

# Materiales y Métodos

## 1. Material Vegetal

Para el presente trabajo se utilizó una población RILs derivada del cruzamiento entre UC1113 x Kofa, que fue desarrollada y gentilmente cedida por el Dr. Jorge Dubcosvky (*University of California, Davis*) en F<sub>5</sub>. Kofa es una variedad del desierto desarrollada por *Western Plant Breeders* (ahora *WestBred*) que tiene excelente calidad de pasta (óptimo color de sémola y pasta, alto contenido de proteína y buena fuerza gluten). UC1113 es una línea del programa de mejoramiento de trigo de la *University of California, Davis* seleccionada de la cruce CD52600 de CIMMYT (KIFS//RSS/BD1419/3/MEXIS-CP /4/ WAHAS/5/YAV79). Esta línea tiene excelente comportamiento agronómico pero parámetros de calidad de pasta intermedios. Plantas F<sub>2</sub> fueron autofecundadas y conducidas por el método SSD (*simple seed descent*) (Brim 1966), hasta la generación F<sub>9-10</sub>. Las 93 RILs y 10 testigos (Kofa, UC1113 y ocho variedades locales Buck Platino, Buck Topacio, Buck Esmeralda, Buck Cristal, Buck Ambar, Bonaerense INTA Facon, Bonaerense INTA Carilo y Bonaerense INTA Cumenay) fueron evaluados durante las campaña 2006/07 y 2007/08 en las localidades de Cabildo (39°36' S 61°64' O), Tres Arroyos (38°20' S 60°13' O) y Balcarce (37° 45' S 58° 18' O), que se denominaran ACA-Cabildo, CEI-Barrow e INTA-Balcarce, respectivamente. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar (BCA) con tres repeticiones. El tamaño de parcela fue de 3 m<sup>2</sup>, con 3 surcos de 5 m. espaciados a 0,20 m. Cada experimento recibió condiciones particulares de manejo y fertilización adecuadas a la zona y criterios del campo experimental.

En este trabajo cada combinación de año x localidad se denominará ambiente, indicados en números romanos de I– VI como sigue: I) ACA-Cabildo 2006/07, II) CEI-Barrow 2006/07, III) INTA-Balcarce 2006/07, IV) ACA-Cabildo 2007/08, V) CEI-Barrow 2007/08, VI) INTA-Balcarce 2007/08.

El periodo del cultivo se extendió entre Julio y Enero, con siembras realizadas principalmente a mediados de Agosto. La cosecha se realizó entre mediados de diciembre y mediados de enero. El cultivo emergió aproximadamente en los 20 días posteriores a la siembra. En el ambiente I, las RILs 1, 2, 3 y 47 no fueron sembradas por falta de semilla. Por otro lado, algunas parcelas experimentales no fueron cosechadas por fallas en la emergencia o problemas en la siembra (ambiente II: 3 parcelas; ambiente VI: 11 parcelas).

## 2. Evaluación fenotípica

Los experimentos fueron seguidos a lo largo de todo su ciclo registrándose el número de plantas emergidas ( $PL/m^2$ ), la fecha de espigazón y floración, la altura de las parcelas (ALT), el número de espigas por  $m^2$  ( $ESP/m^2$ ) y se colectaron 10 plantas individuales por parcela para análisis de componentes de rendimiento que son objeto de otra tesis doctoral en curso (Lic. Pavan Akkiraju). El peso de las parcelas (Kg/ha), de 1000 granos (PMG) y el peso hectolitrito (PH) fueron registrados luego de la cosecha y son parte de la tesis de magíster de la Ing. Patricia Gómez. Algunas de estas variables fueron utilizadas en un análisis de correlación entre variables de color y rendimiento.

La producción de cada parcela experimental fue acondicionada de manera de obtener granos limpios, los cuales fueron conservados a temperatura ambiente hasta la molienda. Las muestras de harina integral se obtuvieron utilizando un molino UDY Cyclone Mill (*Cyclone Sample Mill, UDY Corporation*) y fueron conservadas a 4°C hasta el momento de realizar las determinaciones. El total de fracciones combinadas referidas como “harina integral”, incluyen la harina, la cual es principalmente endosperma, y el salvado, una asociación de las capas que cubren la semilla, aleurona, algo de harina y el germen. Muestras de sémola de los testigos comerciales se obtuvieron utilizando un molino experimental Brabender Júnior (Laboratorio de Calidad Industrial de Granos de la Chacra Experimental Integrada Barrow) sobre 100 g de grano por parcela.

El CPC en las RILs se determinó utilizando el micrométodo informado por Fares *et al.* (1991). La confiabilidad y precisión del micrométodo fue previamente evaluada sobre los testigos comerciales de la campaña 2006/07, en los cuales se midió el CPC en sémola y harina integral utilizando el método estándar AACC 14-50 y el CPC en harina integral según el micrométodo. En cada caso, se realizó una extracción de pigmentos por parcela experimental.

### 2.1 Micrométodo de Fares *et al.* (1991)

La extracción del CPC se realizó sobre muestras de 1,00 g de harina integral utilizando 5 ml de n-butanol saturado en agua por 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 del extracto claro en un espectrofotómetro (METROLAB 1600 PLUS,

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  $\beta$ -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

251= coeficiente de extinción del  $\beta$ -caroteno a 448 nm

Los valores de CPC obtenidos en las RILs usando el micrométodo no fueron corregidos en función del grado de humedad de la harina. Esto se debe a que como fuera determinado previamente sobre los testigos comerciales, los valores de CPC en muestras corregidas por humedad y muestras sin corregir se encuentran altamente correlacionadas ( $r=0,999$ ,  $p \leq 0,0001$ ). La variación de humedad entre muestras fue mínima. El test de ANOVA entre muestras corregidas por humedad y muestras sin corregir mostró que las mismas no difirieron significativamente ( $\alpha= 0,01$ ).

## 2.2 Método estándar AACC 14-50

El CPC se determinó utilizando 8,00 g de muestra, corregidas en función del 14% de humedad. Las muestras se colocaron en frascos de vidrio de igual tamaño, con 40 ml de alcohol n-butílico saturado en agua y se agitaron vigorosamente (170 rpm) por 1 minuto. Luego se incubaron en reposo durante la noche (16-18 hs.). Finalizado este período, se agitaron por 1 minuto en las condiciones antes mencionadas. El extracto fue filtrado a través de un filtro Whatman No. 1 y las lecturas de absorbancia se realizaron en espectrofotómetro a 436 nanómetros (nm). La fórmula utilizada para calcular el contenido de pigmentos fue:

$$\frac{A_s}{A_{st}} \times \frac{V}{100} \times 1000$$

----- =  $\mu\text{g/g}$  de pigmento

Peso seco de la muestra

Donde  $A_s$  = absorbancia de la muestra

$A_{st}$  = absorbancia estándar de un miligramo de pigmento por 100 mililitros de solución

V = volumen de la solución de extracción

El CPC, expresado en ppm de  $\beta$ -caroteno, no representa estrictamente la cantidad de  $\beta$ -caroteno presente, ya que el grupo mayoritario de pigmentos que detecta este método son xantofilas (luteína libre y sus esteres) y los valores obtenidos son valores relativos de pigmentos, no absolutos (Johnston *et al.*, 1980). La absorptividad utilizada para calcular el CPC (ppm) es 1,663 para el  $\beta$ -caroteno (Sims & Lepage, 1968). La extracción del CPC según el método estándar fue realizada en sémola y harina integral de los testigos comerciales.

### 2.3 Medición del color amarillo

En 1946, la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) aprobó los valores triestímulos X, Y y Z como la medición de la contribución proporcional de los componentes rojo, verde y azul del espectro visible, para simular la evaluación visual. Sin embargo, es difícil determinar el color actual de un objeto basado solamente en los valores triestímulo XYZ. Estos son, más frecuentemente usados como punto de partida para el cálculo de otros valores de color que facilitan la lectura del color de un objeto. Además, comparar los valores triestímulos entre las muestras es dificultoso, porque los ojos son más sensibles a los cambios en algunos colores que en otros (Hunter, 1975). A fin de resolver este problema, la CIE en 1976 recomendó el sistema  $L^*a^*b^*$  o CIELAB dentro del espacio tridimensional de color, donde los valores  $L^*a^*b^*$  son calculado a partir de los valores triestímulo XYZ. Este espacio de color CIELAB está organizado en forma de cubo.

Para la medición de color se emplea comúnmente una iluminación difusa producida por una lámpara pulsátil de arco de xenón. Las lecturas de color se expresan como valores triestímulo (CIE  $L^*a^*b^*$ ), donde  $L^*$  representa la **brillosidad** (claridad) sobre una escala de unidades que va desde 0 (negro puro) a 100 (blanco puro),  $a^*$  describe la cromaticidad **verde-rojo** donde los valores positivos son rojos y los negativos verdes y  $b^*$  la cromaticidad **amarillo-azul** donde los valores positivos son amarillos y los negativos azules.  $a^*$  y  $b^*$  no tienen límites numéricos específicos. Los valores de  $b^*$  proporcionan una medida de la amarillez en las muestras de harina.

Existen dos tipos de instrumentos que miden el color de un objeto: aquellos que miden directamente los valores triestímulo, llamados colorímetros, y los que miden la magnitud radiométrica o fotométrica que caracteriza a la fuente o al objeto a partir de la cual se calculan los valores triestímulos (espectrofotómetros y

espectrorradiómetros). Los colorímetros miden el color de fuentes de radiación primarias y secundarias, obteniendo directamente los valores triestimulo XYZ de formas óptica, no matemática.

Se evaluó entonces, el color de la harina integral en la población de RILs, los progenitores y testigos comerciales, tomando una muestra de cada parcela experimental. Se utilizó un colorímetro Minolta Chromameter CR-310 (CIE  $L^*a^*b^*$ , 1976). Para realizar la medición de color, fueron depositados aproximadamente 20-25 g de harina integral sobre una bandeja de aluminio donde se homogenizó la muestra. Posteriormente se llenó al ras un recipiente contenedor del equipo colorímetro, que cuenta como fondo con un cristal. Se coloca la tapa sobre el recipiente cubierto completamente la harina o sémola y se invierte la misma. Sobre el cristal se coloca el cabezal de medición de color que cierra herméticamente.



**Figura 10:** Equipo colorímetro Minolta CR-310 (A). Plato de calibración de blanco y recipiente contenedor (B). Cabezal de medición de color (C). Muestras de harina y equipo Minolta (D).

Con la utilización de un botón disparador se proyecta un haz de luz que reflexiona sobre la muestra y es captado por un receptor que lo convierte en valores triestímulo  $L^*a^*b^*$ .

En los testigos comerciales el color de la sémola y harina integral, obtenida a partir de cada parcela, se midió también utilizando el colorímetro Minolta Chromameter CR-310. 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.

### 3. Estimación de parámetros

La normalidad de los datos por ambiente fue evaluada a través del método de Shapiro-Wilk. El análisis de la varianza (ANOVA) se realizó para cada ambiente, según el modelo:

$$Y_{ij} = \mu + B_i + G_j + \varepsilon_{ij} .$$

Para el ANOVA conjunto los efectos de localidad y año fueron considerados como factores individuales y se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + (B / A) / L_{jkm} + G_i + A_j + L_k + GA_{ij} + GL_{ik} + AL_{jk} + GAL_{ijk} + \varepsilon_{ijkm}$$

Donde:  $\mu$  = media general

$(B / A) / L_{jkm}$  = efecto de m-esimo bloque dentro del j-esimo año y la k-esima localidad ( $k=1,2,\dots,r$ ).

$G_i$  = efecto del i-esimo genotipo ( $i=1,2,3,\dots,i$ ).

$A_j$  = efecto del j-esimo genotipo ( $j=1,2,3,\dots,a$ ).

$L_k$  = efecto del k-esimo genotipo ( $k=1,2,3,\dots,l$ ).

$GA_{ij}$  = efecto de la interacción del i-esimo genotipo con el j-esimo año.

$GL_{ik}$  = efecto de la interacción del i-esimo genotipo con la k-esima localidad.

$AL_{jk}$  = efecto de la interacción del j-esimo año con la k-esima localidad.

$GAL_{ijk}$  = efecto de la interacción del i-esimo genotipo con el j-esimo año y la k-esima localidad.

$\varepsilon_{ijkm}$  = error experimental aleatorio en cada parcela

El genotipo, repeticiones, localidades y años fueron considerados como factores aleatorios. El test de normalidad de los datos, los estadísticos estándar, el ANOVA, el test de DUNCAN y los análisis de correlación fenotípica fueron realizados con el programa SAS 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Para el ANOVA se utilizó el procedimiento GLM, mientras que los análisis de correlación fueron realizados con el procedimiento CORR. Para la selección fenotípica, el cálculo de ganancia genética y la estimación de los parámetros genéticos de heredabilidad, varianza genotípica y fenotípica, se utilizó el programa GENES (<http://www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>).

La heredabilidad de los caracteres fue estimada en sentido estricto como la razón entre la varianza genética aditiva,  $(\sigma_a^2)$ , y la varianza fenotípica,  $(\sigma_f^2)$ :  $h^2 = \sigma_a^2 / \sigma_f^2$ . La varianza genética aditiva,  $(\sigma_a^2)$ , y la varianza fenotípica,  $(\sigma_f^2)$  fueron estimadas por el método de los momentos. La ganancia genética (GG) obtenida por selección fenotípica fue calculada como el diferencial de selección, DS ( $DS = \bar{X}_s - \bar{X}_o$ ) multiplicada por la heredabilidad estricta:  $GG = (DS).h^2$ ,  $\%GG = 100(GG) / \bar{X}_o$ .

La GG debida a la selección por los marcadores ligados a QTL, se obtuvo considerando QTLs individuales y combinados. La aditividad de los QTLs se evaluó considerando la diferencia (Di) entre el DS observado (DS<sub>o</sub>) y el esperado (DS<sub>e</sub>), estimando el valor de DS<sub>e</sub> como la suma de los DS<sub>o</sub> de los QTLs considerados en la

combinación., esto es:  $DS_e = \sum_{i=1}^n DS_{Q_i}$ ,  $i = 1, 2, 3 \dots n$ ).

#### 4. Mapeo de QTL

La matriz molecular utilizada en la confección del mapa genético informado por Zhang *et al.* (2008) fue cedida por el Dr. Jorge Dubcovsky, en función de la colaboración establecida. Brevemente, el mapa genético utilizado en el análisis de QTL contó con un total de 269 marcadores incluyendo 230 SSR, 23 marcadores SNP, 10 RFLP, 3 STS, 2 proteínas y 1 marcador morfológico. La longitud total del mapa fue de 2140 cM, con un largo promedio por cromosoma de 153 cM (Zhang *et al.*, 2008). El análisis de ligamiento fue realizado usando el programa MapMaker versión 3.0b (Lander *et al.*,

1987). Las distancias genéticas fueron calculadas con la función de mapeo de Kosambi (1944). Las regiones genómicas en las cuales el orden de los marcadores tuvo valores de LOD menores a 2,0 son indicados por líneas verticales sobre los cromosomas reproducidos en esta tesis.

El mapeo de QTL se realizó con el programa Windows QTLCartographer (Wang *et al.*, 2004) utilizando el modelo 6 del método de mapeo por intervalo compuesto (*Composite Interval Mapping-CIM*) con velocidad de avance de 0,5 cM, método de regresión 3 (*Forward and Backward method*) para la selección de cofactores con probabilidad de entrada y salida de 5% y tamaño de ventana de 10 cM. La posición del posible QTL fue confirmada cuando el valor mayor de LOD estimado superó el valor umbral de significancia ( $\alpha=0,05$ ) establecido mediante el método de 1000 permutaciones (Churchill & Doerge, 1994; Doerge & Churchill, 1996).

Se consideraron probables aquellos QTLs que presentaron valores de LOD superiores a dos e inferiores al valor de significancia. Para el mapeo de QTLs asociados al CIE b\* y el CPC la media de cada ambiente así como la media de cada campaña y la media de las dos campañas fueron usadas como vectores fenotípicos. El efecto aditivo de cada QTL fue estimado como la diferencia media (en unidades del carácter) entre los dos grupos genotípicos de RILs portando los alelos de Kofa y UC1113. Un valor positivo significa que el alelo de Kofa incrementa el valor fenotípico mientras que un valor negativo implica que el alelo de UC1113 aumenta el valor fenotípico (Marza *et al.*, 2006).

Todos aquellos marcadores más próximos al pico del QTL y estables (presentes al menos en tres ambientes), fueron analizados en un ANOVA con la finalidad de identificar interacciones entre todos los pares posibles de QTLs identificados para cada carácter. El ANOVA se realizó con el programa SAS versión 9.0 PROC GLM (SAS Institute Inc., Cary, NC).

# Resultados y Discusión

## 1. Experimentos a campo

Las 93 RILs, los genotipos parentales y los 8 testigos comerciales utilizados, totalizando 1828 parcelas experimentales fueron cosechados en los seis ambientes de cultivo. La **Figura 11** muestra fotografías de los ensayos implantados en los tres campos experimentales donde se desarrollo el trabajo de investigación.



**Figura 11:** Fotografías de diferentes estadios fenológicos (emergencia, espigazón y madurez) del trigo candeal en los ensayos realizados para esta tesis en los campos experimentales de INTA-Balcarce (A), CEI-Barrow (B,C,F) y ACA-Cabildo (D,G)

## 2. Análisis de datos fenotípicos

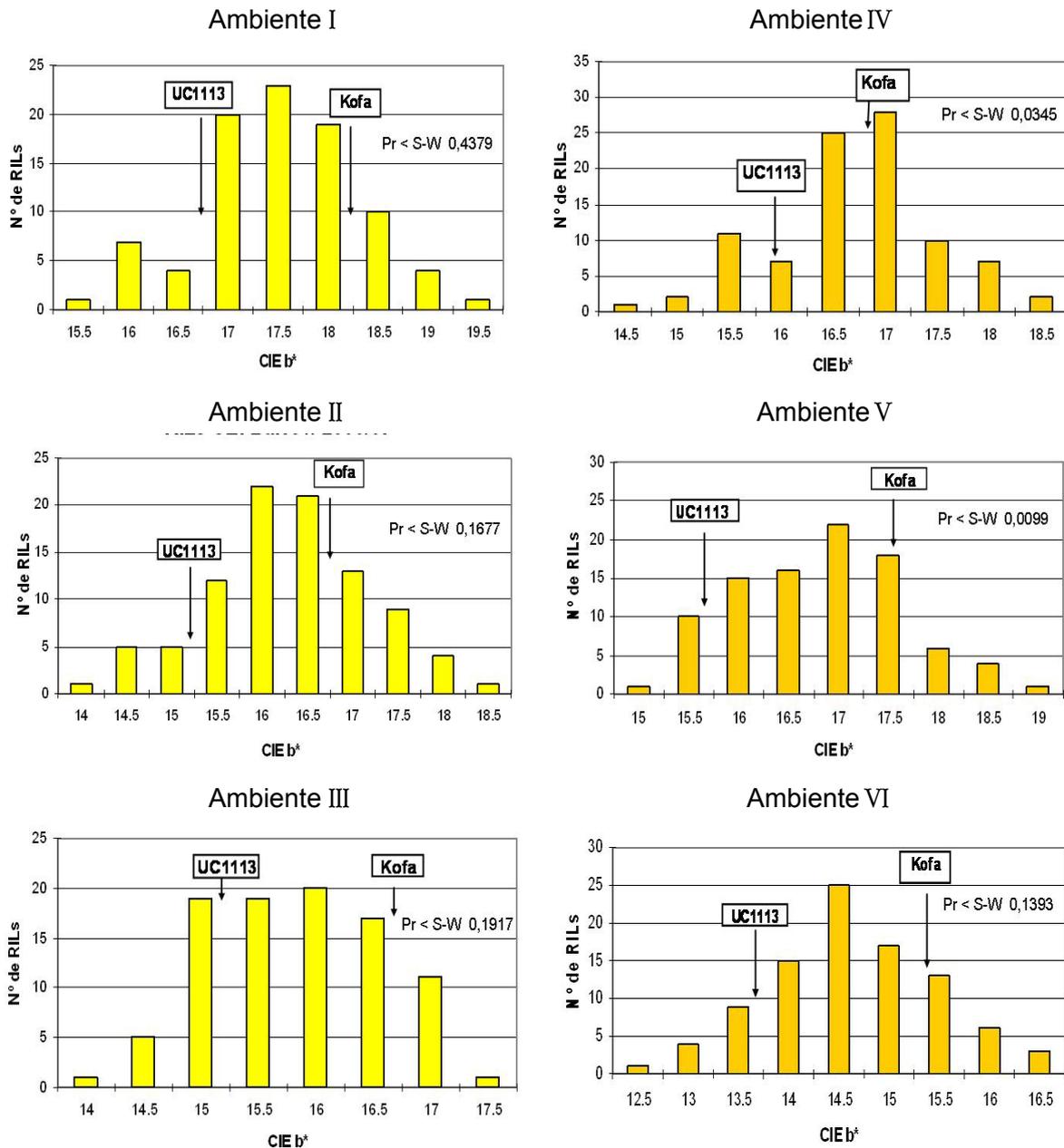
El análisis del CPC realizado en los testigos comerciales mostró que el micrométodo de extracción de pigmentos realizado en harina integral tuvo una precisión muy similar al método estándar AACC 14-50. Esto fue corroborado por el análisis de correlación entre ambos métodos ( $r=0,94$ ;  $p < 0,0001$ ;  $N=90$ ).

Además, los valores de CPC obtenidos por el micrométodo estuvieron altamente correlacionados con los CPC estándar y el CIE  $b^*$  en sémola ( $r=0,94$ ;  $p < 0,0001$ ;  $N=90$ , igual en ambos casos). Además, el CIE  $b^*$  medido en sémola, se encontró altamente correlacionado ( $r=0,84$ ;  $p < 0,0001$ ;  $N=90$ ) con el CIE  $b^*$  en harina integral, indicando que el CIE  $b^*$  medido en harina integral posee una eficiencia similar a la obtenida con muestras de sémola, para determinar el color amarillo de los granos.

Una vez comprobada la utilidad del micrométodo en harina integral para estimar el CPC y la similitud de las mediciones de CIE  $b^*$  en ambos tipos de molienda, el micrométodo y el CIE  $b^*$  medidos en harina integral fueron utilizados para caracterizar la población de mapeo.

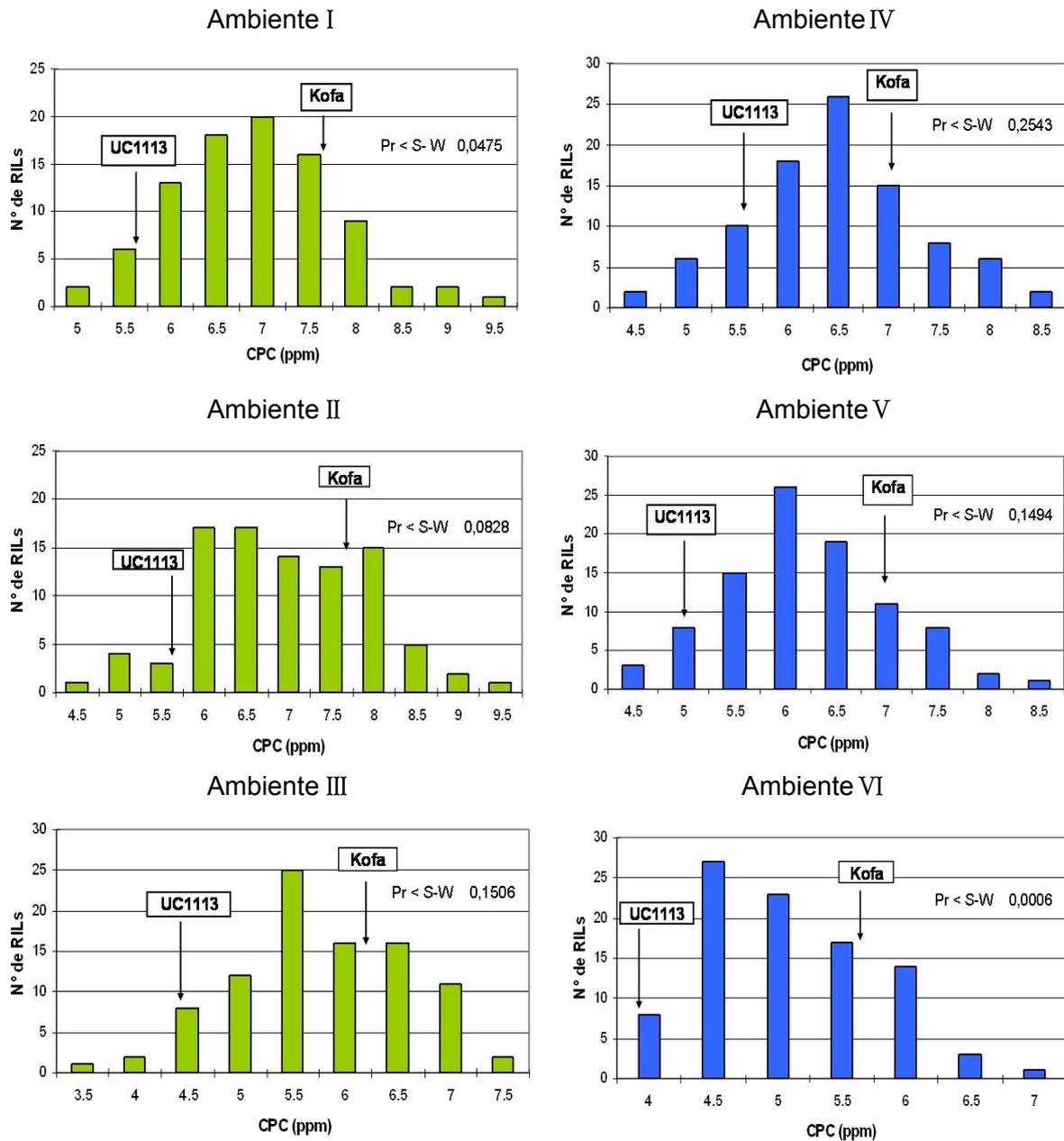
En las **Figuras 12 y 13** se muestra la distribución de frecuencias de valores fenotípicos obtenidos en este trabajo (CIE  $b^*$  y el CPC) para cada ambiente, considerando el valor promedio de las tres repeticiones para cada RIL.

La distribución normal de los datos obtenidos se analizó por ambiente usando el test de Shapiro-Wilk al 5% de significancia. El análisis de los datos de las tres repeticiones por localidad permitió establecer que en la mayoría de los ambientes (4 de 6), la distribución fue normal, para ambos caracteres (CIE  $b^*$  y CPC). En los ambientes IV (ACA-Cabildo 2007) y V (CEI-Barrow 2007) la distribución de los datos de CIE  $b^*$  no fue normal. Lo mismo sucedió para el CPC en los ambientes I (ACA-Cabildo 2006) y VI (INTA-Balcarce 2007) (**Figuras 12 y 13**). Sin embargo, al considerar los valores promedio por RIL en cada ambiente (valores utilizados para el mapeo de QTL) el test de Shapiro-Wilk indicó normalidad de los datos en todos los casos (**Tabla 7, página 61**). Esto podría deberse a la presencia de cierta variabilidad espacial dentro de algunos ambientes, que es eliminada al promediar las repeticiones y obteniéndose así una distribución normal.



**Figura 12:** Distribución de frecuencias de los valores promedio de CIE b\* por ambiente. Pr < S-W = valor de probabilidad (p) para el test de Shapiro-Wilk. Un valor p  $\geq 0.05$  indica que se acepta la hipótesis de normalidad de los datos.

La distribución de los valores fenotípicos en las RILs evidenció un tipo de herencia transgresiva bi-direccional para ambos caracteres en todos los ambientes. Rieseberg *et al.* (2003) indican que la segregación transgresiva es el resultado característico de la recombinación de QTLs de efectos antagónicos presentes en los progenitores. La distribución continua observada para ambos caracteres es la esperada para un carácter cuantitativo, donde ambos progenitores poseen genes positivos y negativos que afectan el carácter.



**Figura 13:** Distribución de frecuencias de los valores promedio de CPC por ambiente. Pr < S-W = valor de probabilidad (p) para el test de Shapiro-Wilk. Un valor  $p \geq 0.05$  indica que se acepta la hipótesis de normalidad de los datos.

Estos, al combinarse en las RILs producen genotipos extremos. El comportamiento observado coincide con los resultados obtenidos por otros autores para los mismos caracteres (Johnston *et al.*, 1983; Elouafi *et al.*, 2001; Mares & Campbell, 2001; Santra *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006). Los ambientes estresantes conducirían a una segregación transgresiva negativa (Elouafi *et al.*, 2001; Santra *et al.*, 2005).

**Tabla 7:** Test de normalidad de Shapiro-Wilk realizado utilizando los valores promedio para cada RIL (UC1113 x Kofa) por ambiente ( $\alpha = 0,05$ ).

Ambiente	Localidad / año	CIE b*	CPC
		Test Shapiro-Wilk	Pr < W
I	ACA-Cabildo 2006/07	0,727	0,6284
II	CEI-Barrow 2006/07	0,7903	0,4717
III	INTA-Balcarce 2006/07	0,5306	0,6064
IV	ACA-Cabildo 2007/08	0,2148	0,7175
V	CEI-Barrow 2007/08	0,1322	0,905
VI	INTA-Balcarce 2007/08	0,6334	0,0688

Pr < S-W = valor de probabilidad (p) para el test de Shapiro-Wilk. Un valor  $p \geq 0.05$  indica que se acepta la hipótesis de normalidad de los datos.

En el ambiente VI los valores de CPC fueron los más bajos observados de todos los ambientes, pero mostraron una segregación transgresiva positiva (**Tablas 8 y 9**). Estos bajos valores podrían explicarse por una fuerte helada ocurrida en etapas tempranas durante el llenado del grano (15 de noviembre de 2007), que podrían haber afectado la síntesis de pigmentos (Clarke *et al.*, 2006). Al mismo tiempo, en este ambiente el rendimiento fue elevado (datos no informados). Altos rindes asociados a granos de gran tamaño disminuyen el CPC por dilución, al aumentar otros componentes del grano como el almidón (Hessler *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2006). Si bien el ambiente V también fue afectado por las heladas, estas ocurrieron en un estadio fenológico del cultivo más avanzado, por lo que el CPC fue afectado en menor medida.

**Tabla 8:** Valores de CIE b\* de las RILs provenientes de la cruce UC1113 x Kofa en cada ambiente.

	Ambiente					
	I	II	III	IV	V	VI
<b>RILs min.</b>	15,00	12,31	13,71	13,68	14,65	12,18
<b>RILs prom.</b>	17,26	16,04	15,57	16,44	16,55	14,38
<b>RIL máx.</b>	19,54	18,50	17,66	18,50	18,71	16,24
<b>Kofa</b>	18,13	16,78	16,70	16,91	17,56	15,45
<b>UC1113</b>	16,76	15,17	15,11	15,95	15,62	13,65
<b>DS</b>	0,82	0,93	0,78	0,83	0,87	0,84
<b>N</b>	267	276	279	279	279	271

Prom. = promedio, min. = mínima, máx. = máxima, DS = Desvío estándar., N= número total de observaciones.

En todos los ambientes los valores mínimos y máximos de CIE b\* y CPC en las RILs

superaron a los correspondientes valores parentales (**Tablas 8 y 9**). El CIE b\* varió entre 12,18 (ambiente VI) y 19,54 (ambiente I), mientras que el CPC lo hizo entre 3,23 (ambiente III) y 9,66 (ambiente II). Como era esperable, la variedad Kofa mostró valores superiores a los de UC1113 en todos los ambientes considerados en este estudio para ambos caracteres.

**Tabla 9:** Valores de CPC de las RILs provenientes de la cruce UC1113 x Kofa en cada ambiente.

	Ambiente					
	I	II	III	IV	V	VI
<b>RILs min.</b>	4,74	4,34	3,23	4,14	3,94	3,33
<b>RILs prom.</b>	6,67	6,75	5,56	6,23	5,94	4,81
<b>RIL máx.</b>	9,36	9,66	7,43	8,43	8,13	6,67
<b>Kofa</b>	7,56	7,66	6,16	7,03	7,02	5,68
<b>UC1113</b>	5,60	5,66	4,45	5,57	5,08	3,86
<b>DS</b>	0,92	0,98	0,86	0,84	0,86	0,69
<b>N</b>	267	276	279	279	279	271

Prom. = promedio, min. = mínima, máx. = máxima, DS = Desvío estándar., N= número total de observaciones.

La variedad estadounidense Kofa mostró valores similares de CIE b\* y CPC a la variedad argentina Buck Topacio y en algunos ambientes no difirieron significativamente según el test de Duncan ( $\alpha= 0,05$ ), mostrando la adaptación de Kofa a los ambientes de nuestro país para estos caracteres. La variedad Buck Topacio fue el testigo que mostró los valores más elevados de CPC y CIE b\* para el promedio de los seis ambientes, seguida por Kofa, B.I. Cariló y B.I. Facón. El mismo resultado se observó en un estudio reciente de CPC realizado en cuatro ambientes de Canadá que incluyó las variedades Kofa y Buck Topacio, donde esta última mostro valores ligeramente superiores (Reimer, 2008 MSc Tesis).

### 3. Análisis de la varianza en RILs

Para determinar la existencia de diferencias entre las RILs en CIE b\* y CPC en cada ambiente de cultivo se realizó un test de ANOVA, considerando el genotipo como fuente de variación aleatoria (**Tablas 10 y 11**). Este análisis indicó que el efecto del genotipo fue altamente significativo en todos los ambientes para ambos caracteres, evidenciando un alto componente genético afectando los mismos.

Los Coeficientes de Variación (CV%) calculados para el CIE b\* fueron bajos, observándose los mayores valores en los ambientes II y V (CEI-Barrow). Un comportamiento similar se observó para el CPC en los mismos ambientes. El CV % fue mayor para las mediciones de CPC en relación a las de CIE b\*. El mismo puede considerarse aceptable en todos los casos, indicando que la precisión de los experimentos en cada ambiente fue alta.

**Tabla 10:** ANOVA individual para el carácter CIE b\* analizado por ambiente

	Ambiente					
	I	II	III	IV	V	VI
CM bloque	0,101152	0,320365	0,120523	0,162324	0,516663	0,197234
CM genotipo	1,856041***	2,373052***	1,688449***	1,882369***	2,030036***	1,911512***
CM residuo	0,095101	0,109286	0,083554	0,093049	0,125457	0,085291
G.L. bloque	2	2	2	2	2	2
G.L. genotipo	88	92	92	92	92	92
G.L. residuo	176	181	184	184	184	176
<b>CV %</b>	1,79	2,06	1,86	1,86	2,14	2,03
R <sup>2</sup>	0,91	0,92	0,91	0,91	0,89	0,92

CM = Cuadrado medio, G.L. = grados de libertad, \*\*\* = p ≤ 0,0001, CV% = Coeficiente de variación en porcentaje, R<sup>2</sup> = Coeficiente de variación fenotípica explicada por el modelo.

**Tabla 11:** ANOVA individual para el carácter CPC analizado por ambiente

	Ambiente					
	I	II	III	IV	V	VI
CM bloque	0,466848	0,010668	0,066198	0,354007	1,699045	0,007036
CM genotipo	2,388099***	2,696144***	2,164239***	2,057446***	2,054272***	1,350243***
CM residuo	0,074379	0,078622	0,045992	0,034884	0,066431	0,033292
G.L. bloque	2	2	2	2	2	2
G.L. genotipo	88	92	92	92	92	92
G.L. residuo	176	181	184	184	184	176
<b>CV %</b>	4,09	4,15	3,86	3,00	4,34	3,79
R <sup>2</sup>	0,94	0,95	0,96	0,97	0,94	0,95

CM = Cuadrado medio, G.L. = grados de libertad, \*\*\* = p ≤ 0,0001, CV% = Coeficiente de variación experimental en porcentaje, R<sup>2</sup> = Coeficiente de variación fenotípica explicada por el modelo.

A fin de evidenciar el efecto del ambiente sobre los caracteres de color en las RILs se realizó en test de ANOVA conjunto. Para ello se analizó la homogeneidad de las varianzas de acuerdo al criterio de Cruz y Regazzi (1997), que consideran que la relación entre el mayor CM residuo / el menor CM residuo entre los experimentos debe

ser menor a 7. Para el color amarillo esta relación fue 1,50 mientras que para CPC fue de 2,36. Al considerarse las fuentes de variación como aleatorias es posible extender nuestros resultados a otras poblaciones, años y localidades. Teniendo en cuenta estas consideraciones se realizó entonces un test de ANOVA triple considerando todas las interacciones posibles (**Tablas 12 y 13**).

El análisis combinado sobre ambientes reveló un comportamiento distinto para las variables CIE b\* y CPC. No se observaron efectos significativos del año y la localidad sobre el CIE b\*, aunque las interacciones dobles y triples fueron altamente significativas ( $p \leq 0,01$ ). Esto significa que, si bien existe un fuerte componente genético afectando el carácter (como se viera previamente el test de ANOVA por ambiente), los efectos combinados del año y la localidad ejercen un efecto sobre la expresión del mismo.

**Tabla 12:** ANOVA triple para el color amarillo (CIE b\*) en 6 ambientes para una población de RILs de trigo candeal (UC1113 x Kofa)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados Tipo III SS	Cuadrado Medio	Valor F	p
Genotipo(G)	92	863,10321	9,381557	12,19	<0,0001
Año(A)	1	101,445065	101,445065	0,92	0,4375
Localidad(L)	2	1013,52106	506,76053	4,6	0,1781
GxA	92	53,68133	0,583493	1,91	0,0001
GxL	184	89,915171	0,488669	1,6	0,0008
AxL	2	218,373017	109,186508	358,51	<0,0001
GxAxL	180	54,906574	0,305037	3,07	<0,0001
(B/L)/A	2	0,973901	0,486951		
Residuo	1095	108,971682	0,099518		
Total	1650	2507,27314			
Media	16,037				
CV (%)	1,948				

CV%= coeficiente de variación experimental en porcentaje, G.L.= grados de libertad, Tipo III SS= Suma de cuadrados para modelos desbalanceados.

El CPC, como se viera previamente es afectado en forma altamente significativa por el genotipo. Sobre este carácter el efecto del año y localidad mostró ser significativo ( $p \leq 0,05$ ). No se observó interacción del genotipo con el año, pero la interacción del genotipo con la localidad fue significativa y las interacciones localidad x año y genotipo x año x localidad fueron altamente significativas.

**Tabla 13:** ANOVA triple para el CPC en 6 ambientes para una población de RILs de trigo candeal (UC1113 x Kofa)

Fuente de variación	G.L.	Suma de Cuadrados Tipo III SS	Cuadrado Medio	Valor F	p
Genotipo (G)	92	998,584016	10,854174	32,85	<0,0001
Año (A)	1	184,372937	184,372937	39,81	0,0265
Localidad (L)	2	543,085985	271,542993	56,02	0,0153
GxA	92	20,243464	0,220038	0,72	0,9633
GxL	184	77,00412	0,418501	1,36	0,0197
AxL	2	9,406008	4,703004	15,3	<0,0001
GxAxL	180	55,440481	0,308003	5,17	<0,0001
(B/L)/A	2	0,274418	0,137209	2,3	0,1004
Residuo	1095	65,218264	0,05956		
Total	1650	1951,55503			
Media	5,998				
CV (%)	3,914				

CV%= coeficiente de variación experimental en porcentaje, G.L.= grados de libertad. Tipo III SS= Suma de cuadrados para modelos desbalanceados.

Esto significa que el CPC varió en una misma localidad en años diferentes y asimismo hubo diferencias entre localidades. En este sentido se desprende de la **Tabla 9** que en el año 2007 los valores de CPC promedio fueron menores en todas las localidades. Esto parece deberse a que en ese año las precipitaciones fueron mayores y en consecuencia los rendimientos. Se observó que en las localidades donde los rindes suelen ser más elevados el CPC es menor.

Resultados similares a los hallados en esta tesis fueron informados por Patil *et al.* (2008) quienes analizaron las combinaciones de año x localidad como 5 diferentes ambientes y hallaron que el efecto de las RILs, del ambiente y su interacción fueron altamente significativos. En la población de mapeo (UC1113 x Kofa), la mayoría de los genotipos tuvo una posición relativa similar en cada ambiente y un análisis detallado de las medias muestra que la interacción fue causada primariamente por cambios en magnitud, aunque es necesario validar esta afirmación estadísticamente.

#### 4. Diferencias de medias

Al considerar los valores medios por localidad, como promedio de las dos campañas, el test de Duncan al 5% de significancia permitió establecer un orden de localidades: ACA-Cabildo > CEI-Barrow > INTA-Balcarce; con valores decrecientes y significativamente diferentes para CIE b\* y CPC (**Tabla 14**). Como se mencionó

previamente los valores de rendimiento siguen un orden creciente inverso al descripto para el CIE b\* y el CPC.

**Tabla 14:** Comparación de medias por localidad para CPC y CIE b\*, utilizando el test de Duncan ( $\alpha= 0,05$ ).

Localidad	N	CIE b*	CPC
ACA-Cabildo	546	16,84a	6,44a
CEI-Barrow	555	16,29b	6,34b
INTA-Balcarce	550	14,98c	5,18c

Valores con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha=0,05$ ), N= número total de observaciones.

Los resultados contrapuestos del test de ANOVA (falta de significancia de los efectos año y localidad) y las diferencias de medias para el carácter CIE b\* puede explicarse en el hecho de haber considerado todos los efectos del ANOVA como aleatorios. Estos supuestos son necesarios para el cálculo de heredabilidad. Sin embargo, el test de medias considera todos los efectos del ANOVA como fijos.

Al comparar los valores promedio de cada campaña para ambos caracteres, se encontró que la campaña 2006/07 fue significativamente superior según el test de Duncan (**Tabla 15**). Comparando cada localidad en los dos años de cultivo (I-IV, II-V, III-VI) se observó que los valores de la campaña 2006/07 fueron superiores en todas las localidades para el CPC (**Tabla 16**). Lo mismo ocurrió para el CIE b\*, con la excepción de la localidad CEI-Barrow, donde la campaña 2006/07 produjo valores de CIE b\* significativamente menores. Es difícil explicar esta diferencia dado que son muchas las variables climáticas y técnicas a considerar.

**Tabla 15:** Comparaciones de medias por año para CPC y CIE b\*, utilizando el test de Duncan ( $\alpha= 0,05$ ).

Campaña	N	CIE b*	CPC
2006/07	822	16,28a	6,32 <sup>a</sup>
2007/08	829	15,79b	5,66b

Valores con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha=0,05$ ), N= número total de observaciones.

La Diferencia Media Significativa (DMS) calculada con un  $\alpha=0,05$  fue estimada para ambos caracteres, como se observa en la **Tabla 16**.

**Tabla 16:** Comparaciones de medias entre ambientes para CPC y CIE b\*, utilizando el test de Duncan ( $\alpha= 0,05$ ).

Ambiente	N	CIE b*		C.P.C.	
		Media	DMS (5%)	Media	DMS (5%)
I	267	17,26a	1,07	6,67b	0,95
II	276	16,04d	1,15	6,75a	0,97
III	279	15,57e	1,01	5,55e	0,75
IV	279	16,44c	1,07	6,23c	0,65
V	279	16,55b	1,24	5,94d	0,90
VI	271	14,38f	1,01	4,81f	0,64

Valores con la misma letra no difieren significativamente ( $\alpha=0,05$ ), N= número total de observaciones.

Como se mencionara en el ítem anterior, los mayores rendimientos obtenidos en la campaña 2007/08, que fueron para cada localidad superiores a los registrados durante la campaña anterior (datos no informados en esta tesis) podrían explicar las diferencias observadas en CPC y CIE b\*. Un mayor rendimiento, asociado a granos de mayor tamaño (como componente del mismo), podría disminuir, por efecto de dilución el CPC y en consecuencia el color de los mismos. Este efecto fue mencionado por otros autores (Hessler *et al.*, 2002; Clarke *et al.*, 2006).

## 5. Heredabilidad de los caracteres analizados

La estimación de la heredabilidad para los caracteres de color analizados en esta tesis resulta de utilidad para poder predecir el éxito en la selección fenotípica. Los resultados del test de ANOVA fueron utilizados para estimar la heredabilidad en sentido estricto ( $h^2$ ). En este tipo de población de mapeo (RILs), la varianza genética es esencialmente aditiva por tratarse de líneas homocigotas, siendo despreciable la varianza debida a la interacción. Por ello la heredabilidad calculada puede considerarse en sentido estricto. Los valores de heredabilidad para el CIE b\* y el CPC fueron elevados en todos los ambientes (**Tablas 17 y 18**). Altos valores de heredabilidad indican un fuerte efecto del genotipo sobre el CPC y el color CIE b\*.

**Tabla 17:** Heredabilidad en sentido estricto del carácter CIE b\* calculada por ambiente

	Ambiente						Promedio
	I	II	III	IV	V	VI	
<b>Varianza genética</b>	0,588	0,755	0,535	0,596	0,635	0,635	0,481
<b>Heredabilidad (h<sup>2</sup>)</b>	0,950	0,955	0,951	0,951	0,938	0,958	0,910

Otros autores también informaron valores medios a elevados de heredabilidad, como Parker *et al.* (1998) para CIE b\* en harina de trigo pan (0,68) y Elouafi *et al.* (2001) para CPC en sémola de trigo candeal en ensayos realizados en 16 ambientes (0,48 y 0,99 con una media de 0,87). Valores elevados de heredabilidad para color fueron también encontrados por otros autores en trigo (Braaten *et al.*, 1962; Lee *et al.*, 1976; Johnston *et al.*, 1983; Joppa & Williams, 1988; Nachit *et al.*, 1995; Santra *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2006; Kuchel *et al.*, 2006) y tritordeos (Álvarez *et al.*, 1998).

**Tabla 18:** Heredabilidad en sentido estricto del carácter CPC calculada por ambiente.

	Ambiente						Promedio
	I	II	III	IV	V	VI	
<b>Varianza genética</b>	0,786	0,880	0,706	0,674	0,663	0,457	0,600
<b>Heredabilidad (h<sup>2</sup>)</b>	0,970	0,972	0,979	0,983	0,968	0,976	0,969

Patil *et al.* (2008) informaron heredabilidades en sentido amplio entre 0,52 y 0,75 en una población de 140 RILs. Recientemente, Zhang *et al.* (2009) obtuvieron un valor de heredabilidad de 0,98 para el CPC y 0,99 para CIE b\* en harina, sobre 240 RILs (PH82-2/Neixiang 188) evaluadas en 6 ambientes de China.

## 6. Correlaciones simples de Pearson entre ambientes para CIE b\* y CPC

El efecto diferencial del ambiente sobre los caracteres en cuestión puede demostrarse analizando los valores de correlación fenotípica entre los ambientes (**Tablas 19 y 20**).

**Tabla 19:** Coeficientes de correlación simple de Pearson entre ambientes para CIE b\*.

Ambientes	I	II	III	IV	V	VI
I	1	0,76	0,77	0,74	0,69	0,63
II		1	0,78	0,73	0,74	0,61
III			1	0,72	0,72	0,66
IV				1	0,74	0,68
V					1	0,64
VI						1

N= 260-279

**N= número total de observaciones**

La correlación entre ambientes para los valores de CIE b\* varió entre 0,61 y 0,78, mientras para el CPC los correspondientes valores estuvieron entre 0,70 y 0,89. Los menores valores de correlación para el CIE b\* fueron obtenidos en el ambiente VI, sin embargo no se observó lo mismo para el CPC. Como se discutiera previamente, el comportamiento de las RILs en relación al CPC en los diferentes ambientes fue más consistente que en relación al CIE b\*. Esto se evidenció a partir de los mayores coeficientes de correlación obtenidos.

**Tabla 20:** Coeficientes de correlación simple de Pearson entre ambientes para el CPC.

Ambientes	I	II	III	IV	V	VI
I	1	0,72	0,70	0,87	0,82	0,76
II		1	0,75	0,82	0,81	0,80
III			1	0,80	0,82	0,80
IV				1	0,89	0,86
V					1	0,85
VI						1

N= 260-279

**N= número total de observaciones**

Al analizar el comportamiento de las RILs en las localidades durante el primero y segundo año por separado (sombreado amarillo) se observa que la correlación entre ambientes para el CIE b\* fue mayor en el primer año, con respecto al CPC. En el segundo año el efecto fue inverso, con una mayor correlación entre ambientes observada para el CPC. Todos los coeficientes de correlación fueron altamente significativos ( $p < 0,0001$ ). Para el CPC la correlación entre ambientes varió desde 0,70 a 0,89 indicando una alta consistencia de las RILs entre ambientes, sugiriendo que la interacción RILs x año o RILs x localidad no fue compleja.

## 7. Correlaciones simples de Pearson entre variables de color

Considerando el total de observaciones (6 ambientes) para las variables de color de la harina (CIE L\*a\*b\*) y el CPC, se encontró que el CIE b\* está altamente correlacionado ( $r=0,83$ ) con el CPC en forma significativa (**Tabla 21**). Estos valores concuerdan con lo informado previamente para esta misma población analizada en los Estados Unidos (Carrera *et al.*, 2007). Los resultados de esta tesis indican que los valores obtenidos en las RILs con ambas variables son similares, permitiendo ordenarlas en función del color en forma similar (ranking relativo) lo que indica que ambas son efectivas para distinguir genotipos de alto y bajo color. Esto fue observado previamente en la evaluación de los métodos como herramientas de fenotipado en los testigos.

**Tabla 21:** Coeficientes de correlación simple de Pearson entre parámetros de color sobre el total de observaciones.

	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
CIE L*	1	-0.71***	-0.33***	-0.31***
CIE a*		1	0.24***	0.16***
CIE b*			1	0.83***
CPC				1

N=1651

\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ , N = número total de observaciones. CIE L\*= Luminosidad, CIE a\*= color rojo-verde, CIE b\*= color amarillo, CPC= contenido de pigmentos carotenoides.

No obstante ello, las observaciones de esta tesis señalan al CPC como un indicador más sensible de color en trigo candeal, principalmente cuando se trata de genotipos con valores intermedios de CIE b\*. Cabe recordar, además, que en esta tesis se utilizaron muestras de harina integral y no de sémola para medir el CIE b\* y CPC (por su facilidad y rapidez). Durante la molienda a sémola se eliminan las capas externas del grano (salvado) que contienen partículas más oscuras y pueden influir en las mediciones de color por reflectancia de la luz. Las observaciones de esta tesis indican que las mediciones del CIE b\* en sémola son más precisas que en harina integral para diferenciar genotipos con valores intermedios. Sin embargo Johnston *et al.* (1981) hallaron buenas correlaciones entre el color de la harina integral ( $r=0,85$  a  $0,90$ ) y el color de la sémola en un grupo de 10 genotipos de trigo candeal.

El análisis de las RILs en cada ambiente en forma individual mostró que los coeficientes de correlación entre CIE b\* y el CPC variaron entre  $0,83$  y  $0,86$  en cinco

de los ambientes y solo alcanzo un valor menor ( $r=0,78$ ) para el ambiente VI (Anexo de tablas, **Tabla 42**).

Otros autores estudiaron previamente el comportamiento del CPC y su relación con el color de la harina (CIE  $L^*a^*b^*$ ) encontrando valores de correlación altos para CIE  $b^*$  y CPC. Algunos primeros estudios informaron una correlación ( $r=0,85$ ;  $r=0,83$ ) entre valor  $b$  (Hunter Lab, 1975) y la luteína y el  $\beta$ -caroteno, respectivamente. Fares *et al.* (1991), quienes describieron el micrométodo de extracción de pigmentos aquí utilizado obtuvieron una correlación ( $r=0,98$ ) altamente significativa entre CIE  $b^*$  y CPC en sémola. Taha & Sagi (1987) informaron una correlación altamente significativa ( $r=0,88$ ) y posteriormente Borelli *et al.* (1999), hallaron un valor de  $r=0,95$  entre ambas variables, estimado sobre sémola de trigo candeal.

Los valores de luminosidad (CIE  $L^*$ ) estuvieron negativamente correlacionados con el color rojo (CIE  $a^*$ ) y amarillo (CIE  $b^*$ ) de la harina y con el CPC. Taha & Sagi (1987), hallaron en trigo candeal que el índice de amarronamiento ( $100-CIE L^*$ ) estuvieron negativamente correlacionados con el CPC y fuertemente correlacionados ( $r=0,96$ ), en forma altamente significativa, con la actividad de las enzimas peroxidasas que actúan degradando los pigmentos carotenoides en menor medida que las lipoxigenasas. Estos autores también informaron una correlación negativa ( $r=-0,76$ ) entre el CPC y la actividad de peroxidasas. Más recientemente, Kuchel *et al.* (2006) informaron una correlación negativa significativa ( $r=-0,51$ ) para CIE  $b^*$  y CIE  $L^*$  en harina de trigo pan.

## **8. Correlaciones simples de Pearson entre variables de color y rendimiento del cultivo**

En base a los datos de rendimiento de la campaña 2006/07 para la población de RILs, fue posible analizar la correlación fenotípica existente entre las variables relacionadas al color del grano y el rendimiento del cultivo (kg/ha), el PMG, el PH, el número de espigas por  $m^2$  (ESP/ $m^2$ ), la altura de parcela (ALT) y el número de plantas por  $m^2$  (PLS/ $m^2$ ). El color CIE  $b^*$  y el CPC en las RILs estuvieron negativamente correlacionados en forma altamente significativa con el rendimiento, el PMG y el PH en los ambientes I y III, como puede observarse en las **Tablas 22 y 24**. Sin embargo, para el ambiente II se encontró una correlación negativa significativa entre el rendimiento y el CPC (**Tabla 23**). Los valores de correlación fueron ligeramente superiores para el ambiente I en relación al ambiente III. Los valores de correlación fenotípica encontrados no fueron elevados ( $r<-0,33$ ), por lo que el efecto que estas

variables sobre una disminución del CIE b\* y el CPC tendría un rol secundario. Sólo para el ambiente II se hallaron valores débiles de correlación entre CIE b\* y ESP/m<sup>2</sup> (r=0,16) y CIE b\*-PLS/m<sup>2</sup> (r=0,15). El CPC estuvo negativamente correlacionado en forma débil (r=-0,16) con la ALT.

**Tabla 22:** Coeficientes de correlación simple de Pearson entre parámetros de color y rendimiento en el ambiente I.

	PLS/m <sup>2</sup>	ALT	ESP/m <sup>2</sup>	Kg/ha	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
PLS/m <sup>2</sup>	1	-0,023ns	0,17**	0,00ns	0,00ns	0,02ns	0,03ns	0,00ns	-0,05ns	0,04ns
ALT		1	-0,10ns	0,24***	-0,05ns	-0,12ns	-0,02ns	0,25***	0,00ns	0,01ns
ESP/m <sup>2</sup>			1	0,20**	-0,07ns	-0,07ns	0,02ns	-0,13*	0,04ns	0,07ns
Kg/ha				1	0,17**	0,01ns	0,29***	-0,12ns	-0,19**	-0,20**
PMG					1	0,68***	0,14*	-0,21**	-0,33***	-0,33***
PH						1	0,06ns	-0,17**	-0,30***	-0,32***
CIE L*							1	-0,58***	-0,08ns	0,07ns
CIE a*								1	-0,10ns	-0,19**
CIE b*									1	0,83***
CPC										1

N=267

\*, \*\*, \*\*\* Correlación significativa con p< 0,05, p<0,01, p< 0,001 respectivamente. ns= no significativo. PLS/m<sup>2</sup>= plantas por m<sup>2</sup>, ALT= altura de parcela, ESP/m<sup>2</sup>= espigas por m<sup>2</sup>, kg/ha= rendimiento del cultivo, PMG= peso de mil granos, PH= peso hectolitrito, CIE L\*= valor L\* del MINOLTA, CIE a\*= valor a\* del MINOLTA.

**Tabla 23:** Coeficientes de correlación simple de Pearson entre parámetros de color y rendimiento en el ambiente II.

	PLS/m <sup>2</sup>	ALT	ESP/m <sup>2</sup>	Kg/ha	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
PLS/m <sup>2</sup>	1	0,10ns	0,40***	0,35***	-0,11ns	0,09ns	0,15*	-0,14*	0,15*	-0,03ns
ALT		1	0,22**	0,33***	0,08ns	0,14*	0,22**	0,15**	-0,00ns	-0,16**
ESP/m <sup>2</sup>			1	0,46***	0,03ns	0,18**	0,25***	-0,07ns	0,16**	0,00ns
Kg/ha				1	0,29***	0,39***	0,35***	-0,06ns	-0,02ns	-0,19**
PMG					1	0,38***	0,12*	-0,09ns	0,00ns	0,00ns
PH						1	0,21**	-0,10ns	0,10ns	-0,01ns
CIE L*							1	-0,34***	0,04ns	-0,11ns
CIE a*								1	-0,14*	-0,17**
CIE b*									1	0,83***
CPC										1

N=276

\*, \*\*, \*\*\* Correlación significativa con p< 0,05, p<0,01, p< 0,001 respectivamente. ns= no significativo. PLS/m<sup>2</sup>= plantas por m<sup>2</sup>, ALT= altura de parcela, ESP/m<sup>2</sup>= espigas por m<sup>2</sup>, kg/ha= rendimiento del cultivo, PMG= peso de mil granos, PH= peso hectolitrito, CIE L\*= valor L\* del MINOLTA, CIE a\*= valor a\* del MINOLTA.

Otros autores utilizando la misma población de mapeo empleada en esta tesis encuentran valores de correlación negativa entre el CPC y el PMG (r=-0,28) y el CPC

y el PH ( $r=-0,24$ ) y también para CIE b\* en sémola y PMG ( $r=-0,22$ ) y CIE b\*-PH ( $r=-0,28$ ), en promedio para 5 ambientes de los Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2008). Trabajos previos utilizando otras poblaciones de mapeo informan que el PMG y PH se encuentran negativamente correlacionados con el color del endosperma (Álvarez *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2006).

**Tabla 24:** Coeficientes de correlación simple de Pearson entre parámetros de color y rendimiento en el ambiente III.

	PLS/m <sup>2</sup>	ALT	ESP/m <sup>2</sup>	Kg/ha	PMG	PH	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
PLS/m <sup>2</sup>	1	0,14*	0,13*	0,11ns	0,05ns	0,07ns	0,08ns	0,02ns	0,00ns	0,03ns
ALT		1	0,18**	0,63***	0,53***	0,28***	0,19**	-0,11ns	0,05ns	0,03ns
ESP/m <sup>2</sup>			1	0,28***	0,08ns	0,09ns	0,02ns	0,00ns	-0,10ns	-0,07ns
Kg/ha				1	0,54***	0,42***	0,30***	-0,15*	-0,16**	-0,21**
PMG					1	0,47***	0,26***	-0,17**	-0,25***	-0,27***
PH						1	0,35***	-0,25***	-0,21**	-0,27**
CIE L*							1	-0,75***	-0,11ns	-0,13*
CIE a*								1	-0,20**	-0,17**
CIE b*									1	0,86***
CPC										1

N=279

\*, \*\*, \*\*\* Correlación significativa con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  respectivamente. ns= no significativo. PLS/m<sup>2</sup>= plantas por m<sup>2</sup>, ALT= altura de parcela, ESP/m<sup>2</sup>= espigas por m<sup>2</sup>, kg/ha= rendimiento del cultivo, PMG= peso de mil granos, PH= peso hectolitrito, CIE L\*= valor L\* del MINOLTA, CIE a\*= valor a\* del MINOLTA.

## 9. Mapeo de QTL

El mapeo de QTL se realizó utilizando el mapa genético confeccionado por Zhang *et al.* (2008) y que contó con un total de 269 marcadores (ver materiales y métodos). La caracterización fenotípica para la identificación de los QTL se realizó sobre la población de RILs evaluada en seis ambientes de nuestro país. En la **Tabla 25** se presentan los valores de LOD significativos obtenidos para los caracteres CPC y CIE b\* por ambiente o combinaciones de ambientes analizados establecidos mediante el test de 1000 permutaciones (Churchill & Doerge 1994).

En general, los valores umbral de LOD obtenidos estuvieron alrededor de 3,0, lo que equivale a considerar que es 1000 veces más probable que el/los marcadores estén asociados al carácter a que no lo estén.

**Tabla 25:** Valores de LOD significativos (obtenidos por el test de 1000 permutaciones) para el CPC y CIE b\* en la población de RILs (UC1113 x Kofa), evaluada en 6 ambientes de Argentina.

Ambiente	LR corte		LOD corte	
	CIE b*	CPC	CIE b*	CPC
I	14,18	14,24	3,08	3,10
II	14,04	14,32	3,05	3,11
II	14,78	14,44	3,21	3,14
Promedio 2006/07	13,99	14,12	3,04	3,07
IV	13,72	13,46	2,98	2,93
V	14,78	13,65	3,21	2,97
VI	13,79	14,96	3,00	3,25
Promedio 2007/08	14,52	14,28	3,16	3,10
Promedio 6 ambientes	14,13	14,25	3,07	3,10

Las **Tablas 26 y 27** resumen el total de QTL identificados para el CIE b\* y el CPC, respectivamente. Los QTL sombreados corresponden a aquellos que resultaron ser altamente significativos según el test de 1000 permutaciones. Los QTL detectados combinando las diferentes localidades en cada campaña y el promedio de los seis ambientes, serían los QTL más estables, que estarían afectando el carácter más allá del efecto ambiental.

**Tabla 26:** QTL para el color amarillo en harina (CIE b\*) identificados en la población de RILs (UC1113 x Kofa) en 6 ambientes de Argentina

Ambiente	CIE b*									
I	4AL.1	4AL.2	6AL.2	7AS	7BS	7BL				
II	1BS	4AL.1	6AL.1	6AL.2	7AL	7BS				
II	6AL.2	7AS	7BS	7BS	7BL					
Combinado 2006/07	1AL	1BL	6AL.2	7AS	7BS	7BL				
IV	1BL	4AL.1	4AL.2	6AL.1	6AL.3	7AS	7BL			
V	1BL	4AL.2	5AS	5BL	6AL.1	6AL.3				
VI	3BS	5AS	5AL	7AS	7AL	7BL				
Combinado 2007/08	1BL	4AL.2	5AS	5BL	6AL.1	6AL.3	7AS			
Combinado 6 ambientes	1BL	2AS	4AL.2	5BL	6AL.2	7AS	7AL	7BS	7BL	

**Tabla 27:** QTL para el CPC identificados en la población de RILs (UC1113 x Kofa) en 6 ambientes de Argentina

Ambiente	CPC					
I	4AL.1	5AL	6AL.1	6AL.3	7AS	7BL
II	1BL	4AL.2	6AL.2	7AS	7AL	7BL
II	6AL.2	7AL	7BS	7BL		
Combinado 2006/07	5BL	6AL.2	7AS	7BS	7BL	
IV	1BL	2AS	6AL.2	7AL	7BS	
V	1BL	2AS	5BL	6AL.2	7BS	
VI	1BL	5AS	6AL.2	7AS	7BL	
Combinado 2007/08	1BL	2AS	5BL	6AL.2	7BS	
Combinado 6 ambientes	1BL	5BL	6AL.2	7AS	7BS	7BL

Los QTL informados como probables en un ambiente particular son aquellos que presentan un valor de LOD entre 2,0 y el umbral de significancia y coinciden con otro QTL identificado en uno o varios ambientes en forma significativa para alguno de los dos caracteres. En los casos donde fue identificado más de un QTL sobre el mismo brazo cromosómico, se los diferenció agregando un número (1,2,3....n) separado por un punto del correspondiente nombre del cromosoma (ej.: 4AL.1; 4AL.2).

### 9.1 Mapeo de QTL asociados al CPC

En este trabajo se identificaron un total de 11 QTL significativos para el CPC en los ambientes I, II y III y en el análisis de QTL combinado correspondiente a la campaña 2006/07. Por otro lado, la **Tabla 28** muestra diez QTL adicionales que pueden considerarse probables, con valores de LOD entre 2 y el umbral de significancia. Para la campaña 2007/08 se detectaron un total de 12 QTL significativos asociados al CPC y 8 QTL probables (**Tabla 29**).

Los QTL más importantes afectando este carácter fueron identificados sobre los cromosomas 6A, 7A y 7B. Los mismos se encontraron presentes en la mayoría de los ambientes. En la primera campaña se encontraron QTL en los cromosomas 4A, 5A y 6A (4AL.1, 4AL.2, 5AL, 6AL.1 y 6AL.3) que no estuvieron presentes durante la segunda campaña. En la campaña 2007/08 se identificaron dos QTL adicionales sobre los cromosomas 2AS y 5AS que no habían sido detectados en el primer año de evaluación. En la segunda campaña los QTL 1BL y 5BL fueron observados en mayor cantidad de ambientes.

Los QTL 2AS, 4AL.2, 5AS, 6AL.1, 6AL.2, 6AL.3, 7AS, 7AL, 7BS se ubicaron entre los mismos marcadores flanqueantes a lo largo de los seis ambientes y en los análisis combinados, por lo que su posición puede ser considerada estable. Mientras que el pico de los QTL 1BL, 4AL.1 5BL y 7BL se mostró más inestable a lo largo de los ambientes (**Tablas 28 y 29**).

De este análisis se desprende que ambos progenitores portan alelos favorables para el carácter. En la mayoría de los QTL el alelo favorable fue aportado por Kofa, siendo este el progenitor de mejor color.

En el próximo apartado se describen los QTL encontrados por cromosoma.

**Tabla 28:** QTL para CPC identificados en la población de RILs de trigo candeal (UC1113 x Kofa) durante la campaña 2006/07

Ambiente	Cromosoma	Marcadores flanqueantes (cM)	Alelo favorable	Posición del pico (cM)	LOD	Efecto aditivo	R <sup>2</sup> (%)
I	4AL.1	<i>Lpx-A3--wmc617a(4,8)</i>	U	23,3	3,89	-0,31	11,90
	5AL	<i>wmc727-cfa2149(1,7)</i>	U	196,01	3,53	-0,29	9,96
	6AL.1	<i>barc146(0,0)-gwm132</i>	K	36,21	7,53	0,45	22,75
	6AL.3	<i>barc353-gwm169(4,2)</i>	K	88,41	2,81	0,29	9,81
	7AS	<i>barc174(2,0)-barc1034</i>	U	76,31	2,62	-0,25	7,44
	7BL	<i>Psy-B1-cfa2257(0,3)</i>	K	199,01	3,40	0,30	9,33
II	1BL	<i>BE443797_436(5,0)- barc302</i>	K	52,11	3,81	0,31	10,17
	4AL.2	<i>wmc219(0,0)- wmc722</i>	K	126,21	5,43	0,34	11,99
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(0,7)</i>	K	66,41	7,05	0,41	16,76
	7AS	<i>BQ170462_176-barc174(0,0)</i>	U	74,31	2,41	-0,21	4,41
	7AL	<i>wmc116-cfd6a(0,1)</i>	U	171,11	2,67	-0,24	5,52
	7BL	<i>wmc311(7,0)- wmc276</i>	K	170,41	5,37	0,42	16,90
	7BL	<i>cfa2040 -barc1073(0,2)</i>	K	184,41	4,97	0,35	11,07
III	6AL.2	<i>barc113-wmc553(1,2)</i>	K	65,91	7,15	0,41	20,91
	7AL	<i>wmc116-cfd6a(0,0)</i>	U	171,11	2,88	-0,24	7,04
	7BS	<i>barc23a-barc72(1,3)</i>	K	57,91	2,25	0,23	6,36
	7BL	<i>wmc311-wmc276(5,3)</i>	K	176,91	2,26	0,27	8,46
QTL combinado año 2006/07	5BL	<i>wmc149-barc74(1,1)</i>	U	40,11	2,29	-0,19	5,26
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(1,7)</i>	K	65,41	10,83	0,46	30,97
	7AS	<i>BQ170462_176-barc174(0,0)</i>	U	74,31	2,59	-0,20	5,61
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,0)</i>	K	59,21	2,21	0,20	5,04
	7BL	<i>Psy-B1-cfa2257(3,8)</i>	K	195,51	3,12	0,27	8,47

1,2,3 Indican diferentes QTL posicionados sobre un mismo brazo cromosómico. R<sup>2</sup>= % de la varianza explicada por el QTL. I = ACA-Cabildo, II = CEI-Barrow, III = INTA-Balcarce. U=UC1113, K= Kofa.

**Tabla 29:** QTL para CPC detectados en la población de RILs (UC1113 x Kofa) de trigo candeal en la campaña 2007/08

Ambiente	Cromosoma	Marcadores flanqueantes (cM)	Alelo favorable	Posición del pico (cM)	LOD	Efecto aditivo	R <sup>2</sup> (%)
IV	1BL	<i>BE443797_436(3,5)-barc302</i>	K	50,61	2,07	0,20	5,38
	2AS	<i>wmc382-gwm296(0,0)</i>	U	22,81	2,69	-0,22	6,66
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(2,2)</i>	K	64,91	10,43	0,49	33,44
	7AL	<i>gwm276-wmc116(11,8)</i>	U	158,81	2,09	-0,26	9,24
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,3)</i>	K	58,91	3,60	0,27	9,56
V	1BL	<i>BE443797_436-barc302(6,4)</i>	K	54,11	2,28	0,21	6,20
	2AS	<i>wmc382-gwm296(0,0)</i>	U	22,81	2,72	-0,21	6,01
	5BL	<i>gwm499-BE495277_339(0,0)</i>	U	73,31	3,77	-0,26	8,95
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(2,2)</i>	K	64,91	13,74	0,55	42,67
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,0)</i>	K	59,21	4,09	0,27	9,54
VI	1BL	<i>Psr162-wmc728(18,8)</i>	K	125,61	2,55	0,33	22,39
	5AS	<i>wmc350(0,0)-gwm47</i>	U	0,01	3,17	-0,21	8,29
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(1,7)</i>	K	65,41	6,45	0,30	18,61
	7AS	<i>BQ170462_176-barc174(0,0)</i>	U	74,31	2,24	-0,16	5,41
	7BL	<i>cfa2040(0,5)-barc1073</i>	K	183,91	5,55	0,29	14,99
QTL combinado año 2007/08	1BL	<i>BE443797_436(2,5)-barc302</i>	K	49,61	2,50	0,19	6,12
	2AS	<i>wmc382-gwm296(0,0)</i>	U	22,81	3,59	-0,22	8,10
	5BL	<i>gwm499-BE495277_339(0,0)</i>	U	73,31	3,87	-0,24	9,20
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(2,2)</i>	K	64,91	13,21	0,49	40,47
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,0)</i>	K	59,21	4,40	0,26	10,34

1,2,3 Indican diferentes QTL posicionados sobre un mismo brazo cromosómico. R<sup>2</sup>= % de la varianza explicada por el QTL. IV = ACA-Cabildo, V = CEI-Barrow, VI = INTA-Balcarce. U=UC1113, K= Kofa.

### 9.1.1 Cromosoma 6A

Un QTL mayor fue identificado sobre el cromosoma 6AL (6AL.2) en 5 de los ambientes analizados (II, III, IV, V, VI), flanqueado por los marcadores *barc113* y *wmc553*, (más fuertemente ligado al SSR *wmc553*). El alelo favorable fue aportado por la variedad Kofa. Este QTL explicó la mayor parte de la variación fenotípica en cuatro de los ambientes evaluados (III, 20,91 %; IV, 33,44 %; V, 42,67 % y VI, 18,61 %) y en los análisis combinados 2006/07 (30,97 %) y 2007/08 (40,47 %). En el análisis sobre el promedio de los seis ambientes el QTL 6AL.2 explicó la mayor parte de la varianza fenotípica (29,85 %).

El QTL 6AL.2 no se detectó en el ambiente I. Sin embargo, se identificaron otros dos

QTL (6AL.1 y 6AL.3) sobre este mismo cromosoma en una posición anterior y posterior al mismo. El QTL 6AL.1 fue el principal QTL identificado en ese ambiente y estuvo flanqueado por los marcadores SSR *barc146* y *gwm132*, explicando el 22,75 % de la variación fenotípica para el CPC. En el ambiente II, el QTL 6AL.2 explicó un 16,76 % de la variación fenotípica, en comparación al 16,90 % explicado por otro QTL identificado sobre el cromosoma 7BL.

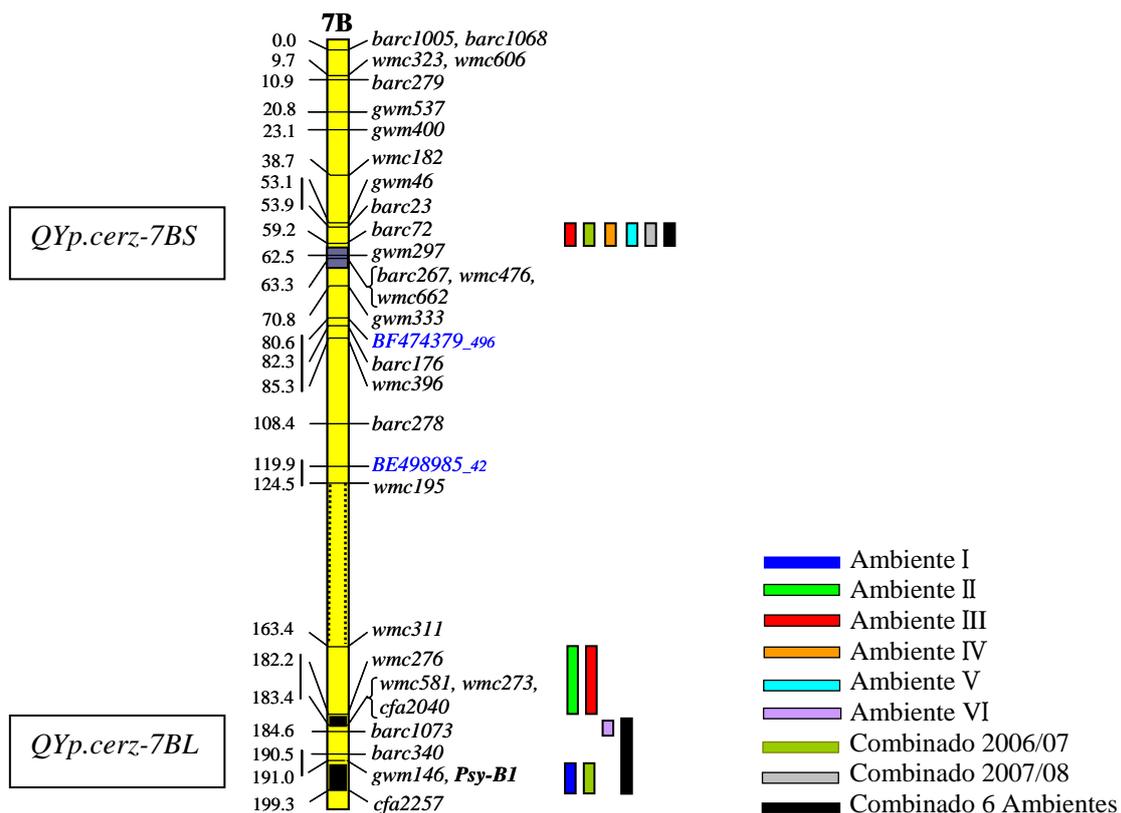
La población de RILs derivada de la cruce UC1113 x Kofa también fue evaluada, como se mencionara, en ambientes de los Estados Unidos, donde se detectó un QTL asociado al CPC sobre el cromosoma 6AL. El mismo se encontró fuertemente ligado al SSR *wmc553* y su posición varió entre los marcadores *barc113* y *gwm570* (Zhang *et al.*, 2008).

### **9.1.2 Cromosoma 7B**

#### **QTL 7BL**

El QTL detectado sobre el cromosoma 7BL mostró una posición de LOD máximo diferente para los ambientes I, II y III (**Figura 13**). En el análisis combinado de la primera campaña este QTL se encontró flanqueado por los marcadores *Psy-B1* y *cfa2257*, siendo esta la posición más probable. El marcador STS *Psy-B1* es un marcador génico diseñado en función de la secuencia del gen para la enzima fitoeno sintasa 1 (PSY1), involucrada en la vía biosintética de carotenoides. Aunque el QTL 7BL se encontró flanqueado por el marcador *Psy-B1*, el máximo valor de LOD no se ubicó sobre este marcador pero sí sobre el marcador flanquearte *cfa2257*.

En la campaña 2007/08 el QTL 7BL sólo fue detectado en el ambiente V y no se lo observó en el análisis combinado de esta campaña. Al utilizar los valores promedios de los seis ambientes, los resultados del mapeo indican la presencia de dos QTL muy próximos en el 7BL, separados por 10,9 cM (**Tabla 33**). Estos dos QTL pueden observarse sobre la **Figura 13**, en la región distal del brazo largo de este cromosoma (regiones indicadas en negro).



**Figura 14:** Identificación de QTL asociados a CPC sobre el cromosoma 7B de trigo candeal (significativos y probables). Las barras coloreadas corresponden a la posición del pico del QTL en cada ambiente (Figuras modificadas de Zhang *et al.*, 2008)

El pico del QTL 7BL se ubico ligado alternativamente al SSR *cfa2257*, marcador flanqueante al gen *Psy1-7B* y entre los SSR *wmc311* y *wmc276* ubicados a 27,6 y 8,8 cM de *Psy1-7B*, respectivamente. En el análisis combinado de los seis ambientes los dos QTL detectados en 7BL se ubicaron sobre el marcador SSR *barc1073*, separado por 6,4 cM de *Psy1-7B* y asociado al SSR *cfa2257*, respectivamente (**Tabla 33**).

Los resultados de esta tesis coinciden, en gran medida, con lo informado por Zhang *et al.* (2008), aunque estos autores encontraron al SSR *barc340* más fuertemente asociado al QTL 7BL. Estos autores sugirieron la presencia de dos genes afectando el CPC en la región 7BL. La hipótesis planteada sería consistente con los resultados del mapeo en nuestro país, que evidencian indirectamente la existencia de un segundo gen afectando el CPC en esta región, pero nuestro segundo gen estaría más asociado al marcador *barc1073*, que al *barc340*.

Se ha afirmado en varias publicaciones recientes la importancia de la enzima PSY en

la síntesis de pigmentos carotenoides, tanto en trigo hexaploide como tetraploide (Pozniak *et al.*, 2007; Zhang & Dubcovsky, 2008; He *et al.*, 2008; He *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Pozniak *et al.* (2007) fueron los primeros autores que propusieron a esta enzima como candidata para el QTL identificado previamente por Elouafi *et al.* (2001) sobre el brazo largo del cromosoma 7B.

El QTL 7BL localizado en esta tesis fue informado de manera consistente en poblaciones de trigo tetraploide (Elouafi *et al.*, 2001; Pozniak *et al.*, 2007; Patil *et al.*, 2008; Zhang & Dubcovsky, 2008; Zhang *et al.*, 2008), trigo hexaploide (Parker *et al.*, 1998; Mares & Campbell, 2001; He *et al.*, 2008; Zhang & Dubcovsky, 2008; Zhang *et al.*, 2009; He *et al.*, 2009), *Lophopyrum ponticum* (Zhang *et al.*, 2005; Zhang & Dubcovsky, 2008) y *Hordeum chilense* (Atienza *et al.*, 2007a), lo que sugiere la presencia de, al menos, un gen mayor para esta región afectando el CPC en las tritíceas.

Recientemente, se han desarrollado marcadores STS para los genes *Psy-1.B* y *Psy-1.A* y su utilidad en la selección fue validada en germoplasma de distintos orígenes (He *et al.*, 2008; 2009). Por otro lado, utilizando como estrategia complementaria la técnica de mapeo por asociación, los genes homeólogos *Psy-1.B* y *Psy-1.A* fueron localizados sobre los cromosomas 7B y 7A respectivamente, la misma región en la cual se identificaron previamente QTL asociados al CPC (Reimer, 2008. MSc Tesis).

Un QTL asociado al CPC fue identificado en el cromosoma 7BL sobre el mapa consenso de trigo candeal, de reciente publicación (Clarke *et al.*, 2008). Este QTL fue posicionado sobre los SSR *wmc276*, *cfa2040*, *barc1073*, *barc340*, *gwm146* y el gen *Psy1-7B*, los cuales fueron mapeados en la misma región cromosómica sobre la población de RILs UC1113 x Kofa. Según Pozniak *et al.* (2007), el QTL 7BL se encuentra flanqueado por el SSR *gwm146*, que mapea aproximadamente a 5,0 cM del gen *Psy-1.7B*. En nuestra población el SSR *gwm146* mapeó en la misma posición que el gen *Psy-1.7B*. Por otro lado, Elouafi *et al.* (2001) informan al QTL 7B asociado al CPC flanqueado por el marcador *gwm344*. Este no fue amplificado en la población UC1113 x Kofa, pero mapeó 1,5 cM de *gwm146* en el mapa consenso de trigo hexaploide (Somers *et al.*, 2004) y a 1,4 cM en el mapa consenso de trigo candeal (Clarke *et al.*, 2008).

### **QTL 7BS**

Un QTL adicional para el CPC fue identificado sobre el brazo corto del cromosoma 7B

(7BS), flanqueado por los SSR *barc23a* y *barc72* (**Figura 13**). Este QTL fue significativo en la campaña 2007/08 en los ambientes IV y V y en el análisis combinado. También se lo detectó como probable en el ambiente III, en el análisis combinado 2006/07 (**Tabla 28**) y el análisis combinado para los seis ambientes (**Tabla 33**). De manera que este QTL se mostró más estable en la campaña 2007/08, pero no al considerar los seis ambientes. El QTL 7BS no fue identificado en los ambientes de Estados Unidos utilizando esta misma población (Zhang *et al.*, 2008).

El único informe de la presencia de este QTL en trigo candeal fue realizado por Patil *et al.*, (2008) quienes lo denominaron QYp.macs-7B. El mismo se encontró ligado al SSR *gwm46*, que en la población de RILs UC1113 x Kofa mapeó a una distancia de 0,8 cM del SSR *barc23a*, marcador que flanqueó en el presente análisis al QTL 7BS. Coincidentemente, el marcador *gwm46* flanqueó a un QTL asociado al contenido de luteína, medida por HPLC, sobre un población de líneas DH derivadas de la cruce Kofa X W9262-260D3 (Singh *et al.*, 2008). Este marcador y el QTL asociado al contenido de luteína se encontraron sobre el cromosoma 7B en el primer mapa consenso de trigo candeal publicado (Clarke *et al.*, 2008). Como ya se mencionara al introducir el tema, la luteína es el principal carotenoide presente en trigo candeal (Lepage & Sims, 1968). Utilizando mapeo por asociación (MA) se encontró un QTL asociado al CPC en el brazo corto del cromosoma 7B, sobre los SSR *gwm537*, *gwm400*, *wmc758* y *wmc475* (Reimer, 2008, MSc Tesis). Como se discute más adelante, en esta tesis se encontró un QTL en el 7BS asociado al CIE b\* entre los marcadores flanqueantes *gwm537* y *gwm400*.

### **9.1.3 Cromosoma 7A**

Dos QTL para al CPC se ubicaron sobre el cromosoma 7A (7AS y 7AL), asociados de manera estable con un marcador flanqueante común (*barc174* y *wmc116*, sobre el 7AS y 7AL, respectivamente) en todos aquellos ambientes donde fueron detectados (**Figura 14**).

#### **QTL 7AS**

EL QTL 7AS fue identificado como probable, con valores de LOD entre 2 y 3, en los ambientes I, II, VI y en el análisis combinado 2006/07 y combinado de los seis ambientes (**Tablas 28, 29 y 33**). Para el análisis combinado de los 6 ambientes, si bien no alcanza a ser significativo, tuvo un valor de LOD de 2,85. Este QTL fue asociado significativamente al CIE b\*, como se discute más adelante. Se trata de un QTL menor, que explica entre un 4,4 y 7,5 % de la variación fenotípica para el carácter.

Estuvo flanqueado por los marcadores *BQ170462\_176* y *barc174*, con la excepción del ambiente I donde se posicionó entre los SSR *barc174* y *barc1034*. El SSR *barc174* fue el más fuertemente ligado al QTL 7AS, cuyo alelo favorable fue aportado por UC1113. La evaluación de estas RILs realizada en los Estados Unidos identificó esta región genómica como asociada a la altura máxima del mixograma (*peak height* - PKHT), solapándose con el QTL 7AS, asociado al CPC en esta tesis.

**Este es el primer informe de la existencia de un QTL sobre el cromosoma 7AS asociado al CPC ó al CIE b\* (como se verá más adelante). La presencia del QTL 7BS, región homeóloga, fue informada recientemente (Patil *et al.*, 2008; Clarke *et al.*, 2008).**

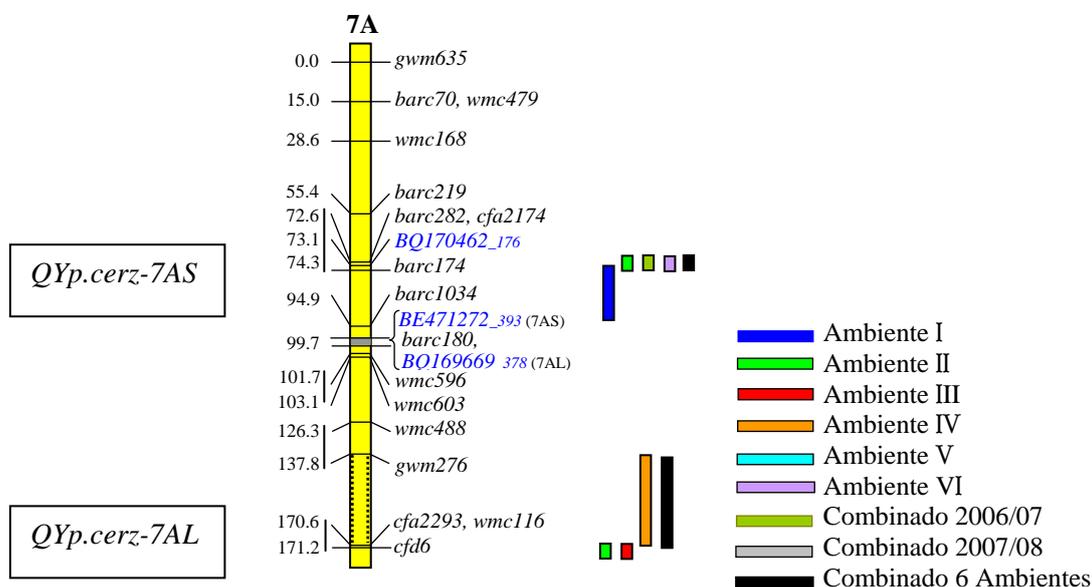
Elouafi *et al.* (2001) encontraron dos QTL sobre el cromosoma 7A (*QYp-7A.1*, *QYp-7A.2*) y aunque ambos fueron detectados sobre el brazo largo, el QTL *QYp-7A.1* se ubicó próximo al centrómero. Por otro lado, Blanco *et al.* (2002) informaron la presencia de QTL asociados al rendimiento (kg/ha) en 7AS y 7BS y sus posibles efectos pleiotrópicos sobre otros QTL asociados al contenido de proteína en estas mismas regiones. Kumar *et al.* (2006) informaron dos QTL solapados asociados a fecha de espigazón y PMG en trigo pan sobre el 7AS. De manera similar, Elouafi & Nachit (2004) hallaron en trigo candeal un QTL asociado a PH sobre 7AS, que explicó 17% de la variación fenotípica. En los análisis de correlación realizados en el presente trabajo se expuso la asociación encontrada entre el CIE b\*, el CPC y los caracteres de rendimiento Kg/ha, PH y PMG. Por ello, podría suponerse la existencia de efectos pleiotrópicos sobre este nuevo QTL, pero será necesario validar la posición y el origen del mismo.

### **QTL 7AL**

Un QTL probable fue mapeado sobre el brazo largo del cromosoma 7A (7AL) en tres ambientes (II, III y IV) pero no se lo detectó en los análisis combinados. Este QTL fue asociado al CPC, color de sémola y pasta en los Estados Unidos utilizando la misma población de RILs. El mismo explicó la mayor parte de la varianza fenotípica para los caracteres mencionados (22, 25 y 15 % respectivamente). La expresión del mismo no fue tan significativa en la Argentina, donde sólo explicó entre un 5,5 y 9,3 % de la variación para el CPC. El alelo positivo para este QTL fue aportado por el progenitor UC1113.

Pozniak *et al.* (2007) confirmaron que el locus *Psy-1* reside sobre el grupo de

cromosomas homeólogos 7 en trigo candeal. El gen *Psy-1.7A* es homeólogo a *Psy-1.7B*, y podría ser responsable de la variación del CPC asociada con el QTL 7AL.



**Figura 15:** Identificación de QTL (significativos y probables) asociados a CPC sobre el cromosoma 7A de trigo candeal. Las barras coloreadas corresponden a la posición del pico del QTL en cada ambiente (Figuras modificadas de Zhang *et al.*, 2008)

Sin embargo, este gen no mostró diferencias ni en la secuencia de la región codificante ni en el promotor entre los alelos de Kofa y UC1113 (Zhang & Dubcovsky, 2008). Este descubrimiento, junto con el mapeo físico de *Psy-1.7A*, utilizando líneas de delección de Chinese Spring, en un bin localizado distalmente al pico del QTL 7AL (identificado en ese estudio), sugeriría que un gen diferente a *Psy-1.7A* es el responsable de las diferencias en CPC asociadas al QTL 7AL. Coincidentemente, sobre la población W9262-260D3/Kofa, el alelo homoeólogo *Psy-1.7A* no fue asociado con el color del endosperma y no se encontraron alelos polimórficos entre los progenitores (Pozniak *et al.*, 2007) El gen *Psy-1.7A* fue clonado y utilizado para desarrollar un marcador funcional co-dominante (*YP7A*) cuya utilidad fue validada en cultivares primaverales chinos (He *et al.*, 2008).

La posición del QTL 7AL detectado en los Estados Unidos y la Argentina resultó ser idéntica, y los resultados de esta tesis apoyarían la hipótesis acerca de la presencia de un segundo gen afectando el CPC.

El 7AL también se encontró utilizando otras poblaciones de mapeo de trigo candeal (Elouafi *et al.*, 2001; Somma *et al.*, 2004; Patil *et al.*, 2008), y en trigo pan explicó la mayor parte de la variación fenotípica para el carácter (Parker *et al.*, 1998; Mares & Campbell 2001; McCartney *et al.*, 2006; He *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009). En trigo candeal este QTL (*QYp.macs-7A*), mapeado utilizando la población PDW233 x Bhalegaon4, resultó ser un QTL mayor que explicó un 55,22 % de la variación del CPC (Patil *et al.*, 2008).

#### **9.1.4 Cromosoma 1B**

En este estudio se encontró al QTL 1BL asociado al CPC flanqueado por el SNP *BE443797\_436* y el SSR *barc302* en los ambientes II, IV, V, el análisis combinado 2007/08 y el análisis combinado de los seis ambientes. Sin embargo, sólo resultó significativo para el ambiente II, donde explicó un 10,17 % de la variación fenotípica. También se lo mapeo como probable en el ambiente VI, estando el pico ubicado más distalmente, entre los marcadores *Psr162* y *wmc728*.

En Estados Unidos se identificó un QTL en este cromosoma flanqueado por los marcadores *wmc626* y *barc302*. El mismo estuvo asociado al color de pasta y al CPC. Otro QTL, asociado al PH, se encontró solapado con los anteriores (Zhang *et al.*, 2008). Aparentemente la misma región estaría afectando el PH y el CPC. En esta tesis, el análisis de correlación mostró que el PH está asociado negativamente, en forma altamente significativa, al CPC en los ambientes I y III ( $r=-0.32$  y  $r=-0,27$ ) (Paginas 70 y 71).

#### **9.1.5 Cromosoma 2A**

Los marcadores SSR *wmc382* y *gwm296* flanquearon el QTL menor 2AS, identificado en los ambientes IV, V y el análisis combinado 2007/08 como asociado al CPC (**Tabla 29**). Sólo resultó significativo en el análisis combinado.

Genes mayores para el color amarillo fueron encontrados sobre el grupo cromosómico 2 de trigo candeal (Joppa *et al.*, 1988). Otros autores también encuentran QTL para CPC en esta región (Pozniak *et al.* (2007) y regiones homeólogas (Mares & Campbell, 2001; Somma *et al.*, 2004).

Este QTL no fue detectado en la misma población en Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2008). Sin embargo, Cenci *et al.*, (2004) mapearon en este cromosoma dos clones

putativos del gen para la enzima  $\zeta$ -caroteno desaturasa (Zds) en trigo candeal. En maíz se ha clonado el gen que codifica para esta enzima (Matthews *et al.*, 2003) y su importancia en la acumulación de carotenoides en la semilla ha sido verificada (Wong *et al.*, 2004). Este gen fue propuesto por Pozniak *et al.*, (2007) como candidato para el QTL localizado en 2A. Este mismo informó recientemente un QTL mayor asociado al contenido de luteína y zeaxantina localizado sobre el cromosoma 2A (Singh *et al.*, 2008). En el mapa consenso de trigo candeal informado por Clarke *et al.* (2008) se identificó un QTL para CPC en el cromosoma 2AS y la región cercana al centrómero sobre 2AL fue asociada con el contenido de Luteína y Zeaxantina.

En 1999, Jimenez & Dubcovsky ya habían asignado un importante rol en la actividad polifenol oxidasa (PPO) en trigo pan y candeal a genes localizados sobre el grupo homeólogo 2. Esta enzima ha sido implicada en la decoloración de noodles asiáticos y mapea en la misma región. Por ello también podría ser considerada candidata.

Los QTL identificados sobre 4AL, 5AS, 5AL y 5BL serán discutidos junto con los detectados para el color CIE  $b^*$ .

## 9.2 Mapeo de QTL asociados al color amarillo

El CIE  $b^*$  fue utilizado, al igual que el CPC, para mapear QTL sobre la población UC1113 x Kofa. Durante la campaña 2006/07 se detectaron un total de 15 QTL significativos en los ambientes I, II, III y el análisis combinado de esa campaña, mientras que 8 QTL adicionales fueron identificados como probables (**Tabla 30**). Los análisis de mapeo de la segunda campaña (2007/08) detectaron 15 QTL significativos en los ambientes IV, V, VI y el análisis combinado. También se encontraron 11 probables QTL en esta campaña (**Tabla 31**).

Los principales QTL identificados coincidieron con los encontrados previamente para el CPC (4AL.1, 4AL.2, 6AL.1, 6AL.2, 6AL.3, 7AS, 7AL, 7BS y 7BL). Estos QTL mantuvieron una posición estable a lo largo de los seis ambientes, con la excepción de los QTL 4AL.1 y 7BL. Otros QTLs fueron detectados en algunos ambientes en particular sobre los cromosomas 1AL, 3BS, 5AS, 5AL y 5BL pero no fueron consistentes.

**Tabla 30:** QTL para color amarillo (CIE b\*) detectados en la población de RILs (UC1113 x Kofa) de trigo candeal en la campaña 2006/07.

Ambiente	Cromosoma	Marcadores flanqueantes (cM)	Alelo favorable	Posición del pico (cM)	LOD	Efecto aditivo	R <sup>2</sup> (%)
I	4AL.1	<i>DuPw4-barc170(0,5)</i>	U	45,71	3,39	-0,24	9,10
	4AL.2	<i>wmc219(0,0)-wmc722</i>	K	126,21	3,15	0,23	8,34
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(1,7)</i>	K	65,41	5,54	0,34	17,09
	7AS	<i>wmc168(10,5)-barc219</i>	U	39,11	3,11	-0,29	12,56
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,3)</i>	K	58,91	2,34	0,20	6,24
	7BL	<i>Psy-B1-cfa2257(2,3)</i>	K	196,01	2,70	0,26	8,86
II	1BS	<i>gwm374(4,5)-wmc406</i>	K	4,51	2,71	0,26	7,99
	4AL.1	<i>DuPw4-barc170(0,0)</i>	U	46,21	3,64	-0,26	8,39
	6AL.1	<i>barc146(0,0)-gwm132</i>	K	36,21	5,67	0,37	16,06
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(0,7)</i>	K	66,41	2,32	0,24	5,61
	7AL	<i>wmc116-cfd6a(4,8)</i>	U	165,81	5,83	-0,43	22,47
	7BS	<i>barc72(0,0)-gwm297</i>	K	59,21	4,39	0,33	12,76
III	6AL.2	<i>barc113-wmc553(0,7)</i>	K	64,91	8,57	0,40	28,30
	7AS	<i>BQ170462_176-barc174(0,2)</i>	U	74,11	4,24	-0,26	11,73
	7BS	<i>gwm537-gwm400(0,8)</i>	K	22,31	2,93	0,22	8,44
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,3)</i>	K	58,91	2,08	0,18	5,09
	7BL	<i>Psy-B1-cfa2257(0,8)</i>	K	198,51	4,25	0,28	12,05
QTL combinado año 2006/07	1AL	<i>Cfa2147-CDO393(0,4)</i>	K	155,51	2,27	0,17	5,27
	1BL	<i>psr162(22,0)-wmc728</i>	K	120,61	2,55	0,36	21,85
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(0,2)</i>	K	66,91	9,73	0,39	26,03
	7AS	<i>BQ170462_176-barc174(0,0)</i>	U	74,31	3,58	-0,23	8,17
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,0)</i>	K	59,21	3,51	0,23	8,31
	7BL	<i>Psy-B1-cfa2257(2,8)</i>	K	196,51	4,34	0,28	11,70

1,2,3 Indican diferentes QTL posicionados sobre un mismo brazo cromosómico. R<sup>2</sup>= % de la varianza explicada por el QTL. I = ACA-Cabildo, II = CEI-Barrow, III = INTA-Balcarce. U=UC1113, K= Kofa.

**Tabla 31:** QTL para color amarillo (CIE b\*) detectados en la población de RILs (UC1113 x Kofa) de trigo candeal en la campaña 2007/08.

Ambiente	Cromosoma	Marcadores flanqueantes (cM)	Alelo favorable	Posición del pico (cM)	LOD	Efecto aditivo	R <sup>2</sup> (%)
IV	1BL	<i>barc181(8,5)-GluB1</i>	K	71,81	2,54	0,25	9,31
	4AL.1	<i>gwm192b-Lpx-A3(6,0)</i>	U	12,31	2,36	-0,24	8,69
	4AL.2	<i>wmc219(0,0)- wmc722</i>	K	126,21	3,50	0,26	10,44
	6AL.1	<i>barc146(0,0)-gwm132</i>	K	36,21	5,82	0,35	18,38
	6AL.3	<i>barc353-gwm169(2,2)</i>	K	90,41	3,40	0,29	12,38
	7AS	<i>wmc168(8,8)-barc219</i>	U	36,61	2,57	-0,30	13,31
	7BL	<i>Psy-B1-cfa2257(0,3)</i>	K	199,01	2,26	0,21	5,96
V	1BL	<i>barc181-GluB1(2,3)</i>	K	80,31	2,40	0,22	6,72
	4AL.2	<i>wmc219(0,0)- wmc722</i>	K	126,21	3,03	0,22	6,73
	5AS	<i>wmc350-gwm47(1,5)</i>	U	2,01	4,54	-0,30	12,88
	5BL	<i>barc74(1,5)-gwm371</i>	U	42,71	4,30	-0,29	12,23
	6AL.1	<i>barc146(0,0)-gwm132</i>	K	36,21	7,31	0,39	21,38
	6AL.3	<i>gwm169(0,0)-BE483091_472</i>	K	92,61	3,89	0,28	10,39
	VI	3BS	<i>gwm493-cfd79(2,0)</i>	U	20,01	2,44	-0,23
5AS		<i>wmc350(0,0)-gwm47</i>	U	0,01	5,11	-0,34	16,20
5AL		<i>wmc110-wmc577(6,5)</i>	U	185,31	2,31	-0,25	9,51
7AS		<i>BQ170462_176-barc174(0,0)</i>	U	74,31	2,33	-0,21	5,98
7AL		<i>wmc116-cfd6a(0,1)</i>	U	171,11	3,35	-0,26	9,80
7BL		<i>cfa2040-barc1073(0,0)</i>	K	184,61	4,57	0,35	13,97
QTL combinado año 2007/08	1BL	<i>barc181-GluB1(5,3)</i>	K	77,31	2,98	0,25	10,68
	4AL.2	<i>wmc219(0,0)- wmc722</i>	K	126,21	3,27	0,22	8,21
	5AS	<i>wmc350(0,0)-gwm47</i>	U	1,01	3,61	-0,26	11,50
	5BL	<i>barc74(4,0)-gwm371</i>	U	45,21	2,87	-0,23	9,43
	6AL.1	<i>barc146(0,0)-gwm132</i>	K	36,21	5,54	0,32	17,43
	6AL.3	<i>gwm169(0,0)-BE483091_472</i>	K	92,61	3,73	0,26	11,37
	7AS	<i>wmc168-barc219(2,8)</i>	U	52,61	2,20	-0,20	6,80

1,2,3 Indican diferentes QTL posicionados sobre un mismo brazo cromosómico. R<sup>2</sup>= % de la varianza explicada por el QTL. IV = ACA-Cabildo, V = CEI-Barrow, VI = INTA-Balcarce. U=UC1113, K= Kofa.

### 9.2.1 Cromosoma 4A

Los QTL localizados sobre el brazo largo del cromosoma 4A (4AL.1 y 4AL.2) aparecieron asociados al CIE b\* en un número mayor de ambientes (**Tablas 30 y 31**). Mientras que el QTL 4AL.1 fue identificado para el CPC sólo en el ambiente I, entre los

marcadores *Lpx-A3--wmc617a* (**Tabla 28**).

#### QTL 4AL.1

El QTL menor 4AL.1 asociado al CIE b\* se mapeó en los ambientes I, II y IV. En los dos primeros ambientes se ubicó entre los marcadores *DuPw4* y *barc170*. Para el ambiente IV el pico estuvo entre el SSR *gwm192b* y el marcador STS *Lpx-A3*, en una posición más cercana a este último. El marcador génico *Lpx-A3* se ubicó en el mapa a 27,9 cM de *barc170*. El marcador *Lpx-A3* mostró un efecto significativo sobre el color de sémola, pasta y el CPC sobre esta misma población de RILs en los Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2008).

Las lipoxigenasas ejercen un rol principal en la degradación de los carotenoides en trigo candeal, por lo que el gen *Lpx-A3* podría ser un buen candidato para este QTL. Sin embargo, un análisis adicional de mapeo por marcador simple utilizando el ANOVA sobre los marcadores ubicados en esta región, indicó que el marcador *DuPw4* se encuentra más fuertemente asociado al CIE b\* y el CPC que el anterior (**Tabla 32**). Estos resultados no fueron coincidentes con lo detectado por el CIM, aunque este último es un método más preciso.

**Tabla 32:** Análisis de QTL por marcador simple utilizando ANOVA sobre los marcadores en la región cercana al QTL 4AL.1 identificado por CIM.

QTL 4AL.1	Promedios					
	6 ambientes		2006/07		2007/08	
	CIE b*	CPC	CIE b*	CPC	CIE b*	CPC
<i>gwm192b</i>	2,77ns	1,69ns	3,81ns	1,9ns	1,71ns	1,4ns
<i>Lpx-A3</i>	4,2(p=0,043)	3,78ns	5,43(p=0,022)	4,22(p=0,043)	2,81ns	3,25ns
<i>wmc617a</i>	2,19ns	2,25ns	4,68(p=0,033)	2,94ns	0,59ns	1,61ns
<i>DuPw4</i>	9,1(p=0,003)	9,82(p=0,002)	12,24(0,000)	11,43(p=0,001)	5,74(p=0,019)	7,94(p=0,006)
<i>Barc170</i>	6,16(p=0,015)	6,22(p=0,015)	8,52(p=0,004)	7,32(p=0,008)	3,75ns	4,99(p=0,028)

*DuPw4* y *Lpx-A3* se encuentran a una distancia de 25,9 cM. Este desplazamiento del pico del QTL podría ser considerado, por un lado como un efecto ambiental aleatorio o, por otro lado, a la presencia de dos genes afectando el CPC y el CIE b\* en esta región.

Genes putativos que codifican para la enzima fitoeno desaturasa (PDS), importante en la biosíntesis de carotenoides, fueron mapeados en el grupo cromosómico 4 (4A, 4B)

en trigo candeal (Cenci *et al.*, 2004). No se han realizado trabajos que informen una posición más precisa de la misma sobre el cromosoma 4A. La misma podría estar asociada a los QTL identificados sobre este cromosoma. Sin embargo, esta hipótesis debe ser validada.

#### **QTL 4AL.2**

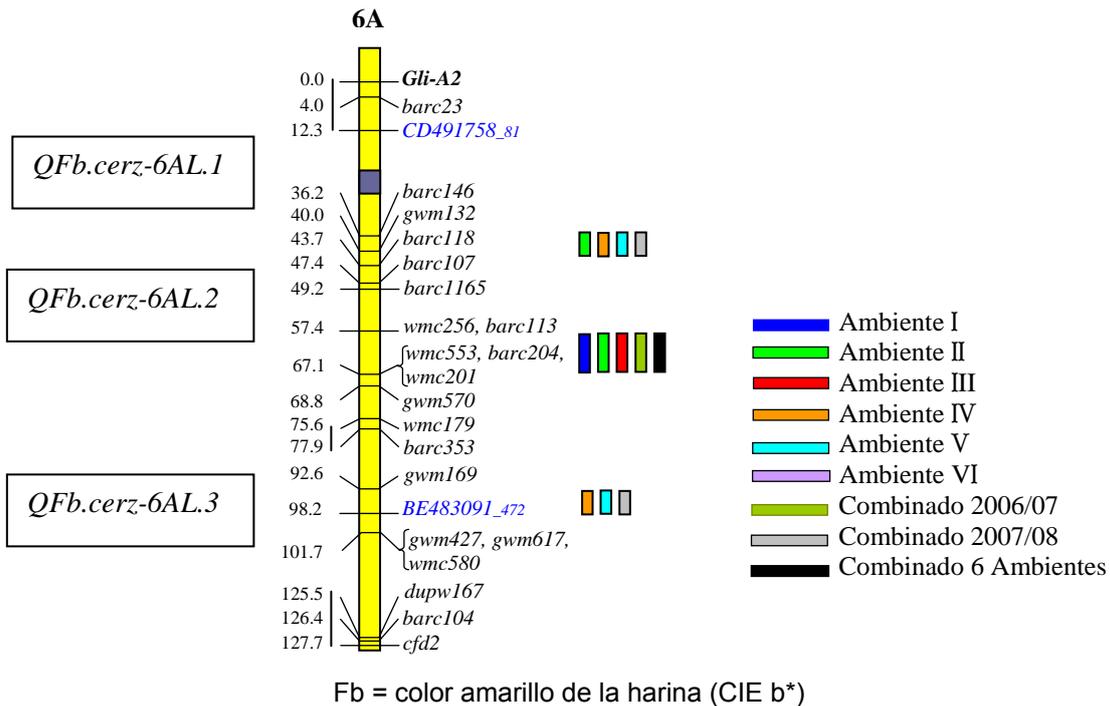
Este QTL (4AL.2) fue identificado en los ambientes I, IV, V y los análisis combinados 2007/08 y combinado para los seis ambientes. En el análisis combinado de los seis ambientes este QTL, junto con el 6AL.2 resultaron ser los únicos significativos de acuerdo al test de 1000 permutaciones (**Tabla 33**). El QTL 4AL.2 mostró una posición estable y su pico se ubicó, en todos los ambientes, entre los marcadores *wmc219* y *wmc722*, explicando entre 6,5 y 10,6 % de la varianza fenotípica. También fue asociado al CPC en el ambiente II. Zhang *et al.* (2008) encontraron los QTL 4AL.1 y 4AL.2 sobre el cromosoma 4A afectando el color de sémola. Resultados similares fueron informados por Hessler *et al.* (2002) y por Zhang *et al.* (2009) en trigo pan, en este caso flanqueado por el SSR *barc170*.

#### **9.2.2 Cromosoma 6A**

Tres QTL fueron identificados sobre este cromosoma (6AL.1, 6AL.2 y 6AL.3), todos se encontraron ubicados, de manera estable, entre los mismos SSR (**Tablas 30 y 31 y Figura 16**). De forma diferente a lo ocurrido con el CPC, el QTL 6AL.2 no fue identificado en todos los ambientes y se lo detectó únicamente durante la primer campaña en los ambientes I, II y III, pero se mostró estable en el análisis combinado 2006/07 y combinado de los seis ambientes.

Sobre el ambiente II se detectó, además, el QTL 6AL.1, el cual explicó una gran parte de la variación fenotípica (16,06 %), en relación al QTL 6AL.2 (5,61 %). En la campaña 2007/08 los QTL identificados fueron el 6AL.1 y 6AL.3. No se encontró el QTL 6AL.2. Para el ambiente VI, no se encontraron QTL sobre este cromosoma (**Tabla 31**). El QTL 6AL.1 mostró un valor de  $R^2$  mayor frente a los otros dos, en todos los ambientes donde fue identificado.

La región genómica designada como 6AL.2 fue asociada al CPC, color de sémola y pasta por el grupo de Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2008). Somma *et al.* (2004) identificaron un QTL asociado al CPC sobre el cromosoma 6A sobre una población de RILs de trigo candeal (Latino x Primadur).



**Figura 16:** Identificación de QTL asociados al CIE b\* sobre el cromosoma 6A de trigo candeal (significativos y probables). Las barras coloreadas corresponden a la posición del pico del QTL en cada ambiente (Figuras modificadas de Zhang *et al.*, 2008)

Mientras que en trigo pan, un QTL para CIE b\* fue identificado sobre 6AL ligado al marcador *gwm169*, aunque no fue asociado al CPC sobre la misma población (Zhang *et al.*, 2006). Mares & Campbell (2001) informaron un QTL sobre 6A asociado al CIE b\*, identificado en sólo un ambiente. Por otro lado, Pozniak *et al.* (2007) identificaron un QTL para el CPC sobre el cromosoma homeólogo 6B. Usando mapeo por asociación Reimer *et al.* (2005), informaron un QTL en el cromosoma 6A para CPC y CIE b\*.

Un análisis de QTL para rendimiento (Kg/ha) utilizando la misma población en los ambientes I, II y III detectó un QTL mayor sobre el cromosoma 6AL en el ambiente III, con el SSR *barc118* ubicado más próximo al pico del mismo (Akkiraju *et al.*, 2008). El *barc118* se encuentra a 7,5 cM del SSR *barc146*, que fue en todos los casos el marcador ubicado sobre el pico del QTL 6AL.1 (CIE b\*), por lo que podría suponerse un efecto pleiotrópico de esta región que afecta el rendimiento, sobre el QTL de color.

### 9.2.3 Cromosoma 7A

#### **QTL 7AS**

El QTL 7AS fue asociado al CIE b\* en los ambientes I, III, IV, VI y los análisis combinados 2006/07, 2007/08 y combinado de los seis ambientes. Pero sólo resultó significativo en los ambientes y en el análisis combinado de la primera campaña. La posición de máxima significancia del QTL se ubicó, alternativamente, entre los SSR *wmc168-barc219* (ambientes I, IV y combinado 2007/08) y *BQ170462\_176-barc174* (ambientes III, VI y combinado 2006/07), explicando entre un 5,98 y 13,31 % de la variación fenotípica. El porcentaje de varianza explicada para el CIE b\* resultó moderadamente superior a la del CPC. Este QTL tuvo un mayor en algunos ambientes.

**Este es el primer informe de la presencia de un QTL asociado al CIE b\* en el brazo corto del cromosoma 7.**

#### **QTL 7AL**

El QTL 7AL fue mapeado de manera significativa en los ambientes II, VI entre los marcadores *wmc116* y *cf6a*. En el ambiente II explicó la mayor parte de la varianza fenotípica (22,47%) y fue considerado menor en el ambiente VI (9,8 %). La posición de este QTL resultó ser idéntica para los dos ambientes (**Tablas 30 y 31**). En el análisis combinado de los seis ambientes, este QTL resultó probable, flanqueado por los SSR *gwm276* y *wmc116* y explicó el 8,57 % de la varianza (**Tabla 33**).

**Tabla 33:** QTL para el CPC y CIE b\* identificados sobre la población de RILs (UC1113 x Kofa) de trigo candeal combinado los 6 ambientes evaluados.

Ambiente	Cromosoma	Marcadores flanqueantes (cM)	Alelo favorable	Posición del pico (cM)	LOD	Efecto aditivo	R <sup>2</sup> (%)
QTL Combinado 6 ambientes CIE b*	1BL	<i>BE443797_436(4,5)-barc302</i>	K	51,61	2,81	0,22	8,57
	4AL.2	<i>wmc219(0,0)-wmc722</i>	K	126,21	4,04	0,24	10,61
	5BL	<i>gwm499(3,0)-BE495277_339</i>	U	69,51	2,10	-0,18	5,66
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(4,7)</i>	K	62,41	5,73	0,32	17,92
	7AS	<i>BQ170462_176-barc174(0,0)</i>	U	74,31	2,08	-0,16	4,69
	7AL	<i>gwm276-wmc116(7,3)</i>	U	163,31	2,02	-0,22	8,57
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,0)</i>	K	59,21	2,65	0,20	6,95
	7BL	<i>wmc311-wmc276(5,8)</i>	K	176,41	2,36	0,22	8,19
QTL Combinado 6 ambientes CPC (µg/g)	1BL	<i>BE443797_436-barc302(5,9)</i>	K	54,61	2,11	0,18	4,98
	5BL	<i>wmc149-barc74(1,6)</i>	U	39,61	2,24	-0,19	5,39
	6AL.2	<i>barc113-wmc553(1,7)</i>	K	65,41	10,45	0,43	29,85
	7AS	<i>BQ170462_176-barc174(0,0)</i>	U	74,31	2,85	-0,20	6,26
	7BS	<i>barc23a-barc72(0,0)</i>	K	59,21	2,09	0,19	4,79
	7BL	<i>cfa2040-barc1073(0,0)</i>	K	184,61	2,99	0,23	6,61
	7BL	<i>Psy-B1-cfa2257(0,3)</i>	K	195,51	2,86	0,24	7,90

1,2,3 Indican diferentes QTL posicionados sobre un mismo brazo cromosómico. R<sup>2</sup>= % de la varianza explicada por el QTL. U=UC1113, K= Kofa.

#### 9.2.4 Cromosoma 7B

##### QTL 7BL

Un QTL sobre el 7BL asociado al CIE b\* fue detectado en los ambientes I, III, IV, VI y los análisis combinados 2006/07 y de los seis ambientes. El mismo se ubicó entre los marcadores *Psy-B1* y *cfa2257* en los ambientes (I, III, IV, VI y el análisis combinado 2006/07). Para el ambiente VI el pico del QTL se posiciono entre los SSR *cfa2040* y *barc1073* (Tablas 30 y 31). Mientras que, en el análisis combinado de los seis ambientes fue flanqueado por los SSR *wmc311* y *wmc276* (Tabla 33). Este QTL explicó, en los ambientes que resultó significativo, entre un 11,70 y 13,97 % de la variación en el carácter.

##### QTL 7BS

Al igual que para el CPC, se encontró un QTL asociado al CIE b\* sobre el brazo corto del cromosoma 7B (7BS). Fue significativo en el ambiente II y el análisis combinado de la primera campaña y resultó probable en los ambientes I y III. No se lo detectó en la campaña 2007/08, donde para el CPC si tuvo una importancia mayor. El pico de este QTL se encontró fuertemente ligado al marcador *barc72* para ambos caracteres. Un

segundo QTL fue mapeado como probable sólo para el ambiente III, entre los SSR *gwm537* y *gwm400*, a 36,9 cM de *barc72*. Como se mencionara previamente estos dos últimos marcadores se encontraron asociados a un QTL de CPC. (pag. 80).

Los QTLs identificados sobre este dos cromosomas (7A y 7B) fueron discutidos más extensamente para el mapeo de CPC y las consideraciones ya expuestas pueden extenderse al CIE b\* por tratarse de caracteres altamente correlacionados (paginas 81-86).

### **9.2.5 Cromosoma 1B**

Los QTLs identificados sobre el cromosoma 1B asociados al CIE b\* no mostraron una posición estable. En todos los casos estos QTL resultaron probables, con valores de LOD entre 2,5 y 3,0. En el ambiente II el QTL fue flanqueado por los marcadores *gwm374* y *wmc406* (1BS). En el análisis combinado 2006/07 este QTL se ubicó más distal sobre 1BL, entre los marcadores flanqueantes *Psr162* y *wmc728*. Mientras que en los ambientes IV, V y el análisis combinado 2007/08 se ubicó en la región distal del brazo largo entre el SSR *barc181* y el marcador isoenzimático *Glu-B1* (**Tablas 30 y 31**). Sin embargo, en el análisis combinado de los seis ambientes, el QTL 1BL se posicionó en la misma región asociado al CPC y el CIE b\*, entre los marcadores flanqueantes *BE443797\_436* y *barc302* (**Tabla 33**). El alelo positivo para el carácter fue aportado por la variedad Kofa.

En un trabajo realizado utilizando la misma población de mapeo se encontró un QTL asociado al test de sedimentación SDS para los ambientes I, II y III de Argentina (Conti, 2007; Conti *et al.*, 2008) y Estados Unidos (Zhang *et al.*, 2008), entre los marcadores *barc181* y *Glu-B1*. Por otro lado, Reimer (2008) identificó un QTL para el CPC sobre 1BS asociado a los SSR *barc8* y *gwm413*. Estos últimos marcadores se posicionaron en la población de RILs (UC1113 x Kofa) a 5,4 y 12,8 cM del SSR *wmc406*, marcador que flanqueó el QTL 1BS sobre el ambiente II.

Un QTL sobre 1B asociado al color amarillo de la harina (*QFb-1B*), el CPC (*QYpc-1B*) y color amarillo de noodles (*QNb-1B*) fue informado recientemente, ubicado entre los marcadores *Sec1* y *HVM23*, en una población de trigo pan (Zhang *et al.*, 2009). Para esta población, el marcador *HVM23* estuvo fuertemente ligado al SSR *barc181*, que se encontró asociado al color CIE b\* en nuestra población (**Tablas 30 y 31**). Este mismo SSR fue asociado al contenido de proteína en harina sobre una población de haploides duplicados de trigo pan ('Trident' x 'Molineux') (Kuchel *et al.*, 2006).

McCartney *et al.* (2006) informaron un total de 14 QTLs de calidad en trigo pan (principalmente caracteres de mixograma y farinograma) cerca del locus *Glu-B1* (cromosoma 1B), incluyendo el contenido de proteína en harina. En los análisis realizados sobre las variedades testigos sembradas en nuestros ensayos junto a la población de RILs se encontró que el % de proteína estuvo correlacionado al color CIE b\* ( $r=0,45$ ) y al CPC ( $r=0,37$ ) medidos en harina integral, de forma altamente significativa.

#### 9.2.6 QTL inestables

Otros QTLs más inestables fueron detectados en algunos ambientes en particular sobre los cromosomas 1AL, 3BS, 5AS, 5AL y 5BL. El QTL 1AL sólo fue identificado como probable en el análisis combinado 2006/07, entre los marcadores *cfa2147* y *CDO393* (Tabla 29). Patil *et al.* (2008) informaron un QTL asociado al CPC en la región distal de brazo largo del cromosoma 1A, en una región co-linear al QTL identificado en el presente trabajo. Además, Zhang *et al.* (2009) informaron en trigo pan un QTL sobre 1AL entre los marcadores *wmc278* y *cf59*, cercano al marcador *cfa2147*.

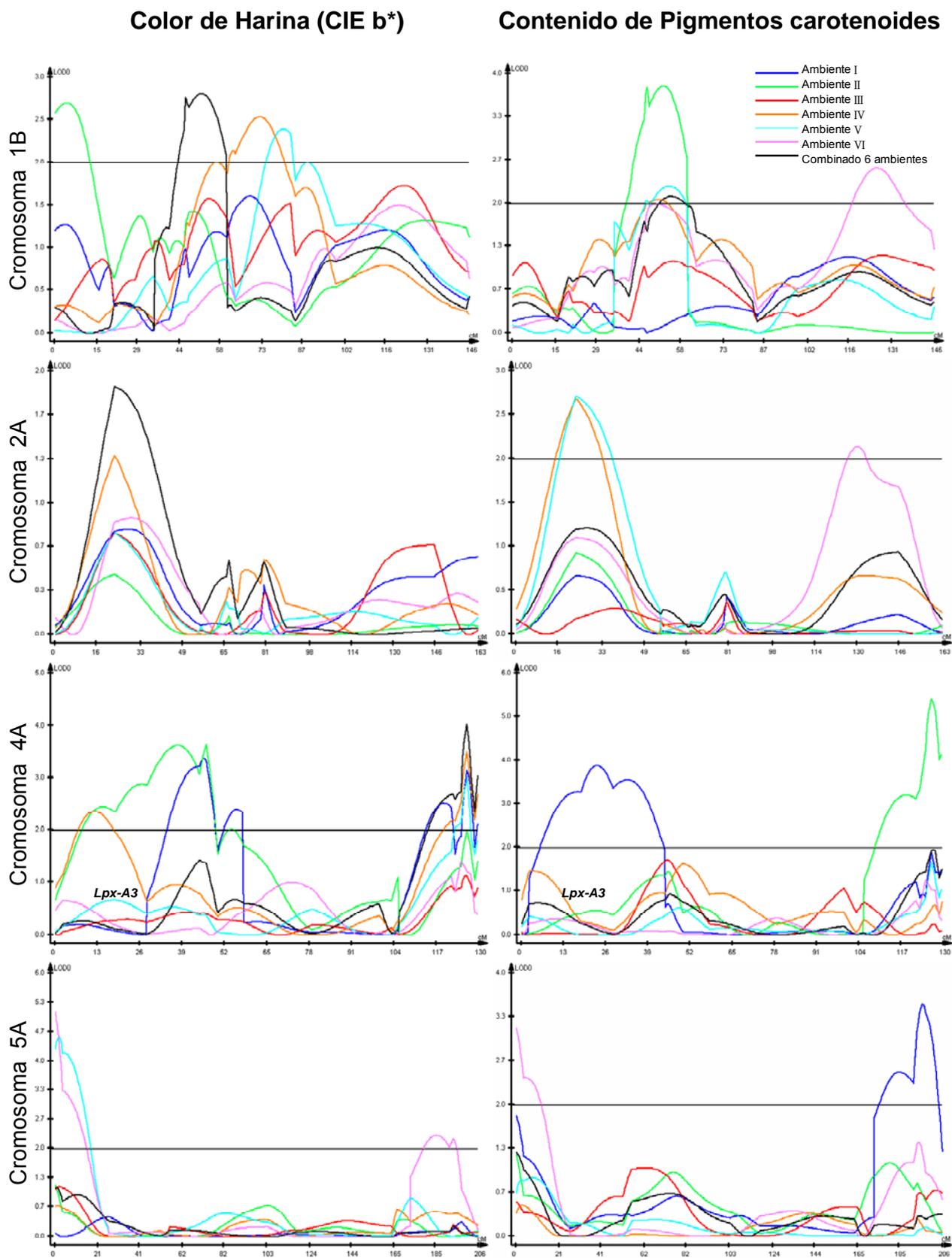
Un probable QTL asociado al color CIE b\* en el ambiente VI se encontró en el 3BS, flanqueado por *gwm493* y *cf79* (Tabla 31). Un análisis previo sobre esta misma población identificó un QTL mayor asociado al rendimiento (Kg/ha) que estuvo ligado al SSR *gwm493*, explicando un 36,63% de la variación fenotípica para el ambiente III de Argentina (Akkiraju *et al.*, 2008). La superposición de estos QTL estaría indicando un posible efecto pleiotropico del rendimiento sobre el QTL 3BS para CIE b\*. Coincidentemente, este ambiente resultó ser el de mayor rinde durante la primera campaña y corresponde a la localidad de Balcarce, al igual que el ambiente VI.

Un QTL sobre el 5AS fue asociado, de forma significativa, al CIE b\* para los ambientes V, VI y el análisis combinado 2007/08, entre los marcadores *wmc350* y *gwm47*. El mismo explicó un 12,88, 16,20 y 11,50 % de la variación fenotípica respectivamente. Además, este QTL explicó un 8,29 % de la varianza fenotípica para el CPC en el ambiente VI. El alelo favorable fue aportado por la línea UC1113. En este mismo cromosoma Zhang *et al.*, (2008) identificaron un QTL asociado al PMG, entre los marcadores *wmc350* y *barc101*. Es de destacar que los mayores valores de rendimiento y PMG (datos no informados) obtenidos por nuestro grupo de trabajo fueron en los ambientes V y VI. Por lo que, como se discutió en los análisis de correlación, podría esperarse un efecto de estas variables sobre el CIE b\* y el CPC.

En la campaña 2007/08 se registraron mayores precipitaciones y se obtuvieron mayores rindes en cada ambiente con respecto a la primera campaña. Este hecho coincidió con la aparición de otros QTL que no fueron mapeados al evaluar los datos fenotípicos de la campaña 2006/07. Un efecto pleiotrópico del PMG o el rendimiento podría ser responsable del QTL 5AS. Es importante mencionar, además, que la mayoría de los QTL asociados al CIE b\* identificados en el ambiente VI, fueron aportados por la línea UC1113 (de más alto rendimiento).

Un QTL sobre el cromosoma 5BL, en el ambiente V y en el análisis combinado 2007/08 afectó ambos caracteres. El mismo estuvo asociado al CIE b\* entre los SSR *Barc74* y *gwm371* y al CPC entre *gwm499* y *BE495277\_339*. El marcador *gwm499* se ubicó a 15,4 cM de *gwm371*, por lo que podría tratarse de QTLs ligados. Estas regiones resultaron invertidas para CIE b\* y CPC al utilizar el vector promedio de los seis ambientes en el análisis de QTL (**Tabla 33**). Patil *et al.*, (2008) informaron recientemente un QTL asociado al CPC sobre el cromosoma 5BL, ligado el marcador *gwm408*. Este SSR se ubicó en nuestro mapa ligado al SNP *BE495277\_339*. Utilizando MA, Reimer (2008) identificó un QTL para CPC sobre el marcador *gwm371* y un QTL adicional ligado al SSR *gwm408*, sobre el cromosoma 5BL, lo que apoya la hipótesis de dos QTL ligados en el brazo largo del cromosoma 5B.

La **Figura 17** muestra los gráficos correspondientes al análisis de QTL realizado sobre ambos caracteres para los seis ambientes en forma individual y al utilizar el vector promedio. Sobre el eje y se encuentran los valores de LOD score y sobre el eje de las x las distancias a lo largo del cromosoma en cM.



**Figura 17:** Gráficos de los QTL identificados para color de harina y CPC en la población de RILs (UC1113 x Kofa) en seis ambientes de Argentina y en promedio por cromosoma.

### Color de Harina (CIE b\*)

### Contenido de Pigmentos carotenoides

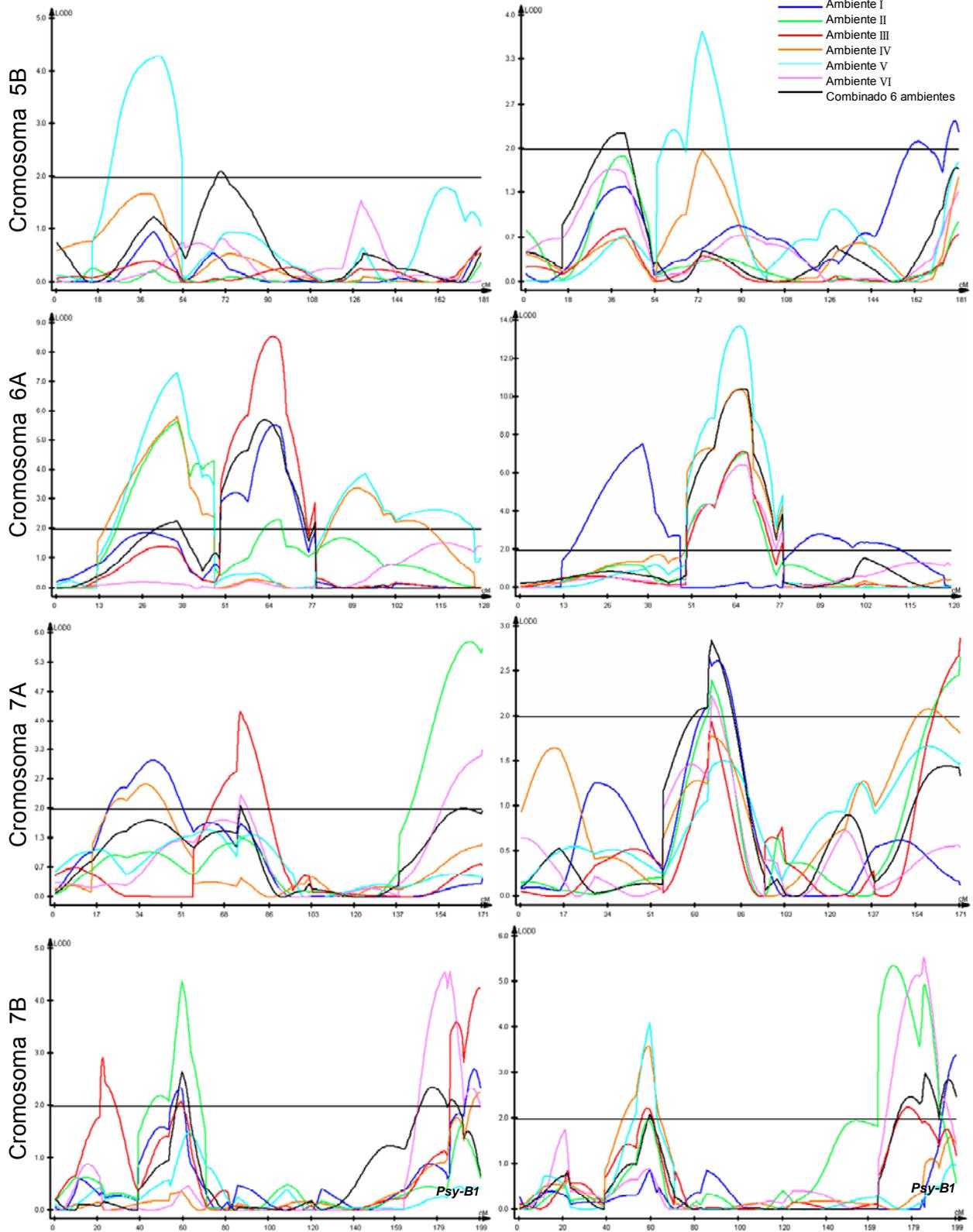


Figura 17: Continuación

## 10. Interacción entre QTL

Identificar posibles interacciones entre QTL es de utilidad para comprender de forma precisa el efecto combinado de algunos genes, más aún si pertenecen a una misma vía metabólica. Además es un factor importante a considerar en el momento de utilizar MAS, ya que la selección combinada de algunos QTL podría causar un efecto de interacción negativo, restando eficiencia a la selección. Por el contrario, sería beneficioso encontrar una interacción positiva entre QTL (**Tabla 34**).

**Tabla 34:** ANOVA para el CPC y CIE b\* con interacciones de dos vías, considerando los QTL como fuente fija de variación

Fuente de variación	G.L.	6 ambientes	
		CIE b*	CPC
Valor F			
<b>QTL</b>			
1BL( <i>BE443797_436</i> )	1	0,02	0,1
4AL.2( <i>wmc219</i> )	1	2,97	2,98
6AL.1( <i>barc146</i> )	1	7,18*	9,21**
6AL.2( <i>wmc553</i> )	1	11,14**	16,77***
7AS( <i>barc174</i> )	1	3,19	2,06
7BS( <i>barc72</i> )	1	7,38**	9,39**
7BL( <i>cfa2257</i> )	1	19,25***	15,56***
<b>Interacciones</b>			
1BL*4AL.2	1	0,01	0,01
1BL*6AL.1	1	2,7	3,22
1BL*6AL.2	1	6,02*	7,72**
1BL*7AS	1	1,53	3,27
1BL*7BS	1	0,68	1,45
1BL*7BL	1	1,53	2,59
4AL.2*6AL.1	1	0,26	0,01
4AL.2*6AL.2	1	5,66*	3,17
4AL.2*7AS	1	0,01	0,64
4AL.2*7BS	1	0,79	0,28
4AL.2*7BL	1	0,3	0,32
6AL.1*6AL.2	1	0,41	0,03
6AL.1*7AS	1	2,72	5,46*
6AL.1*7BS	1	1,02	1,59
6AL.1*7BL	1	8,01**	9,9**
6AL.2*7AS	1	0,76	1,07
6AL.2*7BS	1	1,07	1,29
6AL.2*7BL	1	0,07	0,99
7AS*7BS	1	1,38	0,73
7AS*7BL	1	0,72	0,54
7BS*7BL	1	0,62	1,5
R <sup>2</sup> de modelo		0,78	0,81
Coef. de variación		2,65	7,46
Promedio		15,99	5,94

\*, \*\*, \*\*\* = p < 0,05, p < 0,01 y p < 0,001 respectivamente. G.L.= grados de libertad.

Para buscar las posibles interacciones de dos vías entre los QTL encontrados por el CIM, se utilizó un modelo de ANOVA considerando los marcadores en el pico de los QTL según los análisis combinados de CIE b\* y CPC para los seis ambientes. Además se tuvo en cuenta la posición más estable de algunos QTL (1BL y 7BL) a través de los ambientes al momento de seleccionar el marcador. Fueron incluidos en este modelo los QTL más estables para ambos caracteres (**Tabla 34**). Este modelo explicó un 78 y 81 % de la variación fenotípica para el CIE b\* y el CPC, respectivamente.

Al considerar, dentro del modelo para el QTL 7BL el marcador génico *Psy-B1*, como así también los SSR *barc340* y *barc1073*, en lugar de *cfa2257*, los valores de R<sup>2</sup> disminuyeron y el número de efectos e interacciones significativas fue menor. Esto mismo ocurrió al incluir el QTL 7AL al modelo de ANOVA. Mientras que, considerando el QTL 4AL.1 el R<sup>2</sup> del modelo aumentó, pero muchos de los efectos e interacciones se volvieron no significativos.

Si bien para algunos QTL individualmente el ANOVA no resultó significativo, fue útil en detectar interacciones entre los mismos y otros QTL asociados al CIE b\* y el CPC. EL ANOVA detectó cuatro interacciones significativas. Los QTL 1BL y 6AL.2 mostraron un efecto de interacción sobre ambos caracteres. Además, los QTL 4AL.2 y 6AL.2 tuvieron una interacción significativa sobre el color CIE b\*. Estos dos QTL fueron los únicos identificados como significativos por el CIM para el análisis combinado de seis ambientes.

**El nuevo QTL identificado sobre 7AS mostró un efecto de interacción con el QTL 6AL.1, afectando el CPC de manera significativa.**

La interacción entre los QTL 6AL.1 y 7BL resultó significativa para ambos caracteres. Este análisis mostró que los principales QTL significativos según el mapeo combinado poseen también un efecto de interacción. Sin embargo, no se desprende del ANOVA si las mismas producen un efecto positivo o negativo sobre los caracteres. Para ello será necesario seguir profundizando los análisis estadísticos realizados para esta tesis.

## 11. Utilidad de los QTL en la selección

### 11.1 Ganancia genética por selección fenotípica

La medición del color amarillo por reflectancia de la luz, utilizando un equipo Minolta (CIE  $L^*a^*b^*$ ) es una práctica común en los programas de mejoramiento de trigo candeal y pan. A diferencia de lo que sucede con el candeal, en el caso del trigo pan, la selección se realiza a fin de disminuir el color amarillo. La fenotípica es la principal forma de selección para un carácter favorable dentro de un programa de mejoramiento genético. En los últimos años, los programas de mejoramiento más adelantados han incorporado el uso de marcadores moleculares asistiendo la selección, especialmente para caracteres complejos y/o enfermedades, pero la selección fenotípica sigue siendo aún la base de todo programa de mejora.

La población de mapeo mostró una segregación transgresiva en ambos sentidos, por lo que es posible seleccionar RILs con valores destacados de CIE  $b^*$  y CPC. Se realizó entonces la selección fenotípica sobre los valores medios de cada ambiente y en promedio de los seis ambientes, tomando los mejores 10 individuos sobre un total de 93 (10,75%). La heredabilidad estricta calculada para los 6 ambientes fue alta (**Tablas 17 y 18**) y sería esperable encontrar una ganancia genética importante en una generación subsiguiente.

Las **Tablas 35 y 36** muestran las 10 mejores RILs seleccionadas en base a la media por genotipo en cada ambiente y al promedio general. Estas RILs podrían utilizarse como fuente de germoplasma para un alto CIE  $b^*$  o CPC y los genes favorables que portan pueden ser transferidos a través de retrocruzas, utilizando las RILs como progenitores donantes. En estas tablas se muestra el número de RIL seleccionada junto al valor fenotípico en unidades del carácter entre paréntesis. Algunas de estas RILs seleccionadas mostraron valores superiores al mejor testigo utilizado en los ensayos a campo (Buck Topacio) (**Tabla 37**).

**Tabla 35:** Selección fenotípica de las 10 mejores RILs (UC1113 x Kofa) en cada ambiente, según el promedio por localidad y el promedio general para el color de harina (CIE b\*).

N° RILs Seleccionadas						
Ambiente						Promedio 6 ambientes
I	II	III	IV	V	VI	
9 (18,36)	2 (17,83)	2 (16,92)	2 (18,31)	2 (18,55)	2 (16,04)	2 (17,58)
13 (18,19)	13 (17,22)	17 (16,84)	9 (17,69)	9 (17,53)	7 (15,69)	9 (16,99)
17 (18,44)	17 (17,24)	32 (17,47)	13 (17,72)	12 (17,64)	12 (15,5)	13 (17,13)
32 (19,09)	32 (17,67)	33 (16,69)	17 (17,84)	13 (18,08)	13 (15,53)	17 (17,4)
33 (18,25)	33 (17,41)	42 (16,53)	27 (17,54)	17 (17,98)	17 (16,09)	32 (17,73)
42 (18,75)	42 (18,03)	46 (16,68)	32 (18,15)	32 (18,1)	32 (15,89)	33 (17,06)
47 (18,53)	45 (17,25)	47 (16,63)	33 (17,43)	42 (17,78)	46 (15,94)	42 (17,2)
84 (18,19)	46 (17,56)	50 (16,82)	42 (17,93)	46 (18,23)	84 (15,73)	46 (17,19)
88 (18,95)	47 (17,75)	58 (16,65)	47 (17,56)	47 (18,23)	88 (15,79)	47 (17,34)
91 (18,53)	88 (17,39)	88 (16,78)	88 (17,63)	90 (17,99)	89 (15,56)	88 (17,24)

I = ACA-Cabildo 2006/07, II= CEI-Barrow 2006/07, III= INTA-Balcarce 2006/07, IV= ACA-Cabildo 2007/08, V= CEI-Barrow 2007/08, VI= INTA-Balcarce 2007/08.

**Tabla 36:** Selección fenotípica de las 10 mejores RILs (UC1113 x Kofa) en cada ambiente, según el promedio por localidad y el promedio general para el CPC.

N° RILs Seleccionadas						
Ambiente						Promedio 6 ambientes
I	II	III	IV	V	VI	
13 (8,25)	9 (7,92)	17 (6,77)	2 (7,68)	2 (7,48)	2 (5,78)	2 (7,17)
17 (8,31)	13 (8,19)	32 (7,24)	13 (7,53)	13 (7,2)	13 (5,94)	13 (7,18)
32 (8,69)	17 (8,53)	33 (6,99)	17 (7,42)	17 (7,59)	17 (6,45)	17 (7,51)
42 (9,07)	32 (8,86)	42 (6,76)	32 (8,2)	32 (8,09)	32 (6,5)	32 (7,93)
46 (8,41)	33 (8,47)	47 (6,92)	42 (8,28)	33 (7,05)	33 (5,92)	33 (7,12)
47 (7,97)	42 (9,18)	74 (7,21)	46 (7,56)	42 (7,62)	42 (5,85)	42 (7,79)
50 (8,82)	46 (8,29)	75 (6,92)	47 (7,56)	47 (7,2)	46 (6,02)	46 (7,35)
58 (7,92)	46 (8,41)	80 (6,93)	50 (7,48)	80 (7,16)	47 (6,2)	47 (7,34)
84 (7,86)	47 (8,15)	84 (6,98)	84 (7,54)	84 (7,21)	50 (5,76)	84 (7,2)
88 (7,93)	84 (7,93)	88 (6,81)	88 (7,62)	89 (7,12)	75 (5,75)	88 (7,1)

I = ACA-Cabildo 2006/07, II= CEI-Barrow 2006/07, III= INTA-Balcarce 2006/07, IV= ACA-Cabildo 2007/08, V= CEI-Barrow 2007/08, VI= INTA-Balcarce 2007/08.

Muchas de las RILs seleccionadas mostraron buen comportamiento en todos los ambientes, aunque se observaron variaciones de ciertos genotipos para un ambiente en particular. Este resultado apoya la idea de que la interacción detectada por el ANOVA fue de tipo simple y no compleja o cruzada para los genotipos.

**Tabla 37:** Valores de CIE b\* y CPC en los testigos comerciales considerando el promedio de la interacción genotipo x año x localidad.

Variedad	N	CIE b*	CPC
Kofa	17	17,01b	6,92b
UC1113	17	15,48f	5,11g
Buck Platino	17	15,72e	5,49f
Buck Topacio	18	17,35a	7,69a
Buck Esmeralda	18	15,78e	5,59ef
B.I. Facon	18	16,09d	6,29d
B.I. Cariló	18	16,76c	6,74c
B.I. Cumenay	18	13,67h	3,45i
Buck Cristal	18	15,51f	5,69e
Buck Ámbar	18	14,82g	4,61h

Las variedades con la misma letra no difieren significativamente según el test de Duncan ( $\alpha = 0,05$ )

La ganancia genética (GG) debida a la selección fenotípica fue calculada en base a los valores de heredabilidad estimados en cada ambiente. Se encontró que la selección fenotípica para CPC tendría una mayor eficiencia que la realizada para el CIE b\*, considerando la GG como porcentaje de la media poblacional original ( $\overline{Mo}$ ) (**Tablas 38 y 39**). Los porcentajes de GG (GG%) para CPC variaron alrededor del 20-25% según los valores medios considerados para seleccionar. Mientras que la GG% calculada para el color CIE b\* varió entre 6,0 y 9,5 %.

**Tabla 38:** Ganancia genética para el CIE b\* obtenida por selección fenotípica sobre la población de RILs (UC1113 x Kofa) en cada ambiente.

Ambiente	Selección fenotípica basada en:			
	RIL promedio por localidad		RIL promedio general	
	GG	GG%	GG	GG%
I	1,22	7,07	1,09	6,34
II	1,43	8,92	1,40	8,72
III	1,17	7,54	1,06	6,79
IV	1,27	7,73	1,24	7,51
V	1,37	8,28	1,23	7,41
VI	1,34	9,29	1,11	7,71

GG= ganancia genética, GG%= ganancia genética en porcentaje.

Los mayores valores de GG y/o GG% se obtienen a partir de la selección fenotípica en base a la media de cada RILs calculada por localidad, como promedio de las tres

repeticiones de parcelas. Pero para analizar con mayor precisión la respuesta a la selección en varios ambientes será necesario profundizar los análisis.

**Tabla 39:** Ganancia genética para el CPC obtenida por selección fenotípica sobre la población de RILs (UC1113 x Kofa) en cada ambiente.

Ambiente	Selección fenotípica basada en:			
	RIL promedio por localidad		RIL promedio general	
	GG	GG%	GG	GG%
I	1,58	23,59	1,39	20,74
II	1,59	23,51	1,53	22,63
III	1,37	24,62	1,17	21,11
IV	1,44	23,07	1,42	22,83
V	1,38	23,29	1,35	22,79
VI	1,18	24,52	1,14	23,74

GG= ganancia genética, GG%= ganancia genética en porcentaje.

Los altos valores de heredabilidad para estos caracteres hacen que la selección fenotípica sea efectiva. Estos valores de GG se obtienen al seleccionar 10 individuos sobre un total de 93 (10,75%), aunque es posible obtener mayores valores de GG si se aumenta la presión de selección.

Es necesario puntualizar que esta tesis está considerando un solo carácter fenotípico (color), mientras que comúnmente un programa de mejoramiento evalúa simultáneamente varios caracteres (rendimiento, calidad, enfermedades, etc.) para los cuales se aplica la selección en diferentes etapas del programa y simultáneamente en algunos caracteres.

Un aumento en la presión de selección buscando mayores GG para color, causaría posiblemente una pérdida de variabilidad genética para otros caracteres. Braaten *et al.* (1962), informaron que es posible obtener una ganancia genética por selección aceptable (0,4-0,9 ppm) para el CPC utilizando una presión de selección del 30% en poblaciones F<sub>3</sub> de trigo candeal. Mientras que Johnston *et al.* (1983), obtuvieron un diferencial de selección de 1,5 unidades de CIE b\* utilizando la misma presión de selección y sobre poblaciones F<sub>3</sub>.

La selección fenotípica para color amarillo y otros caracteres de calidad como la fuerza de gluten, estimada a través del test de sedimentación SDS, se realiza principalmente

en etapas tempranas de un programa de mejoramiento ( $F_2$  y  $F_3$ ), eliminando así la mayor parte de los genotipos indeseables para estos caracteres. Una nueva selección puede ser ventajosa si se realiza previo a entrar en la etapa de ensayos preliminares de rendimiento (Braaten *et al.*, 1962).

## 11.2 Selección por marcadores ligados a QTL

La utilidad de los marcadores ligados a los QTL para seleccionar genotipos con valores fenotípicos superiores se evaluó simulando la selección asistida sobre los valores de CPC promedio de los seis ambientes en la población de RILs (UC1113 x Kofa). La selección se hizo considerando los marcadores que flanquearon los QTL, con excepción de los QTLs 4AL.1 y 7BL, donde se consideró un intervalo mayor, debido a que el pico de los mismos no tuvo una posición estable (**Tabla 40**). La selección de un intervalo del cromosoma menor para estos últimos QTL, no mostró diferencias significativas sobre los valores de diferencial de selección (DS) y ganancia genética (GG), por lo que, finalmente se utilizaron los marcadores que muestra la **Tabla 40**. Para aumentar la eficiencia en la selección habría que disminuir el intervalo, de manera de evitar la posibilidad de recombinación entre QTL y marcador/es.

**Tabla 40:** Selección por marcadores flanqueantes a QTL individuales para el CPC promedio de 6 ambientes.

Cromosoma	Marcadores flanqueantes	Is (cM)	$\overline{Ms}$	Alelo favorable	Test t	DS	GG	% GG	MF <sub>n+1</sub>
1BL	<i>BE443797_436-barc302</i>	13,4	6,28 (23)	K	ns	0,29	0,28	4,68	6,27
2AS	<i>wmc382-gwm296</i>	22,8	6,01 (33)	U	ns	0,02	0,02	0,27	6,01
4AL.1	<i>LpxA3-barc170</i>	27,9	6,34 (28)	U	0,0193	0,35	0,34	5,61	6,33
4AL.2	<i>wmc219-wmc722</i>	1,2	6,17 (34)	K	ns	0,18	0,18	2,92	6,17
5AS	<i>wmc350-gwm47</i>	3,5	6,26 (29)	U	ns	0,27	0,26	4,39	6,25
5BL	<i>barc74-gwm371</i>	9,9	6,19 (37)	U	ns	0,20	0,20	3,28	6,19
6AL.1	<i>barc146-gwm132</i>	3,8	6,40 (30)	K	0,0072	0,41	0,39	6,55	6,38
6AL.2	<i>barc113-wmc553</i>	9,7	6,45 (37)	K	0,0012	0,45	0,44	7,35	6,43
7AS	<i>BQ170462_176-barc174</i>	1,2	6,22 (43)	U	ns	0,23	0,22	3,69	6,21
7AL	<i>wmc116-cfd6a</i>	0,6	6,20 (50)	U	ns	0,20	0,20	3,26	6,19
7BS	<i>barc23a-barc72</i>	5,3	6,29 (28)	K	0,0376	0,30	0,29	4,81	6,28
7BL	<i>barc1073-cfa2257</i>	15,9	6,17 (45)	K	ns	0,18	0,17	2,90	6,16

Media población original = 5,99 (n=93);  $h^2 = 96,9$

1,2 Indican diferentes QTL posicionados sobre un mismo brazo cromosómico. Is= Intervalo seleccionado, ns= no significativo. Ms= media de la población seleccionada, DS= Diferencial de selección, GG = ganancia genética, % GG= ganancia genética en porcentaje, MF<sub>n+1</sub>= media predicha en la filial n+1.

Se chequeo la significancia estadística del DS a través del test t, para diferencia de medias. También se estimó la media de la población filial en la siguiente generación (MF<sub>n+1</sub>) como la sumatoria de la media poblacional original ( $\overline{M_o}$ ) y la GG. La GG se expresó además, como porcentaje de la media poblacional original (GG%). De los valores obtenidos a partir de la selección individual sólo los QTL 4AL.1, 6AL.1, 6AL.2 y 7BS resultaron significativos según el test t.

A partir de los resultados del ANOVA sobre los QTL, sería esperable que la selección combinada de dos o más QTL produzca un efecto de interacción. La **Tabla 41** muestra los mejores resultados obtenidos al seleccionar los genotipos que portan dos, tres, cuatro o más QTLs simultáneamente. La media seleccionada sobre la población de RILs ( $\overline{M_s}$ ) fue expresada en ppm, con el número de individuos seleccionados entre paréntesis y su significancia estadística.

Sería esperable que al seleccionar sobre más de un QTL los efectos individuales de los mismos se sumaran, es decir, que los QTLs tuvieran un efecto aditivo. Observando los valores de Di (ver materiales y métodos) se comprueba que en muchos de los casos la selección simultánea de varios QTL es aditiva. Los valores positivos de Di muestran que la interacción entre QTL resulta positiva.

La selección fenotípica, como se mostró anteriormente, alcanzó valores de GG% entre 20 y 25 % aproximadamente, según el ambiente considerado (**Tabla 39**). La selección por marcadores moleculares ligados a QTL, realizada sobre el carácter CPC, fue igualmente efectiva o superior para algunas combinaciones analizadas. La selección a favor de tan solo 3 QTLs (1BL + 6AL.2 + 7BS) obtuvo valores de GG% del 21,68%, mientras que seleccionando a favor de cuatro QTLs (1BL + 4AL.2 + 6AL.2 + 7BS) la GG% fue superior a la obtenida mediante la selección fenotípica (26,87%).

Se observa que el **nuevo QTL identificado sobre 7AS** forma parte de las combinaciones con mayor DSo, en combinaciones de dos y tres QTL (6AL.2 + 7AS, 6AL.2 + 7AS+ 7BS). A modo de ejemplo en la **Tabla 41** se muestran las combinaciones de ocho QTL (1BL + 4AL.1 + 4AL.2 + 6AL.2 + 7AS + 7AL + 7BS + 7BL; 1BL + 2AS + 4AL.1 + 5BL + 6AL.2 + 7AS + 7AL + 7BL) que solo seleccionan un individuo en cada caso y que corresponden a las RILs 32 y 42, respectivamente. Estas RILs fueron las que presentaron mayores valores de CPC y CIE b\* en todos los ambientes, como se observa en las **Tablas 35 y 36**. Las RILs que mostraron el mejor

comportamiento fenotípico fueron portadoras de casi la totalidad de los QTL identificados en este estudio.

**Tabla 41:** Selección múltiple de QTL para el CPC promedio de 6 ambientes utilizando marcadores flanqueantes.

QTLs	$\overline{M}_S$	Alelo favorable	DSo	DSe	Di	GG	% GG	MF <sub>n+1</sub>
1BL + 4AL.1	6,36 (11)ns	K+U	0,36	0,64	-0,28	0,35	5,90	6,34
1BL + 7BL	6,36 (16)*	K+K	0,37	0,47	-0,10	0,36	6,00	6,35
6AL.2 + 7AL	6,37 (25)*	K+U	0,38	0,65	-0,27	0,36	6,09	6,36
7AS + 7AL	6,40 (23)*	U+U	0,41	0,43	-0,02	0,40	6,63	6,39
4AL.1 + 7BS	6,40 (12)*	U+K	0,41	0,65	-0,24	0,40	6,68	6,39
1BL + 7BS	6,41 (12)*	K+K	0,42	0,59	-0,17	0,41	6,79	6,40
1BL + 7AS	6,46 (13)*	K+U	0,47	0,52	-0,05	0,46	7,61	6,45
7BS + 7AL	6,46 (14)*	K+U	0,47	0,50	-0,03	0,46	7,61	6,45
6AL.1 + 7BS	6,48 (11)*	K+K	0,49	0,71	-0,22	0,47	7,87	6,46
7AS + 7BL	6,49 (25)**	U+K	0,50	0,41	0,09	0,48	8,03	6,47
7AS + 7BS	6,51 (16)**	U+K	0,52	0,53	-0,01	0,51	8,47	6,50
1BL + 4AL.2	6,56 (10)*	K+K	0,57	0,49	0,08	0,55	9,14	6,54
4AL.1 + 6AL.2	6,58 (13)**	U+K	0,59	0,80	-0,21	0,57	9,54	6,56
6AL.2 + 7BS	6,63 (9)*	K+K	0,64	0,75	-0,11	0,62	10,36	6,61
6AL.1+ 6AL.2	6,72 (20)***	K+K	0,73	0,86	-0,13	0,71	11,80	6,70
1BL + 7AL	6,73 (8)**	K+U	0,73	0,49	0,24	0,71	11,89	6,70
6AL.2 + 7BL	6,74 (17)***	K+K	0,75	0,63	0,12	0,73	12,19	6,72
1BL + 6AL.2	6,82 (10)**	K+K	0,83	0,74	0,09	0,80	13,36	6,79
6AL.2 + 7AS	6,84 (15)***	K+U	0,84	0,68	0,16	0,82	13,67	6,81
4AL.1 + 6AL.2 + 7BS	6,60 (3)ns	U+K+K	0,61	1,10	-0,49	0,59	9,85	6,58
6AL.2 + 7AL + 7BL	6,69 (12)**	K+U+K	0,70	0,83	-0,13	0,68	11,37	6,67
4AL.2 + 6AL.2 + 7BL	6,82 (6)**	K+K+K	0,83	0,81	0,02	0,80	13,41	6,79
4AL.1 + 6AL.1 + 6AL.2	6,90 (7)**	U+K+K	0,91	1,21	-0,30	0,88	14,70	6,87
1BL + 6AL.1 + 6AL.2	6,92 (8)**	K+K+K	0,93	1,15	-0,22	0,90	14,98	6,89
6AL.2 + 7BS + 7BL	6,94 (6)**	K+K+K	0,95	0,93	0,02	0,92	15,31	6,91
6AL.2 + 7AS+ 7BS	7,12 (4)**	K+U+K	1,13	0,98	0,15	1,09	18,22	7,08
1BL + 6AL.2 + 7BL	7,12 (6)***	K+K+K	1,13	0,92	0,21	1,10	18,32	7,09
1BL + 6AL.2 + 7BS	7,33 (3)**	K+K+K	1,34	1,04	0,30	1,30	21,68	7,29
1BL + 4AL.1 + 6AL.2 + 7BL	6,88 (2)ns	K+U+K+K	0,89	1,27	-0,38	0,87	14,44	6,86
6AL.2 + 7AS + 7BS + 7BL	7,12 (4)**	K+U+K+K	1,13	1,16	-0,03	1,09	18,22	7,08
1BL + 4AL.2 + 6AL.2 + 7BL	7,38 (3)**	K+K+K+K	1,39	1,10	0,29	1,35	22,54	7,34
1BL + 4AL.2 + 6AL.2 + 7BS	7,65 (2)**	K+K+K+K	1,66	1,22	0,44	1,61	26,87	7,60
4AL.2 + 6AL.1 + 6AL.2 + 7BS	7,65 (2)**	K+K+K+K	1,66	1,34	0,32	1,61	26,87	7,60
4AL.2 + 6AL.2 + 7BS + 7BL	7,65 (2)**	K+K+K+K	1,66	1,11	0,55	1,61	26,87	7,60
1BL + 4AL.2 + 6AL.2 + 7AS + 7BL	7,38 (3)**	K+K+K+U+K	1,39	1,33	0,06	1,35	22,54	7,34
1BL + 4AL.1 + 4AL.2 + 6AL.2 + 7AS + 7AL + 7BS + 7BL	7,79 (1)*	K+U+K+K+U+U+K+K	1,80	2,18	-0,38	1,75	29,16	7,74
1BL + 2AS + 4AL.1 + 5BL + 6AL.2 + 7AS + 7AL + 7BL	7,93 (1)**	K+U+U+U+K+U+U+K	1,94	1,92	0,02	1,88	31,39	7,87

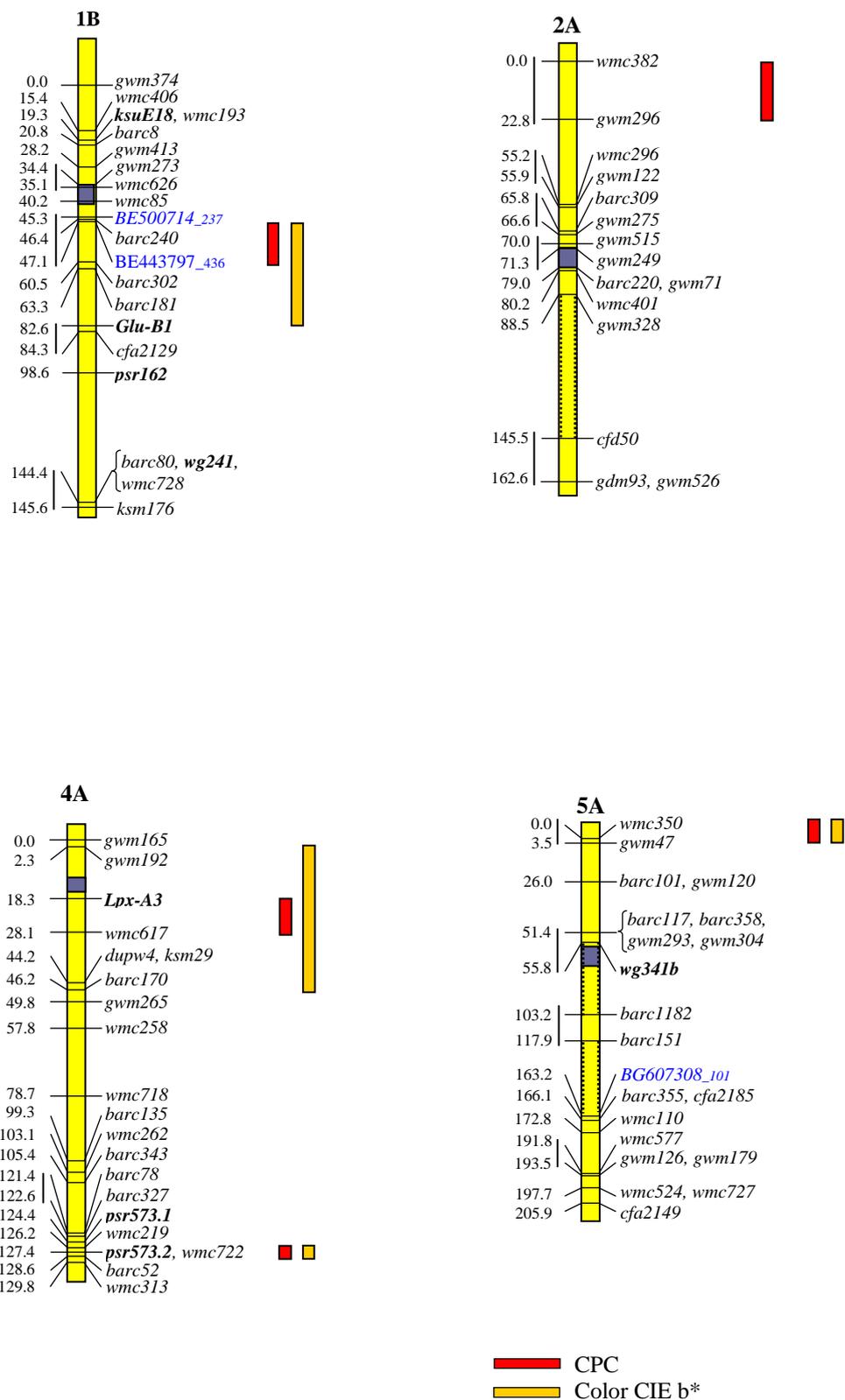
1,2 indican diferentes QTL posicionados sobre un mismo brazo cromosómico. \*, \*\*, \*\*\* significancia del Test t con  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$  respectivamente. ns= no significativo.  $\overline{M}_S$ = media de la población seleccionada, DSo= Diferencial de selección observado, DSe= Diferencial de selección esperado, Di= DSo-DSe, GG = ganancia genética, % GG= ganancia genética en porcentaje, MF<sub>n+1</sub>= media predicha en la filial n+1.

Estos resultados muestran que la selección asistida por marcadores sobre el CPC es eficiente y es posible obtener una GG equivalente o superior a la que se obtiene mediante selección fenotípica. Es importante tener en cuenta que el número de genotipos que portan los QTL seleccionados en esta población representa un 2-3 % de la población original, lo que significa una presión de selección muy alta.

En función de esto, para utilizar la MAS, debe tenerse en cuenta el número de genotipos de la población a seleccionar y el número de caracteres evaluados. Valores de GG% intermedios (10-14%) pueden alcanzarse seleccionado sobre distintas combinaciones de dos QTLs, disminuyendo la presión de selección al 10-20 %. Las distintas alternativas deben tenerse en cuenta en función de los objetivos planteados.

## **12. Principales QTLs identificados**

La **Figura 18** muestra los principales QTLs identificados asociados al CPC y al CIE b\*, posicionados sobre los cromosomas.



**Figura 18:** QTLs para CIE b\* y CPC posicionados sobre el mapa de ligamiento de la población de RILs (UC1113 x Kofa) de trigo candeal (Figuras modificadas de Zhang et al., 2008)

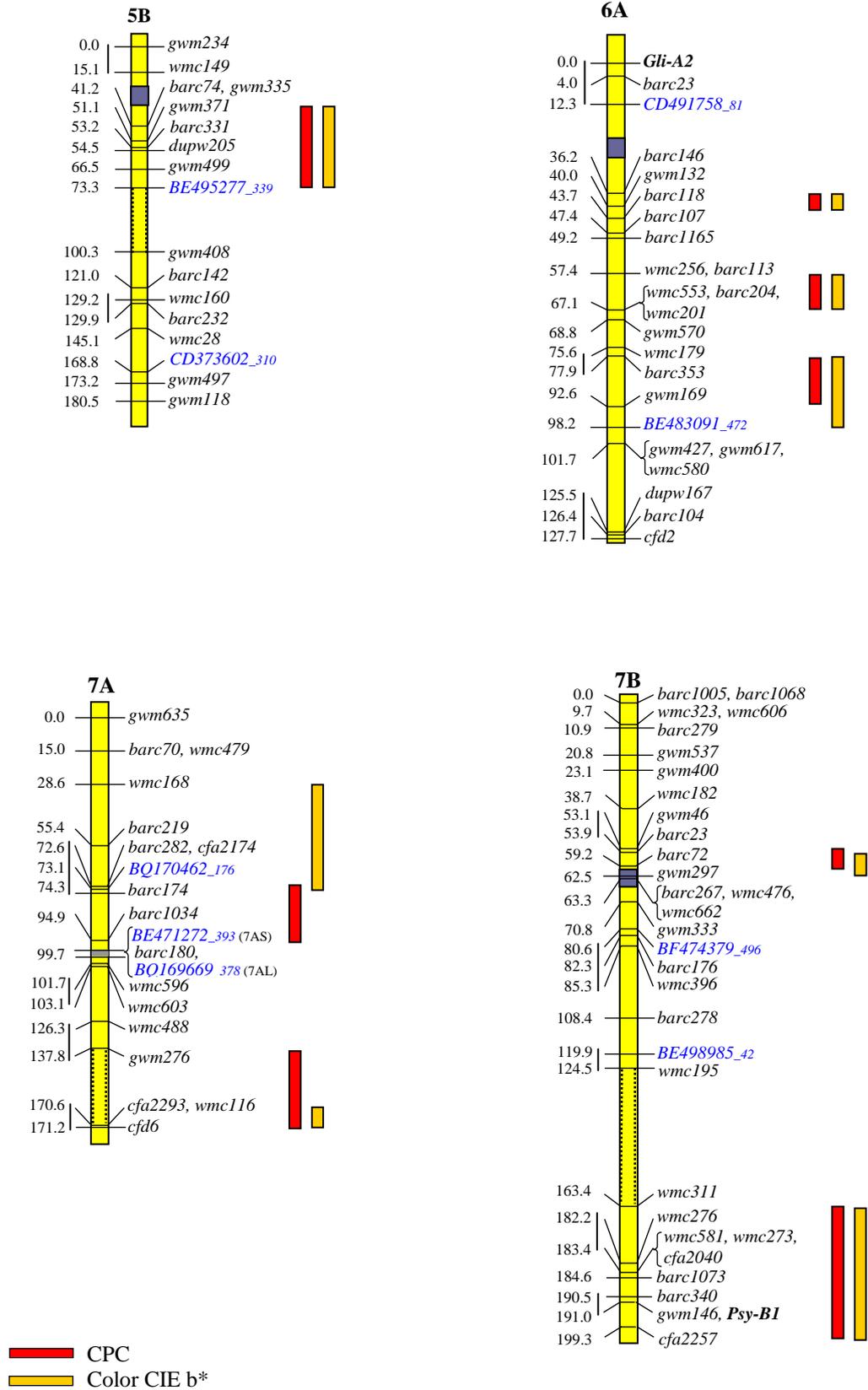


Figura 18: continuación.

# Consideraciones finales

## 1. Conclusiones

- En trigo candeal la herencia del contenido de pigmentos y color amarillo es compleja, siendo afectada por varios genes y por el ambiente, en forma moderada.
- El número de ambientes requeridos para realizar el mapeo de QTL es un factor importante a tener en cuenta, ya que los mismos genotipos presentan la expresión de genes/QTL diferentes en los distintos ambientes.
- Muchos de los QTL detectados en esta tesis fueron informados previamente por otros autores utilizando distintas poblaciones de trigo candeal y pan, lo cual valida los resultados aquí obtenidos. Por otro lado, se identificó un nuevo QTL sobre el cromosoma 7AS, asociado a CIE b\* y CPC.
- Las regiones genómicas de mayor efecto asociadas a CIE b\* y CPC fueron coincidentes, lo que demuestra un control genético similar para ambos caracteres
- Con la información de marcadores ligados a CPC y CIE b\* obtenida en este tesis es posible seleccionar indirectamente caracteres de color en trigo candeal con una eficiencia similar a la selección fenotípica y con la ventaja de no requerir ensayos a campo y análisis de calidad.

## 2. Perspectivas

El trigo y el arroz son los productos vegetales que aportan la mayor cantidad de calorías y proteínas *per cápita* en el mundo y, por lo tanto, son vehículos útiles para incrementar el aporte de nutrientes esenciales, como los carotenoides. La concentración de carotenoides en trigo es pequeña comparada con la que se encuentra en frutos y vegetales. Sin embargo, un pequeño incremento en la concentración de carotenoides en productos elaborados con trigo podría tener un impacto nutricional importante en aquellas poblaciones cuya ingesta de calorías depende del consumo de este cereal.

En la actualidad, la selección asistida por marcadores (MAS) es aplicada con mayor frecuencia en los programas de mejoramiento públicos y privados. En Argentina, el Programa Nacional de Mejoramiento de Trigo del INTA utiliza MAS para no menos de 15 genes de resistencia a roya de la hoja, fusariosis de la espiga (Sumai 3) y diferentes marcadores asociados a calidad panadera, específicamente para gluteninas de alto peso molecular (*Glu-A*, *Glu-B1*, *Glu-D1*), gluteninas de bajo peso molecular (*Glu-A3* y *Glu-D3*), gliadinas y secalinas (*Gli-A1* y *Gli-D1*), puroindolinas A y B (genes *Pin-a* y *Pin-b*), genes waxy de endosperma almidonoso (*Wx-A1* y *Wx-B1*) y susceptibilidad al prebrotado (gen viviparous, *Vp1*). También son utilizados marcadores para genes de vernalización (*Vrn-A1*, *Vrn-B1* y *Vrn-D1*), respuesta al fotoperiodo (*Ppd-D1*) y altura de planta (*Rht-1*, *Rht-2* y *Rht-8*) (Helguera, com. pers., 2008).

Recientemente, un proyecto financiado por la ANPCyT, junto con el INTA, el CONICET, tres Universidades Nacionales (UNS, FAUBA, UNRC) y 6 criaderos privados del país (Bioceres SA, Criadero Klein SA, Buck Semillas SA, Nidera SA, Asociación de Cooperativas Argentinas, Relmó SA y Asociados Don Mario SA) intenta aplicar herramientas de biotecnología para sumar competitividad y sustentabilidad a la cadena de trigo (PAE 37108), de manera de que el MAS se incorpore como estrategia de rutina en los programas de mejoramiento genético de trigo en un futuro cercano. Esta tesis está encuadrada dentro los objetivos de este proyecto.

Los genes involucrados en la vía de la biosíntesis de carotenoides son buenos candidatos para explicar algunas de las diferencias en el color del endosperma y la concentración de carotenoides entre cultivares de trigo.

En nuestro país el germoplasma elite de trigo candeal se generó a partir de pocos cultivares llegados de países del mediterráneo a principios del siglo XX, o más recientemente del CIMMyT. No se han conducido estudios de diversidad genética pero es posible que la variabilidad genética no sea muy alta. Generar esta información es fundamental, ya que revelaría la estructura genética del germoplasma y sería de gran utilidad para los fitomejoradores. Por otro lado, es posible ampliar la base genética del carácter introgressando genes de especies emparentadas. Con esta información adicional, sumada a la aplicación de nuevas tecnologías como MAS, es posible lograr programas de mejoramiento más eficientes y acelerar el lanzamiento de cultivares con mayor color, y rendimiento. El candeal recuperaría así su importancia en la zona triguera, posibilitando que nuestro país vuelva a poseer una posición destacada en su producción en el escenario mundial.

**En paralelo con esta tesis se ha avanzado en la evaluación en tres ambientes de 47 cultivares comerciales y líneas avanzadas, de diferentes orígenes, para caracteres de rendimiento y calidad. Estos conforman la colección base para futuros estudios de diversidad genética y mapeo por asociación, que se realizarán como parte de mi trabajo Postdoctoral. Durante el mismo se validarán los QTL identificados hasta la fecha a través del mapeo por asociación y análisis de QTL sobre otras poblaciones biparentales.**

**Para ello se cuenta con una colección de 120-130 cultivares y líneas avanzadas que serán utilizadas en estudios de desequilibrio de ligamiento y mapeo por asociación. Además se dispone de cuatro cruzamientos biparentales con progenitores contrastantes para caracteres de calidad y rendimiento**

**Buck Topacio x VF 042  
Bonaerense INTA Cariló x Ci 1936  
VF 0113 x Canizzo  
CBW 0105 x 73-IAT2**

**La población de mapeo utilizada en este estudio está siendo utilizada también por el mismo grupo de trabajo, con el objetivo de mapear QTLs de rendimiento en trigo candeal y de este modo abordar la temática quizás más compleja del mejoramiento genético vegetal con las herramientas genético-moleculares y bioinformáticas desarrolladas en este estudio.**

# Referencias Bibliográficas

- Abdel-Aal, E.-S.M., Young, J.C., Rabalski, I., Hucl, P. & Fregeau-Reid, J.** 2007. Identification and Quantification of Seed Carotenoids in Selected Wheat Species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 787-794.
- Abdel-Aal, E.-S.M., Young, J.C., Wood, P.J., Rabalski, I., Hucl, P., Falk, D. & Fregeau-Reid, J.** 2002. Einkorn: a potential candidate for developing high lutein wheat. *Cereal Chemistry* 79: 455–457.
- Adom, K. K., Sorrells, M. E. & Liu R. H.** 2003. Phytochemical profiles and antioxidant activity of wheat varieties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51: 7825-7834.
- 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.
- Akkiraju P\*, Roncallo PF\*, Gómez P\*, Cervigni G, Carrera A, Miranda R, Wehrhahne L, Jensen C, Bariffi J, Helguera M, Echenique V.** 2008. Mapeo de QTLs 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 zeta-carotene 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.
- Atienza, S.G., Avila, C.M. & Martin, A.** 2007a. The development of a PCR-based marker for PSY1 from *Hordeum chilense*, a candidate gene for carotenoid content accumulation in tritordeum seeds. *Australian Journal of Agricultural Research* 58: 767–773.
- Atienza, S.G., Ballesteros, J., Martin, A. & Hornero-Mendez, D.** 2007b. Genetic variability of carotenoid concentration and degree of esterification among Tritordeum (×*Tritordeum Ascherson et Graebner*) and durum wheat accessions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55: 4244-4251.

- Ballesteros, J., Ramirez, M.C., Atienza, S.G. & Martin, A.** 2005. Registration of HT621, a high carotenoid content Tritordeum germplasm line. *Crop Science* 45: 2662–2663.
- 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 pro-lycopene. *European Journal of Biochemistry* 259: 396–403.
- Basten, C., Weir, B. & Zeng, Z.-B.** 2001. QTL Cartographer. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Basten, C.J., Weir, B.S. & Zeng, Z.-B.** 1994. Zmap-a QTLcartographer. In: J.S.G.C. Smith, B.J. Benkel, W.F. Chesnais, J.P. Gibson, B.W. Kennedy & E.B. Burnside (Eds.), *Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production: Computing Strategies and Software*, Guelph, Ontario, Canada. Published by the Organizing Committee, 5<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Live stock Production.
- 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.
- 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.
- 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.
- Borghi, B., Castagna, R., Corbellini, M., Heun, M. & Salamini, F.** 1996. Breadmaking quality of einkorn wheat (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*). *Cereal Chemistry* 73:208-214.
- 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(2): 225–231.
- Borrelli, G.M., De Leonardis, A.M., Platani, C. & Troccoli, A.** 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., Troccoli, A., Di Fonzo, N. & Fares, C.** 1999. Durum wheat lipoxygenase activity and other quality parameters that affect pasta color. *Cereal Chemistry* 76 (3): 335-340.
- 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.
- Bowers, J.E., Abbey, C., Anderson, S., Chang, C., Draye, X., Hoppe, A.H., Jessup, R., Lemke, C., Lenington, J., Li, Z., et al.** 2003. A high-density genetic recombination map of sequence-tagged sites for sorghum, as a framework for comparative structural and evolutionary genomics of tropical grains and grasses. *Genetics* 165: 367-386.

- Braaten, M.O., Lebsock, 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.
- Bresegghello, F. & Sorrells, M.E.** 2006a. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Genetics* 172: 1165-1177.
- Bresegghello, F. & Sorrells, M.E.** 2006b. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Science* 46: 1323-1330.
- Brim, C.A.** 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Science* 6:220.
- Britton, G.** 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal* 9: 1551–1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H.** 1995. Carotenoids today and challenges for the future. In: Britton, G., S. Liaaen-Jensen, and H. Pfander [eds], *Carotenoids vol. 1A: Isolation and Analysis*. Basel: Birkhäuser. 13: 142-167.
- Brummer, E.C., Graef, G.L., Orf, J., Wilcox, J.R. & Shoemaker, R.C.** 1997. Mapping QTL for seed protein and oil content in eight soybean populations. *Crop Science* 37: 370-378.
- Burnette, F.S.** 1977. Peroxidase and its relationship to food flavour and quality: A review. *Journal of Food Science* 42: 1–6.
- Burr, B. & Burr, F.A.** 1991. Recombinant inbreds for molecular mapping in maize. *Trends in Genetics* 7:55-60.
- 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
- 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.
- 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.
- Casasoli, M.P., Plomion, D., Monteverdi, M.C., Barreneche, T., Lauteri, M. & Villani, F.** 2004. Identification of QTLs affecting adaptive traits in *Castanea sativa* Mill. *Plant Cell and Environment* 27(9): 1088-1101.
- Causse, M., Duffe, P., Gomez, M.C., Buret, M., Damidaux, R., Zamir, D., Gur, A., Chevalier, C., Lemaire-Chamley, M. & Rothan, C.** 2004. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* 55(403) 1671-1685.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lecomte, L., Duffe, P., Rousselle, P. & Buret, M.** 2002. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany* vol. 53(377): 2089-2098.
- Celentano, N. & Montero, K.** 2004. Clasificación de trigo argentino para su comercialización. Tesina. CEMA. Pag. 22.
- Cenci, A., Somma, S., Chantret, N., Dubcovsky, J. & Blanco, A.** 2004. PCR identification of durum wheat BAC clones containing genes coding for carotenoid biosynthesis enzymes and their chromosome localization. *Genome* 47: 911–917.

- Cervigni, G., 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.
- Chen, K.-T. & Geddes, W.F.** 1945. Studies on the wheat pigments. University of Minnesota, St Paul, MN.
- Chen, M., San Miguel, P., De Oliveira, A.C., Woo, S.S., Zhang, H., Wing, R.A. & Bennetzen, J.L.** 1997. Microcolinearity in sh2-homologous regions of the maize, rice, and sorghum genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3431-3435.
- Churchill, G.A. & R.W. Doerge.** 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138: 963-971.
- Claire, G., Williams, M., Reyes-Valdes, H. & Huber, D.A.** 2007. Validating a QTL region characterized by multiple haplotypes. *Theoretical and Applied Genetic* 116: 87-94.
- 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 sesion P. 1.4.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. & Pang, E.C.K.** 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.
- Conti, V.** 2007. Mapeo de regiones genómicas (QTL) asociadas a fuerza de gluten en trigo candeal. Tesis de Doctorado en Agronomía. UNS, Bahía Blanca
- 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.
- Corbellini, M., Empilli, S., Vaccino, P., Brandolini, A., Borghi, B., Heun, M. & Salamini, F.** 1999. Einkorn characterization for bread and cookie production in relation to protein subunit composition. *Cereal Chemistry* 76: 727-733.
- Crossa, J., Bargueño, 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.
- Cuaderno de Actualización Técnica Nº 63.** CREA. La Calidad del grano del Trigo. 2000.
- 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.
- D'egidio, M.G., Nardi, S. & Vallega, V.** 1993. Grain, flour and dough characteristics of selected strains of diploid wheat, *Triticum monococcum* L. *Cereal Chemistry* 70: 298-303.
- De Simone, V., Petrarulo, M., Menzo, V., Ficco, D.B.M., De Leonardis, A.M., Trono, D., Riefolo, C., Cattivelli, L. & De Vita, P.** 2008. Lipoxygenase activity and gene expression during grain-filling period In 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.8.15.
- Delcros, J.F., Rakotozafy, L., Boussard, A., Davidou, S., Porte, C., Potus, J. & Nicolas, J.** 1998. Effects of mixing conditions on the behavior of lipoxygenase, peroxidase, and catalase in wheat flour doughs. *Cereal Chemistry* 75: 85-93.
- Demarie, G., Viteri, L. & Ghezan, G.** 1999. Agricultura de contrato en el cultivo de trigo candeal. EEA INTA Balcarce. Copyright 2002. INTA. Rivadavia 1439 (1033) Buenos Aires, Argentina.
- Demeke, T., Morris, C.F., Campbell, K.G., King, G.E., Anderson, J.A. & Hak-Gil, C.** 2001. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations. *Crop Science*. 41: 1750-1757.
- 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.
- Di Salvo, H.** 1969. Breve historia del trigo candeal en Tres Arroyos. *Rev. Bolsa Cereales*, 96 (2818), pag. 60-61.
- Diab, A.A.** 2006. Construction of barley consensus map showing chromosomal regions associated with economically important traits. *African Journal of Biotechnology* 5(3): 235-248.
- Doerge, R. & Churchill, G.A.** 1996. Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142: 285-294.
- 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.
- Dunford, H.B. & Stillman, J.S.** 1976. On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews* 19: 187–251.
- 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.
- Espelle, K.E., Franceschi, V.R. & Kolattukudy, P.E.** 1986. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in woundhealing potato tuber tissue. *Plant Physiology* 81: 487–492.
- Fares, C., Platani, C., Tamma, G. & Leccese, F.** 1991. Microtest per la valutazione del colore in genotipi di frumento duro. *Molini d'Italia, Anno XLII* 12: 19-21.
- Feillet, P., Autran, J.C. & Icard-Vernière, C.** 2000. Mini Review, Pasta brownness: An assessment. *Journal of Cereal Science* 32(3): 215-233.
- Feldman, M. & Sears, E.** 1981. Los recursos geneticos del trigo silvestre. *Investigacion y Ciencia* 54:50-61.
- Feltus, F.A., Singh, H.P., Lohithaswa, H.C., Schulze, S.R., Silva, T.D. & Paterson, A.H.** 2006. A Comparative Genomics Strategy for Targeted Discovery of Single-Nucleotide Polymorphisms and Conserved-Noncoding Sequences in Orphan Crops. *Plant Physiol* 140: 1183-1191.
- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D., 1998.** Introduccion al uso de marcadores moleculares en el analisis genetico. 1er Ed. Brasilia: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. pp 220
- Fofana, B., Humphreys, D.G., Cloutier, S., McCartney, C.A. & Somers, D.J.** 2008 Mapping quantitative trait loci controlling common bunt resistance in a doubled haploid population derived from the spring wheat cross RL4452× ACDomain. *Molecular Breeding* 21(3): 317-325.
- Foolad, M.R., Subbiah, P. & Zhang, L.** 2007. Common QTL affect the rate of tomato seed germination under different stress and non stress conditions. *International Journal of Plant Genomics*. ID97386, 10 pages.
- Fraignier, M.P, Michaux-Ferriere, N. & Kobrehel, K.** 2000. Distribution of peroxidase in durum wheat (*Triticum durum*). *Cereal Chemistry* 77: 11-17.
- Frankel, E.N.** 1989. The antioxidant and nutritional effects of tocopherol, ascorbic acid, and  $\beta$ -carotene in relation to processing of edible oils. En: Somogyi, J.C. & Muller, H.R. (Eds.). *Nutritional Impact of Food Processing*. Vol. 43, 297-312. *Bibliotheca Nutritio et Dieta*. Karger: Basel, Switzerland.
- Fraser, P.D. & Bramley, P.M.** 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Research* 43: 228–265
- Fратиanni, A., Irano, M., Panfili, G. & Acquistucci, R.** 2005. Estimation of color of durum wheat. Comparison of WSB, HPLC, and reflectance colorimeter measurements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2373-2378.
- Fullmer, L.A. & Shao, A.** 2001. The role of lutein in eye health and nutrition. *Cereal Foods World* 46:408-413.
- 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.

- 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.
- Galterio, G., Cappelloni, M., Desiderio, E., Pogna, N.** 1994. Genetic technological and nutritional characteristics of three Italian populations of “farrum” (*Triticum turgidum* spp. *dicoccum*). *Journal of Genetics and Breeding* 48:391-398.
- 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 Disease* 70: 553-556.
- Goñi, E.** 1968. Trigo para fideos. *Rev. Bolsa Cereales*.
- Graham, R.D. & Rosser, J.M.** 2000. Carotenoids in staple foods: Their potential to improve human nutrition. *Food Nutrition Bulletin*. 21: 404–409.
- Griffiths, A.J., Miller, J.H., Susuki, D., Lewontin, R., Gelbart, W.** 1998. Introducción al análisis genético. 5<sup>th</sup> Edición. McGraw Hill, Buenos Aires. ISBN: 84-486-0106-8.
- 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
- Hackett, C.,** 2002. Statistical methods for QTL mapping in cereals. *Plant Molecular Biology* 48: 585-599.
- 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.
- Haley, C. & Andersson, L.** 1997. Linkage mapping of quantitative trait loci in plants and animals, pp. 49–71. In: P. Dear (Ed.), *Genome mapping. A practical approach*, Oxford University Press, NewYork.
- Hart, G.E. & Langston, P.J.** 1977. Chromosome location and evolution of isozyme structural genes in hexaploid wheat. *Heredity* 39: 263-277.
- Hartl, D. & Jones, E.** 2001. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA.
- 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, 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 2A 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, 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.
- Hearnden, P.R., Eckermann, P.J., McMichael, G.L., Hayden, M.J., Eglinton, J.K. & Chalmers, K.J.** 2007. A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *Theoretical and Applied Genetic* 115:383–391.
- Hentschel, V., Kranl, K., Hollmann, J., Lindhauer, M.G., Bohm, V. & Bitsch, R.** 2002. Spectrophotometric determination of yellow pigment content and evaluation of carotenoids by high-performance liquid chromatography in durum wheat grain. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50(23): 6663-6668.
- Hessler, T.G., Thomson, M.J., Benscher, 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.
- Heun, M., Kennedy, A.E., Anderson, J.A., Lapitan, N.L.V., Sorrells, M.E. & Tanksley, S.D.** 1991. Construction of a restriction fragment length polymorphism map for barley (*Hordeum vulgare*). *Genome* 34: 437-447.
- Hidalgo, A., Brandolini, A., Pompei, C. & Piscozzi, R.** 2006. Carotenoids and tocopherols 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
- Hsieh, C.C. & McDonald, C.E.** 1984. Isolation of lipoxygenase isoenzymes from flour of durum wheat endosperm. *Cereal Chemistry* 61: 392-398.
- Huang, N., Parco, A., Mew, T., Magpantay, G., McCouch, S., Guiderdoni, E., Xu, J., Subudhi, P., Angeles, E.R. & Khush, G.S.** 1997. RFLP mapping of isozymes, RAPD and QTL for grain shape, brown plan-thopper resistance in a doubled haploid rice population. *Molecular Breeding* 3(2): 105-113.
- Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B.S., Haselkorn, R., Gornicki, P.** 2002. Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the *Triticum/Aegilops* complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8133-8138.
- Hughes, D.A.** 2001. Dietary carotenoids and human immune function. *Nutrition* 17: 823-827.
- Humphries, J.M. & Khachik, F.** 2003. Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruits, vegetables, wheat and pasta products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1322-1327.
- Hunter, R.S.** 1975. Uniform color scales, Chapt. 8. The measurement of appearance. John Wiley & Sons, New York, pp 102–132.
- Icard-Vernière, C. & Feillet, P.** 1999. Effects of mixing conditions on pasta dough development and biochemical changes. *Cereal Chemistry* 76(4): 558-565.
- Invine, G.N. & Anderson, J.A.** 1953. Variation in principal quality factors of durum wheats with a quality prediction test for wheat or semolina. *Cereal Chemistry* 30: 334-342.
- Iori, R., Cavalieri, B. & Palmieri, S.** 1995. Cathodic peroxidases of durum wheat flour. *Cereal Chemistry* 72: 176–181.
- Irvine, G.N. & Winkler, C.A.** 1950. Factors affecting the color of macaroni II. Kinetic studies of pigment destruction during mixing. *Cereal Chemistry* 27: 205–218.

- Jaccoud, D., Peng, K., Feinsein, D. & Kilian, A.** 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*. 29(4):E25.
- Jompatong, C., McMullen, M.D., Barry, B.D., Darrah, L.L., Byrne, P.F., & Kross, H.** 2002. Quantitative trait loci for first- and second-generation european corn borer resistance derived from the maize inbred Mo47. *Crop Science*. 42:584-593.
- Jansen, R. & Stam, P.** 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136:1447-1455.
- Jansen, R.** 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205–211.
- Jimenez, M. & Dubcovsky, J.** 1999. Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat. *Plant Breeding*. 118: 395-398.
- 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.
- Joppa, L.R. & Williams, N.D.** 1988. Langdon durum disomic substitution lines and aneuploids analysis in tetraploid wheat. *Genome* 30: 222-228.
- Joppa, L.R., Changhen, D., Hart, G. & Hareland, G.A.** 1997. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Science* 37: 1586-1589.
- 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.
- Jukanti, A.K., Bruckner, P.L. & Fischer, A.M.** 2004. Evaluation of wheat polyphenol oxidase genes. *Cereal Chemistry* 81: 481–485.
- Jukanti, A.K., Bruckner, P.L. & Fischer, A.M.** 2006. Molecular and biochemical characterisation of polyphenol oxidases in developing kernels and senescing leaves of wheat (*Triticum aestivum*). *Functional Plant Biology* 33: 685–696.
- Karakousis, A., Gustafson, J.P., Chalmers, K.J., Barr, A.R., & Langridge, P.** 2006 A consensus map of barley integrating SSR, RFLP, and AFLP markers. *Australian Journal of Agricultural Research* 54:1173-1185.
- Kato, K., Miura, H., & Sawada, S.** 1999. QTL mapping of genes controlling ear emergence time and plant height on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 472-477.
- Kearsey, 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.
- Kobrehel, K., Laignelet, B. & Feillet, P.** 1972. Relation entre les activités peroxydasiques et polyphenoloxydasiques des blés durs et le brunissement des pâtes alimentaires. *C. R. Academic Agriculture. Fr.* 14: 1099-1106.
- Kobrehel, K., Laignelet, B. & Feillet, P.** 1974. Study of some factors of macaroni brownness. *Cereal Chemistry* 51: 675-684.
- Kosambi, D.D.** 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugenetics* 12: 172–175.
- Krinsky, N.I.** 1987. Medical uses of carotenoids. En: *Carotenoids*. Krinsky, N.I., Mathews Roth, M.M. & Taylor, R.F., Eds. Plenum Publication, NewYork. pp.195-206.
- Krinsky, N.I.** 1994. The biological properties of carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* 66: 1003-1010.
- Kruger, J.E. & Reed, G.** 1988. Enzymes and colour. En: *Wheat: Chemistry and technology*. Pomeranz, Y. Ed. American Association of Cereal Chemists. vol II, pp. 441-487.
- Kruger, J.E., Matsuo, R.R. & Preston, K.** 1992. A comparison of methods for the prediction of Cantonese noodle colour. *Canadian Journal of Plant Science* 72: 1021-1029.
- Kuchel, H., Langridge, P., Mosionek, L., Williams, K. & Jeveries, S.P.** 2006. The genetic control of milling yield, dough rheology and baking quality of wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 112: 1487–1495.
- Kuchel, H., Williams, K., Langridge, P., Eagles, H.A. & Jeveries, S.P.** 2007. Genetic dissection of grain yield in bread wheat. II. QTL-by-environment interaction. *Theoretical and Applied Genetic* 115:1015-1027.
- Kumar, N., Kulwal, P.L., Gaur, A., Tyagi, A.K., Khurana, J.P., Khurana, P., Balyan, H.S. & Gupta, P.K.** 2006. QTL analysis for grain weight in common wheat. *Euphytica* 151:135-144.
- Kunzel, G., Korzun, L. & Meister, A.** 2000. Cytologically integrated physical restriction fragment length polymorphism maps for the barley genome based on translocation break points. *Genetics* 154: 397-412.
- Laignelet, B., Kobrehel, K. & Feillet, P.** 1972. Le probleme dela coloration des pates alimentaires. *Industries Agricoles et Alimentaires* 89: 413–427.
- Lander, E.S. & Botstein, D.** 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E. & Newburg, L.** 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Landjeva, S., Korzun, V. & Börner, A.** 2007. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding. *Euphytica* 156: 271-296.
- Landrum, J.T. & Bone, R.A.** 2001. Lutein, zeaxanthin and the macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 385:28-40.
- Leach, R.C. & Mares, D.J.** 2003. Targeting the lipoxygenase gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). 53<sup>o</sup> Australian Cereal Chemistry Conference, 7-10 September.

- Lee, J., Kaltsikes, P.J. & Bushuk, W.** 1976. The inheritance of lipoxidase activity and pigment content in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 47: 243–250.
- Leenhardt, F., Lyan, B., Rock, E., Boussard, A., Potus, J., Chanliaud, E. & Remesy, C.** 2006. Genetic variability of carotenoid concentration, and lipoxygenase and peroxidase activities among cultivated wheat species and bread wheat varieties. *European Journal of Agronomy* 25: 70–176.
- Leonova, I.N., Laikova, L.I., Popova, O.M., Unger, O., Borner, A. & Roder, M.S.** 2007. Detection of quantitative trait loci for leaf rust resistance in wheat *T. Timopheevii* / *T. Tauschii* introgression lines. *Euphytica* 155: 79–86.
- Lepage, M. & Sims, R.P.A.** 1968. Carotenoid of wheat flour: Their identification and composition. *Cereal Chemistry* 45: 600-604.
- 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 advanced 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.
- Lijavetzky, D., Martinez, M.C., Carrari, F., & Hopp, H.E.** 2000. QTL analysis and mapping of pre-harvest sprouting resistance in sorghum. *Euphytica* 112(2): 125-135.
- Lincoln, S., Daly M. & Lander, E.** 1993b. Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL. Version1.1. Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, 2<sup>nd</sup> Edn.
- Lincoln, S., Daly, M. & Lander, E.** 1993a. Constructing genetic linkage maps with MAPMAKER/EXP. Version3.0. Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report, 3<sup>rd</sup> Edn.
- 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  $\beta$ -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.
- Mangels, C.E.** 1932. Regional and seasonal variation in pigmentation of durum wheats. *Cereal Chemistry* 9: 485-490.
- Manly, K.F., Cudmore, H. & Meer, J.M.** 2001. MapManager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome* 12: 930–932.

- Manna, F., Borrelli, G.M., Massardo, D., Wolf, K., Alifano, P., Del Giudice, L. & Di Fonzo, N.** 1998. Differential expression of lipoxygenase genes among durum wheat cultivars. *Cereal Research Communication* 26: 23–30.
- Mantovani, P., Maccaferri, M., Sanguineti M.C., Tuberosa, R., Catizone, I., Wenzl, P., Thomson, B., Carling, J., Huttner, E., Deambrogio, E., Kilian, A.** 2008. An integrated DArT-SSR linkage map of durum wheat. *Molecular Breeding* 22: 629–648.
- 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 gasoline 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.
- Martín, A. & Sanchez-Monge Laguna, E.** 1982. Cytology and morphology of the amphiploid *Hordeum chilense* x *Triticum turgidum* conv. *durum*. *Euphytica* 31:262–267.
- Martín, A., Cabrera, A., Hernández, P., Ramírez, M.C., Rubiales, D. & Ballesteros, J.** 2000. Prospect for the use of *Hordeum chilense* in durum wheat breeding. En: Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges. Rojo, C., Nachit, M., DiFonzo N., & Araus, J. EDs. *Options Méditerranées*, Zaragoza. Vol. 40. ISBN: 2-85352-212-1.
- Marza, F., Bai, G.-H., Carver, B.F., Zhou, W.-C..** 2006. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 x Clark. *Theoretical and Applied Genetic* 112: 688–698.
- Massa, A.N., Beecher, B. & Morris, C.F.** 2007. Polyphenol oxidase (PPO) in wheat and wild relatives: molecular evidence for a multigene family. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1239–1247.
- Matsuo, R. R., Bradley, J. W. & Irvine, G. N.** 1972. Effect of protein content on the cooking quality of spaghetti. *Cereal Chemistry* 49: 707-711.
- Matsuo, R.R. & Dexter, J.E.** 1980. Relationship between some durum wheat physical characteristics and semolina milling properties. *Canadian Journal of Plant Science* 60: 49–53.
- Matthews, P., Luo, R. & Wurtzel, E.** 2003. Maize phytoene desaturase and zeta-carotene 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.
- Mccouch, S.R. & Doerge, R.W.** 1995. QTL mapping in rice. *Trends in Genetics* 11:482–487.
- Mcdonald, C.E.** 1979. Lipoxygenase and lutein bleaching activity of durum wheat semolina. *Cereal Chemistry* 56: 84-89.

- Melchinger, A.E., Utz, H.F. & Schon, C.C.** 1998. Quantitative Trait Locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149: 383-403.
- 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.
- Moss, H.J.** 1967. Yellow pigment content of some Australian flours. *Australian Journal of Experimental Agriculture. Husb.* 7: 463–464.
- Mutschler, M.A., Doerge, R.W., Liu, S.C., Kuai, J.P., Liedl, B.E, & Shapiro, J.A.** 1996. QTL analysis of pest resistance in the wild tomato *Lycopersicon pennellii*: QTL controlling acylsugar level and composition. *Theoretical and Applied Genetic* 92: 709-718.
- Nachit, M.M., Baum, M., Lmpiglia, A. & Ketata, H.** 1995. Studies on some grain quality traits in durum wheat in Mediterranean environments. *Proceedings of Seminar on durum wheat quality grown in the Mediterranean regions, Zaragoza, Nov 1995. ICARDA/ CIHEAM/ CIMMYT.Options Mediterraneennes Serie A, 22: pp. 181-188.*
- Nachit, M.M., Elouafi, I., Pagnotta, M.A., El Saleh, A., Iacono, E., Labhilili, M., Asbati, A., Azrak, H., Hazzam, M., Benscher, 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).
- Nelson, J.C.** 1997. Qgene—software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular Breeding* 3:239–245.
- Nesbitt, M. & Samuel, D.** 1996. From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats. *Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats.* En: *Hulled Wheats.* Padulosi, S., Hammer, K. & Heller, J., Eds. Castelvecchio Pascoli, Tuscany, Italy, pp. 41–100.
- 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.
- Ong, A.S.H. & Tee, E.S.** 1992. Natural sources of carotenoids from plants and oils. *Methods in Enzymology,* 213: 142-167.
- 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.

- 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.
- Pastore, D., Trono, D., Padalino, L., Simone, S., Valenti, D., Di Fonzo, N. & Passarella, S.** 2000. Inhibition by  $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbate of linoleate hydroperoxidation and  $\beta$ -carotene bleaching activities in durum wheat semolina. *Journal of Cereal Science* 31: 41-54.
- Paterson A. H.** 2004. Comparative genomics in cereals. En: Gupta P.K. & Varshney R.K. (eds.), Chapter 5. *Cereal Genomics*, 119-133. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Paterson A., Bowers J., Peterson D., Estill J., Chapman B.** 2003a. Structure and evolution of cereal genomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 644-650
- Paterson, A.H. 1996a.** Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 23–39. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press, Austin, Texas.
- Paterson, A.H. 1996b.** Mapping genes responsible for differences in phenotype, In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 41–54. R. G. Landes Company, San Diego, California; Academic Press; Austin, Texas.
- Paterson, A.H., Saranga, Y., Menz, M., Jiang, C.-X., Wright, R.J.** 2003b. QTL analysis of genotype  $\times$  environment interactions affecting cotton fiber quality. *Theoretical and Applied Genetic* 106:384–396
- 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.
- 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  $\times$  wild emmer wheat based on SSR and DArT markers. *Theoretical and Applied Genetic* 117: 103-115.
- 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 de lipoxigenasas. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 77: 175-188.
- 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 and association of a phytoene synthase gene with endosperm colour in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetic* 114: 525–537.
- Pshenichnikova, T.A., Osipova, S.V., Permyakova, M.D., Mitrofanova, T.N., Trufanov, V.A., Lohwasser, U., Röder, M. & Börner, A.** 2008. Mapping of Quantitative Trait Loci (QTL) associated with activity of disulfide reductase and lipoxigenase in grain of bread wheat *Triticum aestivum* L. *Russian Journal of Genetics* 44(5): 567–574.

- Quaglia, G.B.** 1988. Other durum wheat products. En: Durum wheat: Chemistry and technology. Fabriani, G. & Lintas, C., Eds. American Association of Cereal Chemistry. St. Paul, MN. pp. 263-282.
- 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.
- 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.
- 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
- Rieseberg, L., Widmer, A., Arntz, A.M. & Burke, J.M.** 2003. The genetic architecture necessary for transgressive segregation is common in both natural and domesticated populations. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 358: 1141-1147.
- Risch, N.** 1992. Genetic linkage: Interpreting LOD scores. *Science* 255: 803–804.
- Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D. & Hirschberg, J.** 2000. An alternative pathway to  $\beta$ -carotene formation in plant chromoplast discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proceedings of the National Academy of Science*. 97(20), pp. 11102-11107.
- Rosati, C., Aquilani, R., Dharmapuri, S., Pallara, P., Marusic, C., Tavazza, R., Bouvier, F., Camara, B. & Giuliano, G.** 2000. Metabolic engineering of  $\beta$ -carotene and lycopene content in tomato fruit. *The Plant Journal* 24(3): 413-419.
- Rousseau, E.J., Davison, A.J. & Dunn, B.** 1992. Protection by  $\beta$ -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  $\beta$ -carotene concentration in durum wheat (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*). *Euphytica* 144: 215–221.
- Sarkar, P. & Stebbins, G.L.** 1956. Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *American Journal of Botany*. 43:297–304.
- SAS System 9.0 For Windows (Sas Institute).** 2002. SAS Institute, Inc. Cary, NC. USA.
- Sawkins, M.C., Farmer, A.D., Hoisington, D., Sullivan, J., Tolopko, A., Jiang, Z. & Ribaut, J.-M.** 2004. Comparative map and trait viewer (CMTV): an integrated bioinformatic tool to construct consensus maps and compare QTL and functional genomics data across genomes and experiments. *Plant Molecular Biology* 56: 465-480.
- 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.

- Schon, C.C., Melchinger, A.E., Boppenmaier, J., Brunklaus-Jung, E., Herrmann, R.D. & Seitzer J.F.** 1994. RFLP mapping in maize: quantitative trait loci affecting testcross performance of elite European flint lines. *Crop Science* 34: 378-389
- 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.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., Skinnes, H., Marøy, A.G., Tarkegne, Y., & William, M.** 2006. Distribution of DARt, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545-555.
- Serpen, A. & Gökmen V.** 2007. Effects of  $\beta$ -carotene on soybean lipoxygenase activity: kinetic studies. *European food Research and Tecnology* 224(6): 743-748.
- Serpen. A. & Gökmen, V.** 2006. A proposed mechanism for the inhibition of Soybean lipoxygenase by  $\beta$ -carotene. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 401-406.
- Siedow, J.N.** 1991. Plant Lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 145-188.
- Simeone, R., Pasqualone, A., Clodoveo, M.L. & Blanco, A.** 2002. Genetic mapping of polyphenol oxidase in tetraploid wheat. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 763-769.
- Sims, R.P.A. & Lepage, M.** 1968. A basis for measuring the intensity of wheat flour pigments. *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 session
- Siwek, M., Cornelissen, S.J.B., Nieuwland, M.G.B., Buitenhuis, A.J., Bovenhuis, H., Crooijmans, R.P.M.A., Groenen, M.A.M., De Vries-Reilingh, G., Parmentier, H.K. & Van Der Poel, J.J.** 2003. Detection of QTL for immune response to sheep red blood cells in laying hens. *Animal Genetics* 34: 422-428.
- Somers, D.J., Isaac, P. & Edwards, K.** 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetic* 109(6): 1105-1114.
- Somma, S., Cenci, A., Mangini, G., Blanco, A.** 2004. Detection of QTL for carotenoid pigment content in Durum wheat. Proceedings of the XLVIII Italian Society of Agricultural Genetics – SIFV-SIGA Joint Meeting Lecce, Italy – 15/18 September, 2004. ISBN 88-900622-5-8. Poster Abstract – H.03
- Sorrells, M.E.** 2007. Application of new knowledge, technologies, and strategies to wheat improvement. *Euphytica* 2007 157: 299-306.
- 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. *Genetics Research* 13: 1818-1827.
- 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.). *Functional & Integrative Genomics* 4:12-25.

- 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.
- Sreenivasulu, N., Kavikishor, P.B., Varshney, R.K. & Altschmied, L.** 2002. Mining functional information from cereal genomes- the utility of expressed sequence tags (ESTs). *Current Science* 83: 965- 973.
- Stam, P.** 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal* 3: 739-744.
- Steele, K.A., Virk, D.S., Kumar, R., Prasad, S.C. & Witcombe, J.R.** 2007. Field evaluation of up landrice lines selected for QTL controlling root traits. *Field Crops Research* 101(2): 180-186.
- 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 a unicellular chlorophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95: 11482-11488.
- Taha, S.A. & Sagi, F.** 1986. Relationships between chemical composition of durum wheat semolina and quality. I. Total, soluble and insoluble protein. *Cereal Research Communications* 14: 259–266.
- Taha, S.A. & Sagi, F.** 1987. Relationships between chemical composition of durum wheat semolina and macaroni quality. II. Ash, carotenoid pigments, and oxidative enzymes. *Cereal Reserach Communication* 15: 123-129.
- Tang J., Gao L., Cao Y., & Jia J.** 2006. Homologous analysis of SSR-ESTs and transferability of wheat SSR-EST markers across barley, rice and maize. *Euphytica* 151(1): 87-93.
- Tanksley, S.D.** 1993. Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27: 205–233.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.P., De Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J. & Grandillo, S.** 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Teng, S., Tian, C., Chen, M., Zeng, D., Guo, L., Zhu, L., Han, B., Qian, Q.** 2006. QTLs and candidate genes for chlorate resistance in rice (*Oryza sativa L.*) *Euphytica* 152: 141-148.
- Terada, M., Minami, J. & Yamamoto, T.** 1981. Rheological properties of dough made from flour exposed to gaseous ammonia. *Cereal Chemistry* 58: 101-105.
- Terzi, V., Morcia, C., Stanca, A.M., Kucera, L., Fares, C., Codianni, P., Di Fonzo, N., Faccioli, P.** 2007. Assessment of genetic diversity in emmer (*Triticum dicoccon Schrank*) x durum wheat (*Triticum durum Desf.*) derived lines and their parents using mapped and unmapped molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 1613-1621.
- Testolin, R., Huang, W.G., Lain, O., Messina, R., Vecchione, A. & Cipriani, G.** 2001. A kiwifruit (*Actinidia spp.*) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetic* 103: 30-36.
- Teulat, B., Borries, C. & This, D.** 2001. New QTL identified for plant water-status, water-soluble carbohydrate and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth-chamber under two water regimes. *Theoretical and Applied Genetic* 103: 161-170.

- Timmerman, G.M., Mccallum, J.A., Frew, T.J., Weeden, N.F., Russell, A.C.** 1996 Linkage mapping of quantitative trait loci controlling seed weight in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetic* 93: 431-439.
- Timmerman-Vaughan G.M., T.J. Frew, A.C. Russell, T. Khan, R. Butler, M. Gilpin, S. Murray, & Falloon K.** 2002. QTL Mapping of Partial Resistance to Field Epidemics of Ascochyta Blight of Pea. *Crop Science* 42: 2100-2111.
- 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.
- Trono, D., Pastore, D. & Di Fonzo, N.** 1999. Carotenoid dependent inhibition of durum wheat lipoxygenase. *Journal of Cereal Science* 29: 99-102.
- Udall, J.** 1997. Important alleles for noodle quality in winter wheat as identified by molecular markers. M.S. Thesis, University of Idaho, Moscow, ID.
- Utz, H. & Melchinger, A.** 1996. PLABQTL: A program for composite interval mapping of QTL. *Journal of Quantitative Trait Loci* 2(1).
- Vallega, J.** 1974. Durum wheat varieties cultivated in Argentina and their pastificable quality related with the italian “macarroni” industry. Embassy of de Argentine Republic, Rome, Italy.
- Van Den Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S. & Stahl, W.** 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 880-912.
- van Mechelen, J.R., Schuurink, R.C., Smits, M., Graner, A., Douma, A.C., Sedee, N.J.A., Schmitt, N.F. & Valk, B.E.** 1999. Molecular characterization of two lipoxygenases from barley. *Plant Molecular Biology* 39: 1283-1298.
- Van Poppel, G., Spanhaak, S. & Ockhuizen, T.** 1993. Effect of  $\beta$ -carotene on immunological indexes in healthy male smokers. *American Journal of Clinical Nutrition* 57: 402-407.
- Varshney, R.K., Korzun, V. & Börner, A.** 2004. Molecular maps in cereals: methodology and progress. Chapter 3. Gupta, P.K. & Varshney, R.K. (eds.). *Cereal Genomics* 35-82. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Roder, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E. & Graner, A.** 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetic* 114: 1091-1103.
- Varshney, R.K., Sigmund, R., Börner, A., Korzun, V., Stein, N., Sorrell, M.E., Langridge, P. & Granera, A.** 2005. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Science* 168(1): 195–202.
- Walsh, D.E. & Gilles, K.R.** 1971. The influence of protein composition on spaghetti. *Cereal Chemistry* 48: 544-554.
- Walsh, D.E.** 1970. Measurement of spaghetti color. *Macaroni Journal* 52(4): 20-22.
- Wang, S., Basten, C.J., Gaffney, P. & Zeng, Z.B.** 2004. Windows QTLCartographer Version 2.5. Statistical Genetics, North Carolina state University, USA.
- Watanabe, N., Masum Akond, A.S.M.G. & Nachit, M.M.** 2006. Genetic mapping of the gene affecting polyphenol oxidase activity in tetraploid durum wheat. *Journal of Applied Genetic* 47(3): 201-205.

- Wenzl, P., Carling, J., Kudrna, D., Jaccoud, D., Huttner, E., Kleinhofs, A. & Kilian, A.** 2004. Diversity arrays technology (DART) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 9915-9920.
- Wenzl, P., Li, H., Carling, J., Zhou, M., Raman, H., Paul, E., Hearnden, P., Maier, C., Xia, L., Caig, V., Ovesná, J., Cakir, M., Poulsen, D., Wang, J., Raman, R., Smith, K.P., Muehlbauer, G.J, Chalmers, K.J., Kleinhofs, A., Huttner, E. & Kilian, A.** 2006. A high-density consensus map of barley linking DART markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics* 7:206.
- 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  $\zeta$ -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.) lipoxygenase 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., Klotti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus I.** 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 map-based 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 Phytologist*. 1: 193–207, 222–238.
- Zeng, Z.-B.,** 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences 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.

**Zile, M.H.** 1998. Vitamin A and embryonic development: an overview. *The Journal of Nutrition* 128: 455-458.

# Anexo de Tablas

**Tabla 42:** Coeficiente de correlacion simple de Pearson en cada ambiente entre parámetros de color y CPC.

**Ambiente I**

Variable	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
CIE L*	1	-0,58***	-0,08ns	0,07ns
CIE a*		1	-0,11ns	-0,19**
CIE b*			1	0,83***
CPC				1

N=267

**Ambiente IV**

Variable	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
CIE L*	1	-0,90***	-0,45***	-0,13*
CIE a*		1	0,25***	-0,10ns
CIE b*			1	0,84***
CPC				1

N=279

**Ambiente II**

Variable	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
CIE L*	1	-0,34***	0,04ns	-0,11ns
CIE a*		1	-0,14*	-0,17**
CIE b*			1	0,83***
CPC				1

N=276

**Ambiente V**

Variable	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
CIE L*	1	-0,07ns	0,09ns	0,10ns
CIE a*		1	-0,27***	-0,51***
CIE b*			1	0,86***
CPC				1

N=279

**Ambiente III**

Variable	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
CIE L*	1	-0,75***	-0,11ns	-0,13*
CIE a*		1	-0,20**	-0,17**
CIE b*			1	0,86***
CPC				1

N=279

**Ambiente VI**

Variable	CIE L*	CIE a*	CIE b*	CPC
CIE L*	1	-0,86***	-0,37***	-0,04ns
CIE a*		1	0,09ns	-0,33***
CIE b*			1	0,78***
CPC				1

N=271

**Campaña 2006/07**

Variable	L*	a*	b*	CPC
CIE L*	1	-0,35***	0,19***	-0,04ns
CIE a*		1	0,11**	0,00ns
CIE b*			1	0,77***
CPC				1

**Campaña 2007/08**

Variable	L*	a*	b*	CPC
CIE L*	1	-0,28***	-0,19***	-0,07*
CIE a*		1	0,19***	-0,09**
CIE b*			1	0,88***
CPC				1