media He	0,327	0,277	0,199	0,274	0,340	0,262
DE Media He	0,014	0,018	0,020	0,017	0,014	0,018
Media uHe	0,331	0,286	0,239	0,282	0,345	0,271

Población	ARGENTINA	CIMMyT	EE.UU	FRANCIA	ITALIA	WANA
DE Media uHe	0,014	0,018	0,024	0,018	0,015	0,018

No. Bandas = N° de bandas diferentes, **No. Bandas Frec. > = 5%** = N° de bandas diferentes con una frecuencia > = 5%, **N° Bandas privadas** = N° de bandas únicas a una población individual **N° Bandas Com (<= 25%)** = Número de Bandas comunes (Frec.> = 5%) en el 25% o menos poblaciones, **N° Bandas Comm (<= 50%)** = Número de Bandas localmente común (Frec.> = 5%) que se encuentran en el 50% o menos poblaciones, **He** = heterocigosidad esperada = $2 * p * q$, **ühe** = imparcial Esperado = heterocigosidad $(2 N / (2N-1)) * He$.

Incluyendo sólo las bandas polimórficas, el Índice de Shannon y la heterogocidad esperada aumentaron para todas las poblaciones, teniendo en cuenta el origen de las accesiones, siendo las poblaciones de Argentina e Italia las más diversas en los dos casos. El número de alelos diferentes, en promedio para todas las poblaciones, aumentó de 1.242 a 1.707 y la heterogocidad esperada aumentó de 0,096 a 0,280. Este aumento se debe principalmente a que sólo se tienen en cuenta los loci polimórficos.

Con este dato, la distancia genética de Nei incrementó entre las poblaciones mientras que la identidad genética de Nei disminuyó, en comparación con la matriz que contiene la totalidad de la bandas. Estos parámetros se emplean para estimar el grado de diferenciación genética entre poblaciones. La identidad genética es un índice que estima el número de mutaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original. La idea es que los diferentes alelos (o la presencia o ausencia de los loci en el caso de marcadores basados en pcr, como rapd, aflp y ssr) es originada gracias a que un codón (o una base nucleotídica en el caso de marcadores relacionados con pcr) es distinto (Nei 1987). Por lo tanto, a partir de datos de las frecuencias alélicas debería ser posible calcular estadísticamente el número promedio de las diferencias en los codones o en las bases nucleotídicas por locus. Así, el promedio en el número neto de sustituciones nucleotídicas, D, estaría dado por $D = - \log_e I$, donde I (la identidad genética), por lo tanto, D toma valores de 0, si son idénticas las poblaciones, a infinito, si son completamente diferentes.

Esto sugiere que el análisis de los grupos teniendo en cuenta los loci polimórficos agudiza su diferenciación genética porque incrementa la distancia genética de Nei entre los acervos. Además, la cantidad de loci idénticos entre los grupos se hace menor, separándolos

genéticamente, es decir, son grupos diferentes y no se pueden asignar a un mismo conjunto de individuos. Esto podría indicar que es importante para los análisis de desequilibrio de ligamiento y de asociación marcador-carácter hacer un correcto filtrado de los marcadores a usar para no llegar a conclusiones erróneas.

Tabla 20. Identidad genética de Nei y *distancia genética de Nei* para poblaciones de distinto origen de trigo candeal calculada utilizando bandas polimórficas de AFLPs. Sobre la diagonal se muestran los valores obtenidos para la distancia genética de Nei calculada como $= -1 * \ln(\text{Identidad Nei})$ y debajo de la diagonal los valores de Identidad genética de Nei.

Población	ARGENTINA	CIMMyT	EE.UU	FRANCIA	ITALIA	WANA
ARGENTINA	1,000	0,011	0,028	0,017	0,006	0,014
CIMMyT	0,960	1,000	0,025	0,020	0,015	0,021
EE.UU	0,905	0,914	1,000	0,030	0,028	0,028
FRANCIA	0,939	0,929	0,898	1,000	0,014	0,014
ITALIA	0,978	0,945	0,905	0,951	1,000	0,012
WANA	0,950	0,928	0,904	0,952	0,957	1,000

3.7 Estructura y relaciones genéticas de 118 variedades de trigo candeal

3.7.1 Análisis de las relaciones genéticas a partir de la distancia genética binaria

Para analizar las relaciones genéticas entre las 118 variedades de trigo candeal se consideró la matriz binaria de alelos registrados y se calculó la distancia genética binaria entre todos los pares de genotipos, teniendo en cuenta el conjunto completo de marcadores, mono y polimórficos. Las distancias genéticas binarias obtenidas fueron utilizadas para visualizar los grupos de genotipos similares, mediante la obtención de un dendrograma elaborado a través del algoritmo UPGMA y a través del análisis de coordenadas principales (PCoA).

Los resultados obtenidos con el agrupamiento mediante el algoritmo UPGMA (Figura 19), mostraron la conformación de cuatro grupos o acervos genéticos que se correspondieron en su mayoría con el origen geográfico y pedigree conocido.

- ✓ El grupo I (color amarillo), compuesto por dos subgrupos:
 - Subgrupo 1: variedades italianas tradicionales (inscriptas antes de 1990): Gherardo 574, Polesine, y Maristella, la francesa Ardente y las de WANA Marrou, Bilik N°2 y Om Rabi 5.
 - Subgrupo 2: genotipos Taganrog Buck Balcarce, Taganrog Sel. Buck y Taganrog Vilela Fideos.
- ✓ El grupo II (color azul), conformado por dos subgrupos:
 - Subgrupo 1: materiales franceses (Argeles, Artimon, Byblos, Exeldur, Garic, Joyau, Nautilur, Durobonus, y Vivadur), Kofa, del grupo de los norteamericanos,.
 - Subgrupo 2: genotipos de WANA Om Rabi 3(Cham5) y Bha, las accesiones del CIMMyT Focha y Buck N°6, dos italianos, Portorico y Simeto y al argentino CBW 0111
- ✓ El grupo III (color verde): accesiones Gab125, ITA-1, Karur (WANA), Capeiti, Orlu, Simeto y BonInta Cariló.
- ✓ El grupo IV (color rojo): reunió la mayor cantidad de materiales y estuvo compuesto por cinco subgrupos.
 - Subgrupo 1: materiales italianos Capeiti, Gherardo610, Gherardo645 y argentinos Balcarceno INTA, Candéal Durumbuck, BF1776 y Bonaerene Valverde.
 - Subgrupo 2: materiales italianos Gabbiano, Granato, Apullo, Fortore, Creo, Gherardo575 y Alcalou, dos argentinos, CBW 0156, CBW0101 y el francés Arbois.
 - Subgrupo 3: el segundo gran subgrupo por las líneas avanzadas argentinas CBW0112, CBW0141, CBW0153, CBW0200, CBW0225, CBW0230, VF003, VF0121, VF0163 y VF0167, Buck Topacio, Cerzos-1, BonInta Cumenay y los materiales italianos Ciccio, Catervo, Canizzo, Cantico, Co1937, Concadoro, Core y Adamello.
 - Subgrupo 4: El tercer subgrupo se conformó con materiales de la región de WANA en su mayoría, como Om rabi Haurani, Heider, Omguer 4, Korifla (Cham 3) Om rabi 6 y Cham (Waha), dos franceses Sachem, y Biensur y los materiales provenientes del CIMMyT, 65-IAT2, 73-IAT2, CBW 0002, VF0136, VF0137, CBW 0001, Gan y Gallareta (Altar 84), el italiano Ítalo y los argentinos Buck Esmeralda, Buck Ámbar y dos EEUU, UC1113 y DGE-1.
 - Subgrupo 5: conformado por los materiales Argentinos Buck Platino, BonINTA Facón, Buck Cristal, VF042, B#24, B#25, B#27, ACA 1801F, los italianos Duilio, Dupri y Tiziannia y los de CIMMyT VF0154, VF0113, 80 –IAT2 y 71-IAT-2 CBW004, por el francés Duetto y por Wadalmez-1 de la región de WANA.

El agrupamiento por origen geográfico mostró una relación genética muy cercana entre los genotipos italianos y argentinos, entre los del CIMMyT y los norteamericanos y entre los franceses y de los de la región de WANA (Figura 20).

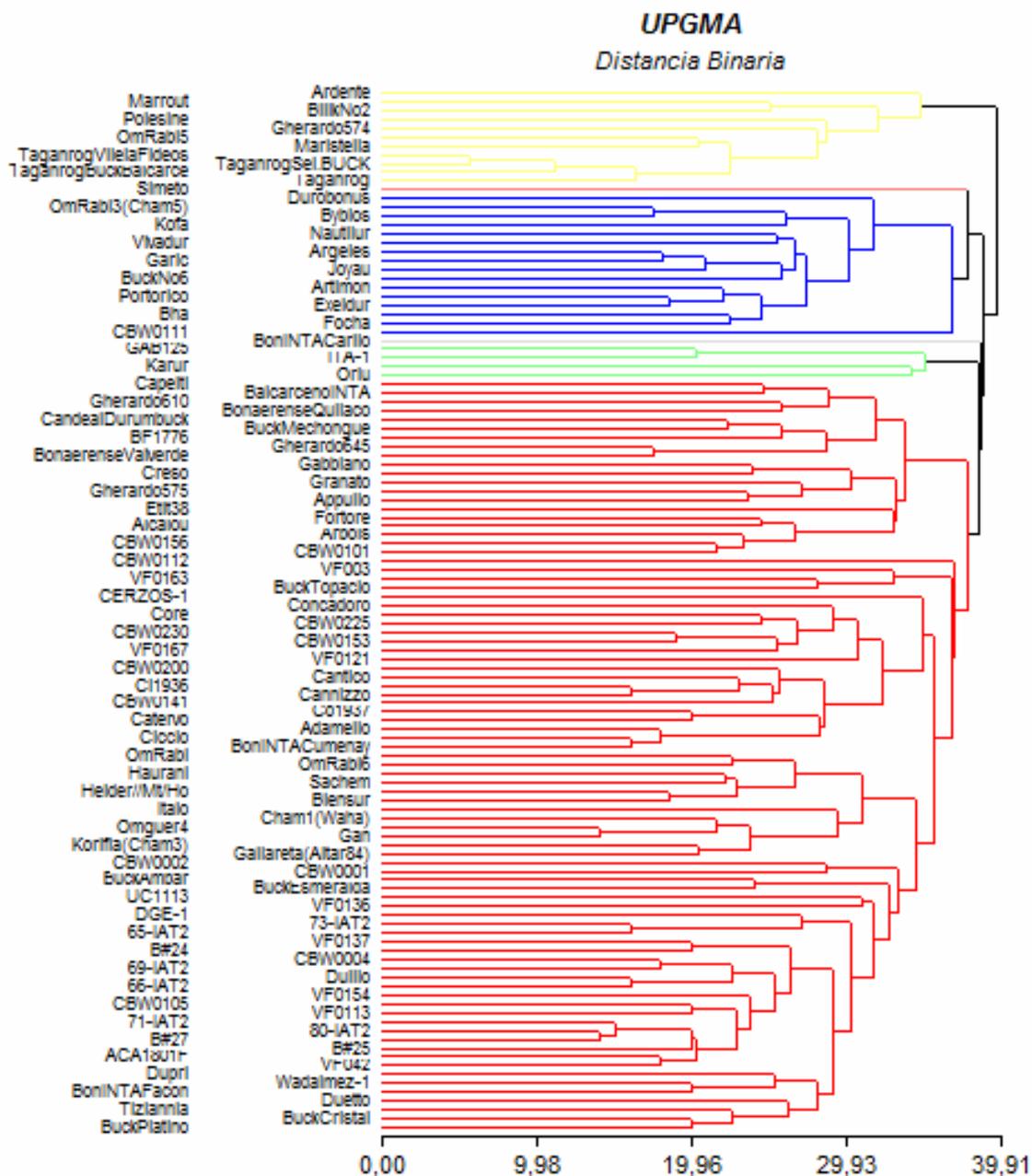


Figura 19. Agrupamiento de 118 genotipos de trigo candeal de distintos orígenes geográficos basado en el análisis UPGMA a partir de la distancia genética binaria obtenida mediante seis combinaciones de marcadores de AFLPs.

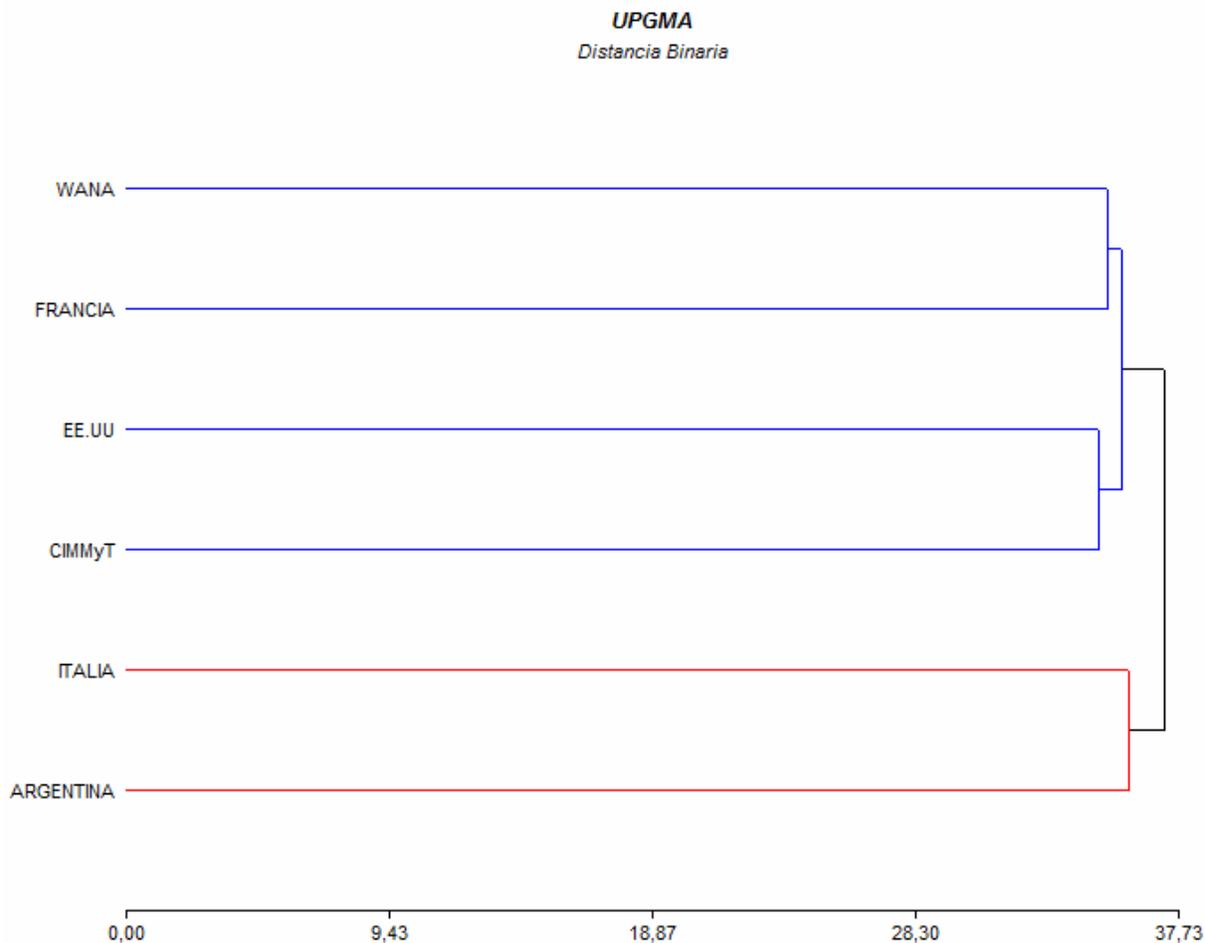


Figura 20. Agrupamiento por origen basado en el análisis UPGMA de 118 genotipos de trigo candeal obtenido a partir de la distancia genética binaria utilizando seis combinaciones de AFLPS.

3.7.2 Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

Para analizar la diferencia entre y dentro de las poblaciones, se realizó un test de AMOVA (Tabla 21). Los resultados indicaron que la mayoría de la variación se encontró dentro de las poblaciones (94%), mientras que las diferencias genéticas entre las poblaciones fueron relativamente menores (6%). Dado que el trigo candeal es una especie autógama cabe esperar que la variación molecular sea mayor entre las poblaciones debido a que cada una de estas poblaciones ha sufrido procesos de selección y evolutivos que afectan en distinta

medida la variabilidad nucleotídica, estando los individuos dentro de estas poblaciones altamente adaptados a un ambiente particular.

Tabla 21. AMOVA para 118 genotipos de trigo candeal de distintos orígenes geográficos utilizando datos de AFLPs. GL: grados de libertad; SC: suma de cuadrados; CM: cuadrado medio; S^2 : varianza estimada y % porcentaje explicado de la varianza. Entre las poblaciones; Dentro de las poblaciones.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	S ²	% Exp.
Entre las Poblaciones	5	195,040	39,008	1,173	6%
Dentro de las Poblaciones	112	1947,730	17,390	17,390	94%
Total	117	2142,770		18,564	100%

3.7.3 Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales (PCoA) permitió separar los materiales provenientes del CIMMYT y de EE.UU, los franceses y de WANA y por otra parte los provenientes de Italia y Argentina. Las tres primeras coordenadas explicaron el 97,06% de la variación (PCoA1: 47,97; PCoA2: 37,43 y PCoA3: 11,66%). Estos resultados indicaron que las poblaciones argentinas e italianas y por otro lado las francesas y de WANA (Figura 21) mantienen mayor una relación entre sus genomas.

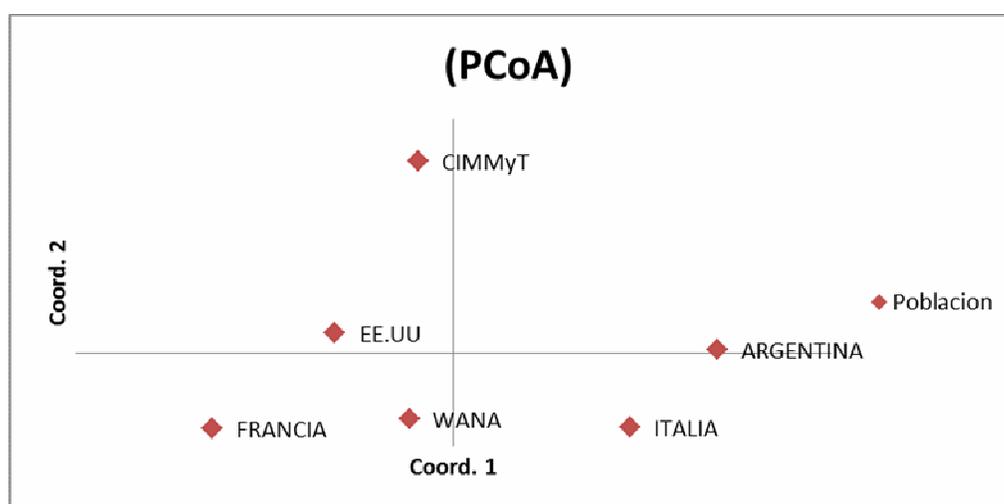


Figura 21. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) para poblaciones de genotipos argentinos, italianos, franceses, de la región de WANA, de CIMMYT y de EE.UU utilizando datos de AFLPs.

Cuando los datos se analizaron de a pares de poblaciones, se detectaron diferencias significativas entre los grupos por origen, con excepción de los pares CIMMyT–EEUU, EEUU–Francia y EEUU–Wana, como se detalla en la Tabla 22.

Tabla 22. Valores de phiPT entre genotipos (considerados por origen) para 118 genotipos de trigo candeal de distintos orígenes geográficos utilizando datos de AFLP.

PhiPT	ARGENTINA	CIMMyT	EE.UU	FRANCIA	ITALIA	WANA
ARGENTINA	0,000	**	*	**	*	**
CIMMyT	0,066	0,000	ns	**	**	**
EE.UU	0,053	0,026	0,000	ns	*	ns
FRANCIA	0,104	0,107	0,016	0,000	**	*
ITALIA	0,011	0,090	0,033	0,073	0,000	*
WANA	0,073	0,095	0,031	0,054	0,049	0,000

Estos resultados permiten inferir que existen diferencias significativas entre las accesiones de origen argentino e italiano. Por otro lado, teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante el análisis de agrupamiento por UPGMA, se subdivide a los genotipos argentinos e italianos en dos grupos, los cultivares y líneas avanzadas obtenidas antes y después de 1990. Por ello se decidió denominar a los materiales registrados antes de esa fecha como tradicionales, y a los posteriores como modernos, tanto para argentinos como para italianos de acuerdo con estos resultados y las conclusiones obtenidas por la Ing. Valeria Beaufort.

3.8 Análisis de la estructura poblacional

La base de datos para el análisis bayesiano incluyó 118 individuos representativos del germoplasma de trigo candeal de diferentes orígenes y 116 loci polimórficos de AFLP para la genotipificación. Estimar la estructura genética es crítico para la correcta interpretación de los resultados obtenidos en el mapeo asociativo entre caracteres y marcadores.

3.8.1 Núcleos de población y subestructuración

La estructura de la población constituida por las 118 accesiones se estimó a través del programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000), utilizando el método de agrupamiento

bayesiano, basado en modelos probabilísticos, como se describe en la sección pertinente, que genera una matriz de estructura poblacional (Tabla suplementaria 5, matriz Q).

Para la estimación de K (número de subgrupos probables) se utilizó el modelo bayesiano desarrollado por Pritchard *et al.* (2000), que permite identificar subpoblaciones genéticamente distintas basadas en los patrones de frecuencias alélicas y en datos multi-locus acumulados en el genotipado. El análisis bayesiano se realizó utilizando 116 loci polimórficos con el número de subpoblaciones asignadas a priori (K), que varió de 1 a 10. Un promedio de tres corridas independientes permitió obtener la máxima probabilidad de los datos en $K = 6$. El logaritmo de la probabilidad o valor máximo de verosimilitud ($\ln [P(D)]$) asignó $K = 6$ (Tabla 23). Este valor de K fue confirmado mediante los resultados del programa Structure (Earl & vonHoldt, 2012) (Figura 22) que hace uso del número de agrupamientos más probable propuesta por Evanno *et al.* (2005), quienes consideran la variación generada por el error de muestreo, calculando el valor absoluto de diferencia de verosimilitud entre la posibilidad de una población con la posibilidad siguiente y estandarizándolo con la desviación estándar de los datos. De esta forma, se puede obtener el máximo valor de verosimilitud que presenta el menor valor de error debido al muestreo. Todos los parámetros para el desarrollo de esta metodología fueron calculados a partir del logaritmo de la probabilidad o valor máximo de verosimilitud ($\ln [P(D)]$) producidos por Structure. La asignación de cada uno de los materiales a uno de los subgrupos se registró a partir de la matriz Q (Tabla suplementaria 5) para el menor valor $\ln(k)$ dentro de las tres corridas independientes para un $K=6$.

Tabla 23 Análisis de la estructura genética de la población de trigo candeal consistente en 118 genotipos de distintos orígenes geográficos utilizando el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012). En negrita se identifica el número de poblaciones identificados con el método de Evanno *et al.*, (2005) a partir de la estimación media de la probabilidad posterior de los datos para cada K entregada por el programa STRUCTURE Referencias: **L(K)**: Promedio de 3 repeticiones de $\ln P(D)$ para cada K, **L'(K)**: $L(K)_i - L(K)_{i-1}$, **L''(K)**: $L'(K)_i - L'(K)_{i-1}$, **[L''(K)]**: valor absoluto de $L''(K)$, **Delta K**: $[L''(K)] / \text{Stdev}$.

K	L(K)	Stdev	L'(K)	L''(K)	[L''(K)]	Delta K
1	-9635,7	1,71	-	-	-	-

2	-9395,0	5,12	240,7	-182,00	182,00	35,5748
3	-9336,3	13,20	58,7	217,73	217,73	16,492
4	-9059,8	50,62	276,4	-225,30	225,30	4,45092
5	-9008,7	301,32	51,1	265,23	265,23	0,88022
6	-8692,3	7,36	316,4	-832,43	832,43	113,13
7	-9208,4	123,09	-516,1	894,10	894,10	7,26398
8	-8830,4	30,66	378,0	-1180,07	1180,07	38,4854
9	-9632,4	584,39	-802,0	1091,10	1091,10	1,86706
10	-9343,3	53,83	289,1	-289,07	289,07	5,37001

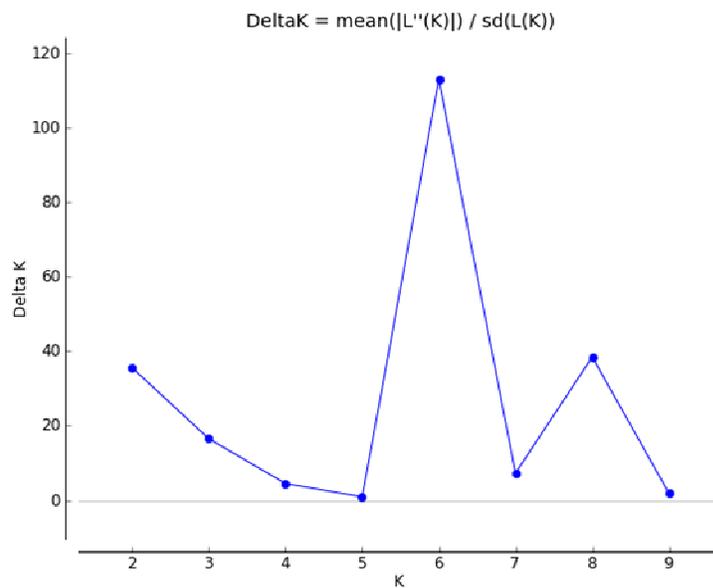


Figura 22. Número de subgrupos (K:6) inferidos por el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt, 2012) a través de la metodología de Evanno *et al.* (2005). En el eje Y se encuentran los valores de ΔK obtenidos para cada valor K para 118 genotipos de trigo candéal de distintos orígenes geográficos.

A partir de la matriz Q, matriz proporcionada en los resultados del programa STRUCTURE, la mayoría de los genotipos fueron asignados a grupos, constituyéndose entre 1 y 6 subgrupos poblacionales. Los detalles relacionados con la proporción de genotipos incluidos en cada uno de los seis subgrupos identificados como Q₁ a Q₆, se muestran en la (Tabla 24). El máximo porcentaje de pertenencia se encontró en el subgrupo

Q₄, con 26,7 % del total de los genotipos, este grupo se caracterizó por incluir a las variedades modernas de argentina y del CIMMyT y algunas variedades italianas. El grupo Q₅ con 18,4 % del total de los genotipos estuvo conformado por las variedades italianas, francesas y argentinas tradicionales, el grupo Q₆ con 18,3 % del total de los genotipos por las variedades argentinas e italianas modernas. El grupo Q₁ con 8,9% del total de los genotipos se encuentran los genotipos Taganrog y las variedades italianas Polesine y Gherardo574, en el grupo Q₂ se encuentran las variedades de WANA Omguer 4, Cham, Korifla y Haudini y algunas de las francesas, como Biensur, Sachem y la italiana Duetto y por último el grupo Q₃ agrupó en su mayoría materiales de Francia. Los individuos fueron asignados a un grupo si su proporción de pertenencia (q_i) al mismo era igual o mayor que el umbral de 0,05.

Este análisis permitió determinar que los genotipos Marrout, Dupri, OmRabi6, Karur, CBW0112, Italo, GAB125, CBW0002, Ardente, VF003 y VF0167 presentaron una proporción de pertenencia (q_i) menor al umbral de 0,05. Estos genotipos mostraron altos niveles de mezcla y todos compartieron casi la misma pertenencia en dos subpoblaciones (q) indicando mezcla de alelos de subpoblaciones separadas.

Teniendo en cuenta el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (F_{st}), obtenido a partir del análisis con el programa Structure, se evidencia que los subgrupos Q₁, Q₃, Q₂, Q₄, Q₅ y Q₆ presentaron una diferenciación genética alta a moderada, respectivamente (Tabla 25). Los subgrupos exhibieron una frecuencia diferencial de ciertos alelos en diferentes genotipos, dando lugar a una diferenciación genética entre ellos, lo cual permite inferir que las variedades de trigo candeal analizadas están estructuradas genéticamente.

En general, los resultados obtenidos con esta metodología no difieren de los resultados obtenidos con el agrupamiento utilizando el algoritmo UPGMA, aunque cabe recalcar que si bien el análisis bayesiano permitió determinar que, probabilísticamente, once genotipos pueden pertenecer a más de dos subgrupos, la tendencia de agrupamiento por origen, pedigree y fecha de inscripción es coincidente entre los dos análisis, demostrando el considerable aislamiento (y diferenciación genética) presente entre los seis subgrupos.

Tabla 24. Proporción de pertenencia de cada uno de los genotipos de trigo candeal en cada uno de los seis grupos que conforman la población de 118 genotipos obtenida utilizando el programa Structure.

Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
1	2	3	4	5	6
0,089	0,123	0,154	0,267	0,184	0,183

Tabla 25. Valores medios de diferenciación genética (Fst) entre los seis grupos que conforman la población de 118 individuos de trigo candeal obtenidos utilizando el programa Structure.

Valor medio de Fst Q ₁	= 0,3746	Valor medio de Fst Q ₂	= 0,2705
Valor medio de Fst Q ₃	= 0,2772	Valor medio de Fst Q ₄	= 0,1837
Valor medio de Fst Q ₅	= 0,1685	Valor medio de Fst Q ₆	= 0,0825

La asignación de los miembros de cada población a uno de los grupos definidos anteriormente se ilustra en el gráfico de barras generado por el programa Structure en función de las proporciones de frecuencias alélicas inferidas a partir del análisis bayesiano (Figura 23). Cada línea vertical representa a un individuo, cada color ilustra la fracción de pertenencia a uno u otro grupo K en función de su constitución genómica inferida a partir de los datos de AFLP.

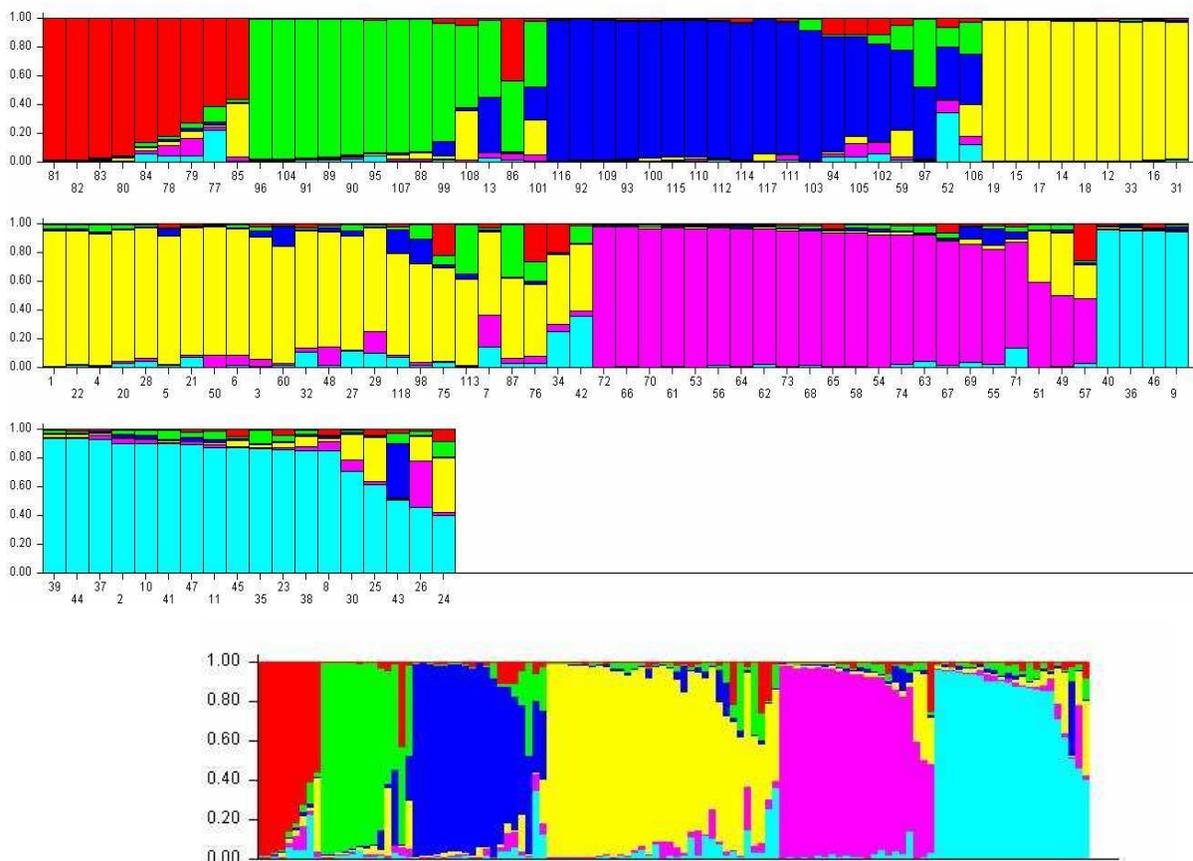


Figura 23. Estructura poblacional. Grafico de barras de 118 genotipos de trigo candeal generado por Structure v. 2.3.3. Se muestra la proporción total de miembros de la población que constituyen cada uno de los seis subgrupos ($K=6$), en función del análisis bayesiano utilizando el modelo admixture y frecuencias alélicas correlacionadas, no se indicó grado de parentesco entre genotipos. Las agrupaciones ($K=6$ poblaciones) son identificadas con colores (subpoblaciones rojo (1), verde (2), azul (3), amarillo (4), rosa (5) y celeste (6)), cada columna representa un genotipo y se divide en segmentos (probabilidades) que indican su origen genético probable.

3.8.2 Desequilibrio de ligamiento

Las correlaciones de las frecuencias alélicas (r^2) se estimaron utilizando 116 bandas polimórficas de marcadores AFLP y 118 genotipos de trigo candeal. Se obtuvo un total de 6612 combinaciones por locus de a pares. El valor de r^2 se obtuvo para todas las combinaciones de loci de AFLP (Tabla 26). Cuarenta y dos (0,635%) de las 6612 combinaciones resultaron estar en desequilibrio de ligamiento con una alta significancia ($P<0,0001$). El promedio de los valores de r^2 fue de 0,237. En la (Figura 24) se presentan,

en el triángulo superior, los valores de r^2 obtenidos y, en el inferior, los valores de significancia correspondientes. Debido a que los AFLP usados no fueron mapeados, no es posible graficar los valores de r^2 en función de su distancia genética. En la Figura 25 también se muestran en recuadro azul, las combinaciones de AFLP que indicaron DL. Se conformaron seis posibles bloques en DL, de ubicación desconocida.

Tabla 26. Cuarenta y dos combinaciones de AFLPs amplificadas en 118 genotipos de trigo candeal que exhibieron desequilibrio de ligamiento, con alta significancia ($P < 0,0001$). El promedio de los valores de r^2 fue de 0,237. El estado se refiere a la forma alélica en la se encontraron las combinaciones de marcadores en DL, A: presencia del marcador y B la ausencia del marcador. Las combinaciones en negrita son aquellas que presentaron los mayores valores de significancia.

Marcador 1	Sitio1	Estado1	Marcador 2	Sitio 2	Estado2	Dist_bp	r^2	D Prima	Valor p
P41M39_459	99	B:A	P41M39_465	98	B:A	1	0,804	0,896	1,21E-25
P41M39_540	97	A:B	P41M39_553	96	A:B	1	0,659	0,886	1,63E-20
P41M39_567	95	B:A	P41M39_569	94	B:A	1	0,684	1,000	3,20E-15
P41M39_256	113	B:A	P41M39_262	111	A:B	2	0,321	0,649	4,40E-10
P41M39_247	115	B:A	P41M39_249	114	B:A	1	0,273	0,580	1,16E-08
P40M43_872	24	A:B	P40M43_921	20	B:A	4	0,272	0,649	3,08E-08
P41M31_433	55	A:B	P40M43_921	36	A:B	19	0,235	0,753	1,71E-07
P41M31_433	47	A:B	P41M31_1049	39	A:B	8	0,302	0,746	1,93E-07
P41M45_1063	78	A:B	P41M31_808	47	A:B	31	0,307	0,676	3,50E-07
P41M45_1063	43	B:A	P41M31_963	42	B:A	1	0,184	0,915	7,28E-07
P41M45_521	87	B:A	P41M45_1063	78	A:B	9	0,248	0,527	1,56E-06
P41M31_808	47	A:B	P41M31_1172	36	A:B	11	0,241	0,735	1,70E-06
P40M43_768	28	A:B	P40M43_927	16	B:A	12	0,227	0,477	2,77E-06
P41M31_808	28	A:B	P40M43_921	20	B:A	8	0,215	0,548	2,77E-06
P40M43_921	20	B:A	P40M43_997	16	B:A	4	0,215	0,548	2,77E-06
P41M45_521	87	B:A	P41M45_857	81	A:B	6	0,204	0,620	3,22E-06
P41M31_912	44	B:A	P41M31_1082	38	B:A	6	0,243	0,612	3,56E-06
P41M39_265	110	B:A	P41M39_291	105	B:A	5	0,292	0,564	4,10E-06
P40M43_768	28	A:B	P40M43_1112	12	B:A	16	0,191	0,668	6,10E-06
P41M39_465	98	B:A	P41M45_952	80	B:A	18	0,171	0,481	7,72E-06
P40M43_872	24	A:B	P40M43_1112	12	B:A	12	0,172	0,431	9,74E-06
P41M43_923	63	B:A	P41M43_972	61	B:A	2	0,167	0,438	1,13E-05
P41M45_1038	79	B:A	P41M31_1082	38	B:A	41	0,222	0,689	1,39E-05
P41M39_456	100	A:B	P41M31_1082	38	B:A	62	0,222	0,689	1,39E-05
P41M45_521	87	B:A	P41M31_808	47	A:B	40	0,207	0,586	1,96E-05
P40M43_793	27	A:B	P40M38_1360	0	A:B	27	0,143	0,767	2,17E-05
P41M31_1270	35	A:B	P41M31_1279	34	B:A	1	0,157	0,464	2,19E-05

Marcador 1	Sitio1	Estado1	Marcador 2	Sitio 2	Estado2	Dist_bp	r ²	D Prima	Valor p
P40M43_944	17	B:A	P40M38_1230	1	B:A	16	0,177	0,716	2,26E-05
P41M45_857	81	A:B	P41M45_1063	78	A:B	3	0,162	0,584	3,56E-05
P41M39_247	115	B:A	P41M39_265	110	B:A	5	0,146	0,878	3,60E-05
P41M43_349	73	B:A	P40M38_1360	0	A:B	73	0,148	0,546	3,76E-05
P41M45_857	81	A:B	P41M31_808	47	A:B	34	0,160	0,709	4,70E-05
P41M45_1063	78	A:B	P40M43_616	30	A:B	48	0,146	0,679	4,94E-05
P41M31_956	43	B:A	P41M31_985	40	B:A	3	0,143	0,435	5,42E-05
P41M45_521	87	B:A	P41M31_1270	35	A:B	52	0,139	0,684	5,52E-05
P41M43_390	71	B:A	P40M43_768	28	A:B	43	0,151	0,479	7,05E-05
P41M45_682	84	A:B	P41M45_1063	78	A:B	6	0,175	0,459	7,12E-05
P41M45_521	87	B:A	P41M45_604	85	B:A	2	0,186	0,661	7,49E-05
P40M43_921	20	B:A	P40M43_1112	12	B:A	8	0,141	0,486	7,51E-05
P41M39_284	109	B:A	P41M39_291	105	B:A	4	0,227	0,550	8,75E-05
P41M43_324	76	A:B	P41M31_1172	36	A:B	40	0,154	0,512	9,70E-05
P41M43_324	28	A:B	P40M43_872	24	A:B	4	0,138	0,547	9,80E-05

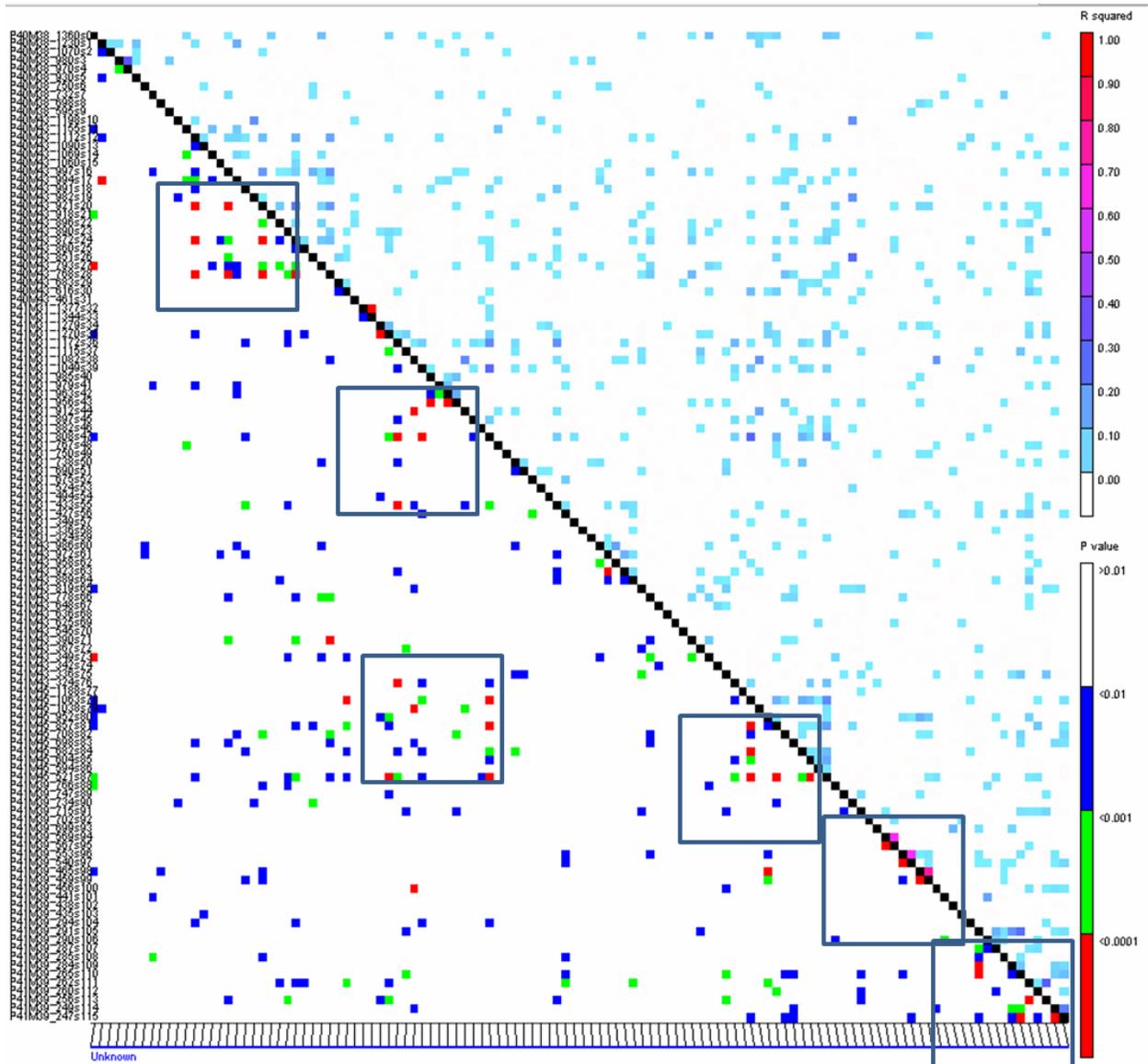


Figura 24. Matriz de desequilibrio de ligamiento para sitios polimórficos. Los sitios polimórficos fueron graficados en el eje-X y en el eje-Y. El cálculo del DL de a pares (r^2) está graficado en la parte superior de la diagonal, con los correspondientes valores-P para la prueba exacta de Fisher, que se muestra debajo de la diagonal. Esta figura representa gráficamente las 6612 combinaciones generadas por los 116 marcadores AFLP. Los puntos rojos representan aquellos marcadores que se encuentran en DL(42). Este gráfico fue generado utilizando el programa TASSEL (Bradbury et al., 2007) para 118 genotipos de trigo candeal.

3.9 Mapeo asociativo

La base de datos para el análisis bayesiano incluyó 118 materiales provenientes de diferentes orígenes geográficos y 116 locus de AFLP para la genotipado. El fenotipado fue realizado en tres ensayos a campo ubicados en tres localidades de la provincia de Buenos Aires (Pieres, Cabildo y Barrow), durante la campaña 2011/2012.

Para testear las asociaciones entre marcadores moleculares y caracteres cuantitativos se utilizó el software TASSEL versión 2.0.1 (Bradbury *et al.*, 2007). Este programa utiliza un modelo lineal mixto para analizar la asociación entre marcadores y caracteres, en el cual los marcadores son considerados factores fijos y los subgrupos detectados en el germoplasma como factores aleatorios. Para determinar la asociación entre marcador y carácter se utilizó la prueba F con una significancia estadística del 5%, establecida por 1000 permutaciones mediante el programa TASSEL v.2.0.1 (Yu *et al.*, 2000). La matriz Q, estimada para K=6, fue proporcionada como covariable. Los criterios utilizados para definir un QTL fueron 1) detectar una asociación significativa entre un marcador y un carácter con un FDR de $p < 0,05$ y 2), tener en cuenta que las asociaciones entre marcadores y un carácter estén a una distancia inferior a 10 -12 cM y con un DL (medido como r^2 de a pares) mayor que 0,20.

En la (Tabla 27) se muestran los marcadores AFLP que mostraron una asociación significativa con alguno de los caracteres agronómicos de interés. Cabe destacar que las regiones que mostraron valores significativos de asociación explican más del cinco por ciento de la variación para el carácter. Para los estudios de mapeo por asociación este nivel de explicación de 5% o más es considerado un valor esperable y adecuado si lo que se busca es desarrollar marcadores genéticos. Los marcadores que explicaron mayores porcentajes de la variación en un carácter entre las asociaciones fueron, P41M39_715, P41M43_390, P41M43_342 y P41M43_349. Como se detalla en la Tabla 26 estos marcadores se encontraron asociados con los caracteres PMG, PGP, CPC y CIE b*, respectivamente.

Tabla 27 Asociaciones significativas entre marcadores AFLP y caracteres identificados en 118 genotipos de trigo candeal utilizando el programa TASSEL. Se consideró una asociación marcador-carácter significativa aplicando una FDR (false discovery rate) < 0.05.

Carácter	Marcador	gl	p-permutaciones del marcador	% de explicación del Marcador	r ² Marcador
BACIEb	P41M43_342	2	1,72E-02	7,29	0,0729
BACIEb	P41M43_367	2	3,74E-02	5,86	0,0586
BACIEb	P41M39_569	2	4,16E-02	5,66	0,0566
BACIEb	P41M39_465	1	4,49E-02	3,56	0,0356
BACPC	P41M43_342	2	1,23E-02	7,75	0,0775
BACPC	P41M39_569	2	4,16E-02	5,55	0,0555
BACPC	P41M31_979	1	3,19E-02	4,00	0,04
BaFa*	P40M38_1230	2	2,95E-02	5,60	0,056
BaFa*	P41M39_262	2	4,35E-02	4,96	0,0496
BaFa*	P41M39_747	1	2,84E-02	3,79	0,0379
BaFL*	P40M38_1070	2	3,35E-02	5,84	0,0584
BaFL*	P41M43_625	1	4,43E-02	3,45	0,0345
BAPGP	P41M43_390	2	4,68E-03	10,41	0,1041
BAPGP	P41M43_349	2	2,01E-02	7,48	0,0748
BAPGP	P41M39_441	1	1,43E-02	5,72	0,0572
BAPGP	P41M31_912	1	1,57E-02	5,56	0,0556
BAPH	P41M39_540	2	2,27E-02	6,53	0,0653
BAPH	P41M31_1172	1	2,55E-02	4,28	0,0428
BAPH	P41M39_766	1	3,52E-02	3,79	0,0379
BAPMG	P41M31_1172	1	2,66E-02	4,46	0,0446
BAPMG	P41M39_465	1	4,77E-02	3,55	0,0355
BuCIEb	P41M39_284	2	1,75E-02	6,65	0,0665
BuCIEb	P41M43_367	2	3,37E-02	5,54	0,0554
BuCIEb	P41M31_767	1	1,10E-02	5,30	0,053
BuCIEb	P41M39_766	1	1,81E-02	4,56	0,0456
BuCIEb	P41M39_465	1	4,40E-02	3,29	0,0329
BuCPC	P41M43_367	2	2,52E-02	6,64	0,0664
BuCPC	P40M38_1360	2	2,62E-02	6,56	0,0656
BuCPC	P41M45_594	2	3,44E-02	6,06	0,0606
BuCPC	P41M31_767	1	1,14E-02	5,77	0,0577
BuFa*	P40M43_918	2	1,95E-02	5,49	0,0549
BuFa*	P40M38_1230	2	3,85E-02	4,51	0,0451
BuFa*	P41M39_747	1	4,67E-02	2,72	0,0272
BuFL*	P40M43_860	2	3,74E-02	4,64	0,0464
BuFL*	P41M39_766	1	3,04E-02	3,29	0,0329

Carácter	Marcador	gl	p-permutaciones del marcador	% de explicación del Marcador	r ² Marcador
BuFL*	P41M39_459	1	3,85E-02	3,01	0,0301
BugPGP	P41M43_390	2	9,84E-03	8,57	0,0857
BugPGP	P41M45_952	2	3,49E-02	6,15	0,0615
BugPGP	P41M39_435	1	2,10E-02	4,87	0,0487
BuPH	P41M43_778	2	1,09E-02	8,05	0,0805
BuPH	P41M39_435	1	1,03E-02	5,82	0,0582
BuPH	P41M39_567	2	4,72E-02	5,37	0,0537
BuPH	P41M39_702	1	2,43E-02	4,46	0,0446
BuPH	P41M31_808	1	3,23E-02	4,02	0,0402
BuPH	P41M39_699	1	3,77E-02	3,78	0,0378
BuPMG	P41M39_715	2	9,70E-04	12,92	0,1292
BuPMG	P41M39_569	2	1,19E-02	8,07	0,0807
BuPMG	P41M39_465	1	4,32E-03	7,42	0,0742
BuPMG	P41M39_567	2	2,13E-02	6,97	0,0697
BuPMG	P41M39_438	2	3,70E-02	5,94	0,0594
BuPMG	P41M39_459	1	2,36E-02	4,60	0,046
BuPMG	P41M39_766	1	4,63E-02	3,55	0,0355
CaCIEb	P41M43_342	2	1,40E-02	7,46	0,0746
CaCIEb	P41M43_367	2	2,03E-02	6,79	0,0679
CaCIEb	P41M31_767	1	4,76E-02	3,37	0,0337
CaCPC	P41M43_342	2	3,28E-02	5,73	0,0573
CaCPC	P41M31_1270	1	4,06E-02	3,49	0,0349
CaCPC	P41M31_767	1	4,58E-02	3,32	0,0332
CaFa*	P41M39_256	2	1,94E-02	6,45	0,0645
CaFa*	P41M31_1279	1	5,17E-03	6,42	0,0642
CaFa*	P41M39_702	1	3,80E-02	3,48	0,0348
CaFL*	P41M45_698	2	3,59E-03	10,69	0,1069
CaPgP	P41M43_367	2	3,34E-02	6,76	0,0676
CaPgP	P41M31_1172	1	2,10E-02	5,29	0,0529
CaPH	P41M43_986	2	1,12E-02	7,39	0,0739
CaPH	P40M38_980	2	2,20E-02	6,24	0,0624
CaPH	P41M31_912	1	1,31E-02	5,02	0,0502
CaPMG	P41M39_715	2	2,52E-02	6,43	0,0643
CaPMG	P41M31_1172	1	3,44E-02	3,87	0,0387
CaPMG	P41M31_1049	1	4,63E-02	3,43	0,0343

Marcadores significativamente asociados con concentración de CPC (ppm), color (CIEa*, CIEb, CIE *L), PMG (g), PH (kg/hl) y PGP (Kg/ha). Se presentan incluyendo grados de libertad (gl), nivel de significación (p-permutaciones marcador) y r² del marcador. Ba, Ca y Bu hacen referencia a la localidad en la que fue significativa la asociación, en donde, Ba es la localidad de Barrow, Ca es la localidad de Cabildo y Bu es la localidad de Pieres.

A continuación, en la (Tabla 28) se describe la magnitud del efecto sobre el carácter evaluado de cada una de las asociaciones significativas detectadas y la forma alélica en la que fue detectada. Para este análisis, dado que se trabajó con marcadores dominantes, la presencia del alelo fue identificada como AA, y la ausencia como BB. El marcador P41M43_342, evidenció un efecto positivo con valores entre 0,65 – 3,14 para los caracteres CPC y para el componente de color CIE b* en las tres localidades. El marcador P41M43_390 mostró un efecto negativo, con valores entre -2016,1 y -1825,6, sobre el carácter PGP en la localidad de Pieres.

Tabla 28. Asociación de marcadores AFLP con caracteres agronómicos de calidad y rendimiento de una población de 118 genotipos de trigo candeal creciendo en tres localidades de la Pcia. de Bs. As., obtenidos con el programa TASSEL. Se considera la forma alélica, para la presencia del alelo fue identificada como AA, y la ausencia como BB, el efecto de la asociación entre el marcador y el carácter y el número de genotipos en los que fue observada. Marcadores significativamente asociados con concentración de pigmentos carotenoides (CPC, ppm), color (CIEa*, CIEb, CIE *L), peso de mil granos (PMG, g) peso hectolítrito (PH, kg/hl) y peso de granos por parcela (PGP9, Kg/ha). Ba, Ca y Bu hacen referencia a la localidad en la que fue significativa la asociación, en donde, Ba es la localidad de Barrow, Ca es la localidad de Cabildo y Bu es la localidad de Pieres. Los caracteres en negrita e itálica corresponden a asociaciones entre caracteres y marcadores con un efecto positivo y deseable para el cultivo.

Caracter	Marcador	Alelo	Efecto	Obs
BaFa*	P40M38_1230	AA	-0,07895191	103
BaFa*	P40M38_1230	BB	-0,26714669	12
BuFa*	P40M38_1230	AA	-0,20395577	103
BuFa*	P40M38_1230	BB	-0,33393633	12
BAPH	P41M31_1172	BB	1,30698634	89
BAPMG	P41M31_1172	BB	-3,088803	89
CaPgP	P41M31_1172	BB	-92,9786022	89
CaPMG	P41M31_1172	BB	-2,45365872	89
BuCIEb	P41M31_767	BB	-0,64619636	103
BuCPC	P41M31_767	BB	-0,39470722	103
CaCIEb	P41M31_767	BB	-0,69669824	103
CaCPC	P41M31_767	BB	-0,51990499	103
CaFa*	P41M39_256	AA	0,33958599	62
CaFa*	P41M39_256	BB	0,19764816	52
BaFa*	P41M39_262	AA	0,32335916	50
BaFa*	P41M39_262	BB	0,39597797	64
BACIEb	P41M39_465	AA	-0,41093634	67

Caracter	Marcador	Alelo	Efecto	Obs
BAPMG	P41M39_465	AA	2,29003027	67
BuCIEb	P41M39_465	AA	-0,37905491	67
BuPMG	P41M39_465	AA	3,66029989	67
BuPH	P41M39_702	BB	1,06796495	90
CaFa*	P41M39_702	BB	-0,12247857	90
BuPMG	P41M39_715	AA	-4,87279813	56
BuPMG	P41M39_715	BB	-8,93991804	59
CaPMG	P41M39_715	AA	-3,3227508	56
CaPMG	P41M39_715	BB	-5,41505314	59
BaFa*	P41M39_747	AA	0,10952088	50
BuFa*	P41M39_747	AA	0,09240833	50
BAPH	P41M39_766	BB	0,958756	56
BuCIEb	P41M39_766	BB	-0,40793482	56
BuFL*	P41M39_766	BB	0,2707191	56
BuPMG	P41M39_766	BB	2,34136299	56
BACIEb	P41M43_342	AA	2,52707771	36
BACIEb	P41M43_342	BB	2,52616239	81
BACPC	P41M43_342	AA	2,1973905	36
BACPC	P41M43_342	BB	2,24254176	81
CaCIEb	P41M43_342	AA	3,14760132	36
CaCIEb	P41M43_342	BB	3,1323549	81
CaCPC	P41M43_342	AA	1,96622202	36
CaCPC	P41M43_342	BB	2,0376274	81
BACIEb	P41M43_367	BB	0,45792376	58
BuCIEb	P41M43_367	BB	0,42944008	58
BuCPC	P41M43_367	BB	0,26842824	58
CaCIEb	P41M43_367	BB	0,65296671	58
CaPgP	P41M43_367	BB	68,798035	58
BAPGP	P41M43_390	AA	294,145503	85
BAPGP	P41M43_390	BB	718,924327	32
BugPGP	P41M43_390	AA	-1825,6801	85
BugPGP	P41M43_390	BB	-2016,11045	32

3.10 (ζ)-Caroteno desaturasa: un interesante gen candidato que afecta el color amarillo del endosperma del grano del trigo candeal.

En este trabajo se caracterizó el gen que codifica la enzima (ζ) Zeta caroteno desaturasa (*Zds*) en trigo candeal. Esta enzima cataliza la segunda desaturación del neurosporeno para producir licopeno en la ruta de biosíntesis de pigmentos carotenoides. El gen fue estudiado para analizar su estructura molecular, determinar su relación con la variación cuantitativa del pigmento amarillo en las sémolas integrales y, en caso de hallarse variantes alélicas que afecten el color y/o contenido de pigmentos carotenoides, desarrollar marcadores moleculares que permitan su utilización en selección asistida para lograr variedades de óptimo color amarillo.

Con el objetivo de obtener la secuencia del gen *Zds* de trigo candeal se diseñaron cebadores basados en el ARNm de trigo pan (FJ169496.1) (Tabla 4) de manera de amplificar las correspondientes secuencias genómicas de trigo candeal. Para ello, previo al diseño de los cebadores, se tuvo en cuenta la posición de los intrones, alineando el ARNm con los genes correspondientes de los genomas A y D de trigo pan (HQ703016 y HQ703014). Estos cebadores se utilizaron para amplificar por PCR el gen *Zds* en ADN de ocho genotipos de trigo candeal que difieren en su CPC, agrupados en tres rangos de valores: alto, intermedio y bajo (Tabla 29).

Tabla 29. Clasificación de variedades de trigo candeal en función de su contenido de pigmentos carotenoides a fin de ser utilizadas para amplificar alelos del gen *Zds*.

Rango de valores CPC	Variedad	CPC (ppm)
CPC alto	B.Topacio(2)	6,72
	Kofa(66)	5,97
	Amarillo(53)	7,07
CPC intermedio	UC 1113(67)	4,98
	Portorico(126)	4,63
	VF 042(21)	4,57
CPC bajo	B.I. Cumenay(8)	3,72
	Polesine(86)	3,53

Los amplicones obtenidos fueron clonados, secuenciados y caracterizados con métodos bioinformáticos tomando como referencia las secuencias del gen *Zds* del genoma A, denominada *TaZds-A1* (HQ703015; Dong et al 2012) y del genoma D, denominada *TaZds-D1* (HQ703014), ambos de trigo pan ; Zhan et al 2011), obtenidas de plantas del cultivar CA9632 y Zhongyou9507, respectivamente. Adicionalmente, mediante el alineamiento con los cromosomas 2A, 2B y 2D de la variedad *Chinese spring*, depositadas en la base de datos del IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium), se obtuvieron las secuencias completas del gen *Zds* de los genomas A y, B de trigo pan, nombradas para esta tesis *TaZds-A-IWGSC* y *TaZds-B-IWGSC*, respectivamente.

3.10.1 Variantes alélicas obtenidas con los cebadores ZDS3F/3R

Uno de los pares de cebadores utilizados en el análisis del gen fue *Zds-3F/3R* (Tabla 4), que amplifica una región de aproximadamente 1000 bp que comprende del sexto al décimo exón del gen. Inicialmente se compararon mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) las secuencias de *Zds* de los tres genomas de trigo pan, encontrándose que la región enmarcada por los cebadores *Zds-3F/3R* comprende ~1.300 pb en el genoma A mientras que es de ~1000 pb en los genomas B y D, justificándose la diferencia por un posible evento de inserción de ~300 pb en el proceso evolutivo del genoma A (Figura 25). Estas secuencias se diferencian adicionalmente por una delección de un triplete G(C/T) A en el genoma A, comparado con los genomas B y D, localizado a 100 pares de bases del sitio de unión del cebador *Zds-3R* en este amplicón (Figura 25). Luego de la amplificación por PCR y clonado, se obtuvieron 51 secuencias a partir de ADN de las variedades ensayadas (Tabla 28), que fueron alineadas mediante BLAST con *TaZdsA-IWGSC* y *TaZds-B- IWGSC* de la variedad *Chinese spring* de *Triticum aestivum* y *TaZds-A* y *TaZds-D* del cv Zhongyou9507 de *Triticum aestivum*.

a)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
TaZds-Al	AGCCAGTTG	TTCGAGCTCT	TCTTGATCCA	GACGGTGCAT	TGCAACAAGT	ACGGGACTTG	GATGATGTAA	GAATTCCTCT	TCTTTTGTGC	AGTGCATtA	
TaZds-A_IWGSC	agccagttg	ttcgagctct	tcttgatcca	gacggtgcat	tgcaacaagt	acgggacttg	gatgatgtaa	gaattcctct	tcttttgtgc	agtgcattA	
TaZds-B_IWGSC	AGCCAGTTG	TTCGAGCTCT	TGTTGATCCA	GACGGTGCAT	TGCAACAAGT	ACGGGACTTG	GATGATGTAA	GAATTCCTCT	TCTTTTGTGC	AGTGCATTA	
TaZds-D1	AGCCAGTTG	TTCGAGCTCT	TCTTGATCCA	GACGGTGCAT	TGCAACAAGT	ACGGGACTTG	GATGATGTAA	GAATTCCTCT	TCTTTTGTGC	AGTGCATTA	
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
TaZds-Al	CTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTCCCTG	TGGACTTGCT	TTTATTTCAT	CTTCCTTGCA	AACTGTTTAG	TCTAGCATGC	
TaZds-A_IWGSC	ctgtgca	tatatgctat	atattttaaa	ttcggatagt	gggttccttg	tggacttgct	tttatttcat	cttccttgca	aaactgtttag	tctagcatgc	
TaZds-B_IWGSC	CTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTCCCTG	TGCACCTGCT	TTTATTTCAT	CCTCCTTGCA	AACTGTTTAG	TCTAGCATGA	
TaZds-D1	GTA	CTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTCCCTG	TGCACCTGCT	TTTATTTCAT	CTTCCTTGCA	AACTGTTTAG	TCTAGCATGC
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
TaZds-Al	ATGTATGGG	CTTCAGAACA	ATTCCCTTAA	GTTTTTCCCC	AGCATAAECT	AGTTGTAGCT	GATTCCTAAA	TCTAAATATA	GAGTTGTATA	TACACTTTTT	
TaZds-A_IWGSC	atgtatggg	cttcagaaca	attcctttaa	gtttttcccc	agcataaect	agttgtagct	gattcctaaa	tctaaatata	gagttgtata	tacacttttt	
TaZds-B_IWGSC	GTCTATGGGA	CTTCAGAACA	ATTCCCTTAA	GTTTTTCCCC	AGCGTAAECT	AGTTGTAGCT	GATTCCTAAA	TCTAAATATA	GAGTTCTATA	TACACTTTTT	
TaZds-D1	ATGTATGGGA	CTTCAGAACA	ATTCCCTTAA	GTTTTTCCCC	AGCATAAECT	AGTTGTAGCT	GATTCCTAAA	TCTAAATATA	GAGTTGTATA	TACACTTTTT	
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
TaZds-Al	CAGGTAAGTT	TCACTGATTG	GTTTCATGCT	AGAGGTGGTA	CTCGAGAGAG	CATCACAAGA	ATGTGGGATC	CTGTGCTTAA	TGCTCTTGGT	TTTATCGACT	
TaZds-A_IWGSC	caggtaagtt	tcactgattg	gtttcatgct	agaggtggta	ctcgagagag	catcacaga	atgtgggatc	ctgtgcttaa	tgctcttgg	tttatcgact	
TaZds-B_IWGSC	CAGGTAAGTT	TCACTGATTG	GTTTCATGCT	AGAGGTGGTA	CTCGAGAGAG	CATCACAAGA	ATGTGGGATC	CTGTGCTTAA	TGCTCTTGGT	TTTATCGACT	
TaZds-D1	CAGGTAAGTT	TCACTGATTG	GTTTCATGCT	AGAGGTGGTA	CTCGAGAGAG	CATCACAAGA	ATGTGGGATC	CTGTGCTTAA	TGCTCTTGGT	TTTATCGACT	
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
TaZds-Al	GTGATAAAT	CAGTGCTCGA	TGCATGCTTA	CTATTTTCAC	CCTGTTTGCC	ACAAAGACAG	AGGCATCTTT	GTTGCGCATG	CTAAAGGGCT	CACCTGATGT	
TaZds-A_IWGSC	gtgataaat	cagtgctcga	tgcatgctta	ctattttcac	cctgtttgcc	acaaagacag	aggcatcttt	gttgccgatg	ctaaaggct	cacctgatgt	
TaZds-B_IWGSC	GTGATAAAT	CAGTGCTCGA	TGCATGCTTA	CTATTTTCAC	CCTGTTTGCC	ACAAAGACAG	AGGCATCTTT	GTTGCGCATG	CTAAAGGGCT	CACCTGATGT	
TaZds-D1	GTGATAAAT	CAGTGCTCGA	TGCATGCTTA	CTATTTTCAC	CCTGTTTGCC	ACAAAGACAG	AGGCATCTTT	GTTGCGCATG	CTAAAGGGCT	CACCTGATGT	
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
TaZds-Al	TTACTTAAAGT	GGCCCAATAA	AGAAGTACAT	AACAGACAGG	GGTGGTAGGT	ATGTTAACGA	GACCAATAAT	ACTCTTCAAT	TGCTATGTA	ATAAATATTG	
TaZds-A_IWGSC	ttacttaagt	ggcccaataa	agaagtacat	aacagacagg	ggtgtaggt	atgttaacga	gaccaataat	actcttcaat	tgctatgta	ataaattttg	
TaZds-B_IWGSC	TTACTTAAAGT	GGCCCAATAA	AGAAGTACAT	AACAGACAGG	GGTGGTAGGT	ATGTTAACGA	GACCAATAAT	ACTCTTCAAT	TGCTATGTA	ATAAATATTG	
TaZds-D1	TTACTTAAAGT	GGCCCAATAA	AGAAGTACAT	AACAGACAGG	GGTGGTAGGT	ATGTTAACGA	GACCAATAAT	ACTCTTCAAT	TGCTATGTA	ATAAATATTG	
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
TaZds-Al	CAGTGCAGCC	ATTTCITTTT	ATATTATAAA	AAAATCCTTC	AGGTTTCACT	TGAAGTGGGG	ATGCCGAGAG	GTTCTCTACG	ATAAGTCACC	CGATGGAGAG	
TaZds-A_IWGSC	cagtgcagcc	atttcttttt	atattataaa	aaaatccttc	aggtttcact	tgaagtgggg	atgccgagag	gttctctacg	ataagtcacc	cgatggagag	
TaZds-B_IWGSC	CAGTGCAGCC	ATTTCITTTT	ATATTATAAA	AAAATCCTTC	AGGTTTCACT	TGAAGTGGGG	ATGCCGAGAG	GTTCTCTACG	ATAAGTCACC	TGATGGAGAG	
TaZds-D1	CAGTGCAGCC	ATTTCITTTT	ATATTATAAA	AAAATCCTTC	AGGTTTCACT	TGAAGTGGGG	ATGCCGAGAG	GTTCTCTACG	ATAAGTCACC	CGATGGAGAG	
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
TaZds-Al	ACCTATGTA	AAGGCTTTCT	CATCTCTAAG	GTTAGCTTTC	GTTCTACGTAG	CAAGATTACT	GCTAGATCAT	CAAAGGTATT	TATGCACTGT	TCCGGAACCT	
TaZds-A_IWGSC	acctatgta	aaggctttct	catctctaag	gttagctttc	gttctacgtag	caagattact	gctagatcat	caaaggtatt	tatgcactgt	tccggaaact	
TaZds-B_IWGSC	ACCTATGTA	AAGGCTTTCT	CATCTCTAAG	GTTAGCTTTC	GTTCTACGTAG	CAAGATTACT	GCTAGATCAT	CAAAGGTATT	TATGCACTGT	TCCGGAACCT	
TaZds-D1	ACCTATGTA	AAGGCTTTCT	CGTCTCTAAG	GTTAGCTTTC	GTTCTACGTAG	CAAGATTACT	GCTAGATCAT	CAAAGGTATT	TATGCACTGT	TCCGGAACCT	
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
TaZds-Al	CTGTTAGTTG	GTAGGAACCG	GATCCCTACC	AGGGCGTGGT	CTCGGGTTGT	AGGGGTGAA	GGAGGGATGG	CGTGAGGAA	GGCGTGGTCG	CCGGCGCTGG	
TaZds-A_IWGSC	ctgttagttg	gtaggaaccg	gatccctacc	agggcgtgg	ctcgggtgt	aggggtgaa	ggagggatgg	cgtaggaa	ggcgtggtcg	ccggcgctgg	
TaZds-B_IWGSC	CTGTT	GTAGGAACCG	GATCCCTACC	AGGGCGTGGT	CTCGGGTTGT	AGGGGTGAA	GGAGGGATGG	CGTGAGGAA	GGCGTGGTCG	CCGGCGCTGG	
TaZds-D1	CTGTT	GTAGGAACCG	GATCCCTACC	AGGGCGTGGT	CTCGGGTTGT	AGGGGTGAA	GGAGGGATGG	CGTGAGGAA	GGCGTGGTCG	CCGGCGCTGG	
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
TaZds-Al	GGCGCGCTCG	TTGCGTGC	GCGCGTGAGA	GAGAGCAGGG	GCGGCGGCTA	GGGTTAGGTC	TCCTGGCTCC	CTAAGGAAGC	CGAGCAAATA	TGATTGCTTC	
TaZds-A_IWGSC	ggcgcgctcg	ttgctgctcg	gcgctgaga	gagagcagg	gcgcgcgcta	gggttaggtc	tcctggctcc	ctaaggaagc	cgagcaata	tgattgcttc	
TaZds-B_IWGSC	GGCGCGCTCG	TTGCGTGC	GCGCGTGAGA	GAGAGCAGGG	GCGGCGGCTA	GGGTTAGGTC	TCCTGGCTCC	CTAAGGAAGC	CGAGCAAATA	TGATTGCTTC	
TaZds-D1	GGCGCGCTCG	TTGCGTGC	GCGCGTGAGA	GAGAGCAGGG	GCGGCGGCTA	GGGTTAGGTC	TCCTGGCTCC	CTAAGGAAGC	CGAGCAAATA	TGATTGCTTC	
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
TaZds-Al	TTGCTTAATC	CCAAAACGGG	TCCTCACACG	AGTTTATATA	ATCCTCCTAA	TAAGATGATT	GGGCTAAGCC	CCTAATAACG	ATAAGATAAA	CTGGGCCACA	
TaZds-A_IWGSC	ttgcttaatc	ccaaaacggg	tcctcacacg	agtttatata	atcctcctaa	taagatgatt	gggctaagcc	cctaataacg	ataagataaa	ctgggccaca	
TaZds-B_IWGSC	TTGCTTAATC	CCAAAACGGG	TCCTCACACG	AGTTTATATA	ATCCTCCTAA	TAAGATAATT	GGGCTAAGCC	CCTAATAACG	ATAAGATAAA	CTGGGCCACA	
TaZds-D1	TTGCTTAATC	CCAAAACGGG	TCCTCACACG	AGTTTATATA	ATCCTCCTAA	TAAGATAATT	GGGCTAAGCC	CCTAATAACG	ATAAGATAAA	CTGGGCCACA	
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
TaZds-Al	ACTAACTGAG	CTAAGCCCCT	AATATGCCGG	TCATAACATT	AGTACTCTCA	CTAACATATT	GCTACATCTG	GGCATTGTAG	GCTACAAGTA	GTGAGATAAT	
TaZds-A_IWGSC	actaaactgag	ctaagcccct	aatatgccgg	tcataacatt	agtactctca	ctaacatatt	gctacatctg	ggcattgtag	gctacaagta	gtgagataat	
TaZds-B_IWGSC	ACTAACTGAG	CTAAGCCCCT	AATATGCCGG	TCATAACATT	AGTACTCTCA	CTAACATATT	GCTACATCTG	GGCATTGTAG	GCTACAAGTA	GTGAGATAAT	
TaZds-D1	ACTAACTGAG	CTAAGCCCCT	AATATGCCGG	TCATAACATT	AGTACTCTCA	CTAACATATT	GCTACATCTG	GGCATTGTAG	GCTACAAGTA	GTGAGATAAT	
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	
TaZds-Al	CAAAGCAGAT	GCATATGTTG	CAGGTTATTT	TTCCTCTCAG	CATTTCITTTT	GTTGATTGAC	TCCCAACCAT	TCAAGCATAA	AATTGATGTT	TCACITTTTG	
TaZds-A_IWGSC	caaagcagat	gcataatggtg	caggttatit	ttcctctcag	catttctttt	gttgattgac	tcccaacct	tcaagcataa	aattgatgtt	tcacittttg	
TaZds-B_IWGSC	CAAAGCAGAT	GCATATGTTG	CAGGTTATTT	TTCCTCTCAG	CATTTCITTTT	GTTGATTGAC	TCCCAACCAT	TCAAGCATAA	A-TTATGTTT	TCACCTTTTG	
TaZds-D1	CAAAGCAGAT	GCATATGTTG	CAGGTTATTT	TTCCTCTCAG	CATTTCITTTT	GTTGATTGAC	TCCCAACCTT	TCAAGCATAA	AATTGATGTT	TCACCTTTTG	
	1310	1320	1330								
TaZds-Al	TTGGGTGCAG	CTTGTGATGT	CCCAGGGATC	AAA							
TaZds-A_IWGSC	ttgggtgcag	cttgtgatgt	cccaggatc	aaa							
TaZds-B_IWGSC	TTGGGTGCAG	CTTGTGATGT	CCCAGGGATC	AAA							
TaZds-D1	TTGGGTGCAG	CTTGTGATGT	CCCAGGGATC	AAA							

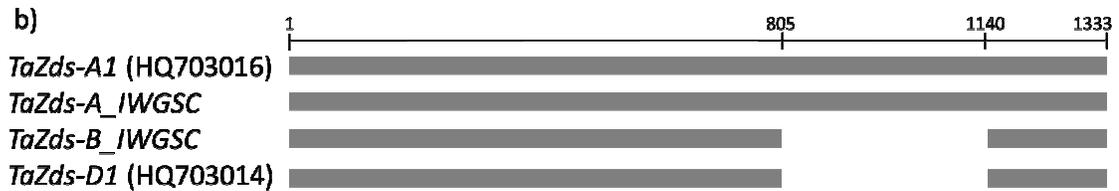


Figura 25. a) Alineamiento entre genes *Zds* de *Triticum aestivum* var. *Chinese spring* *TaZds-A-IWGSC* y *TaZds-B-IWGSC*) y cv. *Zhongyou9507* (*TaZds-A_HQ703016* y *TaZds-D_HQ703014*), en la región enmarcada por los primers *Zds-3F/3R*. Se señala en amarillo la deleción G(C/T)A y la inserción de ~300 bp en las secuencias correspondientes al genoma A de *T. aestivum*. Los genes de los genomas A, B y D se muestran en rojo, verde y negro, respectivamente; b) Representación esquemática del alineamiento mostrado en a). Los números refieren a la posición en bp en el amplicón.

En base a esta observación *in silico*, se analizaron los alineamientos de los fragmentos secuenciados, estableciéndose que 43 secuencias provenían de la amplificación del gen *Zds* del genoma B y ocho del genoma A. El alineamiento de las secuencias atribuidas a la amplificación de *Zds* del genoma B, permitió separarlas en dos grupos, denominados *TtZds-B1.1* y *TtZds-B1.2*, obtenidos a partir de 41 y 2 secuencias, respectivamente. La deleción del triplete GCA, posicionado a 100 bp del inicio del amplicón en *TtZds-B1.2* justificó la clasificación de ambas secuencias como posibles alelos. El hecho de que esta deleción también se haya observado en el genoma A de trigo pan indica adicionalmente que no es un artefacto del proceso de secuenciación (Figura 26).

		90	100	110	120	130	140	150			
TaZds-B IWGSC	TCTTTTTGTC	AGTGCATTA	GCACTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTC-CTT	(
TtZds-B1.1	TCTTTTTGTC	AGTGCATTA	GCACTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTCCTT	(
Zds-A1 (Hq703016)	TCTTTTTGTC	AGTGCATTA	---CTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTC-CTT	(
TaZds-A IWGSC	TCTTTTTGTC	AGTGCATTA	---CTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTC-CTT	(
TtZds-B1.2	TCTTTTTGTC	AGTGCATTA	---CTGTGCA	TATATGCTAT	ATATTTTAAA	TTCGGATAGT	GGGTTC-CTT	(

Figura 26. Alineamiento de los genes *Zds* de *Triticum aestivum* var. *Chinese spring* (*TaZds-A_IWGSC* y *TaZds-B_IWGSC*) y cv. *Zhongyou9507* (*TaZds-A_HQ703016*), con las secuencias del genoma B obtenidos en *T. turgidum*, *TtZds-B1.1* (en rojo) y *TtZds-B1.2* (en verde). Se señala en amarillo la deleción GCA de *TtZds-B1.2*, también observada en *TaZds-A* y *TaZds-A_IWGSC*.

De las ocho secuencias pertenecientes al genoma A, cinco se agruparon bajo la nomenclatura *TtZds-A1.1*. En las otras secuencias se identificaron otros dos posibles secuencias nucleotídicas diferentes para esta región del gen (Figura 27). A fin de validarlas, se diseñaron cebadores específicos sobre los polimorfismos detectados o se

utilizaron cebadores previamente informados, los cuales fueron ensayados en los ocho genotipos contrastantes para el carácter CPC.

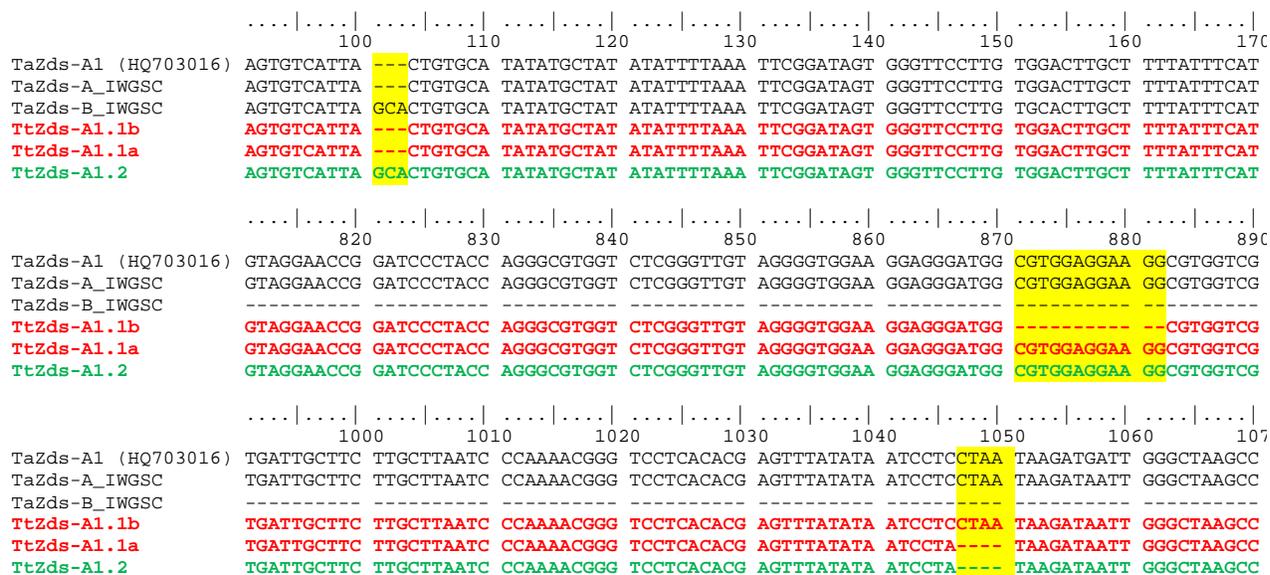


Figura 27. Alineamiento de las regiones polimórficas del gen *Zds* identificadas en la región delimitada por los cebadores *Zds-3F/3R* entre *T. aestivum* var. Chinese spring (*TaZds-A_IWGSC* y *TaZds-B_IWGSC*) y cv. Zhongyou9507 (*TaZds-A*), con las los alelos del genoma A de *T. turgidum*, *TtZds-A1.1a*, *TtZds-A1.1b* (en rojo) y *TtZds-A1.2* (en verde). Se señala en amarillo los polimorfismos identificados entre el sexto al decimo exón del gen *Zds* del genomas A de trigo candeal.

En primer lugar, se utilizó la combinación de cebadores *Zds-3F/YP2A-1R* (Tabla 4), que amplifica 1150 pb del gen, en los ocho genotipos contrastantes. El cebador *YP2A-1* es un marcador funcional co-dominante, identificado por Dong *et al.* (2012), basado en los polimorfismos de dos alelos en el locus, *TaZds-A1a* y *TaZds-A1b*, que producen fragmentos de 183 y 179 pb respectivamente. Dong *et al.* (2012), detectaron un QTL para el contenido de pigmento amarillo en el cromosoma 2A, co-segregando con el marcador funcional *YP2A-1* y *TaZds-A1*; que explicó el 11,3% de la varianza fenotípica para el contenido de pigmento amarillo en una población doblehaploide de Zhongyou 9507 / CA9632.

El análisis bioinformático de las 29 secuencias obtenidas combinado el cebador *Zds-3F* con el reportado *YP2A-1R*, mostró que 24 de ellas generaron un consenso único que resultó idéntico a *TtZds-A1.1*. Así, esta combinación de cebadores permitió confirmar la existencia

del alelo *TtZds-A1.1*, que mostró una identidad del 99% con respecto al gen de trigo pan del genoma A *TaZds-A* (HQ703016), presentando una delección de los nucleótidos CCTA localizados a partir de la posición 1047 con respecto al inicio del amplicón analizado (Figura 27). Esta delección también está presente en el gen *Zds-A1* obtenido del cultivar CA9632 de *T. aestivum* (HQ703015).

Las 5 secuencias restantes generaron un consenso que se diferencia de *TtZds-A1.1* por la delección de los nucleótidos AGGAAGGCGTGG, localizada a partir de la posición 880 respecto del sitio de unión del cebador en este amplicón y no presenta la delección CCTA (Figura 27). Es interesante destacar que este alelo provino de los amplicones obtenidos a partir de la variedad Amarillo, caracterizada por tener altos valores de CPC y CIE b* y no puede ser amplificada en las otras 7 variedades ensayadas. El hecho de que ambas secuencias fueran identificadas con la misma combinación de cebadores pero en diferentes genotipos, nos permite postular que ambos son alelos del gen, proponiéndose la nomenclatura *TtZds-A1.1a* para el alelo identificado en 7 de los genotipos y *TtZds-A1.1b* para el alelo del genotipo Amarillo.

La siguiente combinación de cebadores utilizada para validar los alelos del genoma A, fue *Zds/GCA-F/YP2A-1R*, que amplifica un fragmento de 1100pb aproximadamente. El cebador *Zds-GCA-F* (Tabla 4) fue diseñado para diferenciar la presencia de la inserción GCA posicionado a 100 bp del inicio del amplicón entre los posibles alelos correspondientes al genoma A (Figura 27). La especificidad de genoma se logró con la combinación de este cebador con el *YP2A-1R*, que amplifica el gen *Zds* del genoma A. La secuenciación de los amplicones obtenidos con esta combinación de cebadores, permitió obtener una única secuencia consenso denominada *TtZds-A1.2*, representada por 33 secuencias que fueron identificadas en las ocho variedades contrastantes para CPC.

De esta forma fue posible confirmar que la región que comprende del sexto al decimo exón del gen *Zds* del genoma A de trigo candeal, está representada por al menos tres secuencias nucleotídicas distintas, denominadas *TtZds-A1.1a*, con la variación alélica *TtZds-A1.1b*, obtenida del genotipo Amarillo, y *TtZds-A1.2*. Estos resultados sugieren que el gen *Zds* está duplicado en el genoma A de trigo candeal.

3.10.2 Polimorfismos identificados en la región alélica enmarcada por los cebadores Zds-3F/3R del gen *Zds* en los genomas A y B de ocho variedades de trigo candeal

Los alelos *TtZds-B1.1*, *TtZds-B1.2*, *TtZds-A1.1a*, *TtZds-A1.1b* y *TtZds-A1.2*, amplificados en la región del gen *Zds* enmarcada por los cebadores Zds-3F/3R, fueron comparados entre sí y con las secuencias de trigo pan disponibles (Tabla 29). Con respecto a los genes *Zds* de trigo pan reportados, esta combinación de cebadores amplifica la región correspondiente a las bases 3.629 y 4.960 del gen *Zds-A1* (HQ703016). Como ha sido mencionado, esta región amplificada comprende en trigo pan ~1.300 pb en el genoma A y ~1000 pb en los genomas B y D, diferenciándose adicionalmente por la presencia de una delección del triplete G(C/T)A en el genoma A (Figuras 26 - 28).

El análisis de los datos presentados permite concluir que se han sido detectados cuatro polimorfismos en esta región del gen (Tabla 30). El primero, la inserción de ~300 bp en el genoma A situada a ~800 bp del sitio de unión del primer Zds-3F, permitió clasificar a las secuencias como procedentes del genoma A o B de trigo candeal (Figura 26). El polimorfismo dado por la delección del triplete G(C/T)A del genoma A de trigo pan presentó un patrón muy interesante, dado que fue encontrada en uno de los alelos del genoma B, *TtZds-B1.2*, mientras que aparece como inserción en el alelo del genoma A *TtZds-A1.2* (Figuras 26 - 28).

Los otros dos polimorfismos fueron identificados en la región de la inserción de ~300 bp del genoma A con respecto al B, por lo que no pueden hacerse comparaciones entre genomas. La inserción de 12 pb, **AGGAAGGCGTGG**, que mapea entre las bases 4502 a 4514 de la secuencia *TaZds-A* y a la altura de las bases ~890 en *TtZds-A1.1a* y *TtZds-A1.2*, se encuentra delecionada en *TtZds-A1.1b* (Figura 27). Finalmente, la inserción de los nucleótidos **CCTA** entre las bases 4673 a 4676 de *TaZds-A* y entre las bases 1047 a 1050 en el alelo *TtZds-A1.1b* y la correspondiente delección en el alelo *TtZds-A1.1a* y en la copia del gen *TtZds-A1.2* (Figura 27).

Tabla 30. Caracterización de la región del gen *Zds* comprendida entre los cebadores ZDS3F/3R, identificados en ocho variedades de trigo candeal. La región amplificada se corresponde con las bases 3.629 y 4.960 del gen *TaZds-A1* de trigo pan (HQ703016).

Alelo <i>TtZDS</i>	# Seq	Cebadores	Amplicón (pb)	Polimorfismos		
				GCA	AGGAAGGCGTGG	CCTA
<i>B1.1</i>	41	3F/3R	1001	+	-	-
<i>B1.2</i>	2	3F/3R	991	-	-	-
<i>A1.1a</i>	26	3F/3R	1322	-	+	-
<i>A1.1b</i>	8	3F/Yp2aR	1314	-	-	+
<i>A1.2</i>	33	GCAF-3R o Yp2aR	1319	+	+	-

El árbol filogenético obtenido por medio de la interface EBI (The European Bioinformatics Institute) utilizando el método *Neighbour-joining* evidencia que los alelos del genoma A forman un clúster diferente de los alelos provenientes del genoma B (Figura 28). Así mismo, se evidencia que la secuencia *TtZds-A1.2* forma un grupo diferente, lo cual apoya la hipótesis que sugiere que el gen *TtZds-A* esta duplicado en trigo candeal.

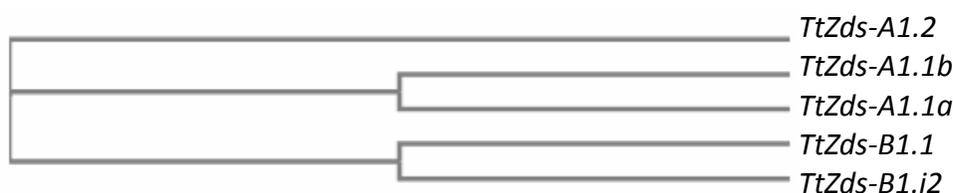


Figura 28. Árbol filogenético construido en base a la secuencia de los alelos identificados en la región del gen *Zds* con los cebadores Zds3F/3R en los genomas A y B de trigo candeal.

3.10.3 Variantes alélicas obtenidas con los cebadores ZDS 4F/5R.

El siguiente par de cebadores utilizados fue ZDS-4F/5R, específicos para la región comprendida entre el onceavo al catorceavo exón del gen *TaZds-A*. Mediante la amplificación por PCR y posterior clonado y secuenciación de los fragmentos en las ocho

variedades se obtuvieron 21 secuencias que confluyeron en una única secuencia consenso de 1.366 pb. La comparación mediante el algoritmo BLASTn de las secuencias de *Zds* de los tres genomas de trigo pan en la región enmarcada por los cebadores *Zds-4F/5R*, reveló que comprende 1.368 pb en el genoma A mientras que es de 1.657 y 1602 pb en los genomas B y D, respectivamente (Figura 29). El alineamiento de las secuencias *TaZds-A* y *TaZDS-B* de *Chinese spring* obtenidas a través del IWGS, mostró que en esta región los genes de los dos genomas se diferencian por una delección de 331 pb en la copia del genoma A respecto de la correspondiente del genoma B (Figura 29).

a)

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
TtZds-B_IWGSC	TTGCACTGTC	ATCCCTCGCT	GACTACTACA	TTGAAGGACA	AGGTTCCCTG	ATCCAGTAAG	GCTACCATCC	AGCACTCTTA	ACAAAGTTAA	CTGTTTGAGG
TaZds-D1 4)	TTGCACTGTC	ATCCCTCGCT	GACTACTACA	TTGAAGGACA	AGGTTCCCTG	ATCCAGTAAG	GCTACCATCC	AGCACTCTTA	ACAAAGTTAA	CTGTTTGAGG
TaZds-A1	TTGCACTGTC	ATCCCTCGCT	GACTACTACA	TTGAAGGACA	AGGTTCCCTG	ATCCAGTAAG	GCTACCATCC	AGCACTCTTA	ACAAAGTTAA	CTGTTTGAGG
TaZds-A_IWGSC	TTGCACTGTC	ATCCCTCGCT	GACTACTACA	TTGAAGGACA	AGGTTCCCTG	ATCCAGTAAG	GCTACCATCC	AGCACTCTTA	ACAAAGTTAA	CTGTTTGAGG
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TtZds-B_IWGSC	TTTTGAAACT	CTGATTTATG	TTTACATAAT	CTGGGCAGTT	TACTTGTGTA	TTTGTGCAGT	ATAAATCTTA	AAATTCATGC	ATTGGACCGG	CTTATCTTTC
TaZds-D1	TTTTGAAACT	CTGATTTATG	TTTACATAAT	CTGGGCAGTT	TACTTGTGTA	TTTGTGCAGT	ATAAATCTTA	AAATTCATGC	ATTGGACCGG	CTTATCTTTC
TaZds-A1	TTTTGAAACT	CTGATTTATG	TTTACATAAT	CTGGGCAGTT	TACTTGTGTA	TTTGTGCAGT	ATAAATCTTA	AAATTCATGC	ATTGGACCGG	CTTATCTTTC
TaZds-A_IWGSC	TTTTGAAACT	CTGATTTATG	TTTACATAAT	CTGGGCAGTT	TACTTGTGTA	TTTGTGCAGT	ATAAATCTTA	AAATTCATGC	ATTGGACCGG	CTTATCTTTC
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
TtZds-B_IWGSC	TGCAAAATAA	TTACACCTGC	GTGTTTGCTT	TATTTGCAGA	GCTGTGCTAA	CTCCAGGTGA	TCCGTACATG	CCATTGCCAA	ATGAGGAGAT	TATTAGCAAG
TaZds-D1	TGCAAAATAA	TTACACCTGC	GTGTTTGCTT	TATTTGCAGA	GCTGTGCTAA	CTCCAGGTGA	TCCGTACATG	CCATTGCCAA	ATGAGGAGAT	TATTAGCAAG
TaZds-A1	TGCAAAATAA	TTACACCTGC	GTGTTTGCTT	TATTTGCAGA	GCTGTGCTAA	CTCCAGGTGA	TCCGTACATG	CCATTGCCAA	ATGAGGAGAT	TATTAGCAAG
TaZds-A_IWGSC	TGCAAAATAA	TTACACCTGC	GTGTTTGCTT	TATTTGCAGA	GCTGTGCTAA	CTCCAGGTGA	TCCGTACATG	CCATTGCCAA	ATGAGGAGAT	TATTAGCAAG
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
TtZds-B_IWGSC	GTTGAAAAC	AGGTGGGTTT	GTACATAATT	TGTTGGTGAA	AGGATCGCTA	TAATTTGATTG	ATGCAGATGA	TTTCTATTAC	CAATATCTAA	GCATGGCCTC
TaZds-D1	GTTGAAAAC	AGGTGGGTTT	GTACATAATT	TGTTGGTGAA	AGGATCGCTA	TAATTTGATTG	ATGCAGATGA	TTTCTATTAC	CAATATCTAA	GCATGGCCTC
TaZds-A1	GTTGAAAAC	AGGTGGGTTT	GTACATAATT	TGTTGGTGAA	AGGATCGCTA	TAATTTGATTG	ATGCAGATGA	TTTCTATTAC	CAATATCTAA	GCATGGCCTC
TaZds-A_IWGSC	GTTGAAAAC	AGGTGGGTTT	GTACATAATT	TGTTGGTGAA	AGGATCGCTA	TAATTTGATTG	ATGCAGATGA	TTTCTATTAC	CAATATCTAA	GCATGGCCTC
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
TtZds-B_IWGSC	ATTCTAAAGC	AGTTCGTAG	AATGTGATT	TATTGTGCTT	CTTGTATGAG	ATGCAACTTG	TCTCTATTTC	ATAGCCCAAG	AGGGGTGTAT	ATATATTACA
TaZds-D1	ATTCTAAAGC	AGTTCGTAG	AATGTGATT	TATTGTGCTT	CTTGTATGAG	ATGCAACTTG	TCTCTATTTC	ATAGCCCAAG	AGGGGTGTAT	ATATATTACA
TaZds-A1	ATTCTAAAGC	AGTTCGTAG	AATGTGATT	TATTGTGCTT	CTTGTATGAG	ATGCAACTTG	TCTCTATTTC	ATAGCCCAAG	AGGGGTGTAT	ATATATTACA
TaZds-A_IWGSC	ATTCTAAAGC	AGTTCGTAG	AATGTGATT	TATTGTGCTT	CTTGTATGAG	ATGCAACTTG	TCTCTATTTC	ATAGCCCAAG	AGGGGTGTAT	ATATATTACA
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
TtZds-B_IWGSC	CAAGACTTGG	GGTACAAGGA	AAAAGGAAAC	ACAATCTAAT	AGGCCACTTG	GACCTAATAC	TCCTTAGGCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCaCaCaC
TaZds-D1	CAAGACTTGG	GGTACAAGGA	AAAAGGAAAC	ACAATCTAAT	AGGCCACTTG	GACCTAATAC	TCCTTAGGCC	CCCCCCCCC	GCC-----	
TaZds-A1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TaZds-A_IWGSC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
TtZds-B_IWGSC	ACACACACAA	ATGCAAAGCG	TATGCATTTC	GGTTGCATT	GAAGTGTAA	AGTAGAAGAA	GAAAAATGAA	AATTCAAAT	CCGGTCTTGT	GGAGTGTGTT
TaZds-D1	-----	CAA	ATGCAAAGCG	TA-----	---TGCATT	GAAGTGTAA	ACTAGAAGAA	GAAAAATGAA	AATTCAAAT	CCGGTCTTGT
TaZds-A1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	ATGAA	AATTCAAAT	CCGGTCTTGT
TaZds-A_IWGSC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	ATGAA	AATTCAAAT	CCGGTCTTGT
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
TtZds-B_IWGSC	TGTAGCATGA	AGAATCTTTA	AAACCTGTGC	AGTCAAGCCA	AAGGAGATAA	CGAGAAGATG	GCGCATCAAC	AGAAGATACA	AGAAAGGAAA	AAATATATGT
TaZds-D1	CGTAGCATGA	AGAATCTTTA	AAACCTGTGC	AGTCAAGCCA	AAGGAGATAA	CGAGAAGATG	GCACATCAAT	AGAAGATACA	AGAAAGGAAA	AAATATATGT
TaZds-A1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
TaZds-A_IWGSC	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
TtZds-B_IWGSC	TTTTGAGAG	TGGGGCTTAT	CAGGACATGT	GTGCTCGTAT	GATTGGCCCT	GCACAGTAAT	CGCTTCAGGG	ATCCCTGCAG	GAGAGCCGAA	CCCTAATACT
TaZds-D1	TTTTGAGAGG	TGGGGCTTAT	CAGGACATGT	GTGCTCGTAT	GATTGGCCCT	GCACAGTAAT	CGCTTCAGGG	ATCCCTGCAG	GAGAGCCGAA	CCCTAATACT
TaZds-A1	-----	GGCTTTAT	CAGGACATGT	GTGCTCGTAT	GATTGGCC-T	GCACAGTAAT	CGCTTCAGGG	ATCCCTGCAG	GAGAGCCGAA	CCCTAATACT
TaZds-A_IWGSC	-----	GGCTTTGT	CAGGACATGT	GTGCTCGTAT	GATTGGCC-T	GCACAGTAAT	CGCTTCAGGG	ATCCCTGCAG	GAGAGCCGAA	CCCTAATACT
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
TtZds-B_IWGSC	AAGACAACIT	AGCGCTTCTG	TTGATTCCTAT	TGTCCTCTCG	ATGCTAATGC	ATTTAAAAT	TTGCGCAGGT	CTTAGATTG	TTTCCATCAG	CCCGAGGCTT
TaZds-D1	AATACTCCTT	AGCGCTTCTG	TTGATTCCTAT	TGTCCTCTCG	ATGCTAATGC	ATTTAAAAT	TTGCGCAGGT	CTTAGATTG	TTTCCATCAG	CCCGAGGCTT
TaZds-A1	AATACTCCTT	AGCGCTTCTG	TTGATTCCTAT	TGTCCTCTCG	ATGCTAATGC	ATTTAAAAT	TTGCGCAGGT	CTTAGATTG	TTTCCATCAG	CCCGAGGCTT
TaZds-A_IWGSC	AATACTCCTT	AGCGCTTCTG	TTGATTCCTAT	TGTCCTCTCG	ATGCTAATGC	ATTTAAAAT	TTGCGCAGGT	CTTAGATTG	TTTCCATCAG	CCCGAGGCTT
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
TtZds-B_IWGSC	GGAAGTTACA	TGGTCCAGTG	TGGTAAAGAT	YGGACAATCC	TTGTACCGTG	AGGCTCCTGG	AAATGATCCA	TTTAGACCTG	ACCAGAAGAC	ACCAGTAAAA
TaZds-D1	GGAAGTTACA	TGGTCCAGTG	TGGTAAAGAT	CGGACAATCC	TTGTACCGTG	AGGCTCCTGG	AAATGATCCA	TTTAGACCTG	ACCAGAAGAC	ACCAGTAAAA
TaZds-A1	GGAAGTTACA	TGGTCCAGTG	TGGTAAAGAT	CGGACAATCC	TTGTACCGTG	AGGCTCCTGG	AAATGATCCA	TTTAGACCTG	ACCAGAAGAC	ACCAGTAAAA
TaZds-A_IWGSC	GGAAGTTACA	TGGTCCAGTG	TGGTAAAGAT	CGGACAATCC	TTGTACCGTG	AGGCTCCTGG	AAATGATCCA	TTTAGACCTG	ACCAGAAGAC	ACCAGTAAAA
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
TtZds-B_IWGSC	AATTTCTTCT	TGCTCGGCTC	TTACACGAAA	CAGGTACAGT	ACACCTGAAG	CAITGACATA	GTCCCTGACC	CTAAAGCAGA	CAAGTTGCAT	TCAAATCTCT
TaZds-D1	AATTTCTTCT	TGCTCGGCTC	TTACACGAAA	CAGGTACAGT	ACACCTGAAG	CAITGACATA	GTCCCTGACC	CTAAAGCAGA	CAAGTTGCAT	TCAAATCTCT
TaZds-A1	AATTTCTTCT	TGCTCGGCTC	TTACACGAAA	CAGGTACAGT	ACACCTGAAG	CAITGACATA	GTCCCTGACC	CTAAAGCAGA	CAAGTTGCAT	TCAAATCTCT
TaZds-A_IWGSC	AATTTCTTCT	TGCTCGGCTC	TTACACGAAA	CAGGTACAGT	ACACCTGAAG	CAITGACATA	GTCCCTGACC	CTAAAGCAGA	CAAGTTGCAT	TCAAATCTCT
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
TtZds-B_IWGSC	AGTAATTTGT	GGAGTCAAIT	TTAAACAGAG	GAATGCTTGC	GACATTGGAT	GATACACGTC	GTTAGGAAAT	AGTAAATGTG	ACCAAAATCA	TGACCTCTTT
TaZds-D1	AGTAATTTGT	GGAGTCAAIT	TTAAACAGAG	GAATGCTTGC	GACATTGGAT	GATACACGTC	GTTAGGAAAT	AGTAAATGTG	ACCAAAATCA	TGACCTCTTT
TaZds-A1	AGTAATTTGT	GGAGTCAAIT	TTAAACAGAG	GAATGCTTGC	GACATTGGAT	GATACACGTC	GTTAGGAAAT	AGTAAATGTG	ACCAAAATCA	TGACCTCTTT
TaZds-A_IWGSC	AGTAATTTGT	GGAGTCAAIT	TTAAACAGAG	GAATGCTTGC	GACATTGGAT	GATACACGTC	GTTAGGAAAT	AGTAAATGTG	ACCAAAATCA	TGACCTCTTT
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
TtZds-B_IWGSC	TATTGTTTTT	GTAGGACTAC	ATTGACAGCA	TGGAAGGAGC	AACCTCTTCT	GGCAGGCGAA	CAGCGCCCTA	CATCTGTGGT	GCTGGAGAGG	AGCTATTAGC
TaZds-D1	TATTGTTTTT	GTAGGACTAC	ATTGACAGCA	TGGAAGGAGC	AACCTCTTCT	GGCAGGCGAA	CAGCGCCCTA	CATCTGTGGT	GCTGGAGAGG	AGCTATTAGC
TaZds-A1	TATTGTTTTT	GTAGGACTAC	ATTGACAGCA	TGGAAGGAGC	AACCTCTTCT	GGCAGGCGAA	CAGCGCCCTA	CATCTGTGGT	GCTGGAGAGG	AGCTATTAGC
TaZds-A_IWGSC	TATTGTTTTT	GTAGGACTAC	ATTGACAGCA	TGGAAGGAGC	AACCTCTTCT	GGCAGGCGAA	CAGCGCCCTA	CATCTGTGGT	GCTGGAGAGG	AGCTATTAGC
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
TtZds-B_IWGSC	CATTTCGAAAG	AAGCTCGTTG	TGCATCACAG	CGAGAAGGCC	TCCGGGATGG	TTCAAATGTT	GCAAACAAGT	TAAACCTTGC	AATCACCAAA	GCCAGAATGC
TaZds-D1	CATTTCGAAAG	AAGCTCGTTG	TGCATCACAG	CGAGAAGGCC	TCCGGGATGG	TTCAAATGTT	GCAAACAAGT	TAAACCTTGC	AATCACCAAA	GCCAGAATGC
TaZds-A1	CATTTCGAAAG	AAGCTCATTT	TGCATCACAG	CGAGAAGGCC	TCCGGGATGG	TTCAAATGTT	GCAAACAAGT	TAAACCTTGC	AATCACCAAA	GCCAGAATGC
TaZds-A_IWGSC	CATTTCGAAAG	AAGCTCATTT	TGCATCACAG	CGAGAAGGCC	TCCGGGATGG	TTCAAATGTT	GCAAACAAGT	TAAACCTTGC	AATCACCAAA	GCCAGAATGC
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
TtZds-B_IWGSC	CCAAACTATA	GGTTTCAGGG	TTATAGGCGA	TTGTCAACAG	TGATTTCTAT	AAATCTTGT	TGAGCATTAG	ATTGGTGTAT	GCCTTTTTTT	-AACCGTGAC
TaZds-D1	CCAAACTATA	GGTTTCAGGG	TTATAGGCGA	TTGTCAACAG	TGATTTCTAT	AAATCTTGT	TGAGCATTAG	ATTGGTGTAT	GCCTTTTTTT	TAGCCGTGAC
TaZds-A1	C-AAACTATA	GGTTTCAGGG	TTATAGGCGA	TTGTCAACAG	TGATTTCTAT	AAATCTTGT	TGCGCATTAG	ATTGGTGTAT	GCCTTTTTTT	TAGCCGTGAC
TaZds-A_IWGSC	C-AAACTATA	GGTTTCAGGG	TTATAGGCGA	TTGTCAACAG	TGATTTCTAT	AAATCTTGT	TGCGCATTAG	ATTGGTGTAT	GCCTTTTTTT	TAGCCGTGAC
	1610	1620	1630	1640	1650					
TtZds-B_IWGSC	ACATTTGCAC	ATCGCATGTT	CCTATCTTAC	AATTGGCAAC	CAGGTGGCCA	AGTGG				
TaZds-D1	ACATTTGCAC	ATCGCATGTT	CCTATCTTAC	AATTGGCAAC	CAGGTGGCCA	AGTGG				
TaZds-A1	ACATTTGCAC	ATCGCATGTT	CCTATCTTAC	AATTGGCAAC	CAGGTGGCCA	AGTGG				
TaZds-A_IWGSC	ACATTTGCAC	ATCGCATGTT	CCTATCTTAC	AATTGGCAAC	CAGGTGGCCA	AGTGG				



Figura 29. a) Alineamiento en la región enmarcada por los primers *Zds*-4F/5R entre los genes *Zds* de *T. aestivum* var. *Chinese spring* *TaZds-A_IWGSC* y *TaZds-B_IWGSC* y cv. *Zhongyou9507* *TaZds-A1* (HQ703016) y *TaZds-D1* (HQ703014). Se señalan en amarillo los polimorfismos entre los genomas A, B y D. Los genes de los genomas A, B y D se muestran en rojo, verde y negro, respectivamente b) Representación esquemática del alineamiento mostrado en a). Los números refieren a la posición en bp en el amplicón.

El análisis de la secuencia consenso obtenida demostró que corresponde al genoma A, demostrándose además que la región del gen *Zds* amplificada con la combinación de cebadores *ZDS* 4F/5R resultó monomórfica en el genoma A de los 8 genotipos, denominándose al alelo *TiZds-A2*.

Posteriormente se diseñaron cebadores específicos para obtener la secuencia de esta misma región correspondiente al genoma B. Para este objetivo se utilizó la combinación *Zds*-733F/5R, que permite amplificar parte de esta inserción de 311 pb, ya que fueron diseñados específicamente sobre la región que la incluye. Luego de obtener los amplicones, se clonaron y secuenciaron, obteniéndose 23 secuencias que generaron un consenso de ~900 pb nombrado *TdZds-B2*, mostrando que esta región del gen también resultó monomórfica en el genoma B de las ocho variedades de trigo candeal analizadas (Tabla 31). La principal diferencia entre el alelo *TdZds-A2* y *TdZds-B2* es, por lo tanto, la delección de ~300 pb en el genoma A respecto del B (Figura 30).

Tabla 31. Caracterización de la región del gen *Zds* comprendida entre los cebadores *ZDS*4F/5R, identificados en ocho variedades de trigo candeal. La región amplificada se corresponde con la situada entre las bases 5.344 y 6.710 del gen *TaZds-A1* de trigo pan (HQ703016).

ALELO <i>TiZDS</i>	# Seq	Cebadores	Tamaño del amplicón (pb)	POLIMORFISMOS
<i>A2</i>	21	<i>Zds</i> 4F/5R	1365	-
<i>B.2</i>	23	<i>Z733</i> /5R	900	-

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      490      500      510      520      530      540      550      560
TaZds-A1 (HQ703016) C-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-A_IWGSC      C-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TtZds-A2          C-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-D1 (HQ703014) AGGCGTGTAT GTATATTACA CAAGACTTGG GGTACAAGGA AAA-GGAAAC GCAAC-----|-----|-----|-----|
TtZds-B_IWGSC      AGGGGTGTAT ATATATTACA CAAGACTTGG GGTACAAGGA AAAAGGAAAC ACAATCTAAT AGGCCACTTG GACCTAATAC
TtZds-B2          -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      570      580      590      600      610      620      630      640
TaZds-A1 (HQ703016) TCCTTAGCC-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-A_IWGSC      TCCTTAGCC-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TtZds-A2          TCCTTAGCC-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-D1 (HQ703014) TCCTTAGCCC CCCCCCCCCT GCC-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TtZds-B_IWGSC      TCCTTAGCCC CCCCCCCCCC CCCCCCCCCC CCCCACACAC ACACACACAA ATGCAAAGCG TATGCATTAC GGTTCATTTC
TtZds-B2          -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      650      660      670      680      690      700      710      720
TaZds-A1 (HQ703016) -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-A_IWGSC      -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TtZds-A2          -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-D1 (HQ703014) GAAGTGTAAC ACTAGAAGAA GAAAAATGAA AATTCAAAT CCGCTTCTTG GGAATGTCGT CGTAGCATGA AGAGTCTTTA
TtZds-B_IWGSC      GAAGTGTAAC AGTAGAAGAA GAAAAATGAA AATTCAAAT CCGCGTCTTG GGAGTGTGTG TGTAGCATGA AGAATCTTTA
TtZds-B2          -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      730      740      750      760      770      780      790      800
TaZds-A1 (HQ703016) -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-A_IWGSC      -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TtZds-A2          -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-D1 (HQ703014) AAACCTGTCG AGTCAAGCCA AAGGAGATAA CGAGAAGATG GCACATCAAT AGAAGATACA GGAAAGGAAA AAATATATGT
TtZds-B_IWGSC      AAACCTGTCG AGTCAAGCCA AAGGAGATAA CGAGAAGATG GCGCATCAAC AGAAGATACA AGAAAGGAAA AAATATATGT
TtZds-B2          -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
      ....|.....| ...
      810
TaZds-A1 (HQ703016) -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-A_IWGSC      -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TtZds-A2          -----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
TaZds-D1 (HQ703014) TTTTGAGGTG GGG
TtZds-B_IWGSC      TTTTGAGGTG GGG
TtZds-B2          TTTTGAGGTG GGG

```

Figura 30 . Alineamiento de la región polimórfica entre los genomas A, B y D de trigo pan incluida en la región enmarcada por los cebadores Zds-4F/5R junto con los fragmentos identificados en candel *TiZds-A2* (genoma A, en rojo) y *TiZds-B2* (genoma B, en verde). El cebador F733, que permite amplificar selectivamente el genoma B, se indica sombreado en verde.

En la Figura 31 se muestra el árbol filogenético obtenido por medio de la interface EBI, utilizando el método Neighbour-joining, en la región enmarcada por los cebadores Zds4F/5R, se evidencia que los alelos del genoma A forman un agrupamiento diferente de los alelos provenientes del genoma B.

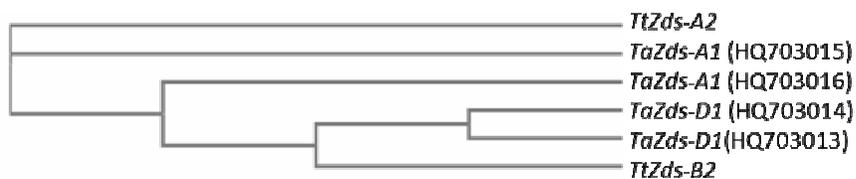


Figura 31 Árbol filogenético para las regiones del gen *Zds* de los genomas A y B de trigo candeal y A y D de trigo pan comprendidas entre los cebadores *Zds-4F/5R*.

3.10.5 Asociación entre las variantes alélicas del gen *Zds* del genoma A, el contenido de pigmentos carotenoides y el color amarillo CIE b^* de la sémola integral del trigo candeal

Como se mencionara previamente, el alelo *TtZds-A1.1b* fue amplificado del genoma A de la variedad Amarillo, que representa una variedad con altos valores de CPC en sémola integral, utilizando la combinación de cebadores 3-F/Yp2A /R. Se planteó como objetivo determinar la existencia de algún tipo de asociación entre la región alélica *TtZds-A1.1b* y la variación fenotípica en el contenido de pigmento carotenoide en la sémola integral de trigo candeal.

Para realizar este estudio se utilizaron dos valores fenotípicos relacionados con el color de la sémola, el CPC y el CIE b^* determinado con el colorímetro minolta, de plantas de la colección de 133 variedades de candeal objeto de estudio en esta tesis. Estas plantas fueron cultivadas en tres localidades bonaerenses (Cabildo, Barrow y Pieres) en la campaña 2011/2012. El marcador molecular utilizado fue Yp2a-1F/R, informado por Dong *et al.*, (2012) para trigo pan (cromosoma II), que permite identificar dos variantes alélicas para el genoma A de trigo pan, denominadas *TaZDS-A1a* y *TaZDS-A1b* (HQ703015). La variante *TaZDS-A1a* consiste en un fragmento de 183 pb y está asociada con bajo CPC y la variante *TaZDS-A1b*, de 179 pb está asociada con alto CPC en trigo pan por los autores mencionados. Así mismo este marcador permite diferenciar la inserción de 4pb (CCTA) que presenta el alelo *TtZds-A1.1b*.

En la Figura 32 se muestra un gel de acrilamida donde se evidencia la amplificación en variedades de trigo candeal lograda con el marcador polimórfico asociado al color, Yp2a-1F/R. Todas las variedades analizadas presentan una banda de ~183 bp, que coincide con la

asociada a bajo color en trigo pan. Sin embargo, nueve de las 133 variedades presentan adicionalmente la banda de menor tamaño (179 bp) reportada para el marcador Yp2a-1F/R, asociada a alto color de la sémola. La presencia de doble banda corresponde a la amplificación de los genes *TtZds-A1.1b* y *TtZds-A2* mientras que en los genotipos que presentan la combinación de genes *TtZds-A1.1a* y *TtZds-A2*, se observa una banda única porque el tamaño del amplicón es el mismo para ambas copias. Estos hallazgos confirman la duplicación de los genes *Zds* del genoma A en el germoplasma analizado de trigo candeal. Interesantemente, los genotipos que mostraron dos bandas también presentaron alto contenido de pigmentos carotenoides: BonINTACarilo (CPC: 5,69 ppm), VF 0113 (CPC: 5,96 ppm), Amarillo (CPC: 7,7 ppm), Gabbiano (CPC: 4,53 ppm), Joyau (CPC: 6,04 ppm), Karur (CPC: 5,6 ppm), Neodur (CPC: 5,2 ppm), Garic (CPC: 5.5 ppm), Exeldur (CPC: 6,3 ppm).

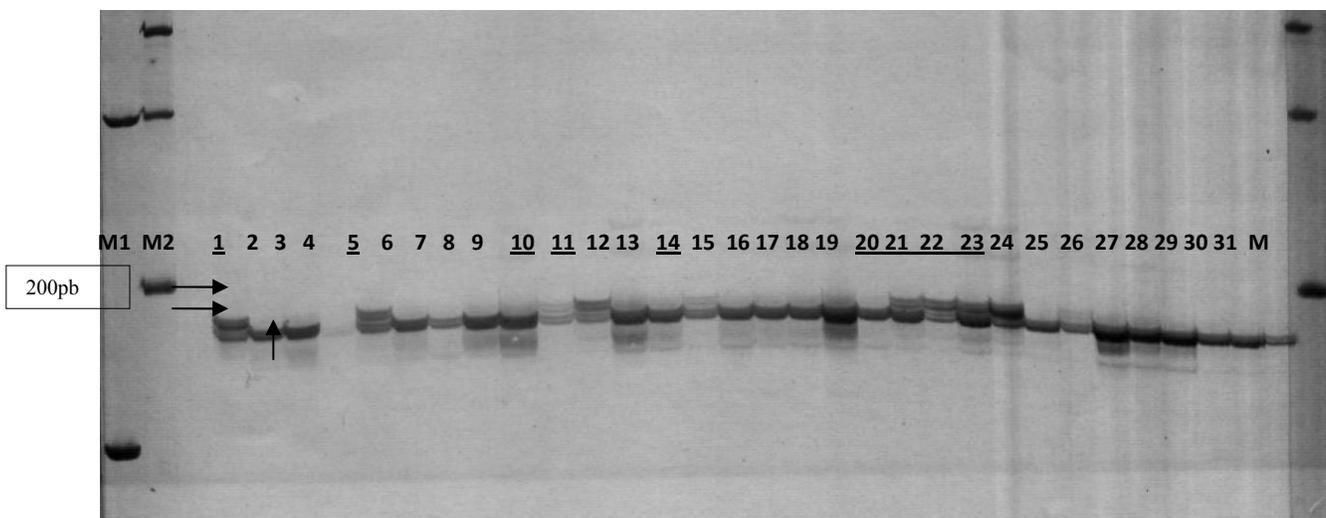


Figura 32. Gel de acrilamida donde se muestra el polimorfismo producido por la combinación de cebadores Yp2A-F/Yp2a-R que permite diferenciar la inserción de 4pb (CCTA) que presenta el alelo *TtZds-A1.1b* en la variedades: 1:BonINTACarilo, 5:VF 0113, 10:Amarillo, 11:Gabbiano, 14:Joyau, 20: Karur, 21:Neodur, 22:Garic, 23:Exeldur, M1 y M2 marcadores moleculares.

El análisis de la varianza (ANOVA) utilizando los modelos lineales generalizados (GLM) ejecutado en el programa SaS 9.2 permite afirmar que la variación en el color amarillo de la sémola integral es explicada por la presencia del alelo *TtZds-A1.1b* de manera altamente

significativa ($p < .0001$). En la (Tabla 32) se presenta el análisis de la varianza realizado teniendo en cuenta el contenido de pigmentos carotenoides (CPC) determinado en 133 variedades de trigo candeal como variable dependiente y la presencia o ausencia del alelo *TtZds-A1.1b* como fuente de variación.

Tabla 32 ANOVA utilizando como fuente de variación la región alélica *TtZds-A1.1b* y como variable dependiente el CPC evaluado en tres ambientes bonaerenses.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	8,548	8,55	22.13	<.0001
Error	131	50,60	0,386233		
Total corregido	132	59,145			

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<i>TtZds-A1.1b</i>	1	8,548	8,548	22.13	<.0001

Las medias ajustadas para el CPC de 133 variedades de trigo candeal y considerando como fuente de variación la ausencia o la presencia del alelo *TtZds-A1.1b* determinaron que existe una diferencia significativa entre la media ajustada para CPC cuando este alelo se encuentra presente. En la Tabla 33 se muestra que la media ajustada de CPC para las variedades que no portan la inserción CCTA (alelo *TtZds-A1.1b*) es de 4,8 ppm mientras que la de las variedades que si la portan es de 5,89 ppm y que estas medias ajustadas son estadísticamente diferentes al rechazarse la hipótesis nula (H_0 : Media ajustada 1 = Media ajustada 2). Esto demuestra que las variedades que portan el alelo *TtZds-A1.1b*, relacionado a mayor color, tienen mayor contenido de pigmentos carotenoides, lo que prueba que se trata de un buen marcador para seleccionar variedades de alto color en trigo candeal.

Tabla 33. Medias ajustadas (Lsmeans) del modelo considerando a la región alélica *Zds-A1.2* como fuente de variación y al CPC, evaluado en tres ambientes bonaerenses, como variable dependiente.

Alelo	CPC LSMEAN	H0:MediaLS1=MediaLS2
<i>TtZds-A1.1a</i>	4,88	Pr > t
<i>TtZds-A1.1b</i>	5,89	<0,0001

El mismo análisis fue elaborado teniendo como variable dependiente el valor CIE b* (color amarillo) medido con el colorímetro minolta que, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis y a publicaciones previas del grupo de trabajo (Roncallo *et al.* 2012), presenta una correlación alta y significativa con el CPC, del orden del 83%. En la Tabla 34 se muestran los resultados del ANOVA para el modelo GLM realizado con el programa SaS 9.2. Este análisis permitió determinar que la variación en el color amarillo de la sémola integral puede ser explicada por la presencia del alelo *TtZds-A1.1b* de manera altamente significativa. En la Tabla 34 se muestra el análisis de la varianza donde se consideró al valor CIE b* del Minolta determinado en 133 variedades de trigo candeal como variable dependiente y a la presencia o ausencia del alelo *TtZds-A1.1b* como fuente de variación.

Tabla 34. ANOVA utilizando como fuente de variación al CIE b* cuantificado en 133 variedades de trigo candeal creciendo en tres ambientes bonaerenses y a la región alélica *TtZds-A1.1b* y como variable dependiente.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	1	16	16	21,2	<.0001
Error	131	97	0,7399084		
Total corregido	132	113			

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<i>TtZds-A1.1b</i>	1,00	15,69	15,69	21,20	<.0001

Las medias ajustadas para el valor de color amarillo CIE b* determinado en 133 variedades de trigo candeal y teniendo como fuente de variación la ausencia o presencia del alelo *TtZds-A1.1b* determinaron que existe una diferencia significativa entre la media ajustada para CIE b* cuando este alelo se encuentra presente. La media ajustada es 13,57 y 14,93 para las variedades que no portan la inserción CCTA (alelo *TtZds-A1.1a*) y las que la portan (alelo *TtZds-A1.1b*), respectivamente. Las medias ajustadas son estadísticamente diferentes (Tabla 35) al rechazar la hipótesis nula ($H_0: \text{Media}_{LS1} = \text{Media}_{LS2}$).

Tabla 35. Medias ajustadas (Ls-means) del modelo teniendo como fuente de variación la región alélica *TtZds-A1.1b* y como variable dependiente el CIE b* evaluado en tres ambientes bonaerenses.

Alelo	CIE b* LSMEAN	H0:MediaLS1=MediaLS2
<i>TtZds-A1.1a</i>	13,57	Pr > t <.0001
<i>TtZds-A1.1b</i>	14,93	

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 El CPC de la sémola integral está determinado principalmente por factores genéticos pero también se ve afectado por el ambiente.

Se utilizaron dos métodos para cuantificar el pigmento amarillo del endosperma del trigo candeal, el primero basado en la cuantificación espectrofotométrica de pigmentos extraídos en butanol saturado con agua y el segundo en la evaluación colorimétrica usando CIE b*, observándose entre ambos una correlación alta y positiva (0.95 $p < 0.0001$). Esta metodología fue utilizada en estudios anteriores para la determinación del CPC en sémola (Carrera *et al.*, 2007; Digesù *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2011, Schulthess *et al.*, 2013). Esto sugiere que las determinaciones de CPC que consumen mucho tiempo y reactivos podrían ser potencialmente sustituidas por el método más simple y rápido ejecutado con el colorímetro minolta. El método ejecutado mediante espectrofotometría debe considerarse sólo si la cantidad de semillas para el fenotipo es escasa, ya que este método requiere menos cantidad de sémola en comparación con la determinación del valor de CIE b*.

La mayor parte de la variabilidad en el valor del pigmento amarillo del endosperma fue explicada por el factor genotipo, altamente significativo, que varió entre un 60 a 73%, seguido del componente ambiental, significativo, con valores entre el 12 al 16% y, en menor medida pero significativo, el factor de la interacción G×A. La influencia del genotipo en el CPC concuerda con los resultados de estudios realizados en múltiples ambientes (MET) por otros investigadores (Nachit *et al.*, 1995; Taghouti *et al.*, 2010, Roncallo *et al.*, 2012, Schulthes *et al.* 2013) y también está sustentada por los altos valores de heredabilidad obtenidos ($h^2 = 0,84$), que coinciden con los valores de heredabilidad de investigaciones previas (Nachit *et al.*, 1995, Clarke *et al.*, 2006.; Digesù *et al.*, 2009, Roncallo *et al.*, 2012, Schulthess *et al.*, 2013).

En relación al efecto del ambiente de cultivo sobre la variación del CPC, se estimó un valor de CPC medio mayor para la localidad de Cabildo (5,38 ppm), seguida por Barrow (4,85 ppm) y Pieres (4,57 ppm). En la localidad de Cabildo las precipitaciones fueron escasas (638 mm) y la temperatura fue relativamente más elevada en comparación con los ambientes Barrow (679 mm) y Pieres (842 mm). En el año 2011, la región cerealera bonaerense presentó condiciones ambientales particularmente secas entre los meses de julio

a octubre, en comparación con años anteriores. Los meses más secos, septiembre y octubre, presentaron valores muy bajos de precipitación, en comparación con otros años. Sin embargo, las precipitaciones ocurridas en noviembre y diciembre superaron ampliamente al promedio histórico, permitiendo revertir la sequía y el cultivo del trigo candeal logró buenos rendimientos, pesos hectolítricos y pesos de mil granos.

En general, el cultivo presentó condiciones estables en los tres ambientes. La fase vegetativa comenzó con buena humedad acumulada en el perfil del suelo. Los meses de septiembre y octubre presentaron un déficit hídrico acompañado de temperaturas moderadas que favorecieron el crecimiento e hicieron que la situación de sequía no afectara en gran medida al cultivo. Las heladas registradas durante la implantación y estado vegetativo (pasto) del cultivo no tuvieron incidencia sobre el mismo. De la misma manera, las heladas ocurridas durante estadios reproductivos no ocasionaron daños significativos. La espigazón de los cultivares se produjo entre el 24 de octubre y el 8 de noviembre, según los distintos momentos de siembra. Las precipitaciones ocurridas en noviembre, ampliamente superiores a la media histórica, acompañadas de días frescos permitieron la recuperación del cultivo, haciendo que los rendimientos fueran buenos, con una media de 4.735 kg/ha para la localidad de Pieres, 3.495 Kg/ha para la localidad de Barrow y para la localidad de Cabildo un rinde bajo en promedio de 872,8 kg/ha. Estas condiciones también favorecieron el llenado de grano con buenos PH (76 a 81 kg/hl en promedio) y PMG (48 a 55 g en promedio). Se puede concluir que los cultivares fueron beneficiados por las altas precipitaciones que ocurrieron en los meses de noviembre y diciembre, que revirtieron la sequía ocurrida hasta fines de octubre. Para el germoplasma local, las fechas de siembra tempranas permiten al cultivo de trigo candeal llegar a la temporada de primavera con un sistema radical más desarrollado, dando a las plantas la oportunidad de absorber el agua antes de que se evapore del suelo con el aumento de las temperaturas durante las estaciones de primavera y verano.

El ambiente en el que crecen y se cosechan los cultivos afecta en gran medida caracteres como el CPC, con influencia adicional de otros factores, por lo que algunas publicaciones son contradictorias. El estrés ambiental, causado por déficit hídrico o altas temperaturas

durante diferentes etapas del llenado del grano podría afectar la concentración y composición de los pigmentos. Las estaciones frescas con abundantes lluvias tienden a producir una mejor pigmentación de trigo candeal. También se han obtenido contenidos más elevados de pigmentos en cultivos bajo riego que en cultivos sin riego (Güler, 2003). Otros autores encontraron que las condiciones climáticas secas sin riego durante el llenado del grano de trigo candeal presentaron efectos positivos para el CPC (Guler, 2003), hallando una relación positiva entre este carácter y las temperaturas estacionales (Rharrabti *et al.*, 2003b). Clarke *et al.* (2006), observaron que la concentración de pigmentos durante el período de llenado del grano tiene una correlación débil y positiva con las temperaturas medias, y negativa con la precipitación. Las heladas ocurridas antes de la etapa de madurez fisiológica afectan el contenido de pigmentos, probablemente debido a una menor actividad de las enzimas que intervienen en la síntesis de los mismos (Clarke *et al.*, 2006).

En esta tesis se observó un rango amplio de expresión de CPC en la población utilizada para mapeo asociativo. La localidad de Pieres, con abundante precipitación y bajas temperaturas durante la temporada de crecimiento, mostró el menor valor medio de CPC entre los ambientes estudiados y un valor intermedio de PMG. Por lo tanto, no se debería hacer generalizaciones con los efectos del estrés hídrico y condiciones de temperatura para el CPC. En los estudios genéticos, es habitual contar con un amplio rango de variabilidad para cada uno de los caracteres debido a que esta variabilidad puede ser causada por factores genéticos que se relacionan con la presencia de mayor número de alelos.

El medio ambiente podría afectar el CPC directamente por efectos bióticos o abióticos, o indirectamente por los efectos de dilución a través del tamaño del grano (Clarke *et al.*, 2006). Dado que el PMG y el PH son caracteres asociados con la calidad del grano, se analizó la incidencia de estos caracteres sobre el CPC. No se detectaron correlaciones significativas entre el CPC y el PH, posiblemente dado que su relación se ve afectada por el ambiente (Rharrabti *et al.*, 2003b; Clarke *et al.*, 2006) y el germoplasma analizado (Clarke *et al.*, 2006).

En cambio, en los tres ambientes, el PMG y el CPC se correlacionaron débil y negativamente ($r^2 = -0,2$; $p < 0,05$), en coincidencia con estudios previos (Rharrabti *et*

al, 2000; Clarke *et al*, 2006; Virgen *et al*, 2010). En la localidad de Pieres el valor de r^2 fue -0,14 ($p < 0,05$), en Cabildo -0,23 ($p < 0,001$) y en Barrow -0,28 ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la variación en CPC observada en la población de MA puede estar influenciada por diferencias genéticas en la expresión del CPC y también debida a efectos pleiotrópicos con la variabilidad en el tamaño de los granos. Cuando el grano crece se produce un efecto de dilución por el aumento de la proporción de almidón y otros componentes, reduciendo la proporción relativa de CPC (Clarke *et al.*, 2006). Hessler *et al.*, (2002) informaron la presencia de un QTL en algunas poblaciones de mapeo para PMG que se asociaba con la variación en el CPC, probablemente debido al efecto de dilución. Es decir que si bien los ambientes Barrow y Pieres son ambientes con buenos rindes, PMG y PH, Cabildo es el ambiente más propicio para un buen color amarillo de la sémola.

El PMG fue altamente heredable en los análisis para ambientes individuales, con valores que van desde moderados ($h^2 = 78,38\%$ en la localidad de Pieres), altamente heredables ($h^2 = 93,1\%$ en la localidad de Cabildo) y moderadamente heredables ($h^2 = 66,6\%$ en Barrow). Cuando se consideraron todos los ambientes se obtuvieron valores medios a altamente heredables ($h^2 = 76,52\%$). Estos resultados concuerdan con las estimaciones de heredabilidad para PMG de informada por otros autores (Sarna & Nota 1964; Belay *et al.*, 1993; Pozniak *et al.*, 2011).

4.2 CIEL* y PGP se determinan principalmente por el ambiente.

El ambiente juega el papel principal en la expresión de CIEL* y el PGP (Roncallo *et al.*, 2012; Schulthess *et al.* 2013). Sin embargo, otros autores encuentran que el factor genotípico explica la mayor parte de la variación del brillo o color marrón de la sémola (Matsuo *et al.*, 1982). Esta discrepancia podría provenir de aspectos metodológicos en el registro del carácter y/o en el número de ambientes utilizados en la evaluación, que fue menor en el caso de Matsuo *et al.* (1982). En este trabajo de tesis fue posible detectar una elevada influencia del ambiente sobre el carácter CIEL*, que se refleja en los valores de heredabilidad media obtenidos ($h^2 = 0,59-0,73$), en concordancia con los encontrados por Digesù *et al.* (2009) ($h^2 = 0,59-0,79$), Roncallo *et al.* (2012) en Argentina ($h^2 = 0,42-0,89$) y Schulthess *et al* (2013) en Chile ($h^2 = 0,48$).

Los efectos ambientales significativos que afectaron este carácter fueron mayores para el ambiente Cabildo, seguidos por Barrow y Pieres. Teniendo en cuenta el análisis GLM individual para Cabildo se identificó un efecto significativo de la repetición de 15,2% y del 7% para los bloques, totalizando un 22,2%, atribuyéndose el efecto mediante MLM al valor residual. En la localidad de Barrow, el análisis GLM individual identificó un efecto significativo de la repetición de 5,55% y del 7,74% para los bloques totalizando un 13,29%. El análisis individual con MLM mostró efecto de los bloques significativo y el mayor porcentaje se le atribuyó al efecto residual 42,3%. En la localidad de Pieres no se identificaron efectos significativos de la repetición ni de los bloques teniendo en cuenta el análisis GLM. Por otra parte el análisis con MLM mostró un efecto residual significativo del 47,5%, lo que conlleva a inferir que la variación producida por los factores repetición y bloque en los ambientes no son la causa de la variación producida por el componente ambiental. Para deducir cuales son los factores que afectan la variabilidad y significancia estadística que otorga el factor ambiente a este carácter es necesario seguir investigando en más localidades y durante más años.

En relación a las correlaciones de Pearson entre el CIEL* y los demás caracteres se evidenció que el CIEL* correlaciona significativamente con el PMG, PH y PGP ($r^2= 0,24$; $0,36$ y $0,15$, respectivamente) en los tres ambientes. Cuando fue analizado por ambientes, se observó que en Pieres correlacionó negativamente con CIEb* y positivamente con el PMG y el PH ($r^2=-0,17$; $0,26$ y $0,36$, respectivamente). En el ambiente Barrow, el CIEL* correlacionó positivamente con el PMG y el PH ($r^2=0,29$ y $0,25$) y en Cabildo este carácter solo mostró una correlación significativa débil con el PH ($r^2=0,16$). Este carácter no es deseable en los programas de mejoramiento, debido a que está asociado con un menor brillo y/o presencia de color marrón en la sémola, característica no deseada para la elaboración de pasta. En conclusión, el CIEL* indica una correlación significativa del orden del 36% en los tres ambientes con el PH y en dos ambientes con el PMG, caracteres de interés agronómico. Se sugiere que este carácter podría presentar un efecto pleotrópico con el PH y podría esperarse que al incrementar el valor del PH indirectamente también se puede incrementar el valor de CIEL* en alguna proporción.

Al igual que el CIEL*, la mayor parte de la variabilidad en el PGP fue explicado de manera altamente significativa por el factor ambiental, coincidiendo con estudios anteriores en trigo candeal en ambientes mediterráneos (Rharrabti *et al.*, 2001; Mohammadi *et al.*, 2009) y en ambientes argentinos (Roncallo *et al.*, 2012). La fuerte influencia del medio ambiente sobre este carácter también se reflejó en su baja heredabilidad, evaluada para los tres ambientes en conjunto ($h^2 = 3.19$). Este valor incrementó al ser calculado para cada ambiente en particular, con heredabilidades medias ($h^2 = 44$ a 55 ; Tabla suplementaria 2a) y en los valores contrastantes, producidos en parte por las condiciones climáticas (precipitaciones) y el tipo de ambiente. Los ambientes Pieres y Barrow, que están en una zona más cálida y con mayores precipitaciones en relación con el ambiente Cabildo, presentaron los mejores rindes y mayores promedios acumulados de mm de precipitación. En el ambiente Cabildo se detectaron los menores rindes, que pueden estar relacionados con los pocos mm de lluvia durante la etapa de crecimiento. Araus *et al.* (2003), en España con condiciones mediterráneas, determinaron que la disponibilidad de agua del cultivo desde la aparición de la hoja bandera tiene una fuerte y positiva asociación con los valores finales de rendimiento, mientras que altas temperaturas durante el periodo de siembra hasta la floración afectan negativamente el PGP, coincidiendo con la condiciones para Cabildo en la campaña 2011/2012.

El PGP, correlacionó positiva, pero débilmente, en los tres ambientes con los caracteres CPC, CIEb*, PMG y PH. Es importante destacar que aunque el PGP está influenciado principalmente por el factor ambiental, que podría descomponerse en el manejo del cultivo y condiciones edafoclimáticas, también presenta un valor de heredabilidad medio a bajo, por lo que es posible pensar en genotipos con rindes estables si se maneja el cultivo de forma adecuada. El aumento del rendimiento debido al incremento de la biomasa podría tener un efecto positivo que dependerá de las diferentes eficiencias de captura y conversión, donde el número de granos es el componente mejor asociado con el rendimiento. Para este carácter, factores como el índice de cosecha son la principal causa de su incremento, donde a mayor índice de cosecha mayor número de granos y por ende mayor rendimiento.

4.3 Peso hectolítrico, el parámetro que mejor conoce el productor, determinado por un significativo componente genético

El Ph es el parámetro que mejor conoce el productor, dado que resume en un valor qué tan sano es el grano. Es importante porque cuanto más sano sea (menor cantidad de impurezas, granos dañados o quebrados, chuzos, picados, fusariosis o con presencia de cualquier enfermedad), mayor es la proporción de almidón en el grano y mejor será la separación del endosperma del resto del grano. Por lo tanto, cuanto más sano, mayor extracción de sémola o harina. A su vez, es una medida de la homogeneidad de la partida de trigo, factor clave en el proceso industrial. Por consiguiente, el peso hectolítrico es una estimación tanto de la calidad física del grano, como de la calidad molinera. Un bajo Ph surge por problemas durante la temporada de crecimiento o cosecha.

Como se mencionó anteriormente, el Ph puede verse afectado por factores ambientales como enfermedades, plagas y hongos (Roth *et al.* 1984; Blum *et al.* 1991; Saadalla *et al.* 1990). Sin embargo, los valores altos de heredabilidad ($h^2= 85.54$) confirman la importancia del control genético de este carácter. Otros autores informaron también valores altos de heredabilidad (Teich 1984; Roth *et al.* 1984; Blum *et al.* 1991; Jalaluddin *et al.* 1989; Saadalla *et al.* 1990; Nachit *et al.* 1995a). Sin embargo, Ghaderi & Everson (1971) y Schuler *et al.* (1994) informan valores bajos de heredabilidad. Estas discrepancias pueden darse como consecuencia de las variedades analizadas, el número de ambientes y los años evaluados.

Para incluir este carácter en los programas de mejoramiento, es importante encontrar factores simples que se correlacionen con el Ph y se puedan utilizar en las primeras generaciones de mejoramiento. Algunos investigadores dividen los componentes del Ph en tamaño y forma del grano (anchura y espesor) y el peso del grano (Yamazaki y Briggie 1969, Ghaderi y Everson 1971, Schuler *et al.* 1994). Trocoli y DiFonzo (1999) sugieren que las características de la espiga pueden utilizarse para seleccionar indirectamente el Ph, especialmente por la forma de los granos. Otros grupos consideran que la combinación de buenos Ph con elevados valores de vitreosidad es adecuada para inferir valores altos de extracción de sémola (pers Nachit. com.). De hecho, ha sido informado que el Ph está altamente relacionado con el rendimiento de sémola y harina (Marshall *et al.*, 1986).

4.4 CIE a*, un carácter poco estudiado y con alto efecto genético

El valor positivo proporcionado por CIEa* describe el color rojo presente en la sémola y está determinado principalmente por el genotipo, con un aporte del 53,9% según los valores obtenidos en el análisis de la varianza. En los tres ambientes evaluados se encontraron valores de heredabilidad altos ($h^2= 86\%$), que concuerda con los resultados obtenidos por Roncallo *et al.*, (2012). CIE a* correlacionó negativa y significativamente con los componentes del color (CPC y CIE b*) y con los caracteres relacionado con calidad y rendimiento PH y PGP. Esta correlación negativa entre los parámetros de calidad y rendimiento sugiere que los efectos ambientales sobre la forma y tamaño de los granos podrían estar afectando la composición del grano, e indirectamente, la expresión de color (L^* , a^* y b^*) y el contenido de pigmentos carotenoides, según lo informado por Hessler *et al.*, (2002).

4.5 Variabilidad genética obtenida a partir de marcadores AFLPs

Con el fin de avanzar en la comprensión de la base genética de caracteres de calidad y rendimiento de trigo candeal se abordó un enfoque de mapeo por asociación que, si bien debería completarse utilizando otros marcadores, permitió realizar un avance hacia el conocimiento de la estructura de la población y la asociación de marcadores AFLP anónimos con estos caracteres.

Los marcadores AFLP son locus específico a nivel de especie (Roupe *et al.*, 1997) y se corresponden a posiciones únicas en los genomas (Vos *et al.*, 1995). Proveen muchas ventajas al ser marcadores neutrales, que no están sujetos a presión de selección, proporcionan información de todo el genoma del cultivo estudiado y no requieren información preliminar del genoma a caracterizar, por lo que se puede aplicar a cualquier especie. Además, utilizan moderadas cantidades de ADN y producen un gran número de bandas polimórficas, de manera altamente reproducibles y con un buen nivel de resolución, tanto en electroforesis como con métodos automatizados. Una vez estandarizados, pueden ser generados a gran velocidad y pueden ser usados para análisis genéticos de poblaciones, análisis de genética cuantitativa y filogenéticos.

Este estudio se realizó sobre 133 genotipos sembrados en tres ambientes de la principal región candealera de Argentina, el sudeste de la Pcia. de Buenos Aires durante la campaña 2011/2012. La mayoría de los genotipos utilizados en este análisis son cultivares tradicionales, modernos y líneas avanzadas provenientes de diferentes regiones geográficas donde se cultiva tradicionalmente este cereal. Cabe destacar que este estudio incluyó materiales argentinos, tradicionales y modernos, muchos de los cuales se encuentran actualmente en uso.

A modo exploratorio se utilizaron diferentes combinaciones de cebadores de AFLP, que resultaron en la amplificación de 402 bandas, de las cuales 116 resultaron polimórficas. Esto confirma la eficacia de estos marcadores para detectar polimorfismos en simultáneo para un gran número de loci en todo el genoma en unos pocos geles (Vos *et al.* 1995).

Si bien los marcadores AFLP utilizados en esta tesis son anónimos, su uso permitió calcular el nivel de polimorfismo presente en la población, que fue en promedio de 35,8% para todos los genotipos y todas las combinaciones de cebadores. En trigo candeal, otros autores hallaron 34,3%, 26,5% y 14,7% loci polimórficos utilizando 3, 11 y 14 combinaciones de cebadores, respectivamente (Sciacca *et al.*, 2010; Shoaib, 2005; Martos *et al.*, 2005). En trigo pan, utilizando 19 genotipos y seis combinaciones de cebadores, los valores de polimorfismo alcanzaron un porcentaje de 91,2% al encontrar 262 bandas polimórficas de un total de 239 bandas (Vieira *et al.*, 2007). Almanzá-Pizon *et al.* (2003) reportaron un nivel de polimorfismo de 59% y un valor similar de 47% fue reportado por Roy *et al.* (2004). En conjunto, estos resultados indican que los marcadores AFLP son eficientes en la detección de la variabilidad genética en el trigo.

Teniendo en cuenta que el trigo candeal es un cultivo que ha estado sometido a diversas fuerzas de selección y procesos de mejoramiento, que se traducen en una disminución de la variabilidad genética (Incirli y Akkaya, 2001), es posible contemplar un nivel de polimorfismo como el encontrado en esta colección de germoplasma. Sin embargo, es aún posible encontrar nuevos alelos que podrían aportar variabilidad genética para distintos caracteres de interés. Los resultados obtenidos a partir de los atributos analizados para las combinaciones de cebadores tales como el índice de contenido polimórfico (PIC) y el

índice del marcador (MI), han sido utilizados en varios estudios para evaluar el poder discriminante de los marcadores AFLP en el análisis de la variabilidad genética (Powell *et al* 1996; Bohn *et al* 1999; Muminovic *et al* 2004; Leela Tatikonda *et al.* 2009).

Los marcadores AFLP tuvieron alto poder de discriminación. En el presente estudio, los valores de PIC oscilaron entre 0,19 y 0,38, con una media de 0,29. Este está en el rango de los obtenidos en investigaciones previas en trigo candeal, donde se obtuvieron valores de PIC de 0,39 para 41 cultivares comerciales, tradicionales y modernos (Medini *et al.*, 2005), 0,24 para 63 variedades locales con 225 bandas polimórficas (Moragues *et al.*, 2007) y 0,34 utilizando 24 cultivares y 186 bandas polimórficas (Martos *et al.*, 2005). Los valores de PIC obtenidos han sido influenciados por dos aspectos: i) el análisis conjunto del polimorfismo de una población en el que se incluyen tanto poblaciones modernas – tradicionales como de mejoramiento: es de esperar que las poblaciones de mejoramiento presenten una reducción de la variabilidad, o cuello de botella, debido a un proceso de selección artificial; y, ii) el hecho de que este estudio incluye exclusivamente 6 combinaciones de AFLP: comparado con los similares resultados de estudios donde se incluye mayor cantidad de marcadores genotípicos (Ghislain *et al.*, 2009), como por ejemplo marcadores codominantes y de última tecnología, se concluye que, utilizando mayor cantidad de marcadores el factor resolutivo de PIC puede incrementar, permitiendo encontrar un mayor número de formas alélicas. Por ejemplo, utilizando SNPs a gran escala.

Otro de los parámetros evaluados fue el índice del marcador. Los valores de este índice variaron entre 1,9 y 10,6, con un promedio de 5,77 entre las combinaciones de AFLP. Martos *et al* (2005) en trigo candeal con resultados similares determinaron el valor de MI en 4,43. El parámetro MI en este estudio exhibió una correlación positiva con PIC de 0,69 ($r^2=0,69$, $p<0,005$). Prevost & Wilkinson (1999) informaron que esta correlación positiva entre los valores de PIC/MI es útil si se quiere seleccionar combinaciones de cebadores con poder discriminante, los cuales pueden ser utilizados en estudios de diversidad genética o como posibles marcadores SCAR como los desarrollados por Jae-Han *et al.*, (2014). Estos índices han sido ampliamente utilizados en estudios de variabilidad en diferentes especies vegetales y en conjunto son una herramienta útil para diferenciar

cultivares o realizar estudios evolutivos, filogenéticos o de variabilidad (Gupta *et al.*, 2013; Laurentin and Karlovsky, 2007; Pecina-Quintero *et al.*, 2013; Sehgal *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2011; Stodart *et al.*, 2005).

Las combinaciones de cebadores que produzcan un único fragmento en un cultivar específico pueden ser usadas para desarrollar marcadores (STS) que permiten identificar cultivares individuales (Fernández *et al.*, 2002). Los fragmentos compartidos y similares pueden ser valiosos en estudios evolutivos porque dan información acerca de alelos simplesiomorficos ancestrales. En ese contexto, la combinación de cebadores que identificó bandas únicas para discriminar entre las poblaciones argentinas e italianas fue P41M39.

Las combinaciones que resultaron ser más informativas para diferenciar genotipos de trigo candeal fueron P41M31, P41M39 y P40M43. Las 116 bandas polimórficas y los relativos buenos valores de los atributos de los marcadores estudiados en el presente estudio sugieren que los AFLP son marcadores que permiten discriminar, clasificar y hacer análisis de variabilidad genética en trigo candeal. Cabe destacar que pueden ser una herramienta potencial para el genotipado de un gran número de muestras de colecciones de germoplasma y, como consecuencia, son una herramienta productiva para realizar mapeo por asociación. Una desventaja de este tipo de marcador es que son anónimos y de posición desconocida en el genoma del trigo candeal. Sin embargo, esta tesis propone ubicar en el mapa de secuencia aquellas combinaciones de AFLP que detecten una asociación significativa entre el marcador y alguno de los caracteres evaluados. Actualmente se encuentran disponibles las secuencias de los cromosomas de trigo pan (IWGSC) y de trigo candeal (CREA, Italia, grupo del Dr. Luigi Cattivelli, con quien nuestro grupo tiene colaboración). Sería entonces una buena estrategia extraer las bandas de los geles, secuenciarlas y realizar un análisis de Blast con los mencionados genomas.

Los resultados relacionados con el número de alelos y su frecuencia, obtenidos con el uso de combinaciones de AFLPs dentro de la población de candeal estudiados, indican un número promedio de 1,7 alelos por locus. El número de alelos efectivos en promedio fue de 1,5. El índice de diversidad de Shannon arrojó un valor bajo, de 0,4 y la heterocigosidad promedio fue de 0,28. Es decir que fue baja, pero se mantiene dentro de los parámetros

esperables, teniendo en cuenta que es una especie homogenizada y con fuerte presión de selección sobre caracteres de rendimiento y calidad. Sin embargo, el trigo candeal porta variabilidad dentro de su genoma (Maccaferri *et al*, 2014).

Teniendo en cuenta los patrones totales de bandas por poblaciones, incluyendo el set de bandas polimórficas, la heterocigosidad media esperada para cada población varió en un rango de 0,199 a 0,340. Con respecto a la identidad y distancia genética de Nei para cada población, el patrón entre las poblaciones fue consistente, siendo las poblaciones de Argentina e Italia las más parecidas entre sí. Esto se debe fundamentalmente a que los materiales argentinos derivan de los italianos. A partir de los años '90, empresas e investigadores argentinos se reunieron con el fin de promover el cultivo (Seghezzi y Molfese, 2001), permitiendo que se produjera el desarrollo de variedades que principalmente fueron obtenidas por cruzamientos con variedades Italianas y del CIMMYT. Es por esto que las variedades argentinas modernas derivan de las italianas modernas y de las del CIMMYT. Así mismo, estos valores de identidad y heterocigosidad se deben a que este germoplasma contiene dentro de sí un 31,3% de accesiones argentinas, un 25,4% de accesiones italianas, 14,4% de accesiones provenientes del CIMMYT, 14,4% de accesiones provenientes de Francia, 11,8% de accesiones provenientes de WANA y 2,5% de accesiones de EE.UU.

Soleimani *et al.* (2002) en su investigación de diversidad genética con variedades modernas de trigo candeal, realizada con marcadores AFLP, concluyeron que la variación genética dentro de los cultivares modernos es alta a pesar de la fuerte presión de selección y deriva genética debida al trabajo de los programas de mejoramiento, concluyendo que las estimaciones de diversidad genética realizadas con AFLPs pueden proporcionar información valiosa para los fitomejoradores (Shoaib y Arabi, 2006).

4.6 Relaciones genéticas y estructura poblacional

El objetivo de esta investigación fue realizar un estudio preliminar de MA utilizando una colección global de cultivares y líneas avanzadas de distintos programas de mejoramiento de trigo candeal que son utilizadas en estudios de mejoramiento genético y cultivadas por

productores de la región bonaerense. En esta tesis se utilizó el enfoque de exploración genómica (genome-wide association study, GWAS) que permite el uso de una colección genotípicamente diversa, como la utilizada en este trabajo. La identificación de asociaciones marcador-carácter proporciona información sobre la ubicación de las regiones genómicas asociadas con el control genético de los caracteres de interés. Este enfoque permitió comprender y utilizar los valores genéticos calculados y analizados de cada uno de los genotipos de esta tesis. Considerando la homogeneidad de la población que fue del 64,2%, se consideró que la cobertura de los marcadores fue adecuada para alcanzar el objetivo de mapeo asociativo. También fue adecuado que el número de accesiones incluidas para el análisis de MA, debido a que con un número elevado de variedades aumenta el número de alelos y reduce el DL entre loci no ligados e incrementa el poder resolutivo para detectar QTLs (Thornsberry *et al.* 2001; Gaut y Long 2003; Hamblin *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2004).

De manera que, con los genotipos y marcadores utilizados, fue posible estructurar la población. Tanto el análisis de estructura como de agrupamientos del germoplasma dividieron a la población en seis grupos. Los grupos generados por el programa Structure siguieron el mismo patrón de agrupamiento que obtenido utilizando el algoritmo UPGMA. La estructura dentro del germoplasma se debe posiblemente a que los materiales argentinos tradicionales provienen de cruzamientos con materiales italianos tradicionales, mientras que los genotipos argentinos modernos se generaron en los últimos 25 años, principalmente, de materiales italianos modernos y del CIMMYT.

Para los estudios de MA, las estimaciones de estructura poblacional basadas en modelos probabilísticos se han sugerido como más informativas en comparación con los modelos tradicionales, basados en distancia genética (Pritchard *et al.*, 2000). En este estudio, la comparación de los resultados analizados con los dos métodos resultó en patrones similares que, en general, formaron grupos por origen geográfico y por genealogías. Sin embargo, se observaron algunas diferencias menores entre las estimaciones obtenidas a partir de la distancia genética binaria con respecto a los modelos bayesianos, que pueden ser, en parte,

debidas al sesgo en la selección de los marcadores con los que se realizó el análisis de estructura.

Recurriendo al dendrograma por relación de pedigree y el análisis bayesiano se encontró un agrupamiento claro de los materiales argentinos e italianos modernos y por otra parte los materiales tradicionales. Aunque ocho variedades (Marrou, Dupri, OmRabi6, Karur, CBW0112, Ítalo, GAB125, CBW0002, Ardente, VF003, VF0167) fueron asignadas a más de un grupo con el análisis bayesiano, este resultado es esperable, dado que los materiales utilizados representan cultivares elite de programas de mejoramiento de distintos orígenes. Cabe destacar que, aunque actualmente la tecnología ha proporcionado nuevas técnicas como los SNP, las seis combinaciones de AFLP utilizadas en esta tesis generaron 116 marcadores polimórficos y fueron consistentes agrupando los genotipos de forma similar con los resultados obtenidos en el análisis probabilístico bayesiano y por genealogía.

4.7 Asignación poblacional

La asignación de individuos a una población K específica, realizada utilizando el programa Structure, con el modelo “*admixture*”, infiere que cada individuo posee alguna fracción de su genoma en cada una de las K poblaciones, es decir que los genotipos pudieran haber estado mezclados ancestralmente por lo que cada individuo ha heredado alguna fracción del genoma de sus ancestros.

Este análisis mostró un aumento continuo de la bondad de ajuste para el estadístico $\ln [P(D)]$, en comparación con el número de poblaciones K , es decir que, aunque hubo convergencia entre el número de iteraciones y el número posibles de K , no se logró establecer el número de poblaciones K después de la asignación probabilística. Por lo tanto, para determinar el K óptimo que representa la estructura poblacional de los genotipos de trigo tetraploide se utilizó la metodología ΔK (delta K) de Evanno *et al.*, (2005) que permite un mejor ajuste para el valor K . Este test permitió determinar que ΔK presenta un punto de inflexión (máxima verosimilitud) en $K = 6$. Es decir, que existen seis subgrupos poblacionales. Es de esperar que exista una marcada estructura entre los genotipos provenientes de cruzamientos en poblaciones de mejoramiento. En este caso, la estructura

que presenta la población de 118 genotipos indica una diferenciación debido a que se incluyen líneas y variedades de mejoramiento argentinas y de diferentes orígenes geográficos. A la fecha los estudios de estructura poblacional en trigo han identificado subgrupos dentro de sus poblaciones de estudio (Macaferri *et al.*, 2005, Somers *et al.* 2007, Reimer *et al.* 2008, Macaferri *et al.* 2010, Macaferri *et al.* 2011, Pozniak *et al.* 2012, Vanzetti *et al.* 2013, Macaferri *et al.* 2014), proponiendo el uso de estas poblaciones para metodologías de mejoramiento como el mapeo por asociación. Sin embargo, estas investigaciones fueron realizadas con marcadores codominantes, y colecciones de germoplasma diferentes por lo que el uso de este tipo de marcador AFLP dominante en el germoplasma analizado en esta tesis, quizá podría generar un número diferente de grupos a los obtenidos en otras investigaciones.

4.8 Desequilibrio de ligamiento.

El DL se refiere a asociaciones no aleatorias entre los alelos de distintos loci y constituye la base conceptual de cualquier estudio de mapeo por asociación. La distancia sobre la cual el DL persiste va a determinar el número y la densidad de marcadores, así como el diseño experimental que se ajuste mejor para el mapeo por asociación. Debido a ello, es importante conocer en primera instancia el DL y determinar el alcance del mismo en el trigo candeal.

Las dos medidas comúnmente usadas para cuantificar DL son el coeficiente de desequilibrio estandarizado (D') (Lewontin 1964) y la correlación de frecuencias alélicas al cuadrado (r^2) (Hill y Weir 1994), siendo esta última la más empleada por presentar menor varianza en muestras pequeñas. Se considera un bloque en DL cuando todos los pares de loci adyacentes presentan un $r^2 > 0,3$ (Stich *et al.*, 2005). Además de los valores de polimorfismo y de variabilidad alélica los resultados indicaron que los 116 marcadores polimórficos AFLP detectaron siete pares de loci en DL entre 6612 comparaciones.

Considerando el objetivo de mapeo asociativo, la manera más apropiada de cuantificar el DL fue calculando el valor de r^2 , que también es un indicador de la correlación entre el marcador y el carácter (Gupta *et al.* 2005, Oraguzie *et al.* 2006, Abdallah, *et al.* 2003). El valor de r^2 varía entre 0 y 1 y es igual a 1 cuando solo dos haplotipos están presentes. r^2 es

afectado por la tasa de mutación y recombinación, mientras que D es afectado por el historial de mutaciones (Flint-García *et al* 2003, Gupta *et al* 2005, Oraguzie, *et al* 2006, Gaut *et al* 2003). La mutación y la recombinación son los fenómenos que tienen mayor impacto. La mutación genera el material de partida para la creación de sitios polimórficos que estarán en DL. En cambio, la recombinación es el principal factor que provoca una disminución del DL intra-cromosómico, y la segregación independiente disminuye el DL inter-cromosómico (Flint-García *et al.*, 2003). El sistema de apareamiento también determina los niveles de DL, por ejemplo, en especies de reproducción autógama o de autopolinización el DL tiende a ser mayor que en especies de polinización cruzada (Flint-García *et al.*, 2003).

La representación gráfica del DL de a pares entre dos loci fue muy útil para estimar los patrones de DL a partir de las combinaciones de AFLP. El DL se representó de a pares en una parcela triangular con un código de color basado en el nivel de significancia de DL entre los pares de locus (r^2 , o el valor de D y el valor-p,) esto permitió visualizar el bloque de loci (bloque rojo) en DL significativo. Los bloques rojos de haplotipos cerca de la diagonal del triángulo indican la presencia de un alto nivel de DL entre los loci que generan estos bloques. Esto significa que ha habido un limitado o ningún patrón de recombinación desde la formación del bloque en DL. Es decir, estos pares de loci segregan y si están vinculados a algún carácter la asociación entre este par de loci y el carácter será fácilmente detectable con un buen fenotipado.

Los bloques en DL son de gran interés en el mapeo asociativo debido a que simplifican los esfuerzos de mapeo de caracteres complejos (Zhang, *et al* 2002) y permiten determinar el número de marcadores que se deberían utilizar para cubrir de manera eficiente el genoma. Es decir, a mayor número de bloques en DL, menor será el número de marcadores moleculares necesarios para encontrar asociaciones marcador – carácter.

Para estimar el tamaño de los bloques en DL, el valor de r^2 es usualmente graficado en relación a la distancia genética (cM), de esta forma es posible calcular e inferir cuan rápido decae el DL. La rápida caída del DL en relación a la distancia genética indica que la magnitud de DL se conserva con el ligamiento y es proporcional a la recombinación (Stich, *et al.*, 2005, Gupta, *et al.*, 2005). En trigo tetraploide se ha informado que el DL decae

aproximadamente entre 2 -3 cM ($r^2 < 0,2$) (Somers *et al.*, 2007) y 20 cM aproximadamente ($r^2 < 0,2$, Maccaferri *et al.* 2005, 2015). Este valor es fluctuante a través del genoma y los factores que lo incrementan pueden ser la generación de mutaciones, el sistema de polinización, aislamiento genético, la estructura poblacional, el efecto fundador, la mezcla génica, la presión de selección y los rearrreglos genómicos (Gupta *et al.*, 2005, Oraguzie *et al.*, 2007). La disminución del DL generalmente se debe a elevadas tasas de recombinación, mutación, fecundación cruzada y conversión génica (Flint-Garcia *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005, Oraguzie *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta que el trigo candeal ha sido objeto de fuertes presiones de selección a lo largo de su historia, se ha demostrado que el germoplasma elite posee un alto nivel de DL (Maccaferri *et al.*, 2010; 2014, 2015), que podría ser explotado de forma beneficiosa en estudios de asociación.

Si bien se observó DL significativo entre algunos marcadores dentro de la población de MA y, a la vez, es posible que los mismos estén asociados con caracteres de calidad y rendimiento, estos AFLP son anónimos y no fue posible estimar la distancia genética entre los bloques en DL ni conocer la ubicación de los marcadores y caracteres con asociaciones significativas. Es posible que la presencia de DL entre los marcadores AFLP y el carácter pueda estar dada por factores como deriva génica reciente.

Estos AFLP podrían ser empleados dentro de un programa de selección asistida por marcadores en trigo candeal, donde primero sería necesario validar su funcionalidad partiendo por ejemplo de: i) el análisis del patrón de bandeo o de la secuencia que amplifican, en cuanto a su grado de asociación con los caracteres de interés evaluados en esta tesis; y, ii) un análisis más detallado de su ubicación genética y física dentro del genoma.

Como se mencionó, 42 locus estuvieron en DL, dentro de esos, tres locus presentaron valores de $r^2 > 0,684$ y los restantes 39 valores de $r^2 > 0,138$ a 0,321, con un promedio de $r^2 = 0,237$. Esto sugiere que las combinaciones de AFLP analizadas detectaron DL en la población, donde se visualizó la conformación de seis bloques en DL con ubicación desconocida. Estos resultados concuerdan con los informados por Maccaferri *et al.*, (2010;

2014) y Laidò *et al.* (2014), quienes realizaron estudios de mapeo por asociación en trigo candeal con valores similares de DL.

En este trabajo, los resultados obtenidos sobre DL deben considerarse como un resultado positivo, dado que los AFLP son dominantes en comparación con los multialélicos SSR, los AFLP únicamente distinguen dos alelos, disminuyendo su capacidad informativa. Sin embargo, los AFLP mostraron ser una herramienta valiosa para este tipo de estudios porque permitieron obtener mucha información en poco tiempo y en forma económica. El registro de marcadores mapeados en un germoplasma o colección de accesiones, permite un análisis mucho más detallado del DL a nivel genómico, cromosómico e inclusive dentro de regiones candidatas. En relación al uso de AFLP y su aplicación en DL y mapeo QTL, se considera que los mismos ofrecen una buena cobertura del genoma y con frecuencia se agrupan en torno a las regiones centroméricas (Alonso-Blanco *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 2001).

4.9 Caracteres de calidad y rendimiento asociados con marcadores AFLP

El mapeo por asociación enriquece el repertorio de herramientas disponibles para la disección de caracteres complejos, aplicable tanto en especies modelo como en cultivos de importancia económica (Rafalski, 2010). Este enfoque comenzó a desarrollarse en especies vegetales a comienzos del Siglo XXI, debido al salto tecnológico producido en la biología molecular en términos de información genómica disponible en bases de datos y de técnicas de genotipado de alto rendimiento (high-throughput).

La variación fenotípica de muchos de los caracteres de importancia agronómica o evolutiva está determinada por múltiples QTL, la interacción entre éstos, el ambiente y las interacciones QTL-ambiente. Los análisis de ligamiento en familias o poblaciones biparentales y, más recientemente, los análisis de asociación son las dos estrategias más utilizadas a la hora de disectar caracteres de base genética compleja. Ambos análisis se basan en la coheredabilidad de los polimorfismos funcionales o variantes alélicas. La diferencia es que en los análisis de ligamiento tradicionales, son pocos los eventos de recombinación que llegan a producirse, por ejemplo, en los descendientes de un cruzamiento biparental, resultando en un mapeo de baja resolución.

En el mapeo por asociación, en cambio, la recombinación y la diversidad genética natural se analizan para lograr mapeo de alta resolución (Zhu *et al.*, 2008). Es decir, tiene el potencial de alcanzar resolución a nivel de genes individuales, dado que hace uso de los numerosos eventos de recombinación ocurridos dentro de las poblaciones a lo largo de su historia, permitiendo así detectar aquellas formas alélicas involucradas en la variación de un determinado carácter fenotípico (Nordborg y Tavaré 2002). En el caso de las plantas, las poblaciones analizadas pueden ser verdaderas poblaciones naturales, colecciones de germoplasma, líneas o variedades elite de un programa de mejoramiento (Brescghello y Sorrells 2006a).

Este trabajo de tesis se propuso demostrar la aplicabilidad de estudios de genética de asociación en trigo candeal, como enfoque alternativo al tradicional mapeo de QTL en poblaciones biparentales y como herramienta para dilucidar los componentes genéticos involucrados en caracteres agronómicos complejos, como el contenido de pigmentos carotenoides, los componentes del color, peso de mil granos, peso hectolítrico y rendimiento.

El CPC, los componentes del color (CIE b*, CIEL* y CIEa*), el PMG y el PH son caracteres que involucran herencia pleiotrópica, con numerosos genes interactuando y produciendo diferentes efectos sobre la expresión del fenotipo (Clarke *et al.* 2006). El análisis de ligamiento en poblaciones biparentales ha sido la herramienta más utilizada para la identificación de genes que incrementan estos caracteres (Elouafi y Nachit, 2004, Mares y Campbell, 2001, Schmidt *et al.* 2004, Roncallo *et al.*, 2012; Akkiraju *et al.*, 2010). A pesar de su amplia utilización, este tipo de análisis presenta algunas desventajas en comparación con el mapeo asociativo. Por ejemplo, la cantidad de variación genética segregante es limitada en las poblaciones biparentales, debido a que sólo dos alelos pueden ser evaluados a la vez para un marcador dado. Adicionalmente, si no existe polimorfismo entre los parentales seleccionados para el cruzamiento respecto al marcador ligado al carácter, el QTL nunca podrá ser identificado. El mapeo por asociación, en cambio, al utilizar poblaciones naturales o colecciones de individuos disponibles en los bancos de germoplasma, permite explotar la mayor diversidad alélica presente en ellos y evita el gran

insumo de tiempo que conlleva la creación de poblaciones RILs creadas a partir del cruzamiento de parentales de pedigree conocido.

Debido a la ubicuidad de los AFLPs y a su fácil adaptación a técnicas de genotipado a gran escala, éstos marcadores se seleccionaron, para los estudios preliminares de asociación. Por ello, en este trabajo de tesis se caracterizaron las variaciones fenotípicas sobre 118 genotipos y un conjunto de 116 regiones genómicas (AFLP anónimos) de trigo candeal algunos de ellos representativos de los materiales de mejoramiento del cultivo en Argentina. Esta parte del trabajo permitió, estimar la variabilidad, el polimorfismo nucleotídico y evaluar el alcance del DL en el trigo candeal cultivado.

El análisis de mapeo asociativo ejecutado en el programa Tassel 2.0.1 (www.maizegenetics.net), permitió identificar asociaciones significativas entre los marcadores y los caracteres cuantitativos evaluados, que fueron testeadas utilizando el modelo lineal mixto (MLM), conteniendo una matriz de coancestría (K), elaborada con datos de pedigree, y una matriz de estructura poblacional (Q), elaborada a partir de datos genotípicos. Se consideró una asociación marcador-carácter significativa aplicando una $FDR < 0.05$. Las asociaciones descritas a continuación fueron las que mostraron la mayor explicación de la variabilidad fenotípica de los caracteres y también las que produjeron algún efecto sobre el carácter evaluado.

El marcador P40M38_1230 se encontró asociado con el color rojo de la sémola integral en los ambientes Barrow y Pieres con una significancia de 0,0294 p-permutaciones, el porcentaje de explicación de la variación fenotípica debida a este marcador fue del orden del 5%. En la localidad de Pieres el marcador P40M38_1360 se encontró asociado con el CPC de la sémola integral, el componente del color relacionado con el brillo de la sémola integral CIE L* se asoció con el marcador P40M38_1070 en la localidad de Barrow. El marcador P40M38_980 se encontró asociado con el PH en la localidad de Cabildo. El porcentaje de explicación de la variación fenotípica debida a estos marcadores fue del orden del 5%, en todas las asociaciones. Teniendo en cuenta el patrón de bandeo y la presencia de este marcador en al menos dos ambientes, el carácter que más se asoció con este marcador fue el **color rojo de la sémola integral**, con un efecto negativo que varió de

-0,3 (para la ausencia del alelo) a -0,20 (para la presencia). Roncallo *et al.*, (2012) identificaron QTLs con efectos pleiotrópicos afectando el componente del color CIEa* localizados en los cromosomas 7B, 1AL, y 1BL explicando el 12,5, 11,3 y 20,2% de la variación fenotípica total en trigo candeal.

El marcador P41M31_767 mostró asociación con los caracteres CIE b* en Pieres y Cabildo, y con el CPC en las tres localidades, estas asociaciones explicaron del 5 al 6% de la variación total del fenotipo. Para el PH, con una significancia de 0,013 p-permutaciones, el marcador (P41M31_1172 en Barrow, P41M31_808 en Pieres, P41M31_912 en Cabildo) explicó el 5% de la variación en cada una de las localidades. El PMG con un valor de p-permutaciones de 0,03, explicando un 3% de la variación fenotípica total para el carácter mostró asociación en las localidades de Barrow y Cabildo con el marcador P41M31_1172. El PGP, explicó el 5% de la variación del rendimiento de las variedades en las localidades de Cabildo (P41M31_1172) y en Barrow (P41M31_912). **Este marcador se vio asociado al peso, tamaño / forma (PH) y al rendimiento de los granos.**

En general, existe una correlación negativa entre el peso hectolítrico (PH) y el peso de mil granos (PMG) con la concentración de pigmentos (Whiteside *et al.*, 1934; Markley, 1937; Worzella, 1942; Alvarez *et al.*, 1999), probablemente, debido a un efecto de dilución por el incremento de otros constituyentes del grano, como el almidón (Clarke *et al.*, 2006). De hecho, la reducción en la concentración de pigmentos ha sido asociada a un locus ubicado en el cromosoma 5A, que está relacionado con el tamaño de los granos. Sin embargo, la pequeña correlación negativa de este estudio indica que otros factores, además del PH y PMG, también afectarían la concentración de pigmentos (Hessler *et al.*, 2002). Ambientes altamente productivos incrementan el tamaño de los granos, lo cual afectaría indirectamente el contenido de carotenoides. La correlación entre localidades dentro del mismo año o en las mismas localidades pero en diferentes años, ha demostrado que el ambiente afecta diferencialmente la concentración de pigmentos (Clarke *et al.*, 2006).

El marcador P41M39_715 se encontró asociado al carácter PMG en las tres localidades, la correlación entre el marcador y el peso del grano fue del orden del 13%. Con una significancia estadística de 0,00097 p-permutaciones. El marcador P41M39_747 con una

significancia de 0,019 p-permutaciones correlación con el carácter CIEa* esta asociación explicó el 6% de la variación fenotípica para el carácter color rojo de la sémola en las tres localidades. El marcador P41M39_465 se encontró asociado significativamente con el color amarillo de la sémola integral con una significancia de 0,018 p-permutaciones y explicando el 6% de la variación fenotípica en Pieres y Barrow. Así mismo en Barrow y Pieres para el PH el marcador P41M39_540 y P41M39_435 respectivamente explicaron el 7% de la variación fenotípica con una significancia de 0,01 p-permutaciones.

El marcador P41M45, se encontró asociado significativamente con el brillo o color marrón de la sémola de los granos de trigo candeal en el ambiente Cabildo. Esta asociación explicó el 11% de la variación fenotípica para el carácter.

El marcador P41M43_367, mostró asociaciones significativas con el **color amarillo de la sémola de los granos de trigo candeal en los tres ambientes**. Con una explicación de variación fenotípica del 8%. A partir de este análisis se infiere que varias combinaciones detectaron, en diferente magnitud, asociaciones con el color amarillo de la sémola, lo cual indica que este carácter tiene patrones de herencia que involucran varios genes/QTL. Esto también fue informado por otros autores (Pozniak *et al* 2007; Reimer *et al.* 2008, He *et al.* 2008; Patil *et al.* 2008; Howitt *et al.* 2009; Blanco *et al.* 2011, Singh *et al.* 2009). Teniendo en cuenta la alta correlación entre el CPC y el CIE b* descrita anteriormente, es posible indicar que las asociaciones identificadas con este marcador son un resultado positivo. Para validarlo es necesario desarrollar una metodología que permita identificar la posición del marcador y generar un marcador SCAR que podría ser utilizado en mejoramiento a fin de aumentar el color amarillo y la proporción de precursores de vitamina B. Finalmente, el marcador P41M43_390 se encontró asociado significativamente con el rendimiento, explicando un 9% de la variación fenotípica y con una significancia de 0.005 p-permutaciones.

Como conclusión podemos mencionar que los marcadores que explicaron mayores porcentajes de la variación en un carácter fueron: P41M39_715, para el peso de los granos; P41M39_747, asociado con el componente del color CIE a*; P41M43_390, asociado con el rendimiento; P41M31_767, relacionado con el contenido de pigmentos carotenoides y el

componente de color CIE b* y P41M43_367, asociado con CIE b*. En relación a CIE L* el marcador P41M45_698 mostró una asociación significativa en la localidad de Cabildo, para el PH se encontró una asociación con el P41M31_1172 y P41M39_569 mostró asociación fuerte con los caracteres relacionados con el color amarillo en las localidades de Pieres y Barrow. Sería interesante conocer la posición en el genoma de los mismos y realizar un estudio adicional para tratar de validar su utilidad en seleccionar estos caracteres.

4.10 (ζ)-Caroteno desaturasa

Dada la importancia de la enzima Zds en la biosíntesis de carotenoides, nos propusimos encontrar variantes alélicas del gen y determinar si pueden explicar, en alguna proporción, la variación fenotípica observada en la concentración de pigmentos amarillos entre las distintas variedades de trigo candeal. Dado que el trigo candeal es un tetraploide, al menos dos genes, uno del genoma A y uno del genoma B, son esperables. En esta tesis se partió de la hipótesis de que la variación alélica en uno o más genes *Zds* pueden explicar parcialmente las diferencias en la expresión fenotípica del pigmento amarillo en los cultivares de trigo candeal.

El patrón de bandeo en los geles de poliacrilamida así como el análisis de las secuencias nucleotídicas revelaron la presencia de dos copias del gen *Zds* en el genoma A, designadas *TtZds-A1.1a* y *TtZds-A1.2*. Esta última (*TtZds-A1.2*) fue identificada en las ocho variedades. En cambio, *TtZds-A1.1a* fue identificada en todas las variedades estudiadas excepto Amarillo, donde se identificó a la variante alélica del genoma A hallada en la región delimitada por los cebadores ZdsF3/R3, denominada *TtZds-A1.1b*. Esta variedad se caracteriza por presentar valores altos de CPC de manera estable en los ambientes evaluados. En el genoma B se identificó un gen denominado *TtZds-B1*. Dado que el trigo candeal es una especie tetraploide, la presencia de dos genes sugiere que el gen *Zds* pudo, de hecho, ser duplicado en el grupo dos de cromosomas de trigo candeal (Dong *et al* 2012), con dos conjuntos de genes homólogos. Esto fue validado por la obtención de más de 20 clones de cada uno de los genes y de ocho secuencias en la variante alélica identificada. El locus de la enzima lipoxigenasa, relacionada con la degradación oxidativa de los pigmentos

carotenoides, se encontró duplicado en los cromosomas 4B (Carrera *et al.*, 2007) y 4A (Garbus *et al.*, 2009; 2013) en trigo candeal.

Las dos copias del gen del genoma A, *TtZds-A1.1a* y *TtZds-A1.2* comparten una identidad del 98% para la región analizada, lo cual sugiere una relativa reciente duplicación. Este resultado propone que el número de copias del gen *Zds* puede ser importante en la regulación y/o acumulación del contenido de pigmentos carotenoides en el grano del candeal.

Asimismo, para determinar el rol del gen en la expresión de pigmento amarillo, el alelo *TtZds-A1.1b*, fue caracterizado con el marcador molecular Yp2a-1F/R (Dong *et al.*, 2012) en una población de germoplasma compuesta por 133 variedades de trigo candeal de diferentes orígenes geográficos, en donde se encontró que esta variante alélica *TtZds-A1.1b*, explicaba un 17,7% de la variación del CPC. Recientemente, ha sido diseñado un nuevo marcador para identificar mediante PCR los genotipos portadores del alelo observado en la variedad Amarillo para establecer su posible asociación con el color. Este marcador resulta en un amplicón de 136 bp en Amarillo y de 148 bp en el resto de las variedades por lo que será resultado mediante una corrida electroforética en geles de acrilamida.

Como se indicara en los resultados, la diferencia entre las medias ajustadas en presencia y ausencia del alelo para los caracteres de calidad CPC y el color amarillo CIEb* de sémola integral validaron la hipótesis de que la variación alélica del gen *TtZds-A1.1b* explica parcialmente las diferencias en la expresión fenotípica del pigmento amarillo en los materiales estudiados. Esto también confirma que la variante alélica *TtZds-A1.1b*, identificada en las variedades BonINTACarilo, VF 0113, Amarillo, Gabbiano, Joyau, Karur, Neodur, Garic y Exeldur se encuentra alta y significativamente relacionada con la variación del CPC y CIE b*. Se considera que las variedades que porten el alelo *TtZds-A1.1b* relacionado con mayor color tienen mayor contenido de pigmentos carotenoides, lo cual permite postular que la combinación de cebadores 3F/Yp2aR o 3F-3R que amplifican este alelo son una buena herramienta para seleccionar variedades de alto color amarillo en trigo candeal.

Reimer & Pozniak (comunicación personal) mapearon un QTL para pigmento amarillo en el cromosoma 2A en una población de haploides duplicados de trigo candeal derivada del cruzamiento W9262-260D3 / Kofa. Por otra parte, han sido mapeados clones BAC que contenían genes hipotéticos de *Zds* para el grupo 2 de cromosomas Cenci *et al.*, (2004). En este contexto, podemos sugerir que los genes *TtZds-A* identificados en esta tesis podrían corresponder como genes candidatos para el QTL ubicado en el cromosoma 2A asociado con pigmento amarillo.

5. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS.

- ✓ El análisis de la varianza de las variables estudiadas en esta tesis para ambientes individuales permitió detectar los siguientes efectos:
 - En términos de las estimaciones de parámetros de covarianza, la mayor proporción de la varianza en relación (CPC y CIE b*) fue debida al factor genotipo, seguido del factor ambiente y por el componente de la interacción G×A, aunque en una menor magnitud.
 - La mayor parte de la variación en el brillo (CIE L*) fue explicada por el factor ambiental, seguido por el componente genotípico, que tuvo una igual contribución que el factor G×A en relación con la variación total.
 - El factor genotipo explicó la mayor parte de la variación en el rojo (CIE a*), seguido por el componente G×A y, en menor medida, por el factor ambiente.
 - La mayor parte de la variación del PMG fue debida al genotipo, seguida por el componente de interacción G×A, teniendo el ambiente importancia menor.
 - En el caso del PH, la mayor parte de la variación fue explicada por el factor genotipo, seguido por el componente de interacción G×A y por el factor ambiente, en similar magnitud.
 - En cuanto al PGP al rendimiento, la mayor parte de la variación fue explicada por el ambiente, con una contribución limitada del componente de interacción G×A y el factor genotipo.
- ✓ Teniendo en cuenta la elevada proporción relativa de la variación total proporcionada por el factor genotípico, no es sorprendente encontrar valores altos de heredabilidad ($h^2 = 84,5\%$, $92,8\%$ y $85,5\%$) para los caracteres CPC, CIEb*, CIEa* respectivamente. Los caracteres CIEL*, PMG y PH obtuvieron valores de heredabilidad medios y altos ($h^2 = 59,1\%$, $76,5\%$ y $85,54\%$ respectivamente). Por otro lado, el carácter de rendimiento, PGP, obtuvo un valor bajo de heredabilidad ($h^2 = 3,19\%$).

- ✓ Los resultados obtenidos con la metodología REML/BLUP para los caracteres de calidad relacionados con el color del grano como el contenido de pigmentos carotenoides (CPC) y color amarillo (CIEb*) evaluados en 133 genotipos indicaron que los materiales de trigo candeal Amarillo (53), CBW 05082 (133), Buck Topacio (2), Durobonus (110), Vivadur (120), Joyau (111), Exeldur (123), CBW 0105 (33), CBW 0225 (40), VF 0163 (23) y Argeles (124) fueron las variedades que mantuvieron el comportamiento de genotipos superiores para las localidades de Pieres, Cabildo y Barrow. En relación a los caracteres de PMG y PH las variedades que se comportaron similarmente en los tres ambientes fueron ACA 1801F (32), Candeal Durumbuck (81), Buck Esmeralda (3), Taganrog Sel. BUCK (90), Portorico (126), Catervo (45), Buck Cristal (4), CBW 0156 (56), CBW 0230 (41), CBW 0225(40), Tiziannia (122), Garic (118), Buck Granate (B#26) (64) y CBW 0153 (37). Por consiguiente, se considera que estas variedades son genotipos superiores y estas observaciones demuestran la posibilidad de encontrar dentro de estos materiales alelos favorables para estos caracteres.
- ✓ Los marcadores AFLP utilizados en esta tesis produjeron 116 bandas polimórficas que permitieron establecer que existe estructura poblacional en la colección de germoplasma, donde el número de subgrupos identificados fueron seis.
- ✓ Las 116 bandas polimórficas y los relativos buenos valores de los atributos de los marcadores estudiados en el presente estudio sugieren que los AFLPs son marcadores que permiten discriminar, clasificar y hacer análisis de variabilidad genética en trigo candeal.
- ✓ Las combinaciones de marcadores de AFLP que resultaron ser más informativas para diferenciar genotipos de trigo candeal fueron P41M31, P41M39 y P40M43.
- ✓ La extensión del desequilibrio de ligamiento en trigo candeal cultivado alcanza distancias comparables a las encontradas en otras especies autógamas según la bibliografía. De acuerdo a ello, la densidad de marcadores necesarios para un estudio de *genome-wide association* sería mucho menor que lo informado para otras

especies (entre 30.000 y 40.000 SNPs). Sin embargo, este valor deberá ajustarse de acuerdo a la presencia de regiones genómicas con un desequilibrio de ligamiento de menor alcance.

- ✓ Los niveles de polimorfismo y variabilidad nucleotídica encontrados en el conjunto de genotipos de trigo candeal, representativos de los materiales del cultivo en Argentina y de otros orígenes, fueron moderados como consecuencia de la fuerte presión de selección a la que fueron sometidos. Sin embargo, existe aun un 35,8% de variabilidad genética que puede ser explotada por los fitomejoradores y biotecnólogos según sea el interés.
- ✓ Las correlaciones de las frecuencias alélicas (r^2) se estimaron utilizando 116 bandas polimórficas de marcadores AFLP y 118 genotipos de trigo candeal. Se obtuvo un total de 6612 combinaciones por locus de a pares. Cuarenta y dos (0,635%) de las 6612 combinaciones resultaron estar en desequilibrio de ligamiento con una alta significancia ($P < 0,0001$). El promedio de los valores de r^2 fue de 0,237. Se conformaron seis posibles bloques en DL, de ubicación desconocida.
- ✓ Las técnicas de genotipado a mediana escala optimizadas en este trabajo de tesis (con AFLPs) resultaron eficientes, simples y versátiles para: (1) aumentar la cantidad de individuos para en los estudios de mapeo por asociación y (2) incorporar posibles marcadores funcionales al mapa genético trigo candeal cultivado.
- ✓ Este estudio encontró asociaciones significativas marcador/carácter para la mayoría de las variables de calidad y rendimiento analizadas y demostró que es posible establecer estudios de genética de asociación en trigo candeal para dilucidar los componentes genéticos involucrados en caracteres complejos relacionados con calidad y rendimiento.
- ✓ Aunque los AFLP son de posición anónima, permiten establecer asociaciones significativas entre marcadores y caracteres de calidad y rendimiento. Los marcadores que explicaron mayores porcentajes de la variación en un carácter

fueron, P41M39_715 para el peso de los granos, P41M39_747 para el CIE a*, P41M43_390 para el rendimiento, P41M31_767 para el contenido de pigmentos carotenoides y el CIE b* y el marcador P41M43_367 para el CIE b*. Otros marcadores se encontraron asociados a caracteres en algunas localidades.

- ✓ Aunque no se logro determinar el nivel de DL debido a que los AFLPs son anónimos, esta tesis fue útil para identificar regiones candidatas que pueden ser objetivo de nuevos experimentos en mapeo asociativo.
- ✓ La variabilidad alélica del gen *Zds* descrita para el *trigo pan* es consistente con la variabilidad del gen *Zds* encontrada en esta tesis en trigo candeal. Sin embargo en la región analizada se encontraron nuevos polimorfismos para el genoma A de trigo candeal.
- ✓ Los polimorfismos identificados en el gen *Zds* y su relación con el CPC y el color amarillo convierten al gen *Zds* en un gen candidato para hacer mapeo asociativo y también para ser utilizado en programas de mejoramiento del cultivo de trigo candeal.
- ✓ El análisis de las secuencias nucleótidas y también el patrón de bandeo en los geles de acrilamida revelaron la presencia de dos copias del gen *Zds* en el genoma A que se designaron como: *TtZds-A1.a*, y *TtZds-A1.2*, y la variante alélica del genoma A denominada *TtZds-A1.b*, la cual se encontró asociada a variedades con valores altos de CPC y CIE b*.
- ✓ La identificación del alelo *TtZds-A1.b* asociado con alto color amarillo permitió establecer que el marcador desarrollado en trigo pan por Dong *et al.*,(2012) puede ser utilizado en trigo candeal por los mejoradores para la obtención de líneas con alto color amarillo y alto contenido de pigmentos carotenoides.
- ✓ El polimorfismo identificado en trigo candeal en la copia del gen denominada *TtZds-A1.2* y *TtZds-A1* con la inserción **AGGAAGGCGTGG** y delección en el alelo asociado a alto color *TtZds-A1.b*, están siendo utilizados en la obtención de un

marcador molecular que podría ser transferido y utilizado en los programas de mejoramiento de trigo candeal para la obtención de líneas con alto color amarillo y alto contenido de pigmentos carotenoides.

- ✓ Este trabajo de tesis constituye el primer antecedente de aplicación de mapeo por asociación en trigo candeal en la Argentina. Si bien el resultado aquí presentado deberá ser validado, es realmente promisorio la aplicación de este nuevo enfoque para la disección de factores genéticos involucrados en caracteres agronómicos de importancia en candeal.

LITERATURA CONSULTADA

- Agrama, H. A., Eizenga, G. C., y Yan, W. 2007. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Molecular Breeding* 19(4): 341-356.
- Akhunov, E., Nicolet, C., y Dvorak, J. 2009. Single nucleotide polymorphism genotyping in polyploid wheat with the Illumina GoldenGate assay. *Theoretical and Applied Genetics* 119(3): 507-517.
- Akhunov, E.D., Akhunova, A.R. & Dvorak, J. 2005. BAC libraries of Triticum urartu, Aegilops speltoides and Ae. tauschii, the diploid ancestors of polyploid wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 111: 1617-1622.
- Allan, R. E. 19E5. Agronomic comparisons among wheat lines nearly isogenic for three reduced-height genes. *Crop Sci.* 26: 707-710
- Alonso-Blanco, C., Peeters, A. J., Koornneef, M., Lister, C., Dean, C., van den Bosch, N., Pot, J., Kuiper, M. T: 1998. Development of an AFLP based linkage map of Ler, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a Ler/Cvi recombinant inbred line population. *Plant J.* 14(2): 259-271.
- Andersen, J. R., Schrag, T., Melchinger, A. E., Zein, I., and Lübberstedt, T. 2005. Validation of *Dwarf8* polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* 111, 206-217.
- Andersen, J. R., Zein, I., Wenzel, G., Krützfeldt, B., Eder, J., Ouzunova, M., and Lübberstedt, T. 2007. High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a *Phenylalanine Ammonia-Lyase* locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Theor Appl Genet* 114, 307-319.
- Arumuganathan, K., and Earle, E.D. 1991. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. *Plant Mol Biol Rep* 9, 229-233.
- Akkiraju P*, Roncallo PF*, Gómez P*, Cervigni G, Carrera A, Miranda R, Wehrhahne L, Jensen C, Bariffi J, Helguera M, Echenique V. 2008. Mapeo deQTLs de rendimiento en trigo candeal y evaluación de su utilidad en la selección. VII Congreso Nacional de Trigo. Sesión de póster GB13. 2-4 de Julio. La Pampa, Argentina. * Igual contribución al trabajo.
- Albrecht, M., Klein, A., Hugueney, P., Sandmann, G. & Kuntz, M. 1995. Molecular cloning and functional expression in E. coli of a novel plant enzyme mediating zetacarotene desaturation. *FEBS Letters* 372: 199-202.
- Alvarez, J.B., Martin, L.M. & Martin, A. 1998. Chromosomal localization of genes for carotenoid pigments using addition lines of *Hordeum chilense* in wheat. *Plant Breeding* 117: 287-289.
- Alvarez, J.B., Martin, L.M. & Martin, A. 1999. Genetic variation for carotenoid pigment content in the amphiploid *Hordeum chilense* × *Triticum turgidum* conv. durum. *Plant Breeding* 118: 187-189.
- American Association of Cereal Chemists. Approved Methods of the AACC. Tenth Edition, March 2000. Method 14-50, reapproval November 3, 1999.
- Anderson, J.V. & Morris, C.F. 2001. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity. *Crop Science* 41: 1697-1705.
- Anderson, J.V., Fuerst, E.P., Hurkman, W.J., Vensel, W.H. & Morris, C.F. 2006. Biochemical and genetic characterization of wheat (*Triticum* spp.) kernel polyphenol oxidases. *Journal of Cereal Science* 44: 353-367.
- Andlauer, W. & Furst, P. 1998. Antioxidative power of phytochemicals with special reference to cereals. *Cereal Foods World* 43: 356-360.
- Arrach, N., Fernandez-Martin, R., Cerda-Olmedo, E. & Avalos, J. 2001. A single gene for lycopene cyclase, phytoene synthase, and regulation of carotene biosynthesis in *Phycomyces*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. PNAS, February 13, 98(4), pp. 1687-1692.
- AUTRAN, J.-C. 1981. Recent data on the biochemical basis of durum wheat quality. Pages 257-273 in: *The Quality of Foods and Beverages, Chemistry and Technology*, Vol. 1. G. Charalambous and G. Inglett, eds. Academic Press: New York. AUTRAN, J.-C., and FEILLET, P. 1987. Genetic and technological basis of protein quality for durum wheat in pasta. Pages 59-71 in: *EEC Symp. on Protein Evaluation in Cereals and Legumes*. V. Pattakou, ed. Cereal Institute: Thessaloniki, Greece.
- AUTRAN, J.-C., and GALTERIO, G. 1989. Associations between electrophoretic composition of protein, quality characteristics, and agronomic attributes of durum wheat. II. Protein-quality associations. *J. Cereal Sci.* 9:195-215.
- AUTRAN, J.-C., ABECASSIS, J., and FEILLET, P. 1986. Statistical evaluation of different technological and biochemical tests for quality assessment in durum wheats. *Cereal Chem.* 63:390-394. AUTRAN, J.-C., LAIGNELET, B., and MOREL, M. H. 1987. Characterization and quantification of low molecular weight glutenins in durum wheats. *Biochimie* 69:699-711.
- Blanco, A., Simeone, R., Cenci, A., Gadaleta, A., Tanzarella, O. A., Porceddu, E., Salvi, S., Tuberosa, R., Figliuolo, G., Spagnoletti, P., Roder, M. S. y Korzun, V. 2004. Extension of the Messapia x dicoccoides linkage map of *Triticum turgidum* (L.) Thell. *Cellular and Molecular Biology Letters*. 9(3): 529-541

- Bartley, G.E., Scolnik, P.A. & Beyer, P. 1999. Two Arabidopsis thaliana carotene desaturases, phytoene desaturase and zeta-carotene desaturase, expressed in Escherichia coli, catalyze a poly-cis pathway to yield lycopen. European Journal of Biochemistry 259: 396–403.
- Barnaud, A., Lacombe, T., and Doligez, A. 2006. Linkage disequilibrium in cultivated grapevine, *Vitis vinifera* L. Theor Appl Genet **112**, 708-716.
- Baublis, A.J., Chongrun, L., Clydesdale, F.M. & Decker, E.A. 2000. Potential of wheat-based cereals as a source of dietary antioxidants. American College of Nutrition 19: 308-311.
- Blair, M. W., Garris, A. J., Iyer, A. S., Chapman, B., Kresovich, S., and McCouch, S. R. 2003. High resolution genetic mapping and candidate gene identification at the *xa5* locus for bacterial blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet **107**, 62-73.
- Bendich, A. 2001. Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids institute of medicine washington, DC: National Academy Press, 2000 ISBN: 0-309-06935-1. Nutrition, 17(4), 364.
- Bhatt, G.M. & McMaster, G.J. 1976. Variation in pigment content of flour color in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Euphytica 25(1): 685-691.
- Black, C.K. & Panozzo, J.F. 2004. Accurate technique for measuring color values of grain and grain products using a visible-NIR instrument. Cereal Chemistry 8(14): 469- 474 Barker J S F. 2001 Conservation and management of genetic diversity: a domestic animal perspective. Can. J. For. Res. 31: 588–595.
- Becerra, V. y Paredes, C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura técnica. 60(3): 270-281.
- Bensch, S., Akesson, M. 2005. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? Mol Ecol. 14(10): 2899–2914.
- Berloo, R., Zhu, A., Ursem, R., Verbakel, H., Gort, G., y F. van Eeuwijk, F.A. 2008. Diversity and linkage disequilibrium analysis within a selected set of cultivated tomatoes. Theoretical and Applied Genetics. 117: 89–101.
- Bilgin O, Baser I, Korkut KZ, Genctan T, Balkan A, Saglam N (2009). Variations for grain yield and milling value of durum wheat landraces and obsolete cultivars. Phillip Agric Scientist 92: 25–32.
- Bilgin O, Korkut KZ, Baser I, Daglioglu O, Ozturk I, Kahraman T, Balkan A (2010). Variation and heritability for some semolina characteristics and grain yield relations in durum wheat (*Triticum durum* Desf). World J Agric Sci 6: 301–308.
- Blum, A., Shpiller, L., Golan, G., Mayer, J. and Sinrna, B. 191. Mass selection of wheat for grain filling without transient photosynthesis. Euphytica 54: 111-116.
- Borrelli, G. M., A. M. De Leonardis, C. Fares, C. Platani & N. Di Fonzo. 2003. Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. Cereal Chemistry 80(2): 225–231.
- Borrelli, G.M., A.M. De Leonardis, C. Platani, & A. Troccoli. 2008. Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. Journal of Cereal Science (2008), doi:10.1016/j.jcs.2007.11.007, in press.
- Borrelli, G.M., A. Troccoli, N. Di Fonzo & C. Fares. 1999. Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta color. Cereal Chemistry 76 (3): 335-340.
- Boivin, K., Deu, M., Rami, J., F., Trouche, F., G., y Hamon, P.1999. Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics. 98: 320–328.
- Bonin, A., Ehrlic, D., Manel, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. Mol Ecol. 16(18): 3737–3758.
- Borrelli, G. M., De Leonardis, A. M., Platani, C., y Troccoli, A. 2008. Distribution along durum wheat kernel of the components involved in semolina colour. Journal of Cereal Science. 48(2): 494-502.
- Borrelli, G. M., De Leonardis, A. M., Fares, C., Platani, C., Di Fonzo, N. 2003. Effects of modified processing conditions on oxidative properties of semolina dough and pasta. Cereal Chemistry. 80: 225-231.
- Borrelli, G. M., Troccoli, A., Di Fonzo, N., y Fares, C. 1999. Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta color. Cereal Chemistry. 76(3): 335-340.
- Bozzini A. 1988. Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. In Fabiani G and Lintas C (ed). Durum: Chemistry and Technology. AACC, Minnesota, USA. 1-16.
- Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., y Buckler, E. S. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics. 23(19): 2633-2635.
- Buckler, E. S., y Thornsberry, J. M. 2002. Plant molecular diversity and applications to genomics. Current opinion in plant biology. 5(2): 107-111.
- Blanco, A., Pasqualone, A., Troccoli, A., Di Fonzo, N. & Simeone, R. 2002. Detection of grain protein content QTLs across environments in tetraploid wheats. Plant Molecular Biology 48: 615-623.
- Botella-Pavia, P., Besumbes, O., Phillips Michael, A., Carretero-Paulet, L., Boronat, A. & Rodriguez-Concepcion, M. 2004. Regulation of carotenoid biosynthesis in plants: evidence for a key role of

- hydroxymethylbutenyl diphosphate reductase in controlling the supply of plastidial isoprenoid precursors. *The Plant Journal* 40: 188–199.
- Braaten, M.O., Lebsack, K.L. & Sibbitt, L.D. 1962. Intergeneration relations of physical properties of dough and carotenoid pigment content in durum wheat. *Crop Science* 2: 277-281.
 - Breseghello, F. & Sorrells, M.E. 2006a. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172: 1165-1177.
 - Breseghello, F. & Sorrells, M.E. 2006b. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science* 46: 1323-1330.
 - Caldwell, K. S., Dvorak, J., Lagudah, E. S., Akhunov, E., Luo, M.-C., Wolters, P., and Powell, W. 2004. Sequence polymorphism in polyploid wheat and their D-genome diploid ancestor. *Genetics* 167, 941-947.
 - Caldwell, K. S., Russell, J., Langridge, P., and Powell, W. 2006. Extreme Population-Dependent Linkage Disequilibrium Detected in an Inbreeding Plant Species, *Hordeum vulgare*. *Genetics* 172, 557-567.
 - Campbell, B., Baenziger, P., Eskridge, K., Budak, H., Steck, N., Weiss, A., Gill, K., Erayman, M. 2004. Using environmental covariates to explain genotype×environment and QTL x environment interaction for agronomic traits on chromosome 3A of wheat. *Crop Science* 44: 620-627.
 - Cadena del Trigo en la Región Pampeana. 2005. 5to Foro Federal de la Industria - Región Pampeana. Jornada de Trabajo 26 y 27 de mayo de 2005. Mar del Plata.
 - Cardon, L. R. and Palmer, L. J. 2003. Population stratification and spurious allelic association. *The Lancet* 361, 598-604.
 - Carranco Jáuregui, María Elena, Calvo Carrillo, Ma. de la Concepción, & Pérez-Gil Romo, Fernando. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 233-241. Recuperado en 18 de septiembre de 2017, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222011000300001&lng=es&tlng=es.
 - Carrera, A., Echenique, V., Zhang, W., Helguera, M., Manthey, F., Schragger, A., Picca, A., Cervigni, G. & 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.
 - Carbajo, H. L., Gualati, A., Jensen, C. A. y Loewy, T. 2001. Trigo Candeal, Manual Técnico. Cap. I. INTA, Chacra Experimental Integrada Barrow.
 - Carbajo, H. L. 2001. Trigo Candeal, Manual Técnico, Cap. XII INTA, Chacra Experimental Integrada Barrow.
 - 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.
 - Celentano, N. & Montero, K. 2004. Clasificación de trigo argentino para su comercialización. Tesis. CEMA. Pag. 22. Cervigni, G., 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. Proceedings of 7th international wheat conference. SAGPyA/INTA. Mar del Plata, Argentina 27 de Noviembre– 2 de Diciembre.
 - Chao, S., Zhang, W., Dubcovsky, J., and Sorrells, M. 2007. Evaluation of Genetic Diversity and Genome-wide Linkage Disequilibrium among U.S. Wheat (*Triticum aestivum* L.) Germplasm Representing Different Market Classes. *Crop Science* 47, 1018-1030.
 - Ching A., K.S. Caldwell, M. Jung, M. Dolan, O.S. Smith, S. Tingey, M. Morgante and A. Rafalski. 2002. SNP frequency, haplotype Structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics* 3:9 <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/3/19>
 - Clarke, F. R., Clarke, J. M., Mccaig, T. N., Knox, R. E. & Depauw, R. M. 2006. Inheritance of yellow pigment concentration in seven durum wheat crosses. *Canadian Journal of Plant Science* 86: 133-141.
 - Clarke, F.R., Knox, R.E., Pozniak, C.J., Somers, D.J., Clarke, J.M., Singh, A. & Singh A.K. 2008. Durum consensus map from six diverse population. Proceedings of International Symposium “From Seed To Pasta: The Durum Wheat Chain. Multidisciplinary approaches for a more sustainable and high-quality durum production”. June 30 - July 3, 2008. Bologna, Italy. Poster session P. 1.4.
 - Cockram, J., White, J., Leigh, F. J., Lea, V. J., Chiapparino, E., Laurie, D. A., Mackay, I. J., Powell, W., and O'Sullivan, D. M. 2008. Association mapping of partitioning loci in barley. *BMC Genetics* 9(16).
 - Conti, V., Cervigni, G., Miranda, R., Wehrhahne, L., Jensen, C., Bariffi, J. & Echenique, V. 2008. Utilidad de marcadores moleculares asociados a fuerza de gluten en la selección asistida de trigo candeal. VII congreso Nacional de Trigo. 2-4 de Julio. La Pampa, Argentina.
 - Conti, V. 2007. Mapeo de regiones genómicas (QTL) asociadas a fuerza de gluten en trigo candeal. Tesis de Doctorado en Agronomía. UNS, Bahía Blanca
 - Crossa, J., Bagueño, J., Dreisigacker, S., Vargas, M., Herrera-Foessel, S.A., Lillemo, M., Singh, R.P., Trethowan, R., Warburton, M., Franco, J., Reynolds, M., Crouch, J.H. & Ortiz, R. 2007. Association Analysis

- of Historical Bread Wheat Germplasm Using Additive Genetic Covariance of Relatives and Population Structure. *Genetics* 177: 1889-1913.
- Cruz, C.D. & Regazzi, A.J. 1997. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2da edición. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa. Brasil.
 - Cunningham, F.X. & Gantt, E. 1998. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 557–583.
 - Cunningham, F.X. & Gantt, E. 2001. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene epsilon-cyclases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, pp. 2905–2910.
 - Cunningham, F.X. 2002. Regulation of carotenoid synthesis and accumulation in plants. *Pure and Applied Chemistry* 74:1409–1417.
 - Cuaderno de Actualización Técnica N° 63. CREA. La Calidad del grano del Trigo. 2000.
 - Delcour JA, Hoseney RC. 2010. Principles of cereal science and technology. 3rd ed. St. Paul, M inn.: AACC International.
 - DEXTER, J. E., MATSUO, R. R., and MARTIN, D. G. 1987. The relationship of durum wheat test weight to milling performance and spaghetti quality. *Cereal Foods World* 32:772
 - Dexter, J. E. & Marchylo, B. A. 2001. Recent trends in durum wheat milling and pasta processing: impact on durum wheat quality requirements. Pages 139–164. En: Abecassis, J.; Autran, J.-C. and Feillet, P. (Eds.). *Les Colloques No. 99. International Workshop on Durum Wheat, Semolina, and Pasta Quality: Recent Achievements and New Trends*, 2000 Nov. 27, Montpellier, France. Institute National de la Recherche Agronomique, Montpellier, France.
 - Dexter, J.E. & Matsuo, R.R. 1977. Influence of protein content on some durum wheat quality parameters. *Canadian Journal of Plant Science* 57: 717-727.
 - Dibari, B., F. Murat, A. Chosson, V. Gautier, C. Poncet, P. Lecomte, I. Mercier, H. Bergès, C. Pont, A. Blanco, and J. Salse. 2012. Deciphering the genomic structure, function and evolution of carotenogenesis related phytoene synthases in grasses. *BMC Genomics* 13:1-14.
 - Di Salvo, H. 1969. Breve historia del trigo candeal en Tres Arroyos. *Rev. Bolsa Cereales*, 96 (2818), pag. 60-61.
 - Digesù, A.M., Platani, C., Cattivelli, L., Mangini, G., Blanco, A., 2009. Genetic variability in yellow pigment components in cultivated and wild tetraploid wheats. *J. Cereal Sci.* 50, 210–218.
 - Dong H., Deng Y., Mu J., Lu Q., Wang Y., Xu Y., et al. (2007). The *Arabidopsis* Spontaneous Cell Death1 gene, encoding a ζ -carotene desaturase essential for carotenoid biosynthesis, is involved in chloroplast development, photoprotection and retrograde signalling. *Cell Res.* 17 458–470. 10.1038/cr.2007.51
 - Dogbo, O., A. Laferrière, A. D’Harlingue, and B. Camara. 1988. Carotenoid biosynthesis: Isolation and characterization of a bifunctional enzyme catalyzing the synthesis of phytoene. *PNAS* 85: 7054-7058.
 - Dongliang, Q., Diretto, G., Tavarza, R. & Giuliano, G. 2007. Improved protocol for agrobacterium mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. *Scientia horticultrae* 112(2): 172- 175.
 - Dubscovsky, J., Lijavetzky, D., Appendino, L. & Tranquilli, G. 1998. Comparative RFLP mapping of Triticum monococcum genes controlling vernalization requirement. *Theoretical and Applied Genetic* 97: 968-975.
 - Dvorak, J. 1977. Transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to *Triticum aestivum*. *Can J Genet Cytol* 19:133-141.
 - Dvorak, J., Di Terlizzi, P., Zhang, H.B. & Resta, P. 1993. The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36:21-31. Elouafi, I. & Nachit, M.M. 2004. A genetic linkage map of the Durum x *Triticum dicoccoides* backcross population based on SSRs and AFLP markers, and QTL analysis for milling traits. *Theoretical and Applied Genetic* 108: 401-413.
 - Elouafi, I., Nachit, M.M. & Martin, L.M. 2001. Identification of a microsatellite on chromosome 7B showing a strong linkage with yellow pigment in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Hereditas* 135: 255–261.
 - Ersoz E, Yu J, Buckler ES. Applications of Linkage Disequilibrium and Association Mapping in Crop Plants en: *Genomics-Assisted Crop Improvement*. (2007) Varshney, Tuberosa (ed). Springer Netherlands. Vol 1: *Genomics Approaches and Platforms*:97-119pp.
 - Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*. 14(8): 2611-2620
 - FAO (Food and agriculture organization of the United Nations) (2006) <http://faostat.fao.org/site/>.
 - Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.

- Farnir, F., Coppieters, W., Arranz, J.-J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Mni, M., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., and Georges, M. 2000. Extensive Genome-wide Linkage Disequilibrium in Cattle. *Genome Research* 10, 220-227.
- Feillet, P., Autran, J.C. & Icard-Vernière, C. 2000. Mini Review, Pasta brownness: An assessment. *Journal of Cereal Science* 32(3): 215-233.
- Feuillet, C., & Muehlbauer, G. J. (Eds.). (2009). *Genetics and genomics of the Triticeae* (Vol. 7). Springer Science & Business Media.
- Ficco, D. B. M.; Mastrangelo, A. M.; Trono, D.; Borrelli, G. M.; De Vita, P.; Fares, C.; Beleggia, R.; Platani, C.; Papa, R. The colours of durum wheat: a review. *Crop Pasture Sci.* 2014, 65, 1–15.
- Fraser, P.D. & Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Research* 43: 228–265
- Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M., y Buckler I. V. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual review of plant biology.* 54.1: 357-374.
- Frankham, R., Ballou, J., y Briscoe, D. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Fu, B.X., Schlichting, L., Pozniak, C.J., Singh, A.K., 2011. A fast, simple, and reliable method to predict pasta yellowness. *Cereal Chem.* 88, 264–270.
- Garbus, I., Soresi, D., Romero, J., y Echenique, V. 2013. Identification, mapping and evolutionary course of wheat lipoxygenase-1 genes located on the A genome. *Journal of Cereal Science.* 58(2): 298-304.
- Garbus, I., Carrera, A. D., Dubcovsky, J., y Echenique, V. 2009. Physical mapping of durum wheat lipoxygenase genes. *Journal of Cereal Science.* 50: 67-73.
- García del Moral, L. F., Rharrabti, Y., Villegas, D., y Royo, C. 2003. Evaluation of Grain Yield and Its Components in Durum Wheat under Mediterranean Conditions: An Ontogenic Approach. *Agron. J.* 95: 266–274.
- García Olmedo, F., Carbonero Zalduogui, P., Aragoncillo Ballesteros, C., Salcedo Duran, G., Hernandez Lucas, C., Sánchez-Monge Laguna De Rins, R., & Ponz Ascaso, F. 1985. Sobre moléculas, genes y plantas. *Biología molecular del endospermo de los cereales.* *Tecnología Dosmil.* 17-23.
- GHADERI, A. and EVERSON, E.H. 1971. Genotype-environment studies of test weight and its components in soft winter wheat. *Crop Sci.* 11,617-620.
- GHADERI, A., EVERSON, E.H. and YAMAZAKI, W.T. 1971. Test weight in relation to the physical and quality characteristics of soft winter wheat. *Crop Sci.* 11, 515-518.
- González-Martínez, S. C., Wheeler, N. C., Ersoz, E., Nelson, C. D., y Neale, D. B. 2007. Association genetics in *Pinus taeda* LI Wood property traits. *Genetics.* 175(1): 399-409.
- Golovnina K.A., Glushkov S.A., Blinov A.G., Mayorov V.I., Adkison L.R., Goncharov N.P. (2007). Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L. *Plant Syst. Evol.* 264: 195–216.
- Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C. y Ramesh, B. 1999 Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed.* 118: 369–390.
- Gupta, P. K., Roy, J. K., y Prasad, M. 2001. Single nucleotide polymorphisms (SNPs): a new paradigm in molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science.* 80(4): 524-535.
- Gupta, A., Maurya, R., Roy, R. K., Sawant, S. V., y Yadav, H. K. 2013. AFLP based genetic relationship and population Structure analysis of *Canna*—An ornamental plant. *Scientia Horticulturae.* 154, 1-7.
- Gupta, P. K., Rustgi, S., y Kulwal, P. L. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology.* 57: 461–485.
- Gómez Pallarés M., León A., y Rosell C. (2007). Trigo. En: *De tales harinas, tales panes*. Ed. León A. y Rosell. pp. 19-71
- Haddioui, A., y Baaziz, M. 2001. Genetic diversity of natural populations of *Atriplex halimus* L. in Morocco: An isoenzyme-based overview. *Euphytica.* 121(1): 99-105.
- He, Z. H., Liu, L., Xia, X. C., Liu, J. J., y Pena, R. J. 2005. Composition of HMW and LMW glutenin subunits and their effects on dough properties, pan bread, and noodle quality of Chinese bread wheats. *Cereal Chemistry.* 82(4): 345-350.
- Hedrick, P.W. 1987. Gametic disequilibrium measures: proceed with caution. *Genetics,* 117: 331–341.
- Hill, W. G y Rasbash J. 1986. Models of long term artificial selection in finite populations. *Genet. Res.* 48: 41–50.
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephens, M., y Pritchard, J. K. 2009. Inferring weak population Structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources.* 9(5): 1322-1332
- Gale M. D. & Devos K. M. 1998. Comparative genetics in the grasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* vol.95, no.5, pp.1971-1974. Galterio, G., Cappelloni, M., Desiderio,

- E., Pogna, N. 1994. Genetic technological and nutritional characteristics of three Italian populations of “farrum” (*Triticum turgidum* spp. *dicoccum*). *J Genet Breed* 48:391-398.
- Gallagher, C.E., Matthews, P.D., Li, F. & Wurtzel, E.T. 2004. Gene duplication in the carotenoid biosynthetic pathway preceded evolution of the grasses. *Plant Physiology* 135: 1776–1783.
 - Gaut, B. S. and Long, A. D. 2003. The Lowdown on Linkage Disequilibrium. *The Plant Cell* 15, 1502-1506.
 - Geldermann, H. 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by genes markers. *Theoretical and Applied Genetic* 46: 310-330.
 - Gill, B.S., Raupp, W.J., Sharma, H.C., Browder, L.E., Hatchett, J.H., Harvey, T.L., Moseman, J.G. & Waines, J.G. 1986. Resistance in *Aegilops squarrosa* to wheat leaf rust, wheat powdery mildew, greenbug, and Hessian fly. *Plant Dis* 70: 553-556.
 - Güler, M. 2003. Irrigation effects on quality characteristics of durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 83: 327–331.
 - Gupta, P.K., Mir, R.R., Mohan, A. & Kumar, J. 2008. Review Article: Wheat Genomics: Present Status and Future Prospects. *International Journal of Plant Genomics*. Article ID 896451, 36 pages. doi:10.1155/2008/896451
 - Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Journal of Genetic* 8: 299-309.
 - Hamblin, M. T., Mitchell, S. E., White, G. M., Gallego, J., Kukatla, R., Wing, R. A., Paterson, A. H., and Kresovich, S. 2004. Comparative Population Genetics of the Panicoid Grasses: Sequence Polymorphism, Linkage Disequilibrium and Selection in a Diverse Sample of *Sorghum bicolor*. *Genetics* 167, 471-483.
 - Hartl, D. & Jones, E. 2001. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
 - He, X.Y., He, Z.H., Zhang, L.P., Sun, D.J., Morris, C.F., Fuerst, E.P. & Xia, X.C. 2007. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2^a and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 115:47–58.
 - He, X.Y., Zhang, Y.L., He, Z.H., Wu, Y.P., Xiao, Y.G., Ma, C.X., & Xia, X.C. 2008. Characterization of phytoene synthase 1 gene (*Psy1*) located on common wheat chromosome 7A and development of a functional marker. *Theoretical and Applied Genetic*. DOI 10.1007/s00122-007-0660-8.
 - He, X.Y., He, Z.H., Ma, W., Appels, R. & Xia X. C.. 2009. Allelic variants of phytoene synthase 1 (*Psy1*) genes in Chinese and CIMMYT wheat cultivars and development of functional markers for flour colour. *Molecular Breeding* DOI 10.1007/s11032-009-9255-1
 - He, Z.H. 1999. Wheat breeding and quality requirements in China. In: *Proceedings of the 9th Assembly of the Wheat Breeding Society of Australia*. pp. 23–28. He, Z.H., Yang, J., Zhang, Y., Quail, K. & Pena, R.J. 2004. Pan bread and dry White Chinese noodle quality in Chinese winter wheats. *Euphytica* 139: 257–267.
 - Hessler, T.G., Thomson, M.J., Bensch, 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 Science* 42: 1695–1700.
 - Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. & Piscozzi, R. 2006. Carotenoids and tocols of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum* L.) *Journal of Cereal Science* 44: 182–193.
 - Hirschberg, J. 2001. Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion Plant Biology* 4: 210–218
 - Howitt, C.A., C.R. Cavanagh, A.F. Bowerman, C. Cazzonelli, L. Rampling, J.L. Mimica, and B.J. Pogson. 2009. Alternative splicing, activation of cryptic exons and amino acid substitutions in carotenoid biosynthetic genes are associated with lutein accumulation in wheat endosperm. *Funct. Integr. Genom.* 9:363-376.
 - Howitt, C.A., and B.J. Pogson. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. *Plant Cell Environ.* 29:435-445.
 - Humphries, J.M. & Khachik, F. 2003. Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruits, vegetables, wheat and pasta products. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 1322-1327.
 - International Grains Council 2013 <http://www.igc.int>
 - Jauhar PP, Riera-Lizarazu O, Dewey WG, Gill BS, Crane CE, Bennett JH (1991) Chromosome pairing relationships among the A, B, and D genomes of bread wheat. *Theor Appl Genet* 82:441–449
 - Jalaluddin, M. II and Ilarrison, S. A. 1989. Heriability, genetic correlation and genotype x environment interactions of soft red winter wheat yield and test weight. *Cercal Res. Commun.* 17:43-49.
 - Jing RL, Chang XP, Jia JZ, Hu RH. Establishing wheat doubled haploid population for genetic mapping by anther culture. *Biotechnol.* 1999;9:4–8.
 - Jin Y, Singh RP. Resistance in U.S. wheat to recent Eastern African isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with virulence to resistance gene *Sr31*. *Plant Dis.* 2006;90:476–480. doi: 10.1094/PD-90-0476.

- Jin Y, Singh RP, Ward RW, Wanyera R, Kinyua M, Njau P, Pretorius ZA. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic Sr gene lines to race TTKSK of *Puccinia graminis* f. sp. tritici. *Plant Dis.* 2007;91:1096–1099. doi: 10.1094/PDIS-91-9-1096.
- Jin Y, Szabo LJ, Pretorius ZA, Singh RP, Ward R, Fetch T., Jr Detection of virulence to resistance gene Sr24 within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. tritici. *Plant Dis.* 2008;92:923–926. doi: 10.1094/PDIS-92-6-0923.
- Jin Y, Szabo LJ, Rouse MN, Fetch T, Jr, Pretorius ZA, Wanyera R, Njau P. Detection of virulence to resistance gene Sr36 within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis* f. sp. tritici. *Plant Dis.* 2009;93:367–370. doi: 10.1094/PDIS-93-4-0367.
- Johnson, B.L. & Dhaliwal, H.S. 1978. *Triticum urartu* and genome evolution in the tetraploid wheats. *American Journal of Botany* 65(8): 907-918.
- Johnston, R.A., Quick, J.S. & Hammond, J.J. 1983. Inheritance of semolina color in six durum wheat crosses. *Crop Science* 23: 607–610.
- Johnston, R.A., Quick, J.S., & Donnelly, B.J. 1980. Note on comparison of pigment extraction and reflectance colorimeter methods for evaluating semolina color. *Cereal Chemistry* 57(6): 447-448.
- Johnston, R.A., Quick, J.S., & Donnelly, B.J. 1981. Methods for evaluating semolina color in early generations. *Crop Science* 21: 472-473.
- Jones, N., Ougham, H. & Thomas, H. 1997. Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytology* 137:165–177.
- Jornadas Técnicas De Capacitación En Siembra, Cosecha, Postcosecha, Pulverización Y Fertilización. 2005. Manejo eficiente de la cosecha y postcosecha de trigo y siembra de soja sobre rastrojo de trigo. Eficiente aplicación de agroquímicos y fertilizantes líquidos. Precop. INTA EEA Manfredi.
- Kraakman, A. T. W., Martínez, F., Mussiraliev, B., van Eeuwijk, F. A., and Niks, R. E. 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. *Molecular Breeding* 17, 41-58.
- Kraakman, A. T. W., Niks, R. E., Van den Berg, P. M. M. M., Stam, P., and Van Eeuwijk, F. A. 2004. Linkage Disequilibrium Mapping of Yield and Yield Stability in Modern Spring Barley Cultivars. *Genetics* 168, 435-446.
- Kearsy, M. & Pooni, H. 1996. *The genetical analysis of quantitative traits*. Chapman & Hall, London. Kobrehel, K. & Gautier, M.F. 1974. Variability in peroxidase isozymes in wheat and related species. *Canadian Journal of Botany* 52:755-759.
- Kirby, E.J.M. (2002). Botany of the wheat plant. In "Bread wheat. Improvement and Production", BC Curtis, S Rajaram, H Gomez Macpherson, eds. Food and Agriculture Organisation, Rome
- Kobrehel, K., Laignelet, B. & Feillet, P. 1974. Study of some factors of macaroni brownness. *Cereal Chemistry* 51: 675-684.
- Komugi, 2012. Catalogue of Gene Symbols. KOMUGI: Wheat Genetic Resources Database. Available online at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/> (Website accessed: January 2, 2013).
- Landjeva, S., Korzun, V. & Börner, A. 2007. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156: 271-296.
- Lewontin, R. C. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 49, 49-67.
- Lezcano, E.P. (2011). Cadena de la Harina de Trigo. Alimentos Argentinos – Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. 1-12
- Li, J.Z., Huang, X.Q., Heinrichs, F., Ganal, M.W. & Roder, M.S. 2006. Analysis of QTL for yield components, agronomic traits, and disease resistance in an advance backcross population of spring barley. *Genome* 49: 454–466.
- Li, J.Z., Huang, X.Q., Heinrichs, F., Ganal, M.W., & Roder, M.S. 2005. Analysis of QTL for yield, yield components, and malting quality in a BC3-DH population of spring barley. *Theoretical and Applied Genetics* 110(2): 356–363.
- Li, W.L., Faris, J.D., Chittoor, J.M., Leach, J.E., Hulbert, S.H., Liu, D.J., Chen, P.D. & Gill, B.S. 1999. Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98(2): 226-233.
- Linden, H., Misawa, N., Saito, T. and Sandmann, G. (1994) A novel carotenoid biosynthesis gene coding for ζ -carotene desaturase: functional expression, sequence and phylogenetic origin. *Plant Mol. Biol.* 24: 369–379.
- Lijavetzky, D., Martínez, M.C., Carrari, F., & Hopp, H.E. 2000. QTL analysis and mapping of pre-harvest sprouting resistance in sorghum. *Euphytica* 112(2): 125-135.
- Lynch, M., y Walsh, B. 1998. *Genetics and analysis of quantitative traits* (Vol. 1). Sunderland, MA: Sinauer.
- Lindgren, L.O., Stalberg, K.G. & Hoglund, A.S. 2003. Seed-specific overexpression of an endogenous arabidopsis phytoene synthase gene results in delayed germination and increased levels of carotenoids, chlorophyll, and abscisic acid. *Plant Physiology* 132: 779-785.

- Liu, B., 1998. Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis. CRC Press, BocaRaton.
- Liu, S. & Anderson, J.A. 2003. Targeted molecular mapping of a major wheat QTL for Fusarium head blight resistance using wheat ESTs and synteny with rice. *Genome* 46:817-823.
- Lomniski, L., Bar-Natan, R., Sklan, D. & Grossman, S. 1993. The interaction between β -carotene and lipoxygenase in plant and animal systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1167: 331-338.
- Mangels, A.R., Holden, J.M., Beecher, G.R., Forman, M.R. & Lanza, E. 1993. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of American Dietetic Association* 93: 284-296.
- Maccaferri, M., Zhang, J., Bulli, P., Abate, Z., Chao, S., Cantu, D., y Dubcovsky, J. 2015. A genome-wide association study of resistance to stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) in a worldwide collection of hexaploid spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *G3: Genes| Genomes| Genetics*. 5(3): 449-465.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M.C., Noli, E., Tuberosa, R. 2005. Population Structure and long-range linkage disequilibrium in a durum wheat elite collection. *Mol Breed*. 15: 271-290.
- Maccaferri, M., Cane, M. A., Sanguineti, M. C., Salvi, S., Colalongo, M. C., Massi, A., y Tuberosa, R. 2014. A consensus framework map of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) suitable for linkage disequilibrium analysis and genome-wide association mapping. *BMC genomics*. 15(1): 873.
- Maccaferri, M., Sanguineti, M. C., Demontis, A., El-Ahmed, A., Del Moral, L. G., Maalouf, F., y Tuberosa, R. 2010. Association mapping in durum wheat grown across a broad range of water regimes. *Journal of experimental botany*. erq287
- Mac Key J. 1988. A plant breeder's perspective on taxonomy of cultivated plants. *Bio Zentralbl* 107:369-379.
- Malosetti, M., van der Linden, C. G., Vosman, B., and van Eeuwijk, F. A. 2007. A Mixed-Model Approach to Association Mapping Using Pedigree Information With an Illustration of Resistance to *Phytophthora infestans* in Potato. *Genetics* 175, 879-889
- Mangels, C.E. 1932. Regional and seasonal variation in pigmentation of durum wheats. *Cereal Chemistry* 9: 485-490. Mangelsdorf PC (1953) *Sci Am* 189: 50
- Marshall, D. R., Mares, D. J., Moss, H. J., and Ellison, F. W. 1986. Effects of grain shape and size on milling yields in wheat. II. Experimental studies. *Aust. J. Agric. Res.* 37: 331-342.
- Mather, K. A., Caicedo, A. L., Polato, N. R., Olsen, K. M., McCouch, S., and Purugganan, M. D. 2007. The Extent of Linkage Disequilibrium in Rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 177, 2223-2232.
- Mares, D. & Campbell, A. 2001 Mapping components of flour and noodle colour in Australian wheat. *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1297-1309.
- Mares, D.J. & Panozzo, J.F. 1999. Impact of selection for low grain polyphenol oxidase activity on darkening in Asian noodles. En: 'Proceedings of the Ninth Assembly Wheat Breeding Society of Australia'. Williamson, P.; Banks, P.; Haak, I.; Thompson, J.; Campbell, A. (Eds.) pp. 32-33.
- Markley, M.C. & Bailey, C.H. 1935. The nature of the pigments of the gasolins extracts of wheat. *Cereal Chemistry* 12: 33-39.
- Markley, M.C. 1937. Variability in carotenoid pigment content of individual plants of *Triticum vulgare* and *Triticum durum*. *Cereal Chemistry* 14: 400-409.
- McClung, A. M. 19E5. Relationship between glume color and gluten strength and plant height and yield in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Dissertation Abstracts, -B-Sciences-andEngineering* 6: 17528-17 538
- Mc Cullagh P. y Nelder J (1989) *Generalized Linear Models*. Chapman y Hall. Londres. 511 p.
- MELENDEZ-MARTINEZ, Antonio J.; VICARIO, Isabel M. y HEREDIA, Francisco J. Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *ALAN* [online]. 2004, vol.54, n.2 [citado 2017-08-24], pp. 209-215. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200011&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0004-0622.
- Nachit, M., DiFonzo N., & Araus, J. EDs. *Options Méditerranées, Zaragoza*. Vol. 40. ISBN: 2-85352-212-1.
- MAGRA G., SENN J., y R. MARTÍN 2005. *Revista AgroMensajes* N°17. <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/17/15AM17.htm>. [Verificación: 20/04/2016]
- Matthews, P., Luo, R. & Wurtzel, E. 2003. Maize phytoene desaturase and zetacarotene desaturase catalyse a poly-Z desaturation pathway: implications for genetic engineering of carotenoid content among cereal crops. *Journal of Experimental Botany* 54: 2215-2230.
- Matuz, J. & Beke, B. 1996. Inheritance of quality traits in two durum wheat (*Triticum durum* Desf.) crosses. *Cereal Research Communication* 24: 203-210.
- McCartney, C.A., Somers, D.J., Lukow, O., Ames, N., Noll, J., Cloutier, S., Humphreys, D.G. & McCallum, B.D. 2006. QTL analysis of quality traits in the spring wheat cross RL4452 x AC Domain. *Plant Breeding* 125: 565-575.
- Miller H.E., Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kanter M. 2000. Antioxidant content of whole grain breakfast cereals, fruits and vegetables. *Journal of the American College of Nutrition* 19: 312S-319S.

- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M. & Rice-Evans, C.A. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384: 240–242.
- Miskelly, D.M. 1984. Flour components affecting paste and noodle colour. *Journal of Science Food Agriculture* 35: 463–471.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R. & Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3:87–103.
- Morrell, P. L., Toleno, D. M., Lundy, K. E., and Clegg, M. T. 2005. Low levels of linkage disequilibrium in wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) despite high rates of self-fertilization. *PNAS* **102**, 2442-2447.
- Moss, H.J. 1967. Yellow pigment content of some Australian flours. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 7: 463–464.
- Mohammadi, R., Haghparast, R., Amri, A., Ceccarelli, S., 2009. Yield stability of rainfed durum wheat and GGE biplot analysis of multi-environment trials. *Crop Pasture Sci.* 61, 92–101
- Nachit, M.M., Baum, M., Impilia, A. and Ketata, H. (1995a). Studies on some grain quality traits in durum wheat grown in Mediterranean environments. In: Proceedings of the Seminar on Durum Wheat Quality in the Mediterranean Region, Di Fonzo, N., Kaan, F. and Nachit, M.M. (eds), Zaragoza (Spain), 17-19 November. *Options Mediterraneenes, Mediterranean Seminars*, No. 22, pp. 181-188.
- Nachit, M.M., Sorrells, M., Labhilili, M., Baum, M., Asbati, A., Azrak, M. and Baalabaki, M. (1995b). Durum wheat improvement, grain quality. *Cereal Improvement Program. Ann. Report*, 1995, pp. 102-105.
- Nachit, M.M., Elouafi, I., Pagnotta, M.A., El Saleh, A., Iacono, E., Labhilili, M., Asbati, A., Azrak, H., Hazzam, M., Benschel, D., Khairallah, M., Ribaut, J.-M., Tanzarella, O.A., Porceddu, E. & Sorrells, M.E.. 2001. Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Theoretical and Applied Genetic* 102: 177-186.
- Naik, P.S., Chanemougasoundharam A., Khurana, P.S.M. & Kalloo, G. 2003. Genetic manipulation of carotenoid pathway in higher plants. *Current Science.* 85(10).
- Nordborg, M., Borevitz, J. O., Bergelson, J., Berry, C. C., Chory, J., Hagenblad, J., Kreitman, M., Maloof, J. N., Noyes, T., Oefner, P. J., Stahl, E. A., and Weigel, D. 2002. The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* **30**, 190-193.
- Nordborg, M. and Tavaré, S. 2002. Linkage disequilibrium: what history has to tell us. *TRENDS in Genetics* **18**, 83-90.
- Novaro P, Colucci F, Venora G, D'Egidio MG, 2001. Image analysis of whole grains: A noninvasive method to predict semolina yield in durum wheat. *Cereal Chem* 78: 217–221.
- Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., Vaquero, M. & Cajigal, C. 2001. Lutein in patients with cataracts and age-related macular degeneration: a long-term supplementation study. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 904–909.
- Olson, J.A. & Kobayashi, S. 1992. Antioxidants in health and disease: overview. *Proc. Soc. Experimental Biol. Med.* 200: 245-247.
- Panfili, G., Fratianni, A. & Irano, M. 2004. Improved normal-phase high-performance liquid chromatography procedure for determination of carotenoids in cereals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52: 6373-6377.
- Park, H., Kreunen, S.S., Cuttriss, A.J., DellaPenna, D. and Pogson, B.J. (2002) Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell* 14: 321–332.
- Parker, G.D. & Langridge, P. 2000. Development of a STS marker linked to a major locus controlling flour colour in wheat. *Molecular Breeding* 6: 169–174.
- Parker, G.D., Chalmers, K.J., Rathjen, A.J. & Langridge, P. 1998. Mapping loci associated with flour colour in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetic* 97: 238–245.
- Patil, R.M., Oak, M.D., Tamhankar, S.A., Sourdille, P. & Rao, V.S. 2008. Mapping and validation of a major QTL for yellow pigment content on 7AL in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum). *Molecular Breeding* 21(4): 485-496.
- Pecetti L. y Annicchiarico P. 1998. Agronomic value and plant type of Italian durum wheat cultivars from different eras of breeding. *Euphytica.* 99: 9–15.
- Peng J.H., Bai Y., Haley S. and Lapitan N. (2009) Microsatellite-based molecular diversity of bread wheat germplasm and association mapping of wheat resistance to the Russian wheat aphid. *Genetica* 135: 95–122
- Peleg, Z., Saranga, Y., Suprunova, T., Ronin, Y., Röder, M.S., Kilian, A., Korol, A.B., Fahima, T. 2008. High-density genetic map of durum wheat x wild emmer wheat based on SSR and DArT markers. *Theoretical and Applied Genetic* 117: 103-115.

- Petersen G, Seberg O, Yde M, Berthelsen K (2006) Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol Phylogenet Evol* 39:70–82.
- Pfeiffer, W. H., and B. McClafferty. 2007. HarvestPlus: Breeding Crops for Better Nutrition. *Crop Sci.* 47(Suppl3):S-88-S-105. doi:10.2135/cropsci2007.09.0020IPBS
- Pflieger S., V. Lefebvre, C. Caranta, A. Blattes, B. Goffinet, & A. Palloix. 1999. Disease resistance gene analogs as candidates for QTLs involved in pepper–pathogen interactions. *Genome* 42: 1100–1110
- Picca, A., Roncallo, P., Carrera, A., Cervigni, G. & Echenique, V. 2008. Saturación de un mapa genético de trigo candeal y detección de QTL asociados a actividad delipoxigenasas. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 77: 175-188.
- Sourdille, P., Singh, S., Cabalen, T., Brown-Guedira, G.L., Gay, G., Qi, L., Gill, B.S., Dufour, P., Murigneux, A., Bernard, M. 2004. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct Integr Genomics* 4:12-25.
- Pinson, S.R.M., Capdevielle, F.M., & Oard, J.H. 2005. Confirming QTL and finding additional loci conditioning sheath blight resistance in rice using recombinant inbred lines. *Crop Science* 45(2): 503–510.
- Pozniak, C.J., Knox, R.E., Clarke, F.R. & Clarke, J.M. 2007. Identification of QTL & association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 114: 525–537.
- Quaglia, G.B. 1988. Other durum wheat products. En: *Durum wheat: Chemistry and technology*. Fabiani, G. & Lintas, C., Eds. American Association of Cereal Chemistry. St. Paul, MN. pp. 263-282.
- Rharrabi, Y., Elhani, S., Martos-Núñez, V., García del Moral, L.F., 2000. Relationship between some quality traits and yield of durum wheat under southern Spain conditions. In: *Royo, C., Nachit, M., Di Fonzo, N., Araus, J.L. (Eds.), Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges*, n. 40. *Options Méditerranéennes*, pp. 529–531.
- Ramakrishna, W., Dubcovsky, J., Park, Y.J., Busso, C., Emberton, J., Sanmiguel, P., Bennetzen, J.L. 2002. Different types and rates of genome evolution detected by comparative sequence analysis of orthologous segments from four cereal genomes. *Genetics* 162: 1389-1400.
- Rani, K.U., Prasada Rao, U.J.S., Leelavathi, K. & Haridas Rao, P. 2001. Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. *Journal of Cereal Science* 34: 233-242.
- Ravel, C., Praud, S., Murigneux, A., Canaguier, A., Sapet, F., Samson, D., Balfourier, F., Dufour, P., Chalhouf, B., Brunel, D., Beckert, M., and Charmet, G. 2006a. Single-nucleotide polymorphism frequency in a set of selected lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* 49, 1131-1139.
- Ravel, C., Praud, S., Murigneux, A., Linossier, L., Dardevet, M., Balfourier, F., Dufour, P., Brunel, D., and Charmet, G. 2006b. Identification of *Glu-B1-1* as a candidate gene for the quantity of high-molecular-weight glutenin in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by means of an association study. *Theor Appl Genet* 112, 738-743.
- Reimer, S.O., Somers, D.J., Clarke, F.R., Knox, R.E., Clarke, J.M. & Pozniak, C.J. 2005. Association Mapping For Endosperm Color In Durum Wheat. *PAG-XIV 2005*
- Reimer, S.O. 2008. Association Mapping of Endosperm Colour in Durum Wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). © Copyright Sherisse Opal Reimer, December 2008. All Rights Reserved. MSc Thesis. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- Resende, M. D. V. (2004). Métodos estatísticos ótimos na análise de experimentos de campo. Colombo: Embrapa Florestas. 57 p.
- Resende, M. D. V. (2007). SELEGENREML/BLUP: sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos. Colombo: Embrapa Florestas. 359 p.
- Resende, M. D. V., & Duarte, J. B. (2007). Precisão e controle de qualidade em experimentos de avaliação de cultivares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 37, 182-194.
- Rostoks, N., Ramsay, L., MacKenzie, K., Cardle, L., Bhat, P. R., Roose, M. L., Svensson, J. T., Stein, N., Varshney, R. K., Marshall, D. F., Graner, A., Close, T. J., and Waugh, R. 2006. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties. *PNAS* 103, 18656-18661
- Rosado, A. M., Rosado, T. B., Alves, A. A., Laviola, B. G., & Bhering, L. L. (2012). Seleção simultânea de clones de eucalipto de acordo com produtividade, estabilidade e adaptabilidade. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47, 964-971. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2012000700013>.
- Roy JK, Lakshmikumaran MS, Balyan HS and Gupta PK (2004) AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. *Bioc Gen* 42:43-59.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., y Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*. 2(3): 225-238.

- Powell, W. 1992. Plant genomes, markers and linkage maps." Biotechnology and crop improvement in Asia. Edited by JP Moss. International Crops Research Institute of the Semi-Arid Tropics, Patancheru, India. 297-322.
- Pritchard, J. K. y Rosenberg N.A. 1999. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 65: 220–228.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. 2000. Inference of population Structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155(2): 945-959.
- Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. (2001) *Am J Hum Genet* 69:1-14.
- Pritchard, J. K. y Wen W. 2004. Documentation for Structure Software. The University of Chicago Press, Chicago.
- Qi, X., Stam, P. y Lindhout, P. 1998. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor Appl Genet.* 96: 376–384.
- Quaglia, G. B. 1988. Other durum wheat products. En: *Durum wheat: Chemistry and technology.* Fabiani, G. & Lintas, C., Eds. American Association of Cereal Chemistry. St. Paul, MN. 263-282.
- Rafalski A. y Morgante M. 2004. Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. *Trends Genet.* 20: 103–111.
- Rharrabti, Y., Royo, C., Villegas, D., Aparicio, N., García del Moral, L.F., 2003a. Durum wheat quality in Mediterranean environments. I. Quality expression under different zones, latitudes and water regimes across Spain. *Field Crops Res.* 80, 123–131.
- Rharrabti, Y., Villegas, D., García del Moral, L.F., Aparicio, N., Elhani, S., Royo, C., 2001. Environmental and genetic determination of protein content and grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Plant Breed.* 120, 381–388.
- Rharrabti, Y., Villegas, D., Royo, C., Martos-Núñez, V., García del Moral, L.F., 2003b. Durum wheat quality in Mediterranean environments. II. Influence of climatic variables and relationships between quality parameters. *Field Crops Res.* 80, 133–140.
- Rani, K. U., Rao, U. P., Leelavathi, K., y Rao, P. H. 2001. Distribution of enzymes in wheat flour mill streams. *Journal of Cereal Science.* 34(3): 233-242.
- Reimer, S., Pozniak, C. J., Clarke, F. R., Clarke, J. M., Somers, D. J., Knox, R. E., y Singh, A. K. 2008. Association mapping of yellow pigment in an elite collection of durum wheat cultivars and breeding lines. *Genome.* 51(12): 1016-1025.
- Remington, D. L., Thornsberry, J. M., Matsuoka, Y., Wilson, L. M., Whitt. S.R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M. M., y Buckler, I. V.. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *PNAS.* 98 (20): 11479–11484.
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B. & Giuliano, G. 2000. Metabolic engineering of β -carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant Journal* 24(3): 413-419.
- RONCALLO PABLO; GARBUS INGRID; PICCA AURORA M.; ECHENIQUE VIVIANA; CARRERA ALICIA; GERARDO CERVIGNI; MIRANDA RUBENANALISIS DE LAS BASES GENETICAS DEL COLOR EN TRIGO CANDEAL (review) *Revista de la facultad de Agronomía -UNLP*; Lugar: La Plata, Buenos Aires; Año: 2009 vol. 108 p. 9 - 23
- Roncallo P.F., G. Cervigni, A. Carrera, P. Akkiraju, P. Gómez, R. Miranda, M. Seghezzo, E. Molfese, L. Wehrhahne, C. Jensen, H. Bariffi, M. Helguera & V. Echenique. 2008. QTLs Associated to Color in a RILs Mapping Population of Durum Wheat. *Proceedings of International Symposium "From Seed To Pasta: The Durum Wheat Chain. Multidisciplinary approaches for a more sustainable and high-quality durum production"*. June 30 - July 3, 2008. Bologna, Italy. Poster session P. 2.15.
- Roncallo PF, Cervigni G, Jensen C, Miranda R, Carrera A, Helguera M and Echenique V. 2012. QTL analysis of main and epistatic effects for grain color traits in pasta wheat. *Euphytica* 185: 77-92
- RONCALLO PABLO F.; AKKIRAJU PAVAN CHAND; CERVIGNI GERARDO; ECHENIQUE VIVIANA C. QTL mapping and analysis of the epistatic interactions for grain yield and yield-related traits in *Triticum turgidum* L. var. Durum EUPHYTICA; Lugar: Berlin; Año: 2016
- Rousseau, E.J., Davison, A.J. & Dunn, B. 1992. Protection by β -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Radical Biological Medicine* 13: 407-433.
- Santra, M., Santra, D.K., Rao, V.S., Taware, S.P. & Tamhankar, S.A. 2005. Inheritance of β -carotene concentration in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. durum). *Euphytica* 144: 215–221.

- Saadalla, M. M., Quick, J. S. and Shanahan, J. F. 1990. Heat tolerance in winter wheat: II. Membrane thermostability and field performance. *Crop Sci.* 30: 1248-1251.
- Sandhu, D. and Gill, K. S. 2002. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. *Plant Physiology* 128, 803-811.
- Sanguineti MC, Li S, Maccaferri M, Corneti S, Rotondo F, Chiari T, Tuberosa R. Genetic dissection of seminal root architecture in elite durum wheat germplasm. *Ann Appl Biol.* 2007;151:291–305
- Sarkar, P. & Stebbins, G.L. 1956. Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Amer J Bot* 43:297–304.
- SAS System 9.0 For Windows (Sas Institute). 2002. SAS Institute, Inc. Cary, NC. USA.
- Schneider A, Molnar I, Molnár-Láng MM. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica.* 2008;163:1–19.
- Schmidt, A.L., Liu, C., Martin, D., Kelly, A. & McIntyre, L. 2004. Molecular markers for selected quality traits in australian hexaploid bread wheat. *Proc 4th Int Crop Science Congress.* Brisbane, Australia Schmitt, N.F. & van Mechelen, J.R. 1997. Expression of lipoxygenase isoenzymes in developing barley grains. *Plant Science* 128: 141-150.
- Seghezzo, M.L. & Molfese, E. 1999. Trigo Candeal. Criterios para la evaluación de la calidad. Publicación Miscelaneas N° 2. Seguezzo, M.L. y Molfese E. (eds). Chacra Experimental Integrada Barrow, INTA-Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires.
- Serpen. A. & Gökmen, V. 2006. A proposed mechanism for the inhibition of Soybeanlipoxygenase by β -carotene. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 401-406.
- Sciacca, F., Fichera, S., Di Silvestro, S., Conte, E., y Palumbo, M. 2010. Genetic diversity of durum wheat as determined by AFLP fluorescence. *Biología Plantarum.* 54 (1): 198-200.
- Sims, R.P.A. & Lepage, M. 1968. A basis for measuring the intensity of wheat flourpigments. *Cereal Chemistry* 45: 605-611.
- Singh, A., Pozniak, C.J., Clarke, F.R., Ames, N.P., Knox, R.E., Clarke, J.M. & Singh, A.K. 2008. QTL Mapping of Lutein and Zeaxanthin in Durum wheat (*Triticum turgidum* var. durum). *Proceedings of International Symposium "From Seed To Pasta:The Durum Wheat Chain. Multidisciplinary approaches for a more sustainable and high-quality durum production"*. June 30 - July 3, 2008. Bologna, Italy. Poster sesión.
- Sissons, M. 2008. Role of durum wheat composition on the quality of pasta and bread. *Food* 2: 75-90.
- Sissons, M.J., N.E. Egan, and M.C. Gianibelli. 2005. New insights into the role of gluten on durum pasta quality using reconstitution method. *Cereal Chem.* 82:601-608
- Skot L, Humphreys J, Humphreys MO, Thorogood D, Gallagher J, Sanderson R, Armstead IP, Thomas ID. Association of candidate genes with flowering time and water-soluble carbohydrate content in *Lolium perenne* (L.). (2007) *Genetics* 177:535-547.
- Slafer GA, Rawson H. 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: A re-examination of some assumptions made by physiologist and modellers. *Australian Journal of Plant Physiology.* 21:, 393-426. Wallace, D.H. 1985. *Plant Breeding. Reviews* 3,21-167
- Stich, B., Maurer, H. P., Melchinger, A. E., Frisch, M., Heckenberger, M., van der Voort, J. R., y Reif, J. C. 2006. Comparison of linkage disequilibrium in elite European maize inbred lines using AFLP and SSR markers. *Molecular Breeding.* 17(3): 217-226
- Somers, D.J., Isaac, P. & Edwards, K. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical Applied Genetic* 109(6): 1105-1114.
- Somers, D. J., Banks, T., Depauw, R., Fox, S., Clarke, J., Pozniak, C., y McCartney, C. 2007. Genome-wide linkage disequilibrium analysis in bread wheat and durum wheat. *Genome.* 50(6): 557-567.
- Sorrells, M.E., Rota, M.L., Bermudez-Kandianis, C.E., Greene, R.A., Kantety, R.Munkvold, J.D., Miftahudin, M. Mahmoud, A., Ma, X., Gustafson, P.J. 2003. Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genet Res* 13:1818-1827. Sourdille, P., Snape, J.W., Cadalen, T., Charmet, G., Nakata, N., Bernard, S. & Bernard M. 2000 Detection of QTL for heading time-and photoperiod response in wheat using a doubled-haploid population. *Genome* 43 (3): 487-494.
- Sun, D.J., He, Z.H., Xia, X.C., Zhang, L.P., Morris, C.F., Appels, R., Ma, W.J. & Wang, H. 2005. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat. *Molecular Breeding* 16: 209–218.
- Sun, Z., Cunningham, F.X.Jr & Gantt, E. 1998. Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in unicellular chlorophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95: 11482-11488.
- Schulthess, A. 2013. Factores genotípicos, ambientales y agronómicos que influncian la amarillez de semolina de trigo candeal en Chile. MS Thesis. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 155 pp

- Schulthess A, Matus I, Schwember A (2013) Genotypic and environmental factors and their interactions determine semolina color of elite genotypes of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) grown in different environments of Chile. *Field Crops Res* 149:234–244.
- Taghouti M, Gaboun F, Nsarellah N, Rhrif R, El-Haila M, Kamar M, Abbad- Andaloussi F, Udupa SM (2010). Genotype × environment interaction for quality traits in durum wheat cultivars adapted to different environments *African J Biotech* 9: 3054–3062.
- Teich, A. H. 19E4. Heritability of grain yield, plant height and test weight of a population of winter wheat adapted to southwestern Ontario. *Theor. Appl. Genet.* 68: 21-23
- Tenaillon, M. I., Sawkins, M. C., Long, A. D., Gaut, R. L., Doebley, J. F., and Gaut, B. S. 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays* ssp. *mays* L.). *PNAS* **98**, 9161-9166.
- Thuillet A.-C, D. Bru, J. David, P. Roumet, S. Santoni, P. Sourdille and T. Bataillon. 2002. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellites loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L) Thell. ssp. durum desf. *Mol. Biol. Evol.* 19:122-125
- Thornsberry, J. M., Goodman, M. M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D., and Buckler, E. S., IV. 2001. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. *Nature Genetics* **28**, 286-289.
- Toenniessen, G.H., O'Toole, J.C. and De Vries, J. (2003) Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 191–198.
- Tommasini, L., Schnurbusch, T., Fossati, D., Mascher, F., and Keller, B. 2007. Association mapping of *Stagonospora nodorum* blotch resistance in modern European winter wheat varieties. *Theor Appl Genet* **115**, 697-708.
- Troccoli, A., Borrelli, G.M., De Vita, P., Fares, C. & Di Fonzo, N. 2000. Durum wheat quality: a multidisciplinary concept. *Journal of Cereal Science* 32: 99–113.
- Vallega, V. 1985. Identification of a major protein gene compatible with high grain yields in semidwarf *Triticum durum* Eeotyqs' *Cereal Res. Commun.* 13:201-207
- Vallega, J. 1974. Durum wheat varieties cultivated in Argentina and their pastificable quality related with the italian “macaroni” industry. Embassy of de Argentine Republic, Rome, Italy.
- Van Poppel G. Epidemiologic evidence for β -carotene in prevention of cancer and cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr.* 1996;50 Suppl 3:S57–S61.
- VIEIRA, E.A.; CARVALHO, F.I.F. de; BERTAN, I.; KOOP, M.M.; ZIMMER, P.D.; BENIN, G.; SILVA, J.A.G. da; HARTWIG, I.; MALONE, G.; OLIVEIRA, A.C. de. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Molecular Biology*, v.30, p.392-399, 2007.
- Wall, J. D. and Pritchard, J. K. (2003). Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nature reviews. Genetics.* 4(8):587–97.
- Walsh, D.E. 1970. Measurement of spaghetti color. *Macaroni Journal* 52(4): 20-22.
- Wang, J., X. He, Z. He, H. Wang, and X. Xia. 2009. Cloning and phylogenetic analysis of phytoene synthase 1 (Psl1) genes in common wheat and related species. *Hereditas* 146:208-256
- Weber, A., Clark, R. M., Vaughn, L., Sánchez-Gonzalez, J. d. J., Yu, J., Yandell, B. S., Bradbury, P., and Doebley, J. 2007. Major Regulatory Genes in Maize Contribute to Standing Variation in Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). *Genetics* **177**, 2349-2359.
- Weir, B. S., 1996: *Genetic Data Analysis II*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA
- Wells, W. C. 1984. Genetic variances, correlations, and predicted responses from simple and index selection in a random mating population of spring wheat. *Dissertation Abstracts, -B-Science-andEngineering* 45: 10868.
- Whiteside, A.G.O., Edgar, J. & Goulden, C.H. 1934. The influence of environment on the carotenoid content of hard red spring wheat. *Cereal Chemistry* 11: 615-624.
- Winter, P. & Kahl, G. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11: 438-448.
- Wong, J.C., Lambert, R.J., Wurtzel, E.T. & Rocheford T. R.. 2004. QTL and candidate genes phytoene synthase and ζ -carotene desaturase associated with the accumulation of carotenoids in maize. *Theoretical and Applied Genetic* 108: 349-359.
- Worzella, W.W. 1942. Inheritance and interrelationship of components of quality, cold resistance, and morphological characters in wheat hybrids. *Journal of Agricultural Research* 65: 501-520.
- Wu, Y., Schwarz, P.B., Doehlert, D.C., Dahleen, L.S. & Horsley, R.D. 1997. Rapid separation and genotypic variability of barley (*Hordeum vulgare* L.) lipoxigenase isoenzymes. *Journal of Cereal Science* 25: 49-56.
- Yan, Y., Zhu, Y.H., Jiang, J.G. & Song, D.L. 2005. Cloning and sequence analysis of the phytoene synthase gene from a unicellular chlorophyte, *Dunaliella salina*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1466-1469.

- Ye, X., Al-Babili, S., Klott, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus I. 2000. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287: 303–305.
- Ye, X.D., S. Al-Babili, A. Klott, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, and I. Potrykus. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.
- Young, N.D. 2001. Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. In Phillips R.L. & Vasil I.K. (eds), *DNA-Based Markers in Plants*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 2001, pp.31-48.
- Yu, J., Ni P., & Wong, G.K.-S. 2006. Comparing the whole-genome-shotgun and mapbased sequences of the rice genome. *Trends in Plant Science* 11(8): 387–391.
- Yu, J.-K., La Rota, M., Kantety, R.V., & Sorrells, M.E. 2004. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice. *Molecular Genetics and Genomics* 271(6): 742–751.
- Yule, G.U., 1902 Mendel's laws and their probable relations to intra-racial heredity. *New Phytol.* 1: 193–207, 222–238.
- Zeng, Z.-B., 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10972-10976.
- Zeng, Z.-B., 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136: 1457-1468.
- Zhang L.Y., Bernard M., Leroy P., Feuillet C. & Sourdille P. 2005. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 111(4): 677-687.
- Zhang, W. & Dubcovsky, J. 2008. Association between allelic variation at the Phytoene synthase 1 gene and yellow pigment content in the wheat grain. *Theoretical and Applied Genetic* 116: 635-645
- Zhang, W., Chao, S., Manthey, F., Chicaiza, O., Brevis, J.C., Echenique, V. & Dubcovsky, J. 2008. QTL analysis of pasta quality using a composite microsatellite and SNP map of durum wheat. *Theoretical Applied Genetic* DOI 10.1007/s00122-008-0869-1
- Zhang, W., Lukaszewski, A.J., Kolmer, J., Soria, M.A., Goyal, S. & Dubcovsky, J. 2005. Molecular characterization of durum and common wheat recombinant lines carrying leaf rust resistance (Lr19) and yellow pigment (Y) genes from *Lophopyrum ponticum*. *Theoretical and Applied Genetic* 111: 573-582.
- Zhang, Y., Wu, Y., Xiao, Y., He, Z., Zhang, Y., Yan, J., Zhang, Y., Xia, X. & Ma, C. 2009. QTL mapping for flour and noodle colour components and yellow pigment content in common wheat. *Euphytica* 165: 435-444.
- Zhang, C., C. Donga, X. He, L. Zhang, X. Xia, and Z. He. 2011. Allelic variants at the TaZds-D1 locus on wheat chromosome 2DL and their association with yellow pigment content. *Crop Sci.* 51:1580-1590.
- Zhao, H., Nettleton, D., Soller, M., and Dekkers, J. C. M. 2005. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. *Genet Res Camb* 86, 77-87.
- Zhao, J., Paulo, M.-J., Jamar, D., Lou, P., van Eeuwijk, F., Bonnema, G., Vreugdenhil, D., and Koornneef, M. 2007a. Association mapping of leaf traits, flowering time, and phytate content in *Brassica rapa*. *Genome* 50, 963-973.
- Zhao, K., Aranzana, M. J., Kim, S., Lister, C., Shindo, C., Tang, C., Toomajian, C., Zheng, H., Dean, C., Marjoram, P., and Nordborg, M. 2007b. An *Arabidopsis* Example of Association Mapping in Structured Samples. *PLOS Genetics* 3, 71-82.
- Zhu, C., Gore, M., Buckler, E. S., y Yu, J. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The plant genome.* 1(1): 5-20
- Zile, M.H. 1998. Vitamin A and embryonic development: an overview. *The Journal of Nutrition* 128: 455-458.

TABLAS SUPLEMENTARIAS

Tabla suplementaria 1. Medias de minimos cuadrados (LSMEAN) calculadas para las variables CPC, CIE b*, CIE L*, CIE a*, PMG, PH y PGP de 133 variedades de trigo candeal, en los ambientes Pieres (PI), Cabildo (Ca) y Barrow (Ba).

Variedad	Orden MA	CPC LSMEAN PI	CPC LSMEAN CA	CPC LSMEAN BA	Fb* LSMEAN PI	Fb* LSMEAN CA	Fb* LSMEAN BA	PMG LSMEAN PI	PMG LSMEAN CA	PMH LSMEAN BA	Ph LSMEAN PI	Ph LSMEAN CA	Ph LSMEAN BA	GPP LSMEAN PI	GPP LSMEAN CA	GPP LSMEAN BA	FL* LSMEAN PI	FL* LSMEAN CA	FL* LSMEAN BA	FA* LSMEAN PI	FA* LSMEAN CA	FA* LSMEAN BA
Buck Platino	AM1	5,00	6,39	4,77	13,65	15,28	13,48	49,71	35,84	52,33	79,32	79,08	78,89	5255,43	777,79	3479,92	83,43	83,52	81,21	-0,45	-0,37	0,0
Buck Topacio	AM2	7,09	6,77	6,26	15,34	15,77	14,46	42,15	45,07	45,38	78,56	79,72	76,08	4835,69	995,71	3417,41	83,31	83,03	81,72	-0,56	-0,25	-0,1
Buck Esmeralda	AM3	4,11	4,87	4,44	12,86	14,21	13,14	53,62	47,52	54,72	82,46	82,35	79,61	5443,23	815,04	3133,99	84,29	83,65	82,06	-0,62	-0,35	-0,1
Buck Cristal	AM4	3,94	4,91	4,10	12,08	13,51	12,23	55,53	45,91	48,45	80,34	80,91	78,87	3923,77	674,51	3891,85	83,58	82,76	80,87	-0,24	0,21	0,2
Buck Ambar	AM5	4,69	4,89	4,77	13,34	14,15	12,98	55,81	42,83	46,17	78,24	79,19	77,58	5429,88	866,71	3712,72	83,60	84,08	82,66	-0,42	-0,23	-0,1
BonINTA Facon	AM6	4,73	6,83	6,02	14,19	15,71	14,67	48,65	41,17	43,96	80,70	78,25	77,75	5314,79	791,05	3706,24	83,51	82,74	82,66	-0,67	-0,27	-0,1
BonINTA Carilo	AM7	4,89	7,06	5,14	14,21	16,11	14,11	53,89	42,28	50,93	78,61	76,89	73,57	6811,53	1034,87	3641,38	83,46	82,89	81,81	-0,61	-0,15	-0,1
BonINTA Cumenay	AM8	4,11	4,46	4,47	12,30	12,50	12,45	49,85	47,99	45,06	76,83	77,90	75,98	4002,94	852,43	3850,53	83,00	83,09	80,95	-0,01	0,31	0,3
Ciccio	AM9	4,48	4,67	4,66	13,03	13,18	13,07	45,54	43,83	48,30	75,17	78,36	75,38	3650,91	752,21	3045,50	82,20	83,38	81,79	0,02	-0,03	-0,1
Adamello	AM10	4,46	6,24	4,84	13,20	15,17	13,04	43,62	45,33	47,74	70,85	73,87	70,40	4477,03	902,48	4276,98	82,76	81,13	80,93	-0,21	0,55	0,2
CERZOS-1	AM11	4,11	4,75	4,40	12,23	13,58	12,56	50,02	42,01	51,40	76,69	75,97	77,41	5199,38	1040,50	3334,29	83,37	82,33	81,81	-0,24	0,22	0,2
Duilio	AM12	4,01	4,59	4,19	12,06	12,62	12,25	47,66	41,46	45,53	76,47	76,75	73,77	4209,08	851,40	2754,20	83,37	83,20	81,80	-0,21	-0,04	0,2
Simeto	AM13	4,45	5,02	4,70	13,18	13,33	12,82	45,33	47,15	51,48	71,31	74,48	72,84	3746,47	878,46	3551,38	81,95	82,99	81,71	0,00	-0,01	0,1
65-IAT2	AM14	4,87	4,62	4,39	13,08	13,44	13,43	44,20	40,42	51,89	77,26	77,63	76,10	5440,94	728,03	4789,53	83,06	83,50	82,08	-0,20	-0,23	-0,1
66-IAT2	AM15	4,67	5,13	4,38	12,79	13,46	12,62	38,01	43,76	52,34	75,09	79,07	78,37	5312,68	1015,97	3236,81	82,23	83,75	82,50	-0,12	-0,17	0,0
69-IAT2	AM16	4,70	5,43	4,71	12,94	14,75	12,70	39,69	42,29	48,18	78,91	79,40	76,69	4590,27	951,33	3495,69	83,22	82,14	81,67	-0,24	0,14	-0,1
71-IAT2	AM17	4,16	5,50	4,29	13,12	14,31	12,38	35,70	41,00	51,39	73,00	76,77	76,56	4018,43	851,52	4054,07	83,45	82,48	83,20	-0,24	0,16	-0,1
73-IAT2	AM18	3,73	4,99	3,36	12,20	13,98	12,04	38,28	41,83	50,25	76,72	78,67	76,74	5194,41	1037,47	3844,38	82,67	82,10	81,94	0,15	0,56	0,1
80-IAT2	AM19	3,82	4,63	4,36	12,29	12,75	12,74	47,62	42,76	48,02	77,72	77,67	77,60	4542,89	760,60	3096,35	83,46	83,87	82,08	-0,22	-0,26	-0,1
VF 0154	AM20	4,62	5,90	4,90	13,28	14,86	13,16	43,03	40,07	44,93	77,28	79,04	77,40	5129,02	808,27	3714,36	83,97	83,70	83,47	-0,47	-0,38	-0,1
VF 042	AM21	4,23	4,83	4,48	12,62	13,62	12,56	52,64	48,40	49,31	79,53	80,05	77,89	4391,42	733,51	2612,85	83,30	82,85	81,12	-0,23	0,17	0,0
VF 0113	AM22	4,51	6,91	6,35	13,95	15,85	14,62	48,25	50,03	46,89	77,12	78,79	75,47	4728,52	875,16	3634,96	83,61	83,30	81,29	-0,50	-0,41	0,1
VF 0163	AM23	4,98	7,11	4,83	14,91	16,20	14,39	43,01	43,53	50,42	75,24	76,31	74,77	4588,98	998,33	4014,60	83,25	82,99	81,97	-0,58	-0,12	-0,1

VF 003	AM24	4,17	4,94	4,37	12,32	13,33	12,06	45,38	43,66	53,64	74,16	74,67	75,15	5194,50	996,33	3301,39	82,55	82,43	81,75	0,07	0,14	0,2	
VF 0121	AM25	4,07	5,02	4,99	12,41	13,96	13,21	38,45	37,30	43,40	74,34	72,93	72,97	4454,25	603,76	3054,47	83,10	82,10	80,11	0,12	0,57	0,5	
VF 0167	AM26	4,62	6,94	5,18	14,13	15,90	14,16	45,85	45,97	49,60	75,73	77,86	76,50	5237,98	1029,25	2780,75	83,63	83,36	81,19	-0,40	-0,41	0,4	
VF 0136	AM27	4,66	5,18	4,81	13,66	14,43	13,73	38,43	41,23	47,64	74,20	77,40	74,77	4475,11	837,48	3725,75	83,26	83,33	83,01	-0,20	-0,23	-0,1	
VF 0137	AM28	4,37	4,92	4,86	12,97	14,15	13,32	42,46	39,19	42,51	79,20	79,54	78,14	4486,78	837,82	4296,57	84,16	83,10	82,68	-0,42	-0,03	-0,1	
B#24	AM29	3,72	4,80	4,44	11,98	13,89	12,38	48,44	38,57	48,79	80,82	75,70	77,63	6513,31	761,65	3803,69	83,34	83,07	82,33	-0,11	-0,02	0,0	
B#25	AM30	4,37	4,67	4,56	12,57	12,72	12,58	53,67	46,97	48,03	78,08	78,07	77,55	3377,08	793,20	4351,40	83,13	83,53	81,42	-0,02	-0,11	0,0	
B#27	AM31	4,36	5,77	4,90	13,10	14,91	13,09	55,66	47,16	51,14	80,69	80,81	75,45	5105,06	965,48	4112,66	84,21	82,92	81,87	-0,51	0,11	0,0	
ACA 1801F	AM32	4,18	5,20	4,63	12,42	14,20	12,86	54,15	51,05	61,07	79,67	81,31	77,82	4488,44	755,93	3382,68	83,98	82,91	81,68	-0,25	0,16	0,0	
CBW 0105	AM33	4,86	7,18	6,90	14,51	16,05	14,95	36,49	31,87	32,14	79,41	79,48	78,50	5267,66	863,40	3250,19	83,21	83,43	80,98	-0,58	-0,38	-0,1	
CBW 0112	AM34	4,85	5,48	5,01	13,92	14,68	13,89	47,57	43,44	48,53	77,84	76,55	77,60	4835,98	1057,66	3526,58	83,05	83,25	81,02	-0,36	0,15	0,3	
CBW 0120	AM35	4,93	5,50	4,95	14,25	14,64	13,34	45,28	43,17	47,22	75,34	76,83	75,95	4581,27	1038,05	3131,01	82,34	82,31	80,53	0,03	0,67	0,2	
CBW 0141	AM36	4,28	5,18	4,42	12,64	13,83	12,55	48,74	43,85	45,45	79,54	74,97	74,80	4087,91	699,27	3684,78	83,69	83,34	81,79	-0,23	-0,06	0,0	
CBW 0153	AM37	4,44	5,15	4,54	12,89	14,35	13,22	48,69	47,23	51,92	79,87	80,02	78,65	4379,44	987,63	2855,88	84,23	83,99	82,01	-0,42	0,03	0,2	
CBW 0200	AM38	4,97	5,86	4,92	14,35	15,03	13,91	48,65	48,20	49,59	78,29	78,80	78,87	4568,17	1009,32	3487,47	82,48	82,46	81,22	-0,28	0,05	0,3	
CBW 0210		4,13	4,69	4,74	12,24	13,31	13,01	50,40	41,09	49,76	80,67	80,84	75,18	4832,25	760,91	3654,30	83,33	82,83	81,25	-0,09	0,06	0,0	
CBW 0225	AM40	4,80	7,19	6,72	14,14	16,25	14,58	50,70	41,45	39,28	80,43	81,69	76,86	5152,62	778,66	4273,98	82,89	82,23	81,36	-0,49	-0,17	-0,1	
CBW 0230	AM41	4,58	7,06	6,25	13,91	16,03	13,90	48,39	42,33	44,60	81,28	80,77	76,96	4956,90	835,40	2591,50	83,50	82,84	81,88	-0,43	-0,03	-0,1	
Cannizzo	AM42	3,92	5,07	4,47	12,49	13,49	12,42	47,04	45,05	46,82	68,04	73,80	71,71	3959,56	770,38	3414,06	81,83	81,12	80,11	0,28	0,63	0,7	
Concadoro	AM43	4,16	4,56	4,11	12,47	12,72	12,23	44,63	48,38	48,60	70,69	74,04	72,11	4438,48	896,93	3523,20	81,66	83,12	80,14	0,22	0,08	0,4	
Italo	AM44	4,65	4,70	4,88	13,36	13,67	13,66	48,45	40,16	48,82	79,53	79,89	74,74	5464,94	498,43	3917,38	83,18	82,52	81,60	-0,25	-0,18	-0,1	
Catervo	AM45	4,63	5,60	4,84	14,07	14,66	13,57	52,36	54,40	52,14	73,89	75,31	73,29	3643,46	1045,69	2467,86	82,95	82,77	81,92	-0,11	-0,21	-0,1	
Cantico	AM46	4,62	4,72	4,90	13,50	13,57	12,91	38,61	43,97	49,97	77,11	79,57	77,66	5153,00	780,43	3844,29	82,12	83,66	82,17	0,00	-0,26	-0,1	
Core	AM47	4,61	4,80	4,52	13,40	13,40	12,42	46,63	47,63	53,78	75,34	77,45	75,50	5114,61	795,08	3195,35	82,82	83,98	82,56	0,04	-0,51	-0,1	
Ci 1936	AM48	3,44	4,04	2,56	11,89	11,27	11,14	51,89	44,33	57,47	78,34	77,53	72,91	4778,38	587,00	3660,84	82,86	83,04	82,24	0,14	0,02	0,1	
Co 1937	AM49	4,45	4,82	4,81	13,52	13,44	12,98	45,46	48,50	49,27	76,41	79,39	77,03	4566,49	819,04	3642,12	82,20	83,45	81,22	-0,08	-0,21	-0,1	
CBW 0001	AM50	4,52	4,91	4,91	13,31	13,23	12,78	48,66	46,51	44,67	75,19	76,45	75,26	4626,71	868,54	3589,87	82,68	83,41	81,54	-0,11	-0,08	0,1	

CBW 0002	AM51	4,74	5,75	4,64	14,12	14,74	13,85	35,50	39,19	41,23	76,46	78,42	77,40	4676,75	926,01	2962,50	82,80	83,47	82,00	-0,11	-0,14	0,0	
CBW 0004	AM52	4,77	5,01	4,82	13,87	14,14	13,40	36,96	41,53	43,50	76,94	78,27	76,34	4380,73	845,81	3512,97	82,61	84,06	82,10	-0,08	-0,20	-0,0	
Amarillo	AM53	5,62	9,62	8,03	16,15	18,60	16,45	54,69	42,50	52,53	77,71	77,43	74,27	6102,45	849,52	3523,03	83,11	82,66	81,23	-0,77	-0,49	-0,0	
CBW 0101	AM54	5,11	5,76	4,73	14,79	14,90	13,86	37,53	41,96	41,00	77,87	79,72	79,54	5557,44	1016,73	2368,80	82,59	82,93	80,76	-0,29	0,14	0,2	
CBW 0111	AM55	4,64	4,80	4,65	13,68	13,84	12,91	49,00	49,72	54,82	75,21	77,11	74,91	5708,19	1220,01	3386,61	81,81	84,00	81,19	-0,30	-0,05	0,0	
CBW 0156	AM56	4,86	5,65	4,72	13,60	14,82	13,48	52,72	48,11	57,22	79,21	79,71	76,56	5516,93	896,62	3738,47	83,44	83,62	81,53	-0,43	-0,43	-0,0	
Arbois	AM57	4,61	4,95	5,03	13,28	14,08	13,44	40,32	41,23	44,38	74,87	73,52	72,21	5296,72	1106,81	3072,59	81,62	83,29	80,43	0,20	-0,02	0,2	
Alcalou	AM58	4,71	4,87	4,50	13,39	14,05	13,81	50,67	47,94	56,02	76,30	77,20	77,09	6058,11	961,88	3194,90	82,72	83,17	81,21	-0,11	-0,22	-0,0	
Arcodur	AM59	4,91	5,54	5,84	14,31	14,68	14,10	48,90	46,40	48,21	77,72	79,72	79,31	5148,88	1140,70	3496,49	83,02	84,54	81,82	-0,48	-0,63	-0,0	
Fortore	AM60	4,95	4,70	4,54	12,89	13,88	13,43	50,77	49,71	51,15	75,18	77,06	70,77	4538,41	934,51	3667,70	82,65	83,25	81,92	-0,06	0,09	0,0	
Ardente	AM61	4,06	5,14	4,88	13,20	14,42	12,87	53,69	45,92	50,60	76,95	78,59	73,55	5686,98	1008,46	3420,68	82,70	82,98	81,83	-0,09	0,26	0,0	
Appullo	AM62	4,25	4,78	4,83	13,32	13,23	12,67	42,06	41,62	46,85	77,46	78,45	74,44	4301,27	644,55	3638,01	81,10	82,39	80,40	0,27	0,22	0,5	
Ixos	AM63	4,78	4,98	4,08	13,77	13,75	12,60	44,36	45,80	48,70	74,17	75,22	72,58	4955,69	1109,91	3181,61	82,94	83,93	81,84	0,27	0,27	0,3	
Buck Granate (B#26)	AM64	5,16	6,08	4,89	14,71	14,91	13,89	53,17	47,18	45,84	80,20	79,52	79,17	4928,71	839,54	3992,37	83,60	83,48	82,19	-0,39	-0,18	-0,0	
ACA 1901F	AM65	4,18	4,69	4,67	12,62	13,82	12,26	44,85	45,27	53,58	76,85	78,77	77,75	4277,48	653,55	3063,75	83,66	82,83	82,09	-0,10	-0,07	0,0	
Kofa	AM66	4,76	6,14	6,96	14,50	15,15	14,71	39,94	43,37	46,68	74,79	77,44	74,92	3833,52	857,46	4042,26	83,33	83,30	82,07	-0,28	-0,57	-0,0	
UC1113	AM67	4,67	5,50	4,93	13,87	13,79	13,09	41,85	45,14	48,87	75,66	79,40	77,82	3743,07	722,19	3335,69	83,27	83,80	82,08	0,07	-0,38	-0,0	
Creso	AM68	2,97	4,17	2,53	11,89	11,94	11,60	52,86	49,50	49,95	80,03	78,76	78,83	5172,88	957,51	3449,82	83,26	83,15	81,83	0,30	0,41	0,3	
Gabbiano	AM69	4,25	4,91	4,30	12,95	13,47	12,37	41,09	40,12	48,88	77,12	77,66	70,99	4590,21	801,12	3614,05	83,20	83,40	81,08	0,04	0,08	-0,0	
Granato	AM70	4,32	5,00	4,86	13,06	13,26	12,66	44,92	45,37	45,21	78,16	78,38	78,44	4736,72	1336,31	3863,69	82,83	82,69	81,07	0,31	0,48	0,4	
Capeiti	AM71	4,42	4,90	4,27	13,12	13,00	12,33	46,40	41,97	47,68	77,41	77,33	74,67	4812,51	731,10	3706,42	81,24	83,36	81,49	0,54	0,08	0,3	
Gherardo 575	AM72	4,35	4,76	4,77	13,72	13,41	13,11	40,88	44,93	47,03	72,70	76,83	73,60	3566,54	864,38	2523,99	81,67	83,62	81,78	0,44	0,09	0,3	
Gherardo 610	AM73	4,84	5,07	4,57	13,93	14,27	13,17	56,33	47,22	51,66	78,48	77,81	76,21	3704,77	789,64	4001,38	82,09	82,54	81,27	0,31	0,50	0,4	
Gherardo 645	AM74	3,95	5,08	4,30	13,04	13,79	12,04	49,26	49,71	52,09	76,20	77,14	74,48	4088,18	958,27	2471,91	82,07	82,60	81,62	0,38	0,48	0,0	
Bonaerense Valverde	AM75	5,44	5,29	4,59	14,88	14,41	13,17	45,41	48,78	51,11	78,42	77,84	76,44	4282,33	977,27	4384,02	82,01	83,21	82,45	-0,01	-0,05	0,0	
Bonaerense Quilaco	AM76	4,30	4,89	4,50	13,73	13,35	12,49	46,94	51,05	49,55	79,92	80,12	78,04	4625,94	833,13	3959,50	82,55	83,14	81,65	0,03	0,15	0,2	
BF 1776	AM77	4,12	4,92	4,39	13,26	13,87	13,12	51,70	50,48	48,65	75,13	76,56	73,62	3773,88	875,50	3649,94	82,18	83,34	81,48	0,21	-0,08	0,2	

CBW 05082	AM132	5,21	7,45	7,91	16,03	16,60	15,35	43,31	41,59	37,97	76,72	76,63	76,24	5278,88	950,21	4178,97	82,58	82,89	81,47	-0,50	-0,33	0,00
Buck Granate (B#26)	AM133	4,84	6,25	4,62	14,51	15,09	13,48	48,35	47,51	52,79	79,73	78,40	79,32	4994,01	911,60	3434,22	82,55	83,64	81,92	-0,30	-0,21	-0,00
DD26	AM134	4,05	5,06	4,76	12,85	13,62	13,22	49,00	43,50	43,32	75,93	76,29	75,09	4523,99	612,06	3263,51	82,30	82,44	81,11	0,11	0,02	0,00
DD150	AM135	4,70	4,95	6,26	14,27	14,23	14,50	42,95	44,25	48,95	74,79	77,10	75,92	3999,75	725,76	2762,37	81,99	84,31	81,53	0,02	-0,59	-0,00
Media		4,6	5,4	4,9	13,6	14,2	13,2	46,25	44,25	48,37	77,02	77,72	75,86	4734,53	872,00	3494,93	82,56	83,13	81,58	-0,05	-0,02	0,00
D.E		0,50	0,91	0,87	1,01	1,18	0,96	5,42	4,09	4,48	2,34	1,89	2,07	671,64	145,42	496,67	0,79	0,63	0,76	0,32	0,33	0,20
E.E		0,39	0,46	0,42	0,09	0,10	0,08	0,46	0,35	0,38	0,20	0,16	0,18	57,59	12,47	42,59	0,07	0,05	0,07	0,03	0,03	0,00
MAX		7,09	9,62	8,03	16,20	18,60	16,45	58,83	54,40	61,07	82,46	82,35	79,61	6811,53	1336,31	4789,53	84,29	84,54	83,47	1,33	1,55	1,00
MIN		2,97	3,63	2,53	10,01	10,61	9,78	33,20	31,87	32,14	68,04	72,93	70,19	3198,23	498,43	2368,80	80,62	81,12	78,28	-0,77	-0,74	-0,00

Tabla suplementaria 1.1 Prueba de Tukey para las medias de minimos cuadrados obtenidas via GML calculadas para las variables CPC, CIE b*, CIE L*, CIE a*, PMG, PH y PGP de 133 variedades de trigo candeal estudiadas en los ambientes Pieres, Cabildo y Barrow.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Fb* LSMEAN	405	0,89	0,83	3,38

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	449,77	135	3,33	15,71	<0,0001
amb	62,52	2	31,26	147,40	<0,0001
GEN	387,25	133	2,91	13,73	<0,0001
Error	57,05	269	0,21		
Total	506,82	404			

Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=0,16368

Error: 0,2121 gl: 269

amb	Medias	n	E.E.
CABILDO	14,14	135	0,04 A
PIERES	13,56	135	0,04 B
BARROW	13,19	135	0,04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CPC LSMEAN	405	0,80	0,70	9,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	233,95	135	1,73	7,85	<0,0001
amb	46,72	2	23,36	105,84	<0,0001
GEN	187,23	133	1,41	6,38	<0,0001
Error	59,37	269	0,22		
Total	293,32	404			

Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=0,16698

Error: 0,2207 gl: 269

amb	Medias	n	E.E.
CABILDO	5,39	135	0,04 A
BARROW	4,85	135	0,04 B
PIERES	4,57	135	0,04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PMG	405	0,71	0,57	7,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7122,71	135	52,76	4,91	<0,0001
amb	1149,80	2	574,90	53,53	<0,0001
GEN	5972,91	133	44,91	4,18	<0,0001
Error	2888,75	269	10,74		
Total	10011,46	404			

Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=1,16475

Error: 10,7388 gl: 269

amb	Medias	n	E.E.
BARROW	48,35	135	0,28 A
PIERES	46,23	135	0,28 B
CABILDO	44,22	135	0,28 C

Medias con una letra común no son significativamente diferen

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PhLSMEAN	405	0,80	0,70	1,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1622,00	135	12,01	8,03	<0,0001
amb	238,14	2	119,07	79,58	<0,0001
GEN	1383,86	133	10,40	6,95	<0,0001
Error	402,46	269	1,50		
Total	2024,46	404			

Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=0,43475

Error: 1,4961 gl: 269

amb	Medias	n	E.E.
CABILDO	77,70	135	0,11 A
PIERES	77,00	135	0,11 B
BARROW	75,84	135	0,11 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GPPLSMEAN	405	0,94	0,92	16,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1082353956,43	135	8017436,71	33,65	<0,0001
amb	1050101141,85	2	525050570,93	2203,97	<0,0001
GEN	32252814,58	133	242502,37	1,02	0,4461
Error	64083778,23	269	238229,66		
Total	1146437734,66	404			

Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=173,48110

Error: 238229,6588 gl: 269

amb	Medias	n	E.E.
PIERES	4733,42	135	42,03 A
BARROW	3493,82	135	42,03 B
CABILDO	870,88	135	42,03 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FLLSMEAN	405	0,75	0,62	0,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	284,85	135	2,11	5,98	<0,0001
amb	166,24	2	83,12	235,58	<0,0001
GEN	118,61	133	0,89	2,53	<0,0001
Error	94,91	269	0,35		
Total	379,76	404			

Test:Tukey Alfa=0,01 DMS=0,21112

Error: 0,3528 gl: 269

amb	Medias	n	E.E.
CABILDO	83,13	135	0,05 A
PIERES	82,56	135	0,05 B
BARROW	81,58	135	0,05 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,01)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
faLSMEAN	405	0,78	0,67	1343,69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,91	135	0,24	7,07	<0,0001
amb	1,98	2	0,99	29,55	<0,0001
GEN	29,93	133	0,23	6,73	<0,0001
Error	8,99	269	0,03		
Total	40,90	404			

Test: Tukey Alfa=0,01 DMS=0,06498

Error: 0,0334 gl: 269

amb	Medias	n	E.E.
BARROW	0,11	135	0,02 A
CABILDO	-0,02	135	0,02 B
PIERES	-0,04	135	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,01$)

Tabla suplementaria 2.

Estimaciones de la varianza para los efectos aleatorios y valores F para el efecto fijo (AMB) del análisis de la varianza (ANOVA) para los caracteres: peso de granos por parcela (PGP) concentración de pigmento amarillo (CPC), color amarillo (CIE b*), peso de mil granos (PMG), peso hectolítrito (PH), brillo (CIE L) y color rojo (CIE a). Los datos fueron analizados para los tres ambientes bonaerenses Pieres, Cabildo y Barrow en conjunto (A) e individualmente (B) Pieres (C) Cabildo y (D) Barrow, usando PROC GML en SAS.

GLM ANOVA Conjunto(A)

Fuente de variación	gl	PGP	%	CPC	%	CIE b*	%	PMG	%	PH	%	CIE L*	%	CIE a*	%
Amb	2	2,1E+09 ***	91,0	92,7 ***	16,5	124,37 ***	12,8	2268,2 ***	11,51	476,86 ***	12,2	331,31 ***	42,5	3,94 ***	4,8
Genotipo	134	6,2E+07 ***	2,7	346,5 ***	61,8	720,1 ***	74,0	11060 ***	56,10	2653,6 5 ***	67,9	213,37 ***	27,4	55,013 ***	67,5
Amb*Gen	268	1,2E+08 ***	5,3	107,26 ***	19,1	103,48 ***	10,6	5274,4 ***	26,75	771,17 ***	19,7	180,01 ***	23,1	16,77 ***	20,6
Rep (Bloque)	15	6531375 ***	0,3	7,97 ***	1,4	14,62 ***	1,5	303,38 **	1,54	2,71	0,1	28,41 ***	3,6	2,77 ***	3,4
Bloque(Env *Rep)	30	1,7E+07 ***	0,7	6,3 **	1,1	10,56 **	1,1	809,3 ***	4,11	5,929	0,2	25,77 ***	3,3	3,03 ***	3,7

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001

GLM Pieres (B)

Fuente de variación	gl	PGP	%	CPC	%	CIE b*	%	PMG	%	PH	%	CIE L*	%	CIE a*	%
Genotipo	134	1,1E+08 ***	86,8	63,2 ***	98,4	250,51 ***	98,4	7151,92 ***	96,8	1410,1 ***	99,6	150,64 ***	97,7	25,35 ***	99,06
Repetición	1	1,1E+07 ***	8,0	0,00 2	0,0	0,004	0,0	15,91	0,2	0,771	0,1	0,0092	0,0	4,2E-07	0,00
Rep.(Bloque)	14	6869756 **	5,2	1,01	1,6	4,0499	1,6	223,53	3,0	4,36 *	0,3	3,569	2,3	0,241	0,94

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001

GLM Cabildo(C)

Fuente de variación	g l	PGP	%	CPC	%	CIE b*	%	PMG	%	PH	%	CIE L*	%	CIE a*	%
Genotipo	1 3 4	5112320 ***	81,9	200,2 ***	96,4	345,6 ***	96,1	4100,55 ***	98,8	900,48 ***	99,7	99,4 ***	77,8	27,4 ***	87,7
Repetición	1	169335 **	2,7	4,9 ***	2,4	10,1 ***	2,8	24,88 *	0,6	0,0015	0,0	19,42 ***	15,2	3,023 ***	9,7
Rep(Bloque)	1 4	960540 ***	15,4	2,4 **	1,2	3,9 **	1,1	24,71	0,6	2,651 *	0,3	8,93 **	7,0	0,825 *	2,6

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001

GLM Barrow (D)

Fuente de variación	gl	PGP	%	CPC	%	CIE b*	%	PMG	%	PH	%	CIE L*	%	CIE a*	%
Genotipo	134	6,3E+07 ***	92,8	190,3 ***	97,1	227,46 ***	97,03	5081,58 ***	86,0	1114,3 ***	99,9	142,69 ***	86,7	19 ***	91,9
Repetición	1	435232	0,6	3,78 ***	1,9	1,656 ***	0,71	228,64 ***	3,9	0,117	0,0	9,142 ***	5,55	0,376 **	1,8
Rep(Bloque)	14	4463419 *	6,6	1,974 **	1,0	5,31 ***	2,27	596,5 **	10,1	0,73	0,1	12,75 **	7,74	1,304 *	6,3

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,01

Estimaciones de la varianza para los efectos aleatorios y valores F para el efecto fijo (AMB) del análisis de la varianza (ANOVA) para los caracteres: peso de granos por parcela (PGP) concentración de pigmento amarillo (CPC), color amarillo (CIE b*), peso de mil granos (PMG), peso hectolitro (PH), brillo (CIE L) y color rojo (CIE a). Los datos fueron analizados para los tres ambientes bonaerenses Pieres, (A) Cabildo (B) y Barrow (C) Barrow, usando PROC MIXED en SAS.

MLM Pieres (A)

Fuente de variación	PGP	%	CPC	%	CIE b*	%	PMG	%	PH	%	CIE L*	%	CIE a*	%
Genotipo	316098 ***	99,75	0,19 ***	65,1	0,81 ***	73,4	20,9 ***	64,4	5,3 ***	96,29	0,19 ***	52,5	0,09 ***	84,4
Repetición	735,4	0,23	0	0,00	0	0,00	0,02	0,08	0,002	0,04	0	0,0	0	0,0
Bloque (Rep.)	25,395	0,01	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0,016	0,29	0	0,0	0	0,0
Residual	24,9039 ***	0,01	0,10 ***	34,8	0,29 ***	26,5	11,5 ***	35,5	0,19 ***	3,39	0,1 ***	47,5	0,01 ***	15,6

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001

MLM Cabildo (B)

Fuente de variación	PGP	%	CPC	%	CIE b*	%	PMG	%	PH	%	CIE L*	%	CIE a*	%
Genotipo	11779 ***	37,6	0,7 ***	83,3	1,3 ***	86,5	14,9 ***	86,3	3,5 ***	97,2	0,2 ***	24,9	0,08 ***	61,6
Repetición	627,65	2,0	0,03	3,9	0,07	4,7	0,1	1,0	0	0,0	0,1	14,9	0,02	15,2
Bloque (Rep.)	4175,19 *	13,3	0,0075	0,8	0,01	1,2	0	0,0	0,01	0,3	0,2	29,3	0,0015	1,0
Residual	14766 ***	47,1	0,1 ***	12,0	0,11 ***	7,6	2,1 ***	12,7	0,093 ***	2,5	0,2 ***	31,0	0,032 ***	22,1

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001

MLM Barrow (C)

Fuente de variación	PGP	%	CPC	%	CIE b*	%	PMG	%	PH	%	CIE L*	%	CIE a*	%
Genotipo	161823 ***	47,6	0,7 ***	88,7	0,8 ***	87,4	13,1 ***	41,7	4,2 ***	98,1	0,37 ***	43,4	0,05 ***	52,0
Repetición	0	0,0	0,02	3,3	0,007	0,7	1,08	3,4	0,00	0,0	0,06	7,2	0,00	1,8
Bloque (Rep.)	18228 *	5,4	0,008 *	1,1	0,03 **	3,5	4,1 **	13,1	0	0,0	0,06 **	7,1	0,00 *	5,7
Residual	159922 ***	47,0	0,05 ***	6,9	0,08 ***	8,3	13,2 ***	41,7	0,08 ***	1,9	0,3 ***	42,3	0,042 ***	40,5

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001.

Tabla suplementaria 2a.

Análisis de desviación (ANODEV) para los efectos aleatorios del modelo. Componentes de la variancia para un diseño Alfa Lattice para los caracteres evaluados en el ambiente Pieres.

Carácter	Deviance SiN efecto Aleatorio	Deviance CON efecto Aleatorio	Valor LRT	Probabilidad Chi-Cuadrado
PMG	1705.3	1633.1	72,2	<.0001
PH	1233.1	879.9	353.2	<.0001
CIE L*	657.7	551	106.6	<.0001
CIE a*	167.5	-0.4	167.9	<.0001
PGP	4342.7	4294.9	47,8	<.0001
CPC	440,9	366,6	74,3	<.0001
CIE b*	794.9	690.3	104.5	<.0001

Nota: Chi-cuadrado tabulado (3,84 y 6,63) para los niveles de significación de 5% y 1%, respectivamente. Si la prueba LRT (likelihood ratio test) a través de chi-cuadrado tiene un valor de $p < 0.05$ es significativa para GEN.

Heredabilidad y parámetros genéticos para caracteres de calidad y rendimiento en variedades de trigo candeal evaluadas en Pieres obtenidos mediante los componentes de la variancia.

Parámetros genéticos	CPC	CIE b*	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	PGP
Vf	0,29	1,1	32,5	5,5	0,6	0,1	565136,93
Vg	0,19	0,81	20,9	5,3	0,4	0,09	316097,55
Ve	0,10	0,29	11,5	0,19	0,1	0,01	249039,38
h²g	65,1	73,4	64,4	96,4	73,9	84,3	55,9
h²mg	78,8	84,7	78,3	98,2	85,0	91,5	71,7
Acgen	88,8	92,0	88,5	99,0	92,2	95,6	84,7
CVg	9,6	6,6	9,9	3,0	0,8	-656,9	11,8
CVe	7,0	3,9	7,3	0,5	0,5	-282,3	10,5
CVg/CVe	1,3	1,6	1,3	5,2	1,6	2,3	1,1
PEV	0,04	0,1	4,5	0,09	0,0	0,008	89330,07
SEPP 1	0,2	0,3	2,1	0,3	0,2	0,088	298,8
SEPP2	0,2	0,3	2,1	0,3	0,2	0,091	306,1
X	4,5	13,5	46,2	77,0	82,5	-0,046	4735,3

Vf=Vg+Ve: Variancia Fenotípica, Vg: Variancia Genotípica, Ve: Variancia residual, $h^2g = Vg/Vf$: heredabilidad *100, $h^2mg = Vg / (Vg + Ve / \text{num.rep.}) * 100$: Heredabilidad media, Acgen = : Raíz Cuadrada (h^2mg): precisión en la selección de genotipos, CVg=raíz cuadrada (Vg)/Media Geral*100: Coeficiente de variación genético, CVe= Raíz Cuadrada (Ve)/ Media Geral*100: Coeficiente de variación genético, CVg/CVe=CVg/CVe: división CVg/CVe, PEV=(1-Acgen**2)*Vg: Variancia del error de predicción de los valores genotípicos, SEPP1: Raíz cuadrada (PEV): desviación estándar la variancia de los valores genotípicos (BLUP)(Resende, 2007),SEPP2: Raíz cuadrada (de los valores de la diagonal de ecuaciones de modelos mixtos (mmeqsol)): variancia desviación estándar de los valores genotípicos (BLUP) (Resende, 2007), Media general del experimento.

Análisis de desviación (ANODEV) para los efectos aleatorios del modelo. Componentes de la variancia para un diseño Alfa Lattice para los caracteres evaluados en el ambiente Cabildo.

Carácter	Deviancion SIM efecto Aleatorio	Deviancion CON efecto Aleatorio	Valor LRT	Probabilidad Qui-Quadrado
PGP	3526,7	3501,5	252	<.0001
CPC	731,4	545	186,4	<.0001
CIE b*	868.5	628.4	240.0	<.0001
PMG	1534.1	1342.7	191.3	<.0001
PH	1117.1	724	393.1	<.0001
CIE L*	604.9	577.4	27,5	<.0001
CIE a*	206.4	107.8	98,6	<.0001

Nota: Chi-cuadrado tabulado (3,84 y 6,63) para los niveles de significación de 5% y 1%, respectivamente. Si la prueba LRT (likelihood ratio test) a través de chi-cuadrado tiene un valor de $p < 0.05$ es significativa para GEN.

Heredabilidad y parámetros genéticos para caracteres de calidad y rendimiento en variedades de trigo candeal evaluadas en Cabildo

Parámetros genéticos	CPC	CIE b*	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	PGP
Vf	0,86	1.42	17.1	3.6	0.5	0.1	26494,9
Vg	0,76	1.31	14.9	3.5	0.2	0.08	11778,6
Ve	0,11	0.11	2.1	0.09	0.2	0.03	14716,3
h²g	87,3	91.9	87.1	97.4	44.5	73.3	44,4
h²mg	93,2	95.8	93.1	98.6	61.6	84.6	61,5
Acgen	96,5	97.8	96.5	99,3	78.5	91.9	78,4
CVg	16,1	8.0	8.7	2.4	0.5	-1.185.1	12,4
CVe	6,1	2.3	3.3	0.3	0.6	-714.8	13,9
CVg/CVe	2,6	3.3	2.6	6.1	0.8	1.6	0,8
PEV	0,05	0.05	1.0	0.04	0.08	0.01	4528,9
SEPP 1	0,2	0.2	1.0	0.2	0.2	0.11	67,3
SEPP 2	0,2	0.2	1.0	0.2	0.3	0.12	68,8
X	5,3	14.1	44.2	77.7	83.1	-0.025	872,8

Vf=Vg+Ve: Variancia Fenotípica, Vg: Variancia Genotípica, Ve: Variancia residual, $h^2g = Vg/Vf$: heredabilidad *100, $h^2mg = Vg / (Vg + Ve / \text{num.rep.}) * 100$: Heredabilidad media, **Acgen** = Raíz Cuadrada (h^2mg): precisión en la selección de genotipos, **CVg**=raíz cuadrada (Vg)/Media Geral*100: Coeficiente de variación genético, **CVe**= Raíz Cuadrada (Ve)/ Media Geral*100: Coeficiente de variación genético, **CVg/CVe**=CVg/CVe: división CVg/CVe, **PEV**= (1-Acgen**2)*Vg: Variancia del error de predicción de los valores genotípicos, **SEPP1**: Raíz cuadrada (PEV): desviación estándar la varianza de los valores genotípicos (BLUP)(Resende, 2007), **SEPP2**: Raíz cuadrada (de los valores de la diagonal de ecuaciones de modelos mixtos (mmeqsol)): varianza desviación estándar de los valores genotípicos (BLUP) (Resende, 2007), Media general del experimento

Análisis de desviación (ANODEV) para los efectos aleatorios del modelo. Componentes de la variancia para un diseño Alfa Lattice para los caracteres evaluados en el ambiente Barrow

Carácter	Deviance SIM efecto Aleatorio	Deviance CON efecto Aleatorio	Valor LRT	Probabilidad Qui-Quadrado
----------	-------------------------------	-------------------------------	-----------	---------------------------

PGP	4190.5	4153.1	373.473	<.0001
CPC	702.9	450.6	252.272	<.0001
CIE b*	759.9	536.9	223.038	<.0001
PMG	1670.5	1634.3	36,23	<.0001
PH	1162.8	721.2	441.639	<.0001
CIE L*	696.7	660.1	366.186	<.0001
CIE a*	148.3	102.5	45,82	<.0001

Nota: Chi-cuadrado tabulado (3,84 y 6,63) para los niveles de significación de 5% y 1%, respectivamente. Si la prueba LRT (likelihood ratio test) a través de chi-cuadrado tiene un valor de $p < 0.05$ es significativa para GEN.

Heredabilidad y parámetros genéticos para caracteres de calidad y rendimiento en 133 variedades de trigo candeal evaluadas en Barrow.

Parámetros genéticos	CPC	CIE b*	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	PGP
Vf	0,7	0.9	26.3	4.3	0.7	0.09	321745,2
Vg	0,7	0.8	13.1	4.2	0.3	0.05	161822,8
Ve	0,05	0.08	13.2	0.08	0.3	0.04	159922,3
h²g	92,7	91.2	49.9	98.0	50.6	56.1	50,2
h²mg	96,2	95.4	66.6	99.0	67.2	71.9	66,9
Acgen	98,1	97.6	81.6	99.5	82.0	84.7	81,8
CVg	17,4	7.0	7.5	2.7	0.7	209.3	11,5
CVe	4,8	2.1	7.5	0.37	0.7	185.0	11,4
CVg/CVe	3,5	3.2	1.0	7.1	1.0	1.1	1,0
PEV	0,02	0.03	4.4	0.04	0.1	0.01	53516,95
SEPP 1	0,16	0.19	2.0	0.20	0.3	0.1	231,3
SEPP 2	0,18	0.22	2.1	0.26	0.3	0.1	236,4
X	4,8	13.19	48.3	75.8	81.5	0.1	3495,0

Vf=Vg+Ve: Variancia Fenotípica, Vg: Variancia Genotípica, Ve: Variancia residual, $h^2g = Vg/Vf$: heredabilidad *100, $h^2mg = Vg / (Vg + Ve / \text{num.rep.}) * 100$: Heredabilidad media, Acgen= : Raíz Cuadrada (h^2mg): precisión en la selección de genotipos, CVg=raíz cuadrada (Vg)/Media Geral*100: Coeficiente de variación genético, CVe= Raíz Cuadrada (Ve)/ Media Geral*100: Coeficiente de variación genético, CVg/CVe=CVg/CVe: división CVg/CVe, PEV= (1-Acgen**2)*Vg: Variancia del error de predicción de los valores genotípicos, SEPP1: Raíz cuadrada (PEV): desviación estándar la varianza de los valores genotípicos (BLUP)(Resende, 2007), SEPP2: Raíz cuadrada (de los valores de la diagonal de ecuaciones de modelos mixtos (mmeqsol)): varianza desviación estándar de los valores genotípicos (BLUP) (Resende, 2007), Media general del experimento

Tabla suplementaria 3

Rankin de genotipos superiores para los tres ambientes

Valores genotípicos para la variable (PMG) teniendo en cuenta los tres ambientes

Ranque	GEN	g (BLUPS)	SEPg	valor t (g)	Pr > t (g)	gem (int, media,	u+g+gem	Ganancia	Media
--------	-----	-----------	------	-------------	-------------	------------------	---------	----------	-------

1	32	68539	16463	4,16	<0,0001	1,1843	54,3416	6,85391	53,1573
2	126	51834	16458	3,15	0,0018	0,8956	52,3824	6,01865	52,3221
3	45	50346	16458	3,06	0,0024	0,8699	52,2079	5,69064	51,994
4	56	48899	16463	2,97	0,0032	0,8449	52,0382	5,49046	51,7939
5	90	47395	16458	2,88	0,0042	0,8189	51,8618	5,34026	51,6437
6	122	47273	16463	2,87	0,0043	0,8168	51,8475	5,2381	51,5415
7	118	45038	16458	2,74	0,0065	0,7782	51,5854	5,1332	51,4366
8	3	41913	16458	2,55	0,0113	0,7242	51,2189	5,01546	51,3189
9	81	41284	16463	2,51	0,0126	0,7133	51,1452	4,9169	51,2203
10	82	41032	16468	2,49	0,0132	0,7090	51,1156	4,83553	51,1389
11	73	40670	16458	2,47	0,0139	0,7027	51,0732	4,76567	51,0691

Tabla suplementaria 4 Valores genotípicos para la variable (PH) teniendo en cuenta los tres ambientes.

Ranque	GEN	g (BLUPS)	SEPg	valor t (g)	Pr > t (g)	gem (int, media,	u+g+gem	Ganancia	Media
1	3	3,9295	0,6691	5,87	<0,0001	0,6364	81,432	3,929	80,796
2	81	2,7989	0,6691	4,18	<0,0001	0,4533	80,119	3,364	80,231
3	4	2,7339	0,6691	4,09	<0,0001	0,4427	80,043	3,154	80,021
4	41	2,417	0,6691	3,61	0,0003	0,3914	79,675	2,970	79,836
5	40	2,3802	0,6691	3,56	0,0004	0,3855	79,632	2,852	79,718
6	32	2,3667	0,6691	3,54	0,0005	0,3833	79,617	2,771	79,638
7	64	2,3635	0,6691	3,53	0,0005	0,3828	79,613	2,713	79,579
8	37	2,2912	0,6691	3,42	0,0007	0,3710	79,529	2,660	79,527
9	90	2,2283	0,6691	3,33	0,0010	0,3609	79,456	2,612	79,479
10	76	2,1472	0,6691	3,21	0,0015	0,3477	79,361	2,566	79,432

Tabla suplementaria 5. Matriz de estructura poblacional (Q).

VARIEDAD	GENOTIPO	ORDEN MA	ORIGEN	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q
Gherardo574	84	AM84	Italia	0,614	0,107	0,018	0,014	0,022	0,224	1
Maristella	85	AM85	Italia	0,815	0,025	0,015	0,028	0,074	0,043	1
Polesine	86	AM86	Italia	0,726	0,034	0,021	0,053	0,118	0,047	1
Taganrog	88	AM88	Argentina	0,955	0,004	0,010	0,017	0,008	0,007	1
TaganrogBuckBalcarce	89	AM89	Argentina	0,983	0,003	0,003	0,003	0,004	0,005	1
TaganrogSel,BUCK	90	AM90	Argentina	0,983	0,003	0,003	0,003	0,004	0,004	1
TaganrogVilelaFideos	91	AM91	Argentina	0,968	0,007	0,004	0,005	0,007	0,008	1
OmRabi5	92	AM92	WANA	0,859	0,027	0,014	0,019	0,023	0,058	1
BilikNo2	93	AM93	WANA	0,558	0,022	0,006	0,375	0,027	0,012	1
Marrout	94	AM94	WANA	0,429	0,494	0,007	0,007	0,046	0,018	1 M
Simeto	13	AM13	Italia	0,012	0,535	0,382	0,006	0,031	0,034	2
Omguer4	96	AM96	WANA	0,006	0,922	0,006	0,044	0,008	0,015	2
Gan	97	AM97	CIMMyT	0,006	0,955	0,006	0,011	0,005	0,016	2
Cham1(Waha)	98	AM98	WANA	0,005	0,944	0,007	0,005	0,015	0,024	2
Korifla(Cham3)	99	AM99	WANA	0,005	0,960	0,004	0,007	0,005	0,018	2
Haurani	103	AM103	WANA	0,009	0,923	0,008	0,013	0,004	0,043	2
Heider//Mt/Ho	104	AM104	WANA	0,002	0,972	0,006	0,011	0,003	0,005	2
OmRabi	107	AM107	WANA	0,034	0,821	0,096	0,021	0,013	0,016	2
Dupri	109	AM109	Italia	0,019	0,454	0,230	0,246	0,042	0,010	2 M
Biensur	112	AM112	Francia	0,002	0,971	0,011	0,006	0,006	0,005	2
Sachem	116	AM116	Francia	0,006	0,923	0,019	0,027	0,012	0,014	2
Duetto	117	AM117	Francia	0,048	0,571	0,019	0,346	0,010	0,007	2
BuckPlatino	1	AM1	Argentina	0,003	0,031	0,010	0,943	0,007	0,006	3
CBW0111	55	AM55	Argentina	0,058	0,141	0,359	0,012	0,082	0,347	3
Kofa	66	AM66	EE,UU	0,047	0,171	0,559	0,185	0,021	0,017	3
Focha	100	AM100	CIMMyT	0,002	0,004	0,973	0,010	0,005	0,006	3
Bha	101	AM101	WANA	0,008	0,010	0,958	0,009	0,007	0,009	3
BuckNo6	102	AM102	CIMMyT	0,111	0,015	0,802	0,008	0,026	0,038	3
OmRabi6	105	AM105	WANA	0,004	0,474	0,498	0,004	0,008	0,012	3 M
OmRabi3(Cham5)	108	AM108	WANA	0,008	0,007	0,953	0,020	0,005	0,007	3
Durobonus	110	AM110	Francia	0,109	0,068	0,674	0,007	0,080	0,062	3
Joyau	111	AM111	Francia	0,002	0,077	0,907	0,006	0,004	0,004	3
Orlu	113	AM113	Francia	0,113	0,012	0,694	0,051	0,092	0,038	3
Karur	114	AM114	Francia	0,025	0,220	0,350	0,224	0,055	0,127	3 M
Garic	118	AM118	Francia	0,003	0,009	0,970	0,008	0,004	0,006	3

VARIEDAD	GENOTIPO	ORDEN MA	ORIGEN	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q
Byblos	119	AM119	Francia	0,006	0,005	0,951	0,010	0,020	0,008	3
Vivadur	120	AM120	Francia	0,015	0,010	0,915	0,005	0,038	0,017	3
Nautilur	121	AM121	Francia	0,014	0,004	0,951	0,009	0,007	0,015	3
Exeldur	123	AM123	Francia	0,025	0,006	0,950	0,007	0,006	0,006	3
Argeles	124	AM124	Francia	0,004	0,007	0,952	0,021	0,006	0,011	3
Artimon	125	AM125	Francia	0,004	0,005	0,980	0,004	0,003	0,005	3
Portorico	126	AM126	Italia	0,003	0,004	0,933	0,049	0,006	0,005	3
BuckEsmeralda	3	AM3	Argentina	0,017	0,029	0,044	0,852	0,046	0,012	4
BuckCristal	4	AM4	Argentina	0,003	0,053	0,012	0,914	0,009	0,009	4
BuckAmbar	5	AM5	Argentina	0,028	0,006	0,046	0,897	0,008	0,015	4
BonINTAFacon	6	AM6	Argentina	0,006	0,018	0,011	0,874	0,075	0,015	4
BonINTACarilo	7	AM7	Argentina	0,023	0,014	0,014	0,580	0,224	0,145	4
Duilio	12	AM12	Italia	0,009	0,004	0,008	0,969	0,004	0,006	4
65-IAT2	14	AM14	CIMMyT	0,003	0,006	0,007	0,975	0,005	0,004	4
66-IAT2	15	AM15	CIMMyT	0,003	0,005	0,006	0,978	0,003	0,005	4
69-IAT2	16	AM16	CIMMyT	0,003	0,007	0,005	0,965	0,011	0,008	4
71-IAT2	17	AM17	CIMMyT	0,004	0,004	0,005	0,978	0,005	0,004	4
73-IAT2	18	AM18	CIMMyT	0,003	0,008	0,010	0,970	0,004	0,005	4
80-IAT2	19	AM19	CIMMyT	0,004	0,005	0,004	0,979	0,005	0,004	4
VF0154	20	AM20	CIMMyT	0,007	0,026	0,007	0,912	0,016	0,033	4
VF042	21	AM21	Argentina	0,009	0,007	0,008	0,888	0,016	0,073	4
VF0113	22	AM22	Argentina	0,004	0,029	0,012	0,930	0,010	0,016	4
VF0136	27	AM27	CIMMyT	0,006	0,038	0,038	0,794	0,009	0,115	4
VF0137	28	AM28	CIMMyT	0,006	0,014	0,006	0,906	0,023	0,045	4
B#24	29	AM29	Argentina	0,007	0,010	0,005	0,727	0,146	0,105	4
B#27	31	AM31	Argentina	0,009	0,005	0,011	0,949	0,005	0,021	4
ACA1801F	32	AM32	Argentina	0,024	0,014	0,008	0,812	0,031	0,111	4
CBW0105	33	AM33	Argentina	0,007	0,011	0,005	0,968	0,004	0,006	4
CBW0112	34	AM34	Argentina	0,195	0,009	0,008	0,485	0,046	0,257	4 M
Italo	44	AM44	Italia	0,009	0,125	0,007	0,461	0,039	0,359	4 M
CBW0001	50	AM50	CIMMyT	0,010	0,017	0,027	0,798	0,131	0,017	4
CBW0004	52	AM52	CIMMyT	0,005	0,006	0,010	0,887	0,086	0,006	4
UC1113	67	AM67	EE,UU	0,009	0,009	0,135	0,817	0,012	0,018	4
ITA-1AB	82	AM82	Italia	0,218	0,063	0,020	0,651	0,011	0,037	4
GAB125	83	AM83	Italia	0,264	0,131	0,025	0,497	0,053	0,030	4 M
Gallareta(Altar84)	95	AM95	CIMMyT	0,007	0,364	0,007	0,552	0,037	0,032	4
Wadalmes-1	106	AM106	WANA	0,004	0,101	0,173	0,683	0,023	0,017	4
Tiziannia	122	AM122	Italia	0,003	0,340	0,039	0,599	0,009	0,010	4

VARIEDAD	GENOTIPO	ORDEN MA	ORIGEN	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q
DGE-1	127	AM127	EE,UU	0,019	0,022	0,159	0,711	0,014	0,075	4
CBW0002	51	AM51	CIMMyT	0,003	0,039	0,017	0,439	0,490	0,012	5 M
CBW0101	54	AM54	Argentina	0,006	0,030	0,011	0,359	0,588	0,007	5
CBW0156	56	AM56	Argentina	0,004	0,007	0,004	0,017	0,962	0,006	5
Arbois	57	AM57	Francia	0,004	0,031	0,017	0,023	0,918	0,006	5
Alcalou	58	AM58	Francia	0,009	0,023	0,113	0,029	0,801	0,025	5
Fortore	60	AM60	Italia	0,003	0,009	0,006	0,004	0,962	0,017	5
Ardente	61	AM61	Francia	0,255	0,011	0,019	0,234	0,448	0,033	5 M
Appullo	62	AM62	Italia	0,005	0,018	0,020	0,021	0,924	0,012	5
Creso	68	AM68	Italia	0,007	0,005	0,003	0,011	0,963	0,011	5
Gabbiano	69	AM69	Italia	0,007	0,005	0,007	0,011	0,942	0,028	5
Granato	70	AM70	Italia	0,010	0,049	0,010	0,007	0,875	0,049	5
Capeiti	71	AM71	Italia	0,007	0,005	0,011	0,012	0,955	0,011	5
Gherardo575	72	AM72	Italia	0,032	0,009	0,008	0,013	0,929	0,009	5
Gherardo610	73	AM73	Italia	0,005	0,004	0,004	0,006	0,970	0,010	5
Gherardo645	74	AM74	Italia	0,060	0,034	0,019	0,007	0,863	0,017	5
BonaerenseValverde	75	AM75	Argentina	0,010	0,023	0,011	0,004	0,934	0,018	5
BonaerenseQuilaco	76	AM76	Argentina	0,011	0,008	0,087	0,033	0,819	0,043	5
BF1776	77	AM77	Argentina	0,006	0,009	0,005	0,010	0,964	0,006	5
Etit38	78	AM78	WANA	0,020	0,032	0,052	0,021	0,735	0,140	5
BalcarcenoINTA	79	AM79	Argentina	0,004	0,003	0,004	0,006	0,976	0,007	5
BuckMechongue	80	AM80	Argentina	0,012	0,013	0,007	0,018	0,937	0,013	5
CandealDurumbuck	81	AM81	Argentina	0,009	0,039	0,008	0,017	0,904	0,022	5
BuckTopacio	2	AM2	Argentina	0,006	0,027	0,018	0,010	0,033	0,907	6
BonINTACumenay	8	AM8	Argentina	0,038	0,010	0,016	0,015	0,069	0,851	6
Ciccio	9	AM9	Italia	0,005	0,016	0,020	0,006	0,008	0,945	6
Adamello	10	AM10	Italia	0,006	0,031	0,024	0,007	0,030	0,902	6
CERZOS-1	11	AM11	Italia	0,011	0,057	0,019	0,019	0,019	0,874	6
VF0163	23	AM23	Argentina	0,041	0,040	0,010	0,034	0,015	0,859	6
VF003	24	AM24	CIMMyT	0,082	0,106	0,009	0,376	0,020	0,406	6 M
VF0121	25	AM25	Argentina	0,041	0,006	0,006	0,311	0,017	0,619	6
VF0167	26	AM26	Argentina	0,014	0,024	0,008	0,169	0,324	0,461	6 M
B#25	30	AM30	Argentina	0,006	0,012	0,016	0,180	0,072	0,714	6
CBW0141	36	AM36	Argentina	0,007	0,087	0,012	0,016	0,010	0,868	6
CBW0153	37	AM37	Argentina	0,004	0,007	0,013	0,017	0,006	0,954	6
CBW0200	38	AM38	Argentina	0,008	0,006	0,010	0,015	0,027	0,933	6
CBW0225	40	AM40	Argentina	0,005	0,027	0,015	0,074	0,026	0,853	6

VARIEDAD	GENOTIPO	ORDEN MA	ORIGEN	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q
CBW0230	41	AM41	Argentina	0,003	0,019	0,010	0,020	0,007	0,941	6
Cannizzo	42	AM42	Italia	0,009	0,007	0,005	0,008	0,007	0,964	6
Concadoro	43	AM43	Italia	0,007	0,060	0,011	0,013	0,009	0,899	6
Catervo	45	AM45	Italia	0,024	0,073	0,379	0,004	0,008	0,512	6
Cantico	46	AM46	Italia	0,013	0,009	0,008	0,021	0,010	0,939	6
Core	47	AM47	Italia	0,048	0,011	0,014	0,047	0,006	0,874	6
Ci1936	48	AM48	Italia	0,023	0,008	0,004	0,006	0,007	0,952	6
Co1937	49	AM49	Italia	0,018	0,036	0,025	0,004	0,022	0,895	6