



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA

**ESTUDIOS GENÓMICOS DE DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS Y
EVALUACIÓN DE RENDIMIENTO EN GENOTIPOS DE TRIGO CANDEAL
CON DIFERENCIAS EN SU CICLO**

Ing. Agr. Selva Yanet Cuppari

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2021

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Agronomía y CERZOS-CONICET durante el período comprendido entre abril de 2014 y marzo de 2020, bajo la dirección de la Dra. Alicia D. Carrera y la codirección de la Dra. Marina L. Díaz.

SELVA YANET CUPPARI



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

*“A la tierra volverás, no la hieras nunca más. Ella cuida de tu flor,
tu silencio y tu dolor, tu semilla y tu color, tu memoria y tu mañana”*

Raúl Eduardo Barrionuevo (Raly)

AGRADECIMIENTOS

A Alicia Carrera, directora de esta tesis, por haberme aceptado como tesista, haber confiado en mí y dejarme ser parte de su cálido grupo de trabajo. Por sus consejos, conocimientos y por la corrección de este manuscrito.

A mi Co-directora Marina Díaz, por su apoyo constante en el laboratorio, análisis molecular y bioinformático. Por haber confiado en mí y dejarme ser parte de sus cursos de posgrado. Por sus consejos, asistencia permanente y corrección de este manuscrito.

Al grupo de trabajo inicial, excelentes y valiosas personas: Daniela Soresi, Jessica Basualdo, Lorena Armando y Antonio Garayalde (especialmente por su valiosa ayuda en los análisis estadísticos).

A Claudio por su paciencia constante y amor incondicional.

A Federico Delucchi y a Amalia Carelli por su calidez, por confiar en mí y recibirme en el “Área de Ingeniería en Alimentos” del Instituto PLAPIQUI como si fuera parte de su grupo. Siempre predispuestos a ayudarme e incluso en la interpretación final de los datos.

A Laura Martínez, Sofía Tilleria y Cielo Pasten, mis amigas de carrera de posgrado y de vida incondicionales, por estar permanentemente presentes con mucha paciencia y amor. Especialmente a Laura quien es parte del grupo de trabajo y además ha estado muy presente, incluso en viajes de campo y en la finalización de la escritura.

Al Laboratorio de Biotecnología de CERZOS-CONICET por brindarme el espacio para desarrollar gran parte del trabajo y a todas las personas que forman parte y que de una u otra manera estuvieron siempre predispuestos a ayudarme: Juan Rodrigo, Diego Zappacosta, Juan Pablo Selva, Jimena Gallardo, José Carballo, Cristian Gallo, Andrés Bellido y Ana Achilli.

A Leticia Fernández, Soledad Villamil, Liliana Gallez e Irene Cibanal del Laboratorio de Estudios Apícolas (LabEA), que me brindaron espacio y equipamiento. A Luciano Rodríguez por su predisposición para que pueda realizar el análisis de conductividad eléctrica.

A todas las personas del Laboratorio de Producción Vegetal Extensiva de la UNS por brindarme el espacio para que pueda realizar algunas de las determinaciones de la tesis y porque han estado siempre predispuestos a ayudarme: Alejandro Presotto, Marta Miravalles (Pelú), Claudio Pandolfo, Francisco Torres Carbonell, Fernando Hernández y Boris Vercellino.

A Soledad Ureta por su calidez humana y por transmitir esas ganas de crecer en esta bella profesión y más que nada, en el desempeño de la docencia, particularmente en los últimos tres años. Gracias!

A todos mis amigos que estuvieron siempre presentes, por su afecto y apoyo en todo momento para llegar a la etapa final. A mi familia, por su apoyo y amor incondicional.

A quienes me acompañaron a tomar datos al campo y con quienes pasé hermosos momentos: mi amiga Joe, Elena Iribarne, Gonzalo García, Marcos Carbajo, Marcos Hali Sapag, Marcos Miguel, Bruno De Marco. Y un agradecimiento infinito a las personas que me alojaron en Tres Arroyos: Tincho y su mamá, Marcos Hali Sapag y su familia, por esas lindas nohécitas en familia.

A todas las personas que forman parte de la Estación Experimental Agropecuaria Integrada-Barrow-INTA. A Carlos Jensen (con quien tuve el gusto de interactuar muy poquito tiempo) y Adelina Larsen muy especialmente, porque sin su excelente predisposición y logística para los ensayos a campo, no hubiese sido posible llevar a cabo el trabajo realizado en Barrow. A todos los técnicos de la Experimental por haber realizado la siembra, labores intermedias y la cosecha de los ensayos: Marcos Arana, Matías Inchauspe, Juan Carlos Gutiérrez, Américo Gomez y Andrés Elizari y por la buena onda y por dejarme ser parte de sus recreos de mates matutinos. Sumo a este agradecimiento a Liliana Wherhanhe, Verónica Caballero y Ana Storm, del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, quienes estuvieron presentes ante cualquier consulta que me surgiera, siempre con excelente predisposición. A Francisco Di Pane que estuvo predispuesto a intervenir en los ensayos ante cualquier dificultad. A Fernando Ross por prestarme equipamiento para realizar algunas determinaciones. A las personas del Laboratorio de Calidad: Elena Molfese, Valentina Astiz, Eugenio Errea, Dora Miguens, Mauricio Capristo y Oscar Wehrhahne. Especialmente a Elena y a Valentina. A Julio Miguens por ayudarme con el secado de biomasa. A Rubén Mariani (alias Rubincho) quien cada tardecita-noche me decía: “nena!, vos trabajá tranquila que yo me ocupo de cerrar todo y cuando te vas, apago las luces”, nunca olvidaré su compañía.

A los jurados de esta tesis: Alejandro Presotto, Paula Fernández y Guillermo Pratta, por haber aceptado realizar la evaluación de la tesis y ayudarme a mejorar el manuscrito con sus comentarios y sugerencias.

Al Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, por las instalaciones en donde realicé parte de mis ensayos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la beca de posgrado para realizar esta tesis y al gobierno de turno que fomentó la investigación.

A la Universidad Nacional del Sur por haberme otorgado la beca de finalización de doctorado.

RESUMEN

El trigo candeal o trigo duro (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) es una especie de trigo tetraploide ($2n=4x=28$ AABB) que se utiliza, principalmente, para la elaboración de pastas secas de calidad. El mejoramiento de esta especie está focalizado en la obtención de variedades de alta productividad con endosperma duro, vítreo, alto contenido proteico y pigmentos amarillos. Las variedades disponibles en Argentina son de hábito primaveral de ciclo corto a intermedio, y la siembra se realiza en el periodo comprendido entre junio y agosto. La principal zona de cultivo en nuestro país, es el sur de la provincia de Buenos Aires donde la ocurrencia de heladas entre abril y noviembre afecta al cultivo en estadio vegetativo y reproductivo. Los genes de desaturasas que introducen dobles enlaces en los ácidos grasos de cadena larga, se encuentran involucrados en la tolerancia a estrés por bajas temperaturas. La disponibilidad de secuencias de ADN, ARN y proteínas de desaturasas de gramíneas en las bases de datos públicas, permitió realizar un análisis *in silico* de las mismas, logrando caracterizar estructural y funcionalmente esta familia de proteínas. Se observó una distribución cromosómica dispersa y se predijo la localización subcelular más probable. Teniendo en cuenta que no existen secuencias de desaturasas caracterizadas de trigo candeal disponibles en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se realizó un análisis de la variabilidad genética en cinco genotipos, con diferencias en su grado de tolerancia a bajas temperaturas. Se detectó un bajo número de polimorfismos en la esteroil-ACP desaturasa (*SAD*) y ω -3 lípido desaturasa (*FAD3*), mientras que ω -6 lípido desaturasa (*FAD2*) mostró una mayor variabilidad. No se encontraron relaciones entre los polimorfismos en secuencia y el comportamiento frente a frío. El mapeo *in silico* de *FAD2* permitió detectar la presencia de cuatro copias del gen localizadas en el cromosoma 6, incluyendo pseudogenes y un elemento transponible (TE, transponible element) insertado en la cuarta copia del genoma B. Las proteínas deducidas de las secuencias de trigo candeal fueron incluidas en el análisis *in silico* de gramíneas antes mencionado. Las regiones promotoras de los genes de desaturasas contienen sitios de unión a factores de transcripción de respuesta a estrés abiótico.

Por otra parte, se realizó un estudio de respuesta a bajas temperaturas, en tres genotipos de trigo candeal, dos primaverales (BUCK AMBAR y CBW 0101) y uno invernal (MVTD 10-98). Experimentos previos habían mostrado tolerancia a temperaturas bajo cero en cámara, de los genotipos MVTD 10-98 y CBW 0101 en estado vegetativo. El presente estudio incluyó el análisis de expresión del gen *FAD2*, la obtención del perfil de ácidos grasos y ensayos de conductividad eléctrica. Los ácidos grasos insaturados oleico (18:1), linoleico (18:2) y

linolénico (18:3) fueron los que presentaron mayor nivel de cambios frente a bajas temperaturas. Se observó que las líneas CBW 0101 y MVTD 10-98, presentaron similares incrementos de 18:1 y 18:2 ante el tratamiento con frío y perfiles de expresión de *FAD2* concordantes con los niveles de su producto 18:2. Las evaluaciones de integridad de membrana también estuvieron de acuerdo con las diferencias fenotípicas en la tolerancia. Además, se realizaron ensayos de rendimiento a campo en tres fechas de siembra (mayo-junio-julio), durante dos años consecutivos en la Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow - INTA (EEAI). Las variables evaluadas fueron: duración del ciclo a antesis, periodo de llenado de granos, rendimiento y medidas relacionadas (peso de granos, número de granos y sus subcomponentes, biomasa en antesis y madurez fisiológica, índice de cosecha y altura de planta), contenido de proteína en grano y peso hectolítrico. Se encontraron diferencias significativas entre años, fechas y genotipos en todas las variables. El primer año presentó un rendimiento promedio menor que el segundo (57 %), atribuido principalmente a las diferentes condiciones ambientales en relación a precipitaciones, suelo y temperaturas, mientras que el contenido de proteína en grano fue menor en el segundo año (22,25 %). En cuanto al momento de siembra, el rendimiento promedio fue mayor en fechas más tempranas en ambos años. La determinación de los periodos desde emergencia a antesis y de llenado de granos, combinados con diferentes fechas de siembra, permitieron explicar variaciones en el rendimiento. Además, los valores promedio de biomasa aérea total, peso de las espigas alcanzado en el periodo de llenado de granos (PE_{AT-MF}) y peso promedio de granos por unidad de superficie (PG), fueron superiores en las fechas más tempranas. El peso de los granos por unidad de superficie, fue el principal componente numérico del rendimiento. Del análisis de componentes principales entre rendimiento y las variables asociadas, se deduce que el índice de cosecha, PG y PE_{AT-MF} fueron las variables que mejor explicaron cambios en el rendimiento en todos los ensayos. Se evaluó, además, el daño por heladas en etapa de floración en el año 2016. Se identificaron tres formas de daño en espiga (deformada, por zonas y blanca) y el porcentaje promedio total varió entre genotipos desde 0,25 a 9,47 %. En general, los materiales menos afectados por heladas, fueron los de ciclo más largo, aunque también se observaron algunas diferencias en el nivel de daño entre genotipos de fenología similar. Este estudio aporta información de *Triticum turgidum* L. ssp. *durum* relacionada con su genoma, respuesta a estrés abiótico y efecto de fecha de siembra en el sudoeste de Buenos Aires.

ABSTRACT

Durum wheat, also called pasta wheat, (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) is a tetraploid species of wheat ($2n=4x=28$ AABB), mainly produced for the elaboration of high quality dry pasta. Breeding of this species is focused on the obtention of high yield varieties, with hard and glassy endosperm, high protein contents, and yellow pigmentation. Available varieties in Argentina are spring-habit, short to intermediate cycle, with a sowing period that spans from June to August. The main cultivation area in our country is in the South of the Buenos Aires province, where frost occurrences (which may happen between April and November) negatively affect the crops during vegetative and reproductive stages. Fatty acid desaturase genes, which introduce double bonds in long-chain fatty acids, are related to low temperature stress tolerance. Availability of ADN, ARN, and desaturase sequences of grasses in public databases enabled *in silico* analyses, which in turn allowed to structurally and functionally characterize this protein family. A sparse chromosome distribution was observed, and a most likely sub-cellular location was predicted. Taking into account that there are no featured durum wheat desaturase sequences available in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a genetic variability analysis was performed in five different genotypes, each with different low temperature tolerance degrees. A low number of polymorphisms in the esteroil-ACP desaturase (*SAD*) and in the ω -3 desaturase (*FAD3*) were detected, while the ω -6 desaturase (*FAD2*) exhibited higher variability. No relationships between sequence polymorphisms and low temperature tolerance were detected. *In silico* mapping of *FAD2* enabled to detect four copies of the gen, located in chromosome 6, including pseudogenes and a transposable element (TE) inserted in the fourth copy of the B genome. Proteins deduced from durum wheat sequences were included in the *in silico* gramineae analyses mentioned above. The promoting regions in the desaturase genes contain sites with bonding to transcription factors related to abiotic stress response. On the other hand, an analysis of low temperature response was performed on three genotypes of durum wheat, two spring-like (BUCK AMBAR and CBW 0101) and one wintry (MVTD 10-98). Previous experiments showed below-zero chamber temperature tolerance in genotypes MVTD 10-98 and CBW 0101 in vegetative state. The present study includes the expression analysis of the gene *FAD2*, the obtention of the fatty acid profile, and electric conductivity studies. The insaturated fatty acids oleic (18:1), linoleic (18:2), and linolenic (18:3), presented greater change levels under low temperatures. The lines CBW 0101 and MVTD 10-98, presented similar increments in 18:1 y 18:2 upon low temperature exposure, and *FAD2* expression profiles in accordance with its product 18:2. Membrane

integrity evaluations were also in accordance with phenotypic differences in low temperature tolerance. In addition, field yield tests were performed in the Barrow Integrated Experimental Farming Station (Estación Experimental Agropecuaria Integrada, EEAI Barrow) of the National Agricultural Technology Institute (INTA), during three different sowing dates (May, June and July) along two consecutive years. The evaluated variables were: cycle length up to anthesis, grain filling period length, yield, and related measures (grain weight, number of grains and their subcomponents, biomass during anthesis and physiological maturity, harvest index, and plant height), the protein contents in grain, and the hectolitre weight. Meaningful differences were found among years, sowing dates, and genotypes in all the evaluated variables. The first year presented an average yield 57 % lower than the second, which can be attributed to environmental conditions related to precipitation, soil, and temperatures, while the average protein contents in the grain was 22.25 % lower during the second year. Regarding the sowing date, average yield was higher in earlier dates in both years. Period determination from emergency to anthesis, and grain fill, combined with different sowing dates, are able to explain these yield differences. In addition, average total aerial biomass, spikes weight achieved during the grain filling period (PE_{AT-MF}), and average grain weight per surface unit (PG), were all higher in earlier sowing dates. From Principal Component Analysis between yield and the associate variables, it can be established that PG was the most important component of the yield, while PG and PE_{AT-MF} were the variables that best explained yield changes in all the trials. In addition, the frost related damage during the flowering period was evaluated during 2016. Three different damage forms were identified (deformed, by zones, and white), where the average percentage varied between 0.25 and 9.47 %. In general, the genotypes less affected by frost were the ones of longest cycles, even though some differences were observed in the damage level among genotypes of similar phenology.

This study provides information related to the genome and abiotic stress response of *Triticum turgidum* L. ssp. *durum*, and the effects of sowing date in the Southwest of Buenos Aires.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del director

INDICE

PREFACIO	1
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	7
INDICE DE FIGURAS.....	12
INDICE DE TABLAS.....	19
LISTA DE ABREVIATURAS	23
INTRODUCCIÓN GENERAL	24
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos específicos	33
CAPÍTULO 1 Análisis estructural y funcional de las desaturasas en gramíneas	35
INTRODUCCIÓN.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS	40
RESULTADOS	48
DISCUSIÓN	80
CONCLUSIONES.....	87
CAPÍTULO 2 Efecto del frío sobre el contenido de ácidos grasos, permeabilidad de la membrana celular y expresión del gen ω - 6 lípido desaturasa (FAD2).....	89
INTRODUCCIÓN.....	90
MATERIALES Y MÉTODOS	96
RESULTADOS	101
DISCUSIÓN	114
CONCLUSIONES.....	119
CAPÍTULO 3 Evaluación del rendimiento en genotipos de <i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>durum</i> con diferencias en la duración del ciclo de crecimiento	121
INTRODUCCIÓN.....	122
MATERIALES Y MÉTODOS	128

RESULTADOS	135
DISCUSIÓN	172
CONCLUSIONES.....	183
CONSIDERACIONES FINALES.....	184
ANEXO.....	189
REFERENCIAS	228
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS	247

INDICE DE FIGURAS

Figura I. Esquema de las relaciones entre los genomas de trigo. Modificado y adaptado de Marcussen <i>et al.</i> (2014).....	25
Figura II. Mapa de las regiones productoras de trigo en Argentina. El cultivo de trigo candeal se concentra en las subregiones IV y V Sur, subdividida en tres regiones (Sudoeste, Centro Sur y Sudeste). El punto rojo corresponde a la localidad de Tres Arroyos (INTA Barrow), donde se realizaron los ensayos a campo de esta tesis.	27
Figura III. a) Expresión relativa de DREB-A1 en plántulas de BUCK AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y a las 1, 2, 4 y 8 horas de exposición a 4 °C. b) Detalle de (a) de genotipos BUCK AMBAR y CBW 0101. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.....	30
Figura IV. Expresión relativa de Wcor410 en plántulas de BUCK AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y a las 2, 4 y 8 horas de exposición a 4 °C. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.	31
Figura 1.1. Mapeo <i>in silico</i> de genes de desaturasas de trigo candeal, sobre el genoma del cv. Svevo. SAD: estearoil-ACP desaturasa, FAD2/FAD6: ω- 6 lípido desaturasa, FAD7/FAD8: ω- 3 lípido desaturasa, ELD: esfingolípido desaturasa, FD: fitoeno desaturasa y ZCD: zeta-caroteno desaturasa. Con * los genes seleccionados para el análisis de amplificación de secuencias genómicas.	52
Figura 1.2. Esquema del alineamiento, mediante BLASTX, de los transcritos c104217_g1 y c104298_g1 de la línea CBW 0101 con la proteína VAH4146.1 de la base de datos del cv. Svevo. Ambos transcritos, en conjunto, cubren el 96,88% de la secuencia de la proteína. Se indican las posiciones en aminoácidos (arriba) y en nucleótidos (abajo).	53
Figura 1.3. Esquema del alineamiento, mediante BLASTX, del transcripto c45724_g1 de la línea CBW 0101, con la proteína VAI15368.1 de la base de datos del cv. Svevo. El transcripto cubre el 100% de la secuencia de la proteína y presenta un intrón desde la base 603 a la 1613 del transcripto.	53
Figura 1.4. Estructura de los genes de desaturasas de <i>T. turgidum ssp. durum</i> : SAD (a), FAD2 (b) y FAD8 (c). Se indican los extremos UTR-5' y 3'. Rectángulos son exones y líneas intrones.	54
Figura 1.5. Mapeo <i>in silico</i> del gen FAD2 sobre los cromosomas 6A y 6B del genoma de Svevo. Los rectángulos en rojo indican las copias de cada genotipo amplificadas y secuenciadas en este estudio. Los rectángulos en gris representan las copias identificadas en Svevo, al mapear <i>in silico</i> las copias amplificadas.	56
Figura 1.6. Copias en tandem del gen FAD2 de trigo candeal deducidas del genoma del cv Svevo. La línea roja representa: a) el cromosoma 6 A y b) el cromosoma 6 B. Las copias múltiples en cada cromosoma se indican con cuadrados negros. En c) detalle de la cuarta copia del cromosoma 6B conteniendo un retrolemento que incluyó las regiones (1) rve, (2) RVT_2 y (3) RNase_HI_RT_Ty1.	59

Figura 1.7. Abundancia de sitios de unión a FT que responden a estrés abiótico, como resultado del análisis con PlantPAN, en la región 5' de cuatro genes de estearoil-ACP desaturasas. Los nombres de las enzimas corresponden a los ID de proteínas (Tabla A1.1; ANEXO) utilizadas como sondas en genes de <i>T. aestivum</i> (URGI) y a <i>SAD</i> en <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (cv. Svevo).	65
Figura 1.8. Abundancia de sitios de unión a FT que responden a estrés abiótico, identificados mediante la herramienta PlantPAN, en la región 5' de siete genes de ω -6 lípido desaturasas (<i>FAD2</i>). Los nombres de las enzimas corresponden a los ID de proteínas (Tabla A1. 1; ANEXO) utilizadas como sondas en genes de <i>T. aestivum</i> (URGI) y a <i>FAD2</i> en <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (cv. Svevo).	65
Figura 1.9. Abundancia de sitios de unión a FT que responden a estrés abiótico, identificados mediante la herramienta PlantPAN, en la región 5' de tres genes de ω -3 lípido desaturasas. Los nombres de las enzimas corresponden a los ID de proteínas (Tabla A1. 1; ANEXO) utilizadas como sondas en genes de <i>T. aestivum</i> (URGI) y a <i>FAD8</i> en <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (cv. Svevo).	66
Figura 1.10. Logo de seis Acil-ACP desaturasas. Los motivos 2 y 3 incluyen los dominios o cajas de histidina característicos representados por D/EE ₂ H.	76
Figura 1.11. Logo de 21 acil lípido desaturasas. Los motivos 1, 2 y 4 incluyen los dominios o cajas de histidina (HXXHH, HXXHH, HXXXH).	77
Figura 1.12. Representación de la estructura secundaria de la ω - 3 lípido desaturasa (ABN49521.1-S. bicolor). Los números corresponden a los motivos de la Figura 1.11.	78
Figura 1.13. Modelado por homología de estearoil-ACP desaturasa de <i>T. aestivum</i> (ADV59911.1), usando como molde la acil-ACP desaturasa de <i>Ricinus communis</i> . Se indican las secuencias de los dominios de histidina asociados con el sitio activo, el amino y el carboxilo terminal.	78
Figura 1.14. Árbol filogenético enraizado derivado de las secuencias de proteínas desaturasas, inferido mediante el método Maxima Verosimilitud y con 1000 réplicas de bootstrap. I: ω -6 lípido desaturasas; II: FED (Front-End Desaturase); III ω -3 lípido desaturasa; IV: Esfingolípido desaturasas y IV: Acil-ACP desaturasas. Con “•” las desaturasas de <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i>	79
Figura 2.1. Esquema simplificado de la síntesis de ácidos grasos a partir del complejo FAS: AG Sintasa. CoA: Coenzima A, PC: fosfatidilcolina, ACP: Proteína Transportadora de Acilos, des: desaturasa, <i>FAD2/FAD6</i> : ω - 6 lípido des, <i>FAD3/FAD7/FAD8</i> : ω - 3 lípido des.	92
Figura 2.2. Material vegetal utilizado en experimento de ácidos grasos, conductividad eléctrica y expresión del gen ω - 6 lípido desaturasa. Izquierda: estadio de 2-3 hojas según esquema de escala Zadoks (Z1.2) Derecha: plantas creciendo en cámara de cultivo antes de la toma de muestra.	96
Figura 2.3. Protocolo de Metanólisis alcalina (KOH/MeOH) Método Alternativo del AOCS Official Method Ce2-66.	98

Figura 2.4. Cromatografía gaseosa de metilésteres de ácidos grasos extraídos de hojas de trigo candeal correspondiente a una muestra de CBW 0101 de plantas no tratadas (22 °C). Arriba: eje Y en picoampere (pA), unidad de medida del detector de ionización del cromatógrafo; en el eje X el tiempo de retención. El primer pico corresponde a la liberación del hexano. Abajo: información adicional correspondiente a cada pico de AG del gráfico.	101
Figura 2.5. Valores promedio de ácidos grasos (16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3) de los genotipos B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 en las plantas control.	102
Figura 2.6. Valores promedio de ácidos grasos (16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3) de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 0, 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C.	104
Figura 2.7. Valores promedio del contenido de 16:0 de B. AMBAR, MVTD 10-98, CBW 0101 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.	105
Figura 2.8. Valores promedio del contenido de 18:0 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.	106
Figura 2.9. Valores promedio del contenido de 16:1 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.	107
Figura 2.10. Valores promedio del contenido de 18:1 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.	108
Figura 2.11. Valores promedio del contenido de 18:2 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.....	109
Figura 2.12. Valores promedio del contenido de 18:3 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren	

significativamente ($p > 0,05$). La variación entre réplicas de genotipos se indica mediante la barra de error estándar.	110
Figura 2.13. Expresión relativa de <i>FAD2</i> en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (control) y a las 24, 72 y 144 horas de exposición a 4 °C. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). Las letras indican diferencias entre tratamientos dentro de cada genotipo. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.	111
Figura 2.14. Conductividad eléctrica (REL) en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 luego de 12 horas de exposición a 2 °C (CONTROL), -4 y -13 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.	112
Figura 2.15. Conductividad eléctrica (EL) en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98. Los valores medios corresponden a EL a las 12 horas de exposición -4 °C. Promedio con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). Las letras indican diferencias entre genotipos. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.	113
Figura 2.16. Conductividad eléctrica (EL) en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98. Los valores medios corresponden a EL a las 12 hs de exposición -13 °C. La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre genotipos. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.	113
Figura 3.1. Etapas del ciclo de cultivo de trigo y generación de componentes numéricos del rendimiento (Modificado de Slafer y Rawson, 1994, en Miralles et al., 2014). SI: siembra, EM: emergencia, IF: iniciación foliar, DL: doble lomo o diferenciación de espiguillas, ET: espiguilla terminal, ES: espigazón, AN: antesis, MF: madurez fisiológica, CO: cosecha.	123
Figura 3.2. Vista general del ensayo de trigo candeal en el campo de la Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow, INTA. a) Estadio vegetativo y b) Estadio reproductivo.	130
Figura 3.3. Balanza de Shopper para medición de PH (a); contador de granos para medición de peso de mil granos (b); NIR para medición de proteína y humedad del grano (c). Laboratorio de Calidad de Cereales EEAI – Barrow.	132
Figura 3.4. Esquema de la toma de muestras por parcela in situ del daño por heladas (año 2016). Los rectángulos azules representan la ubicación por hilera (1 metro lineal) donde se contabilizaron las espigas dañadas.	133
Figura 3.5. Tipos de daño en espiga observadas a campo: a) espiga blanca, b) espiga deformada, c y d) espigas afectadas en zonas.	133
Figura 3.6. Precipitaciones (mm) registradas en los años 2016 y 2017. Datos provenientes de la estación meteorológica de la Estación Experimental Agropecuaria Integrada (EEAI) - Barrow-INTA.	136

- Figura 3.7. Rendimiento ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) promedio de cuatro réplicas de 15 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F1, F2 y F3). Las barras “//” sobre el eje X indican separación entre años: izquierda; año 2016, derecha; año 2017. 137
- Figura 3.8. Días a antesis (D_{AT}): a) 2016; b) 2017. Período de llenado de granos (D_{AT-MF}): c) 2016; d) 2017, de 15 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F). F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. 141
- Figura 3.9. Relación entre Rto (rendimiento), D_{AT} (días a AT), D_{AT-MF} (días desde AT a MF). a) F1, b) F2 y c) F3 de 2016. El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros. 143
- Figura 3.10. Relación entre Rto (rendimiento), D_{AT} (días a AT) y D_{AT-MF} (días desde AT a MF). a) F1, b) F2 y c) F3 de 2017. El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros. 144
- Figura 3.11. Relación entre Rto, D_{AT} y D_{AT-MF} de 14 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F). Rto y D_{AT} : a) 2016; b) 2017 y Rto y D_{AT-MF} : c) 2016; d) 2017. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05, 0,01, y 0,001, respectivamente. 146
- Figura 3.12. Relación entre Rto (rendimiento), PG (peso promedio de granos), NE (número de espigas), NG (número promedio de granos), NGE (número de granos por espiga), $e\cdot E^{-1}$ (espiguillas/espiga), PMG (peso de mil granos), IC (índice de cosecha), PE_{AT-MF} (peso de la espiga desde AT a MF), BA_{MF} (biomasa aérea en MF) y altura. a) F1, b) F2 y c) F3; fechas de siembra (año 2016). El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros. 149
- Figura 3.13. Relación entre Rto (rendimiento), PG (peso promedio de granos), NE (número de espigas), NG (número promedio de granos), NGE (número de granos por espiga), $e\cdot E^{-1}$ (espiguillas/espiga), PMG (peso de mil granos), IC (índice de cosecha), PE_{AT-MF} (peso de la espiga desde AT a MF), BA_{MF} (biomasa aérea en MF) y altura. a) F1, b) F2 y c) F3; fechas de siembra (año 2017). El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros. 150
- Figura 3.14. Rendimiento ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) de 15 genotipos de trigo candeal. a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre las fechas. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar. 154
- Figura 3.15. Contenido de proteína (%) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016; F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises y b) 2017 (promedio de las tres fechas). Las

letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar. 156

Figura 3.16. Peso hectolítrico PH ($\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar..... 157

Figura 3.17. Altura (cm) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar..... 159

Figura 3.18. Índice de cosecha (IC) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre fechas. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar. 161

Figura 3.19. Relación entre Rto e IC. F1, F2 y F3: fechas de siembra; a) 2016 y b) 2017. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01 y 0,001, respectivamente..... 162

Figura 3.20. Relación entre IC y BA_{MF} : a) 2016 y b) 2017. Relación entre IC y PE_{AT-MF} : c) 2016 y d) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01, y 0,001, respectivamente. 163

Figura 3.21. Relación entre IC y BA_{MF} : a) 2016 y b) 2017. Relación entre IC y PE_{AT-MF} : c) 2016 y d) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01, y 0,001, respectivamente. 164

Figura 3.22. Relación entre PE_{AT-MF} y BA_{MF} : a) 2016 y b) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01 y 0,001, respectivamente..... 165

Figura 3.23. Relación entre Rto y PG: a) 2016 y b) 2017. Relación entre Rto y NG: a) 2016 y b) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de

Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01 y 0,001, respectivamente.	166
Figura 3.24. Daño provocado por heladas en 15 genotipos de trigo candeal en 2016. F1: fecha 1; F2: fecha 2. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.	170
Figura 3.25. Relación entre días a AT (D_{AT}) y porcentaje de daño por frío es espigas: % D (daño total), B (espiga blanca), De (espiga deformada) y Z (espiga afectada por zonas). a) F1, b) F2 (año 2016). El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros.	171
Figura A1.1. Metodología de obtención de genotecas de expresión (ADNc) de CBW 0101 (previo a esta Tesis).	189
Figura A1.2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de <i>SAD</i> de <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> . <i>Td-SAD-2Ba</i> corresponde a los genotipos B. AMBAR, MVTD 10-98, CBW 0101 y B. I. CUMENAY y <i>Td-SAD-2Bb</i> a 80-IAT2. Con línea azul están señaladas las cajas de histidina (dominios conservados). Rectángulo negro señala el número de aminoácidos contenidos en cada secuencia.	190
Figura A1.3. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de <i>FAD2</i> de cv. Svevo (<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>durum</i>) con "CLUSTALW". Con línea azul están señaladas las cajas de histidina (dominios conservados). Las barras "/" están indicando un corte de secuencia desde los 300 a los 1920 aminoácidos ya que ese segmento no mostró alineamiento debido a las características de la copia <i>Td-FAD2-6B.4</i> . Rectángulo negro señala el número de aminoácidos contenidos en cada secuencia (387 aminoácidos) que corresponden a las copias de <i>FAD2</i> funcionales.	191
Figura A1.4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos <i>Td-FAD8</i> de <i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> . <i>FAD8-2Ba</i> corresponde a los genotipos B. AMBAR, MVTD 10-98 y 80-IAT2 y a CBW 0101 y B. I. CUMENAY. Con línea azul están señaladas las cajas de histidina (dominios conservados). Rectángulo negro señala el número de aminoácidos contenidos en cada secuencia.	193

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Desaturasas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
Tabla 1.2. Genotipos de trigo candeal utilizados para amplificar los genes <i>SAD</i> , <i>FAD2</i> y <i>FAD8</i> . Ciclo de crecimiento desde siembra a espigazón (promedio de dos años en dos localidades) y porcentaje de daño en hojas por heladas en condiciones controladas en macollaje y encañazón, según Basualdo (2013).....	41
Tabla 1.3. Cebadores para la amplificación por PCR de tres genes de desaturasas de trigo candeal. Nucleótidos entre [] en la secuencia de cebadores para <i>FAD2</i> , indican bases degeneradas.	42
Tabla 1.4. Condiciones de la PCR para cada uno de los pares de cebadores diseñados para la amplificación de los genes de <i>SAD</i> , <i>FAD2</i> y <i>FAD8</i> de trigo candeal.	43
Tabla 1.5. Estadios de desarrollo de cinco tejidos utilizados en los experimentos de expresión disponibles en <i>WheatExp</i> . Los estadios son identificados mediante la escala Zadoks (Zadoks <i>et al.</i> , 1974).	46
Tabla 1.6. Transcritos de genes de desaturasas de la línea CBW 0101 de trigo candeal detectados en la condición control (C) y frío (F); los símbolos + y - indican mayor o menor expresión, respectivamente. Anotación funcional (AF), nombre según nomenclatura de <i>A. thaliana</i> , localización cromosómica en el genoma del cv. Svevo <i>T. turgidum ssp. durum</i> (CR), número de copias y resultado de BLASTX (hits con al menos 95% de identidad y un e-value < e ⁻⁹), sobre la base de datos de proteínas del cv. Svevo. En negrita se señalan los genes con expresión diferencial significativa (p-value < 0,01) y con * los genes seleccionados para análisis de amplificación de secuencias genómicas. El ID del gen representa un código interno del experimento de ARN-seq.....	49
Tabla 1.7. Polimorfismos en el gen esteroil-ACP-desaturasa <i>Td-SAD-2B</i> identificados a partir del alineamiento de secuencias de cinco genotipos de trigo candeal. Exones en gris.	55
Tabla 1.8. Estructura genética de la copia <i>Td-FAD2-6B.4</i> de trigo candeal.	58
Tabla 1.9. Porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos/aminoácidos entre las copias de <i>FAD2</i> de trigo candeal. En negrita las copias ortólogas.	60
Tabla 1.10. Caracterización de las copias del gen <i>FAD2</i> del cromosoma 6 de trigo candeal. Información deducida a partir de la proteína predicha, BLASTX y alineamiento local.....	61
Tabla 1.11. Polimorfismos en secuencias del gen <i>FAD8</i> del cromosoma 2B obtenidas de cinco genotipos de trigo candeal. En gris se marcan los exones.	62
Tabla 1.12. Perfiles transcriptómicos de los genes homeólogos correspondientes a los genomas A, B y D obtenidos usando BLASTN (e-value: 0,0) en <i>WheatExp</i> . El nivel de expresión indicado se obtuvo con FPKM (<i>T. aestivum</i> - órgano y tratamiento) y RPKM (hojas en senescencia de <i>T. turgidum ssp. durum</i>) de acuerdo con la siguiente escala: + <10, ++ 10–	

20, +++ 20–60, ++++ 60–100, +++++ > 100. HD: en espigazón, 12 DAA y 22 DAA (días después de antesis), SD sin datos. Los hits para cada gen están ordenados de mayor a menor score e e-value.	68
Tabla 1.13. Propiedades fisicoquímicas, localización subcelular, número de aminoácidos, peso molecular (kDa) y punto isoeléctrico (pI) de las desaturasas de gramíneas.	71
Tabla 1.14. Secuencia de aminoácidos C-terminal de las desaturasas localizadas en RE....	73
Tabla 1.15. Dominios transmembrana de las proteínas ω - 3 y ω - 6 lípido desaturasas de gramíneas utilizando el predictor TMHMM	74
Tabla 2.1. Contenido de ácidos grasos (%) en hojas de trigo candeal de plantas control a 22 °C (0 horas) y tratadas a 4 °C (8, 24, 48, 72 y 144 horas). Los valores son los promedios \pm SD (desvío estándar) de tres réplicas biológicas.	103
Tabla 3.1. Fases principales de la escala Zadoks (Satorre <i>et al.</i> , 2004).....	123
Tabla 3.2. Umbrales de daño por efecto de las temperaturas según el estadio de desarrollo de trigo.....	126
Tabla 3.3. Materiales de trigo candeal evaluados a campo durante los años 2016-2017. Entre paréntesis el año de registro; S/R: Sin Registro	129
Tabla 3.4. Valores promedio de las variables: rendimiento (Rto), biomasa aérea en madurez fisiológica (BA _{MF}), peso promedio de granos por m ² (PG), peso de las espigas logrado en el período de llenado de granos por m ² (PE _{AT-MF}), índice de cosecha (IC), número de espigas por m ² (NE), número de granos por m ² (NG), peso de mil granos en gramos (PMG), contenido de proteína en grano (%), peso hectolítrico (PH) y altura obtenidas en los años 2016 y 2017, en 3 fechas de siembra. Promedios con letra común no difieren significativamente (p > 0,05). Entre paréntesis se indica el error estándar.	138
Tabla 3.5. Días a antesis (D _{AT}) y período de llenado de granos (D _{AT-MF}) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra y dos años (2016 y 2017).	140
Tabla 3.6. Análisis de la varianza: rendimiento (Rto), altura, índice de cosecha (IC), contenido de proteína en grano, peso hectolítrico (PH), número de granos por m ² (NG), peso promedio de granos por m ² (PG), peso de mil granos (PMG), peso de espigas logrado en el periodo de llenado de granos (PE _{AT-MF}), número de espigas por m ² (NE), número de grano por espiga (NGE), espiguillas por espiga (e.E ⁻¹) y biomasa aérea en madurez fisiológica (BA _{MF}).....	152
Tabla 3.7. Porcentaje de daño de 11 genotipos de trigo candeal para la F1 del año 2016. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD α =0,05).	168
Tabla 3.8. Valores promedio de daño en espigas por heladas de quince genotipos de trigo candeal en dos fechas de siembra y días a antesis (D _{AT}). D: daño total; B: espiga blanca; De: espiga deformada; Z: espiga dañada por zonas.	169
Tabla A1.1. Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d)	

esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e ⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de <i>Z. mays</i> y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de <i>O. sativa</i> como sondas.	194
Tabla A2.1. Análisis de la Varianza (ANOVA) para los ácidos grasos evaluados a 22 °C (control) y a 4 °C durante 8, 24, 48, 72 y 144 hs.	204
Tabla A2.2. Análisis de la Varianza (ANOVA) para el índice REL (%) a las 12 horas a la temperatura control (2 °C), -4 °C y -13°C.	205
Tabla A2.3. Análisis de la Varianza (ANOVA) para el índice EL (%) a las 12 hs a -4 °C y -13°C.	205
Tabla A2.4. Análisis de la Varianza (ANOVA) para Expresión Relativa de FAD2 a 22 °C y en cada uno de los tiempos evaluados (24, 72 y 144 hs) a 4 °C.	205
Tabla A3.1. Registro de las condiciones meteorológicas de la estación ubicada en la EEAI Barrow (Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow), año 2016.	206
Tabla A3.2. Registro de las condiciones meteorológicas de la estación ubicada en la EEAI Barrow (Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow), año 2017.	207
Tabla A3.3. Análisis de la Varianza para Rendimiento.	208
Tabla A3.4. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, D _{AT} y D _{AT-MF} de 15 genotipos de trigo candeal, año 2016. En negrita correlaciones significativas.	209
Tabla A3.5. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, D _{AT} y D _{AT-MF} de 15 genotipos de trigo candeal, año 2017. En negrita correlaciones significativas.	209
Tabla A3.6. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E ⁻¹ , PMG, IC, PE _{AT-MF} , BA _{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F1 del año 2016. En negrita correlaciones significativas.	210
Tabla A3.7. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E ⁻¹ , PMG, IC, PE _{AT-MF} , BA _{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F2 del año 2016. En negrita correlaciones significativas.	211
Tabla A3.8. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E ⁻¹ , PMG, IC, PE _{AT-MF} , BA _{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F3 del año 2016. En negrita correlaciones significativas.	212
Tabla A3.9. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E ⁻¹ , PMG, IC, PE _{AT-MF} , BA _{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F1 del año 2017. En negrita correlaciones significativas.	213
Tabla A3.10. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E ⁻¹ , PMG, IC, PE _{AT-MF} , BA _{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F2 del año 2017. En negrita correlaciones significativas.	214
Tabla A3.11. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E ⁻¹ , PMG, IC, PE _{AT-MF} , BA _{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F3 del año 2017. En negrita correlaciones significativas.	215

Tabla A3.12. Rendimiento ($\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$) de 15 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,01$).	216
Tabla A3.13. Rendimiento ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,001$).....	217
Tabla A3.14. Contenido de proteína en grano (%) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).	218
Tabla A3.15. Contenido de proteína en grano (%) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).	219
Tabla A3.16. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, Proteína y PH de 15 genotipos de trigo candeal (año 2016). En negrita correlaciones significativas.	220
Tabla A3.17. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, Proteína y PH de 15 genotipos de trigo candeal (año 2017). En negrita correlaciones significativas.	220
Tabla A3.18. Peso hectolítrico ($\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).	221
Tabla A3.19. Peso hectolítrico ($\text{kg}\cdot\text{hl}^{-1}$) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).	222
Tabla A3.20. Altura (cm) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).	223
Tabla A3.21. Altura (cm) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).	224
Tabla A3.22. Índice de cosecha (IC) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,01$).	225
Tabla A3.23. Índice de cosecha (IC) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,01$).	226
Tabla A3.24. Análisis de la Varianza para % de daño en espigas. Año 2016.	227
Tabla A3.25. Coeficiente de correlación de Pearson entre D_{AT} , % de Daño total de espigas por frío y tipos de daño: Blanca, Deformada y Zonas de 15 genotipos de trigo candeal, año 2016. En negrita correlaciones significativas.	227

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP: Acyl Carrier Protein - Proteína Portadora de Acilo

AG: Ácido Graso

ALA: Ácido α -linolénico

AT: Antesis

BA_{MF}: Biomasa aérea total en madurez fisiológica

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CE: Conductividad Eléctrica

D_{AT}: Días a antesis

D_{AT-MF}: Días desde AT a MF o período de llenado de granos

EL: Electrolyte Leakage - Fuga de Electrolitos

EM: Emergencia de plantas

F (N°): Fechas de siembra

SAD: Stearoyl-ACP desaturase - Estearoil-ACP desaturasa

FAD: Fatty Acid Desaturase - Desaturasa de Ácidos Grasos

FAS: Fatty Acid Sintase - Complejo Enzimático AG Sintasa

FT: Factores de Transcripción

GLA: Ácido γ -linolénico

IC: Índice de cosecha

MF: Madurez fisiológica

NE: Número de espigas.m⁻²

NG: Número de granos.m⁻²

NGE: Número de granos/espiga

PE_{AT-MF}: Peso seco de la espiga logrado en el período de llenado de granos (AT-MF)

PG: Peso promedio de granos.m⁻²

PH: Peso hectolítrico

PMG: Peso de mil granos

PUFA: Poly Unsaturated Fatty Acid - Ácidos Grasos Poliinsaturados

RE: Retículo endoplasmático

REL: Relative Electrolyte Leakage o Fuga Relativa de Electrolitos

INTRODUCCIÓN GENERAL

Origen y características genéticas de la especie

El trigo candeal (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) es una especie que pertenece a la familia Gramineae o Poaceae. La historia evolutiva del género *Triticum* es compleja y ha sido revisada por varios autores (Dubcovsky & Dvorak, 2007; Feldman & Levy, 2012; Marcussen *et al.*, 2014). El trigo candeal se originó a través de un proceso de alopoliploidización a partir de las especies diploides *Triticum urartu* ($2n = 2x = 14$ AA) y una especie emparentada con *Aegilops speltoides* Tausch. ($2n = 14$ SS). Esta hibridación formó el alotetraploide *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* ($2n = 4x = 28$; AABB), un antepasado del trigo silvestre emmer o *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum*, cultivado en Oriente Medio (Petersen *et al.*, 2006). La domesticación del trigo emmer condujo a la selección del trigo duro moderno (*Triticum turgidum* ssp. *durum*), cultivado en la actualidad, principalmente, para la producción de pasta (Maccaferri *et al.*, 2019). Posteriormente, un segundo evento de hibridación entre *Triticum turgidum* y la especie diploide *Aegilops tauschii* (DD), produjo el trigo hexaploide o trigo pan, *Triticum aestivum* ($2n = 6x = 42$ AABBDD) (Fig. 1).

Cada uno de los genomas (A, B o D) posee un tamaño considerablemente grande (~5,5 Gb) y una alta proporción (> 80%) de elementos transponibles (TE, transposable elements) altamente repetitivos (Wicker *et al.*, 2011). El ADN repetitivo y la poliploidía facilitan la duplicación de genes (Zhang, 2003), y pueden dar lugar a la generación de pseudogenes (copias del gen no funcionales) (Wicker *et al.*, 2011).

La estructura genómica de la especie, genera una amplia adaptación a condiciones climáticas. Es cultivado en latitudes desde los 60° Norte en Europa hasta los 45° Sur en América y en un rango altitudinal desde pocos metros hasta más de 3000 m.s.n.m (Rharrabti, 2001).

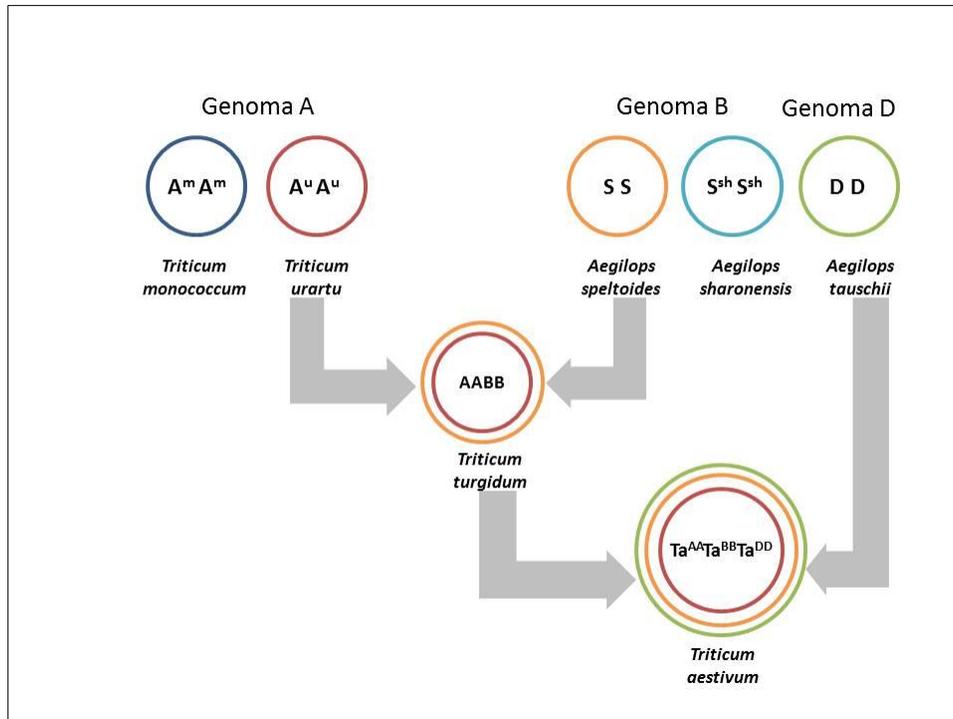


Figura I. Esquema de las relaciones entre los genomas de trigo. Modificado y adaptado de Marcussen *et al.* (2014).

Producción y mejoramiento de Triticum turgidum ssp. durum

La producción de trigo candeal a nivel mundial ronda los 30-40 millones de toneladas y representa alrededor del 6 a 8 % de la producción mundial de trigo (Dominguez Brando, 2014). Los principales productores son Europa, Norte de África (principal importador), Canadá (principal exportador), México, Australia, Oriente Medio y Asia (Larsen, 2017).

En Argentina y en general en otros países de Occidente, el trigo candeal se utiliza principalmente para la elaboración de pastas secas de calidad, siendo la sémola la materia prima principal (Donaire *et al.*, 2018). En otros países de Oriente Medio y Norte de África, constituye la base de su alimentación en preparaciones como couscous, burgol y frek (Quaglia, 1988).

En nuestro país, el sur de la provincia de Buenos Aires concentra el 85 % del área sembrada con trigo candeal, correspondiente a las subregiones trigueras IV y V Sur (Fig. II). Esta región posee clima sub-húmedo/semiárido, inviernos marcados y temperaturas mínimas variables en fecha e intensidad. En los últimos años se ha registrado una expansión del cultivo hacia otras provincias como Tucumán, San Luis y Córdoba (Donaire *et al.*, 2018).

A nivel global, el mejoramiento del cultivo ha sido dirigido, fundamentalmente, al aumento de la productividad y al cumplimiento de las exigencias de la industria: aptitud fideera y calidad de grano. Además, una buena variedad de trigo candeal para pasta debe tener su endosperma duro y vítreo, alto contenido de proteínas y de pigmentos amarillos y una buena composición de proteínas de gluten (Seghezzo, 2014). La mayoría de las variedades de trigo candeal disponibles a nivel mundial, son de hábito primaveral y poseen baja resistencia a frío. Por esta razón, la siembra se realiza a mediados del invierno e incluso en primavera, cuando las temperaturas son menos severas. Sin embargo, el potencial de rendimiento podría explotarse mejor si existieran variedades con mayor tolerancia a las heladas, que puedan sembrarse más temprano en el otoño (Sieber *et al.*, 2014). Un factor que limita la selección de variedades tolerantes a frío, es la variación en la fecha de inicio de ocurrencia de heladas en los distintos años (Sieber *et al.*, 2014).

En Argentina, las pérdidas de rendimiento por heladas, principalmente en estadio de floración, fueron registradas por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en la campaña 2007-08 con 30 a 80 % de pérdidas (Basualdo, 2013). En la actualidad en nuestro país, el cultivo de trigo candeal se basa principalmente en diez variedades las cuales son primaverales de ciclo corto-intermedio, con ausencia de variedades de ciclo largo. En los últimos años, la selección ha sido dirigida hacia variedades de floración tardía, a fin de diversificar la longitud del ciclo en la búsqueda de siembras más tempranas que coincidan con una mayor humedad en el suelo. Además, se busca evitar condiciones de estrés por altas o bajas temperaturas en el período más susceptible de crecimiento, que comprende los estadios alrededor de la floración (Larsen, comunicación personal). Por esta razón, en la actualidad, las siembras más tempranas constituyen una estrategia de manejo importante.

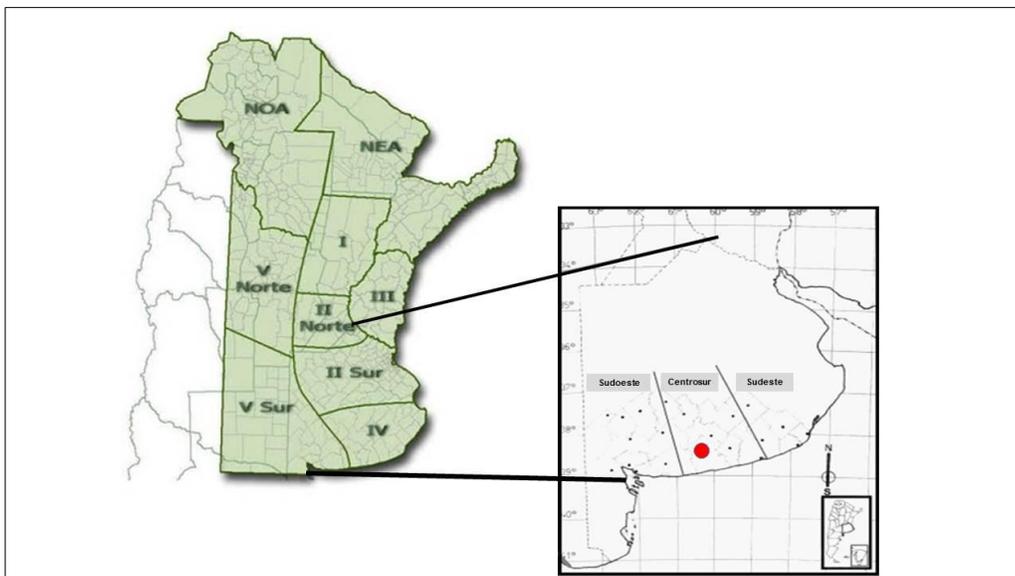


Figura II. Mapa de las regiones productoras de trigo en Argentina. El cultivo de trigo candeal se concentra en las subregiones IV y V Sur, subdividida en tres regiones (Sudoeste, Centro Sur y Sudeste). El punto rojo corresponde a la localidad de Tres Arroyos (INTA Barrow), donde se realizaron los ensayos a campo de esta tesis.

Estrés por bajas temperaturas

El estrés por bajas temperaturas es una de las adversidades que más afectan la producción de los cultivos limitando la distribución geográfica y la época de crecimiento, modificando la calidad y el rendimiento (Yu *et al.*, 2003; Hannah *et al.*, 2005). Para minimizar los daños causados por las bajas temperaturas, en las plantas se activan mecanismos fisiológicos de respuesta general al estrés que están relacionados con modificaciones en la época de senescencia, cambios en el funcionamiento de las células guarda, en la elasticidad de la pared celular y en la estabilidad de las membranas celulares (Chinnusamy *et al.*, 2005). Además, el estrés por frío induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que resulta en un inevitable daño de los tejidos y provoca alteraciones fisiológicas en las plantas (Strand *et al.*, 1999). Por otra parte, las temperaturas por debajo de 0 °C inducen la formación de hielo extracelular que provoca daños en las membranas celulares y deshidratación, alterando la fluidez de las mismas (Litvan, 1972; Hinch, 2003). Por esta razón, en situaciones de estrés por frío, es fundamental que la planta logre mantener la integridad y estabilidad de la membrana celular. Esto depende, en gran medida, de la composición y contenido de ácidos grasos de las bicapas lipídicas que la componen (Nazari *et al.*, 2012; De Bigault & Cacas, 2016). Las enzimas desaturadas de ácidos grasos o FAD

(Fatty Acid Desaturase) catalizan la formación de dobles enlaces en los ácidos grasos que componen los lípidos de las membranas celulares. La presencia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, Poly Unsaturated Fatty Acid), provoca un aumento de la fluidez de las membranas (Somerville, 1991).

La mayoría de la información recopilada sobre características funcionales y estructurales de las desaturasas, se ha basado en el estudio de mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Gibson *et al.*, 1994; Falcone *et al.*, 2004). Posteriormente, se extendió a plantas oleaginosas como *Glycine max* (Blasbalg *et al.*, 2011; Deol *et al.*, 2017), *Helianthus annuus* (Fernandez-Moya *et al.*, 2002), *Olea europaea* (Hernández *et al.*, 2005) y *Linum usitatissimum* (DiNicolantonio & O'Keefe, 2018), fundamentalmente por la importancia en la calidad del aceite y la composición de los ácidos grasos ω -3 y ω -6 para la alimentación humana y animal. En cereales, como trigo y arroz, se han realizado estudios relacionados con el rol de las desaturasas en la respuesta a estrés por frío y sequía (Horiguchi *et al.*, 1996; Horiguchi *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019).

Los estudios de genómica estructural y funcional en combinación con herramientas bioinformáticas predictivas brindan información confiable, relacionada con la composición génica y sus efectos en el fenotipo. Por ejemplo, en trigo, es conocido el rol que cumple el gen VRN-A1 en la transición del meristema apical del estadio vegetativo al reproductivo. El alelo *vrn-1* confiere hábito de crecimiento invernal (la planta requiere de un determinado período de bajas temperaturas para poder florecer) mientras que mutaciones en uno o más homeoalelos constituyen la principal causa del hábito de crecimiento primaveral (la floración ocurre sin requerimiento de frío) (Fu *et al.*, 2005). A partir del uso de marcadores, secuenciado, análisis estructural y estudios de expresión de VRN-1, fue posible explicar la variación fenotípica en la respuesta a vernalización y en la variable días a floración de materiales de trigo candeal de origen diverso a través de polimorfismos en la secuencia de promotores e intrones (Basualdo *et al.*, 2015).

El análisis de expresión, la utilización de herramientas *in silico* junto con la disponibilidad en bases de datos de información sobre secuencias de especies relacionadas, fue fundamental para que el grupo avanzara en la comprensión de un rasgo complejo de trigo candeal como es la longitud de ciclo, y aporta información de utilidad en el proceso de obtención de nuevas variedades.

Antecedentes del grupo en estudios de la respuesta a frío en trigo candeal

En el marco de su tesis doctoral (2013), Jessica Basualdo evaluó la composición alélica de VRN-A1 y el gen Ppd-A1 (fotoperiodo), en 12 genotipos de trigo candeal. Entre los materiales utilizados, el genotipo CBW 0101, presentó ciclo largo, sin respuesta a vernalización, sensibilidad al fotoperiodo (conformación alélica *Vrn-A1c* / *Ppd-A1b*) y mostró un buen comportamiento frente a temperaturas bajo cero en condiciones controladas y en evaluación a campo. En ensayos en cámara con temperaturas de -8 / -9 °C durante 8 horas se observó que en CBW 0101, el daño fue del 15 % y 60 % en macollaje y encañazón, respectivamente, representando valores significativamente menores a otros genotipos primaverales. Por otro parte, en las evaluaciones a campo, en tres ambientes, este genotipo se posicionó entre los valores más bajos de daño en espigazón (4,13 %), aunque en este caso el bajo nivel de daño por heladas pudo atribuirse principalmente a la longitud de ciclo. Estos resultados, condujeron a realizar un análisis más exhaustivo del genotipo CBW 0101. Para ello, se desarrollaron dos genotecas de ADNc de esta línea (plantas en espigazón sometidas a bajas temperaturas y plantas control; condiciones detalladas en Materiales y Métodos del Capítulo 1 de esta tesis).

Posteriormente y como parte de los trabajos del grupo, se seleccionó un set de genotipos de trigo candeal previamente fenotipados en relación a la respuesta a frío y longitud del ciclo (Basualdo 2013) y se analizó el gen correspondiente al factor de transcripción DREB1 (Dehydration Responsive Element Binding). La secuenciación del mismo permitió identificar los 3 dominios característicos de la familia AP2/ERF: señal de localización nuclear, dominio de unión al EREBP/AP2 y una región rica en Ser/Thr. Si bien se detectaron polimorfismos dentro del dominio EREBP/AP2, éstos no se relacionaron con la tolerancia a frío ni con el hábito de crecimiento (Díaz *et al.*, 2014). Por otro lado, se analizó la expresión del gen *DREB-A1* y el correspondiente a la dehidrina *Wcor410*. Las dehidrinas son proteínas osmóticamente activas que se acumulan para evitar la deshidratación que provocan tanto la sequía, como la salinidad y el frío. El gen *DREB-A1* regula la expresión de genes de dehidrinas, entre ellos, *Wcor410*. Mediante qRT-PCR se analizó la expresión de estos dos genes en plántulas de trigo candeal en estadio de dos hojas sometidas a 4 °C durante un periodo de tiempo (desde 1 a 8 horas). Para ello, se utilizaron tres genotipos: CBW 0101 y BUCK AMBAR (ambos primaverales) y MVTD 10-98 (invernal), que fueron seleccionados en base a la diferente susceptibilidad frente a temperaturas bajo cero, observada en ensayos

previos (Basualdo, 2013), donde el genotipo BUCK AMBAR (B. AMBAR) presentó una elevada susceptibilidad, MVTD 10-98 mostró tolerancia y CBW 0101 tuvo un comportamiento intermedio. Los niveles de expresión de los genes mostraron asociación con los fenotipos descritos. La expresión de *DREB-A1* se indujo en MVTD 10-98 y CBW 0101 en la primera hora a 4°C, mientras que en B. AMBAR permaneció sin cambios significativos desde el inicio hasta el final del tratamiento (Fig. III a y b). En el caso de *Wcor410*, desde el inicio del tratamiento hasta las 8 horas, el genotipo invernal mostró significativamente una mayor expresión que la condición control a 22 °C (0 horas). Por otro lado, CBW 0101 aumentó significativamente a partir de las 2 horas hasta el final del tratamiento, mientras que en B. AMBAR la expresión se mantuvo sin cambios significativos (Miguel *et al.*, 2015) (Fig. IV).

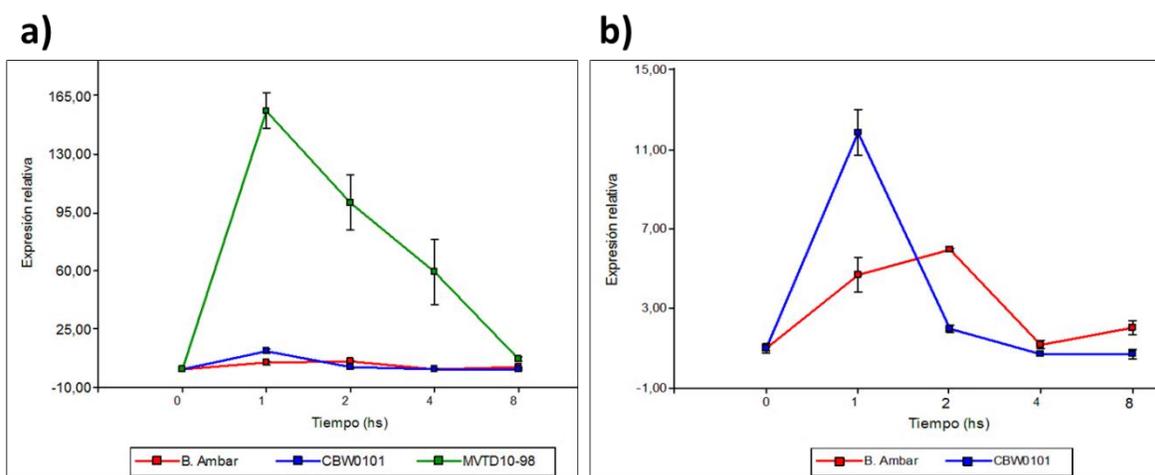


Figura III. a) Expresión relativa de *DREB-A1* en plántulas de BUCK AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y a las 1, 2, 4 y 8 horas de exposición a 4 °C. b) Detalle de (a) de genotipos BUCK AMBAR y CBW 0101. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.

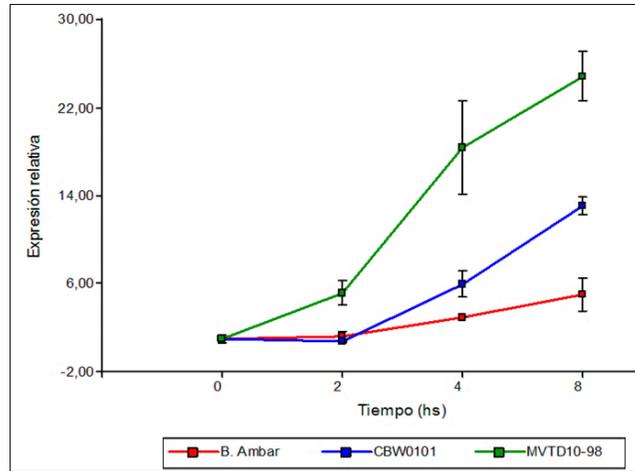


Figura IV. Expresión relativa de *Wcor410* en plántulas de BUCK AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y a las 2, 4 y 8 horas de exposición a 4 °C. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.

Propuesta de trabajo

Para la presente tesis, se tomó como punto de partida la exploración *in silico* de la familia de desaturasas en las gramíneas y luego se profundizó en la caracterización de estos genes en cinco genotipos de trigo candeal, que presentaron variación en la longitud del ciclo y en la respuesta a las bajas temperaturas. Se diseñaron cebadores sobre el transcriptoma de la línea CBW 0101, para amplificar tres genes de desaturasas.

Luego se abordó el estudio desde la perspectiva fisiológica determinando el efecto del frío sobre el perfil completo de ácidos grasos y la permeabilidad de la membrana celular. En estos análisis se utilizaron tres genotipos: BUCK AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98.

Por último, se realizó un análisis de rendimiento en la Estación Experimental Agropecuaria Integrada – Barrow (EEAI). No se disponía de información sistematizada del rendimiento de trigo candeal para esta región, utilizando fechas de siembra relativamente tempranas. Se disponía de información de un ensayo a campo con 73 genotipos (Basualdo 2013) que mostraron una variabilidad significativa en la duración del ciclo. De éstos, se seleccionaron 15 materiales, que fueron sembrados en tres fechas y en dos años consecutivos. Se obtuvieron medidas de rendimiento y sus componentes, índice de cosecha, biomasa aérea, altura, duración de ciclo, contenido proteico en grano y peso hectolítrico.

El abordaje de este estudio, desde diferentes enfoques, genético, bioquímico, fisiológico y agronómico, permite la caracterización del germoplasma y confiere una base genética a la

interpretación de la variabilidad fenotípica, haciendo más preciso el proceso de selección en mejoramiento.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Conocer las respuestas moleculares y fisicoquímicas de trigo candeal frente a las bajas temperaturas y las diferencias en rendimiento y sus componentes, de un grupo de genotipos con diferencias en su ciclo de crecimiento.

Objetivos específicos

Hipótesis 1

Hipótesis 1.1: En una genoteca de ADNc de plantas de *Triticum turgidum* ssp. *durum* expuestas a frío en etapa reproductiva, se encuentran expresadas las enzimas desaturasas de ácidos grasos.

Hipótesis 1.2: El mapeo sobre el genoma de referencia y el análisis de secuencias en un grupo de genotipos, permite establecer número de copias y el nivel de polimorfismo presente en genes de desaturasas de trigo candeal.

Hipótesis 1.3: Las desaturasas de gramíneas comparten patrones estructurales y funcionales que pueden ser identificados y descritos mediante herramientas *in silico*.

Objetivo 1

Objetivo 1.1: Identificar transcritos pertenecientes a genes de desaturasas en el transcriptoma de la línea de *Triticum turgidum* ssp. *durum* CBW 0101.

Objetivo 1.2: Analizar la localización cromosómica y las variaciones en secuencias de nucleótidos y aminoácidos en genes de desaturasas.

Objetivo 1.3: Identificar patrones estructurales y funcionales en los genes de desaturasas de gramíneas, mediante herramientas bioinformáticas.

Hipótesis 2

Hipótesis 2.1: Plantas de trigo candeal sometidas a bajas temperaturas experimentan cambios en la composición lipídica de las membranas celulares de tejidos vegetativos y los genotipos más tolerantes presentan niveles más elevados de ácidos grasos insaturados.

Hipótesis 2.2: El frío provoca variaciones en los niveles de expresión del gen ω -6 lípido desaturasa en etapa vegetativa y los genotipos de trigo candeal que son más tolerantes, presentan niveles más altos de expresión.

Hipótesis 2.3: La permeabilidad de las membranas celulares de hojas de plántulas de trigo candeal es afectada por exposición a bajas temperaturas. Sin embargo, los genotipos más tolerantes conservan una mayor integridad de membrana que puede ser estimada mediante la pérdida de electrolitos.

Objetivo 2

En un set de genotipos de trigo candeal con diferente comportamiento frente a bajas temperaturas:

Objetivo 2.1: Evaluar el perfil y contenido de ácidos grasos de plántulas creciendo a 4 °C durante diferentes periodos de tiempo.

Objetivo 2.2: Analizar la variabilidad en la expresión del gen ω -6 lípido desaturasa (*FAD2*).

Objetivo 2.3: Evaluar la integridad de la membrana celular mediante la medición de la fuga de electrolitos de hojas sometidas a temperaturas bajo cero.

Hipótesis 3: El efecto de la fecha de siembra en genotipos de trigo candeal que difieren en su ciclo de crecimiento, se ve reflejado en cambios en el rendimiento, medidas relacionadas y en el grado de daño por heladas en estadio reproductivo.

Objetivo 3: Evaluar los efectos de la fecha de siembra en un grupo de genotipos de trigo candeal, en relación a la variable rendimiento y sus componentes, días a floración y producción de biomasa. Así mismo, cuantificar el daño causado por temperaturas bajo cero en espigazón.

CAPÍTULO 1

Análisis estructural y funcional de las desaturasas en gramíneas

El desarrollo de este capítulo corresponde a las siguientes hipótesis y objetivos:

Hipótesis 1

Hipótesis 1.1: En una genoteca de ADNc de plantas de *Triticum turgidum* ssp. *durum* expuestas a frío en etapa reproductiva, se encuentran expresadas las enzimas desaturasas de ácidos grasos.

Hipótesis 1.2: El mapeo sobre el genoma de referencia y el análisis de secuencias en un grupo de genotipos, permite establecer número de copias y el nivel de polimorfismo presente en genes de desaturasas de trigo candeal.

Hipótesis 1.3: Las desaturasas de gramíneas comparten patrones estructurales y funcionales que pueden ser identificados y descritos mediante herramientas *in silico*.

Objetivo 1

Objetivo 1.1: Identificar transcritos pertenecientes a genes de desaturasas en el transcriptoma de la línea de *Triticum turgidum* ssp. *durum* CBW 0101.

Objetivo 1.2: Analizar la localización cromosómica y las variaciones en secuencias de nucleótidos y aminoácidos en genes de desaturasas.

Objetivo 1.3: Identificar patrones estructurales y funcionales en los genes de desaturasas de gramíneas, mediante herramientas bioinformáticas.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) son componentes importantes de las membranas celulares de las plantas, particularmente de cloroplasto y retículo endoplasmático (RE). Las variaciones en su composición afectan diferentes procesos celulares y fisiológicos, tales como la adaptación al frío, defensa de patógenos, formación de polen y desarrollo de cloroplastos (Wallis *et al.*, 2002). Las desaturasas son enzimas claves en la síntesis de los PUFA ya que introducen dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos que componen los lípidos de las membranas. En la nomenclatura de ácidos grasos se utiliza la denominación delta (Δ) u omega (ω) para señalar la posición del doble enlace con números, en relación a los extremos carboxilo o metilo, respectivamente.

Existen tres tipos de desaturasas de ácidos grasos de acuerdo al sustrato que utilizan: acil-CoA, acil-ACP (proteína transportadora de grupo acilo) y acil-lípido desaturasas. Las acil-CoA desaturasas están presentes en membranas de células de animales, levaduras y hongos e introducen un doble enlace en ácidos grasos que llevan unido una coenzima A (CoA) (Macartney *et al.*, 1994). Aceptan electrones de un sistema compuesto por citocromo b_5 y NADH. Las acil-ACP desaturasas, exclusivas de plantas, son enzimas solubles, presentes en el estroma de los cloroplastos que introducen el primer doble enlace en ácidos grasos que llevan unido una proteína transportadora de acilo (Murata & Wada, 1992). En esta reacción el sistema NADPH/ferredoxina actúa como donador de electrones. Por último, el grupo responsable de la mayoría de las reacciones de insaturación en plantas, son las acil-lípido desaturasas, que introducen dobles enlaces en los ácidos grasos de los glicerolípidos (dos moléculas de ácidos grasos unidas por enlaces éster a dos grupos alcohol del glicerol). La mayoría están formadas por 300-350 aminoácidos y dada su naturaleza hidrofóbica se encuentran atravesando las membranas celulares repetidas veces (Murata & Wada, 1995). Aparecen como diferentes isoenzimas localizadas en sus correspondientes compartimentos celulares. Las plastidiales requieren como cofactores ferredoxina y NADPH, mientras que las que se localizan en el RE requieren NADH y citocromo b_5 (Los & Murata, 1998).

Tanto las acil-ACP como las acil-lípido desaturasas, presentan un centro di-hierro formando el sitio catalítico e independientemente de su solubilidad y localización, todas las desaturasas de plantas están codificadas por genes nucleares (Collados, 2006). Las acil-lípido desaturasas incluyen subfamilias. La subfamilia “ ω - desaturasa” introduce un doble enlace entre uno existente y el extremo metilo. Una segunda subfamilia, son las denominadas FED (Front-End Desaturase), están presentes en el RE e introducen dobles enlaces entre un doble enlace preexistente y el extremo carboxilo del ácido graso. Las FED contienen

predominantemente el sistema dador de electrones citocromo b_5 fusionado al dominio de insaturación principal (Alonso *et al.*, 2003). La tercera subfamilia está constituida por desaturasas de esfingolípidos, compuestos en su base por un ácido graso unido al amino alcohol de cadena larga esfingocina; estas desaturasas también requieren citocromo b_5 como donador de electrones (Sperling *et al.*, 1998).

En relación a la estructura primaria de las proteínas, las desaturasas solubles (acil-ACP), presentan dos dominios conservados de histidina que consisten en dos cajas “D/EE $_2$ H”, relacionadas con el sitio activo de la proteína (Shanklin & Cahoon, 1998). Las propiedades de solubilidad de este grupo han permitido el acceso a su estructura cristalina (Lindqvist *et al.*, 1996). Por otro lado, las desaturasas de membrana (acil-lípido), contienen tres cajas de histidina, así como varios dominios transmembranales (Los & Murata, 1998). Las cajas de histidina consisten en ocho residuos conservados de este aminoácido agrupados de la siguiente manera: HXXXH, HXXHH y HXXHH (Dar *et al.*, 2017).

La mayoría de los trabajos relacionados con el rol de las desaturasas han sido realizados en *Arabidopsis thaliana*, utilizando una colección de mutantes deficientes en la insaturación de ácidos grasos (Gibson *et al.*, 1994) Así se han descrito ocho genes que codifican desaturasas de ácidos grasos o FAD (Fatty Acid Desaturase) en Arabidopsis: *FAB2* (también denominada *SAD*; *stearoyl-ACP desaturase*), *FAD2*, *FAD3*, *FAD4*, *FAD5*, *FAD6*, *FAD7* y *FAD8* (Tabla 1.1) (Miquel *et al.*, 1993). Esta nomenclatura es utilizada actualmente en la mayoría de las especies vegetales (soja, lino, maíz, arroz, entre otras). Como ejemplos, la enzima soluble *SAD* o Δ -9 estearoil-ACP desaturasa, agrega específicamente un doble enlace entre los carbonos nueve y diez del ácido esteárico-ACP (18:0-ACP) para producir ácido oleico (18:1); *FAD2* y *FAD6* corresponden a las “ ω - 6 o Δ 12 desaturasa”, se localizan en membranas de RE y cloroplasto, respectivamente (Zhang *et al.*, 2009) e introducen un doble enlace en el ácido graso oleico (18:1) para producir ácido linoleico (18:2). Por otro lado, *FAD3* de RE y *FAD7* y *FAD8* de cloroplasto, pertenecen al grupo “ ω - 3 o Δ 15 desaturasas” y actúan insaturando el ácido linoleico para producir ácido linolénico (18:3) (Makarenko *et al.*, 2011) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Desaturasas de *Arabidopsis thaliana*.

Nombre del gen	Nombre de la enzima	Compartimento Celular	Sustrato (AG)	Producto (AG)
FAB2 o SAD	Δ -9 acil-ACP desaturasa	Cl (estroma)	18:0	18:1 ^{Δ9}
			16:0	16:1 ^{Δ9}
FAD2	ω - 6 o Δ -12 desaturasa	RE	18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}
FAD3	ω - 3 o Δ -15 desaturasa	RE	18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}
FAD4	Acil lípido desaturasa	Cl	16:0	16:1 ^{<i>trans</i>}
FAD5	Acil lípido desaturasa	Cl	16:0	16:1 ^{Δ7} <i>cis</i>
FAD6	ω - 6 o Δ -12 desaturasa	Cl	16:1 ^{Δ7}	16:2 ^{Δ7,10}
			18:1 ^{Δ9}	18:2 ^{Δ9,12}
FAD7	ω - 3 o Δ -15 desaturasa	Cl	16:2 ^{Δ7,10}	16:3 ^{Δ7,10,13}
			18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}
FAD8	ω - 3 o Δ -15 desaturasa	Cl	16:2 ^{Δ7,10}	16:3 ^{Δ7,10,13}
			18:2 ^{Δ9,12}	18:3 ^{Δ9,12,15}

AG: ácido graso

Cl: cloroplasto

RE: retículo endoplasmático

La insaturación de los ácidos grasos es un paso importante en la biosíntesis de los aceites vegetales y por lo tanto, determinante de la calidad de los mismos (Mikkilineni & Rocheford, 2003), lo que explica por qué la mayoría de los estudios de desaturasas se enfocan en especies oleaginosas como olivo (Hernández *et al.*, 2005), girasol (Rousselin *et al.*, 2002) y soja (Li *et al.*, 2007). Sin embargo, el desplazamiento de las fronteras agrícolas junto con una creciente demanda de variedades con mayor tolerancia a los estreses ambientales, han renovado el interés por la comprensión de los mecanismos de adaptación de los cultivos a condiciones ambientales adversas. Se sabe que las lesiones inducidas por frío ocurren inicialmente en las membranas celulares y que la aclimatación incluye la activación de mecanismos que preservan la fluidez de las mismas (Karabudak *et al.*, 2014; Matteucci *et al.*, 2011). Dicha fluidez se modula cambiando el contenido de ácidos grasos insaturados mediante la regulación de la actividad de las FAD (Upchurch, 2008). Las desaturasas de mayor participación en la respuesta a estreses abióticos son las que insaturan ácidos grasos de 18 átomos de carbono, ya que son los más abundantes en los lípidos de las membranas celulares. Los estudios en desaturasas de ácidos grasos en gramíneas abordaron principalmente a *Zea mays* (Berberich *et al.*, 1998), *Oryza sativa* (Bevilaqua *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2019), *Triticum aestivum* (Horiguchi *et al.*, 2000; Makarenko *et al.*, 2011; Golizadeh y Kumleh, 2019), mientras que en nuestro conocimiento no se dispone de secuencias de la especie *Triticum turgidum* ssp. *durum* caracterizadas. En este capítulo, se analizaron secuencias genómicas de genes de desaturasas aisladas de cinco genotipos de trigo candeal y se exploraron dos genotecas de ADNc (transcriptoma) de *T. turgidum* ssp. *durum*, obtenidas previamente (Díaz *et al.*, 2019). Transcriptos de genes de desaturasas podrían estar presentes o no en estos transcriptomas de acuerdo a la intensidad y duración del tratamiento a bajas temperaturas. Se reunió la información disponible en bases de datos en relación a secuencias de desaturasas de ácidos grasos de gramíneas, las que se caracterizaron estructural y funcionalmente mediante herramientas bioinformáticas. Así mismo, se incorporaron a este análisis, los genes de desaturasas de trigo candeal obtenidos mediante amplificación por PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación de genes de desaturasas a partir de transcriptomas de trigo candeal

Se realizó la búsqueda de genes de desaturasas en dos genotecas de ADNc disponibles en el grupo de trabajo. Dichas genotecas fueron obtenidas por ARN-seq del transcriptoma de la línea CBW 0101, perteneciente a la colección de germoplasma de la Estación Experimental Agropecuaria Integrada INTA Barrow. El material vegetal fue la hoja bandera de plantas en estadio reproductivo (media espiga emergida) creciendo a 22°C (control) o a 5°C (tratamiento de frío). El tratamiento consistió en una rampa desde 15 °C hasta 5 °C (descenso de 1 °C /hora) permaneciendo 5 hs a 5 °C (Fig. A1.1; ANEXO). Con las lecturas, se llevó a cabo un ensamblado *de novo* y la anotación de los transcritos se realizó con las bases de datos *UniProt* (<https://www.ebi.ac.uk/uniprot/>) y *Pfam* (<https://pfam.xfam.org/>) (Díaz *et al.*, 2019). En la presente tesis, se identificaron los genes de desaturasas expresados en ambas condiciones y aquellos con expresión diferencial ($p\text{-value} < 0,01$). Posteriormente, a través del algoritmo BLASTN (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) se realizó un alineamiento sobre el genoma de trigo candeal del cv. Svevo (<https://www.interomics.eu/durum-wheat-genome-intranet>), para determinar la localización cromosómica y el número de copias.

Para avanzar en la anotación, y dada la reciente disponibilidad de la base de datos de proteínas del cv. Svevo se procedió a interrogarla a través del algoritmo BLASTX, utilizando como sondas los transcritos identificados en las genotecas. Debido a que las secuencias proteicas de trigo candeal aún no están anotadas funcionalmente (“unnamed protein product”) en GenBank, se corroboró su identidad con las bases de datos de proteínas, Uniprot y Pfam.

Extracción de ADN genómico y diseño de cebadores para amplificar SAD, FAD2 y FAD8 en distintos genotipos de trigo candeal

A partir de las secuencias de desaturasas identificadas en las genotecas, se seleccionaron tres genes que representan distintos compartimentos celulares (CI y RE) y funciones de insaturación, para amplificar a partir de ADN genómico de trigo candeal: *SAD*, *FAD2* y *FAD8*. La extracción de ADN se realizó a partir de hojas de plántulas de una semana, de cinco genotipos de *T. turgidum ssp. durum*: MVTD 10-98, CBW 0101, Bonaerense INTA CUMENAY (B.I. CUMENAY), 80-IAT2 y BUCK AMBAR (B. AMBAR). Se utilizó el método estándar CTAB (bromuro de hexa-decil trimetil amonio), basado en Saghai-Marroof *et al.* (1984). Los

genotipos fueron seleccionados de acuerdo a variabilidad en el ciclo desde emergencia a espigazón y la tolerancia a bajas temperaturas bajo condiciones controladas en macollaje y encañazón según Basualdo (2013) (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Genotipos de trigo candeal utilizados para amplificar los genes *SAD*, *FAD2* y *FAD8*. Ciclo de crecimiento desde siembra a espigazón (promedio de dos años en dos localidades) y porcentaje de daño en hojas por heladas en condiciones controladas en macollaje y encañazón, según Basualdo (2013).

Genotipos	Ciclo (días)	Daño en macollaje (%)	Daño en encañazón (%)
80-IAT2	143,67	75,00	96,67
BUCK AMBAR	158,33	96,88	93,75
B. I. CUMENAY	164,75	96,43	81,25
MVTD 10-98	175,87	5,00	57,50
CBW 0101	178,33	15,00	60,00

Para la amplificación mediante la técnica de PCR, se diseñó un par de cebadores para el gen *FAD2* (ω -6 lípido desaturasa), tres para *SAD* (estearoil-ACP desaturasa) y cuatro para *FAD8* (ω -3 lípido desaturasa), a fin de cubrir toda la secuencia codificante, incluyendo el codón de inicio y de terminación de la traducción en todos los casos (Tabla 1.3). Los cebadores fueron diseñados a partir de secuencias provenientes del transcriptoma de la línea CBW 0101 y de secuencias de *Triticum aestivum* L. disponibles en *URGI* (Unité de Recherche Génomique Info; <https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/>), dado que el genoma del cv. Svevo no estaba disponible al momento de este experimento. Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pGEM-T Easy (PROMEGA) y purificados con el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (PROMEGA). La secuenciación se realizó en ambas direcciones con los iniciadores comerciales M13 en la plataforma de secuenciación ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), disponible en el Instituto de Biotecnología-INTA, Hurlingham. La identidad de las secuencias se examinó mediante el algoritmo BLASTN. Posteriormente las secuencias de los cinco genotipos para cada gen se alinearon usando la herramienta *ClustalW* (EMBL-EBI, <http://www.ebi.ac.uk/tools/msa/clustalw2/>) a fin de identificar polimorfismos. Las condiciones de las reacciones de PCR para cada uno de los genes se detallan en la Tabla 1.4. Para la obtención de las secuencias de las proteínas, se predijo el ADNc con la base de datos

EnsemblPlant (<https://plants.ensembl.org/index.html>) y luego se realizó la traducción con la herramienta *ExpASy translate* (<https://web.expasy.org/translate/>).

Tabla 1.3. Cebadores para la amplificación por PCR de tres genes de desaturasas de trigo candeal. Nucleótidos entre [] en la secuencia de cebadores para *FAD2*, indican bases degeneradas.

Gen	Cebador	Sentido	Secuencia
Estearoil-ACP desaturasa (<i>SAD</i>) (3737pb)	1	F	5'-GAATCCATCCACCTGTCCTC-3'
		R	5'-ACTTATGGAAGGACTACGCC-3'
	2	F	5'-CCAACACACCAAATCACCA-3
		R	5'-TGCCATGACTTCTCAACTGG-3'
	3	F	5'-CAATCTGGGCTAGGGACAA-3'
		R	5'-CACTAGCCTCTCCCACTG-3'
ω-6 desaturasa (<i>FAD2</i>) (1155-1195pb)	1	F	5'-GTCAG[TC]AGCATCATGGGTGC - 3'
		R	5'-T[CT]GGCGGCTAGAACTTGTTG- 3'
	1	F	5'-GACCAATCACCAAGTGCAAAC -3'
		R	5'-GGAATGTAACCCACGTACCG-3'
ω-3 desaturasa (<i>FAD8</i>) (3724-3753pb)	2	F	5'-ATGTTCTGGGCGCTCTTC-3'
		R	5'-CTCGCAATCCAGACATGG-3'
	3	F	5'-TATGTGTGTGTGGCCCTTGT-3'
		R	5'-AGATGGTAATGCGGGATTTG-3'
4	F	5'-GTCATTGCTCGAACCATTCA-3'	
	R	5'-TCCGACAATAATTCGGCTTC-3	

Tabla 1.4. Condiciones de la PCR para cada uno de los pares de cebadores diseñados para la amplificación de los genes de *SAD*, *FAD2* y *FAD8* de trigo candeal.

Gen	Cebador	Condiciones de la PCR
Estearoil-ACP desaturasa (<i>SAD</i>)	1	1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95 °C, 30 seg a 49 °C y 30 seg a 72 °C (35 ciclos); 3) 10 min a 72 °C
	2	Touchdown: 1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95°C, 45 seg a 53 °C (disminuye 1 °C/ciclo hasta 45 °C) y 1 min a 72 °C (8 ciclos); 3) 30 seg a 95°C, 45 seg a 45 °C y 1 min a 72 °C (30 ciclos); 4) 10 min a 72 °C.
	3	1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95 °C, 30 seg a 50 °C y 30 seg a 72 °C (35 ciclos); 3) 10 min a 72 °C
ω-6 desaturasa (<i>FAD2</i>)	1	1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95 °C, 30 seg a 57 °C y 30 seg a 72 °C (40 ciclos); 3) 10 min a 72 °C
ω-3 desaturasa (<i>FAD8</i>)	1	1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95 °C, 30 seg a 48 °C y 30 seg a 72 °C (40 ciclos); 3) 10 min a 72 °C
	2	1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95 °C, 30 seg a 50 °C y 30 seg a 72 °C (35 ciclos); 3) 10 min a 72 °C
	3	1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95 °C, 30 seg a 57 °C y 30 seg a 72 °C (40 ciclos); 3) 10 min a 72 °C
	4	1) 5 min a 95 °C; 2) 30 seg a 95 °C, 30 seg a 45 °C y 30 seg a 72 °C (40 ciclos); 3) 10 min a 72 °C

Búsqueda de secuencias de desaturasas de gramíneas en GenBank

Una vez obtenidas las secuencias de ADN genómico, ADNc y las proteínas deducidas correspondientes a *T. turgidum* ssp. *durum*, se procedió a realizar un análisis *in silico* de las secuencias de todas las desaturasas de gramíneas disponibles en GenBank. Utilizando el nombre funcional como herramienta de búsqueda, se obtuvieron las secuencias de ADN genómico, ADN complementario (ADNc) y las correspondientes proteínas deducidas de las desaturasas disponibles en GenBank. Posteriormente, se realizó una búsqueda adicional mediante un alineamiento local o BLAST utilizando como sondas las proteínas identificadas en la búsqueda inicial ($e\text{-value} \leq e^{-80}$).

Además, se interrogó la base de datos *Gramene* (<http://www.gramene.org/>), ya que, si bien comparte información con NCBI, los genomas de gramíneas depositados en esta plataforma podrían proporcionar secuencias de desaturasas adicionales.

Los análisis subsiguientes se realizaron sobre las secuencias resultado de la búsqueda en las bases de datos, a las que se sumaron las secuencias de trigo candeal obtenidas en el presente estudio.

Mapeo in silico de los genes de desaturasas

La localización cromosómica de los genes de desaturasas se obtuvo a través de la interrogación de diferentes bases de datos, como se describe a continuación. Los genes correspondientes a las gramíneas *Oryza sativa*, *Setaria italica*, *Bachypodium distachyon*, *Oryza brachyanta*, *Zea mays*, *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* fueron mapeados *in silico* usando la base de datos de *Gramene* (http://ensembl.gramene.org/genome_browser/index.html). Por otra parte, los genes de *Triticum aestivum* (A, B y D), *Triticum urartu* y *Aegilops tauschii* se mapearon en el sitio *URGI*, para éstas dos últimas se consideró la homología ancestral correspondiente a los genomas A y D de *T. aestivum*, respectivamente (Ling *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2013). Por último, las secuencias de *SAD*, *FAD2* y *FAD8* de *T. turgidum* ssp. *durum*, obtenidas experimentalmente, se mapearon sobre la base de datos disponible de trigo candeal del genoma del cv. Svevo.

Búsqueda de elementos cis reguladores en genes de desaturasas

Este estudio se realizó a partir de las secuencias de ADNc obtenidas desde *T. turgidum ssp. durum* y cuando se tuvo acceso en GenBank a la secuencia de ADNc, lo que ocurrió para las especies *T. aestivum* y *Z. mays*. El análisis consistió en la búsqueda de motivos de unión a factores de transcripción (FT) en regiones promotoras obtenidas a partir de las bases de datos de trigo. Para ello se consideró la secuencia de 1500 pb en dirección 5' del sitio de inicio de la traducción (ATG). La exploración de promotores para dos secuencias de *T. aestivum* con ID ADV59911.1 y ADN59912.1 y cinco de *Z. mays* (ID: ACG41542.1, NP_001149122.1, XP_008652067.1, NP_001266540.1 y XP_008665998.1), se realizó sobre el genoma de *T. aestivum* (International Wheat Genome Sequencing Consortium - IWGSC). Por otro lado, para las de *T. turgidum ssp. durum* se utilizó la base del genoma del cv. Svevo. Todas las regiones fueron analizadas a través de la plataforma *PlantPAN* (<http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw>).

Perfil de transcriptos

La disponibilidad de bases de datos de transcriptoma obtenidos de trigo, sobre diferentes tejidos, estadios de desarrollo y condiciones, permitió realizar un análisis de expresión *in silico* de los genes de desaturasas a través de la plataforma *WheatExp* (<https://wheat.pw.usda.gov/WheatExp/>). Se interrogó esta base de datos, utilizando las siguientes secuencias: HQ589252.1 (*SAD1*), HQ589253.1 (*SAD2*) y D84678.1 (ω -3 lípido desaturasa) de *T. aestivum* (Tabla A1.1; ANEXO) considerando el máximo *e-value* (0,0), y por otro lado las secuencias de ADNc de trigo candeal: *SAD*, *FAD2* y *FAD8*. Se interrogaron los siguientes transcriptomas disponibles en *WheatExp*: tejidos en desarrollo, senescencia foliar y estrés por sequía y calor. En el primer caso se calculó un promedio de expresión sobre tres estadios avanzados en cinco tejidos (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Estadios de desarrollo de cinco tejidos utilizados en los experimentos de expresión disponibles en *WheatExp*. Los estadios son identificados mediante la escala Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974).

Estadios	Grano	Hoja	Raíz	Espiga	Tejido
1	Grain_Z71	Leaf_Z10	Root_Z10	Spike_Z32	Stem_Z30
2	Grain_Z75	Leaf_Z23	Root_Z13	Spike_Z39	Stem_Z32
3	Grain_Z85	Leaf_Z71	Root_Z39	Spike_Z65	Stem_Z65

Para la cuantificación del nivel de transcriptos, se desarrolló una escala *ad hoc* basada en asignación de símbolos positivos (+) a fin de obtener una visualización rápida de las diferencias en los niveles de expresión entre tejidos y tratamientos. El nivel de expresión se organizó en cuatro categorías: <10, 10–20, 20–60 y >100 FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads) o RPKM (Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads).

Análisis de proteínas

En este estudio se obtuvieron las propiedades fisicoquímicas, motivos, dominios conservados, hélices transmembrana y localización subcelular, en un set de secuencias de proteínas de gramíneas (conteniendo los tipos esteroil-ACP desaturasa, ω -6 lípido y ω -3 lípido desaturasas), incluyendo las halladas en trigo candeal. Utilizando la herramienta *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>), se obtuvieron los valores de peso molecular y punto isoeléctrico (pI). Posteriormente, se realizó una búsqueda de motivos conservados con la herramienta *MEME-Suite 4.11.1* (<http://meme-suite.org>), bajo los siguientes parámetros: distribución de motivos: 1 por secuencia; número máximo de motivos: 5; número mínimo de sitios: 2; ancho mínimo del motivo: 5 y ancho máximo del motivo: 50. La herramienta *MEME* muestra los motivos conservados entre las secuencias en estudio, elabora una matriz a partir de un alineamiento múltiple que luego se refleja en un gráfico o “Logo”, en el que la frecuencia de aparición de cada aminoácido se corresponde con el tamaño de las distintas letras del código. La secuencia de los motivos identificados

fue posteriormente analizada en *Pfamserver* (<http://pfam.xfam.org>) a fin de confirmar su identidad y la presencia de dominios relacionados con el sitio activo de la proteína.

Luego se estudió la estructura secundaria de las proteínas, incluyendo la presencia de hélices transmembranas en las acil-lípido desaturasas mediante *TMHMM 2.0 server* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) basado en el Modelo de Markov Oculto (HMM). Para predecir la localización subcelular de las proteínas se utilizó la herramienta *CELLO v.2.5* (subCELLular LOcalization predictor, <http://cello.life.nctu.edu.tw>).

Modelado molecular de Acil-ACP-desaturasas a partir de las secuencias de T. turgidum ssp. durum, T. aestivum, Brachypodium distachyon y Zea mays.

Dada la disponibilidad de un modelo de proteína cristalizada de *Ricinus communis* (2xZ1.A) (Lindqvist *et al.*, 1996) depositada en la Base de Datos de Proteínas (PDB), se realizó el modelado estructural de cuatro desaturasas solubles (acil-ACP desaturasas) de las especies: *T. turgidum ssp. durum* (Td-SAD), *T. aestivum* (ADV59911.1), *B. distachyon* (XP_003573524.1) y *Zea mays* (ACG49052.1), utilizando la interfaz *SwissModel* (swissmodel.expasy.org/interactive). Posteriormente se realizó un gráfico de Ramachandran para obtener el mejor modelo predictivo a través del servidor *RAMPAGE* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) (Lovell *et al.*, 2003).

Análisis filogenético de las desaturasas de gramíneas

Se construyó un árbol filogenético con 29 secuencias de proteínas de desaturasas (incluyendo las de trigo candeal) que incluyó todos los grupos identificados. Este análisis se llevó a cabo utilizando el método de “Máxima Verosimilitud” con el programa *MEGA 6.0.6* (Tamura *et al.*, 2013). La confiabilidad del árbol fue analizada mediante el método bootstrap (1000 repeticiones). Para los aminoácidos faltantes, se seleccionó la opción “pairwise deletion”. La secuencia de una zeta-caroteno desaturasa (*T. aestivum* ACI04664.1) fue incluida como grupo externo teniendo en cuenta que interviene en una ruta de biosíntesis diferente (convierte zeta-caroteno en licopeno a través de dos pasos de insaturación consecutivos).

RESULTADOS

Genes de desaturasas representados en el transcriptoma de la línea de trigo candeal CBW 0101

En el análisis de ARN-seq se identificaron 28 transcriptos de desaturasas con la siguiente anotación funcional: diez acil-ACP desaturasas, siete ω -3 desaturasas, seis ω -6 desaturasas, tres esfingolípido desaturasas, una fitoeno-desaturasa y una zeta-caroteno desaturasa (Tabla 1.6). Del total, tres se expresaron solo en el tratamiento con frío, una solo en el tratamiento control, nueve presentaron mayor expresión a la temperatura control y 15 tuvieron mayor expresión con frío. Dos de estos transcriptos, mostraron expresión diferencial significativa (p -value < 0,01), uno correspondiente a una acil-ACP desaturasa (*SAD*) (ID c45724_g1), que presentó mayor expresión en las muestras control (p -value < 0,01) y otro correspondiente a una ω -6 lípido desaturasa reticular (*FAD2*) (ID c50385_g1), con mayor expresión en el tratamiento con frío (p -value: $2,08 \times 10^{-10}$) (Tabla 1.6). Con respecto al transcripto c50385_g1 (1617 pb), aunque mostró identidad con ω -6 lípido desaturasa (VAI60151.1), debido al bajo valor de cobertura (5 %), no fue considerado en posteriores análisis de expresión de estrés por frío (Capítulo 2 de esta tesis). En la Tabla 1.6 se indican además los tres genes (*SAD*, *FAD2* y *FAD8*) seleccionados para amplificación y análisis de variabilidad entre genotipos.

El mapeo *in silico* de los transcriptos mostró que los genes se encuentran distribuidos en diez cromosomas de trigo candeal (Fig. 1.1) y que algunos poseen más de una copia en el mismo genoma (Tabla 1.6). Al combinar información de secuencia y mapeo (Tabla 1.6 y Fig. 1.1), los transcriptos pudieron ser caracterizados como: i) transcriptos pertenecientes al mismo gen pero con diferente ID, probablemente debido a que los parámetros de ensamblado utilizados no permitieron unirlos (Tabla 1.6; ID: c72884_g1 y c34401_g1), ii) transcriptos cuyo ordenamiento contiguo conformaron un gen completo, como es el caso de c104217_g1 y c104298_g1, correspondientes a la esteroil-ACP desaturasa (*SAD*) (Fig. 1.2), que a su vez evidenció dos copias distanciadas a 4 kb en el cromosoma 2B (Tabla 1.6), iii) secuencias de transcriptos conteniendo intrones, como c45724_g1 (Fig. 1.3). En todos los casos, se confirmó que estos genes están presentes en ambos genomas.

Los 28 transcriptos presentes en las genotecas de CBW 0101, correspondieron a 24 genes de desaturasas de distintos grupos funcionales (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Transcriptos de genes de desaturasas de la línea CBW 0101 de trigo candeal detectados en la condición control (C) y frío (F); los símbolos + y - indican mayor o menor expresión, respectivamente. Anotación funcional (AF), nombre según nomenclatura de *A. thaliana*, localización cromosómica en el genoma del cv. Svevo *T. turgidum* ssp. *durum* (CR), número de copias y resultado de BLASTX (hits con al menos 95% de identidad y un e-value < e⁻⁹), sobre la base de datos de proteínas del cv. Svevo. En negrita se señalan los genes con expresión diferencial significativa (*p-value* < 0,01) y con * los genes seleccionados para análisis de amplificación de secuencias genómicas. El ID del gen representa un código interno del experimento de ARN-seq.

GEN ID	C	F	<i>p-value</i>	AF	Nombre	CR	COPIAS	BLASTX
c104217_g1 (460 pb)	-	+	1		SAD	2B	2	VAH41461.1
c104298_g1 (1107 pb)	-	+	1		SAD	2B	2	VAH41461.1
c13075_g1 (288pb)	0	+	0,43		SAD	7B	1	VAI84719.1
c330_g1 (420pb)	-	+	1		SAD	2A	1	VAH25668.1
c44827_g1 (1813pb)*	+	-	0,92		SAD	2B	1	VAH47179.1
c45724_g1 (2813pb)	+	-	0,003	Acil-ACP desaturasa	SAD	5A	1	VAI15368.1
c47549_g1 (517pb)	+	-	0,85		SAD	3A	1	VAH83650.1
c47549_g2 (1051pb)	-	+	0,51		SAD	3B	1	VAH67785.1
c89429_g1 (344pb)	0	+	0,85		SAD	5B	2	VAI33051.1
c94607_g1 (334pb)	0	+	0,73		SAD	5A	1	VAI8306.1

(continúa) Tabla 1.6. Transcritos de genes de desaturasas de la línea CBW 0101 de trigo candeal detectados en la condición control (C) y frío (F); los símbolos + y - indican mayor o menor expresión, respectivamente. Anotación funcional (AF), nombre según nomenclatura de *A. thaliana*, localización cromosómica en el genoma del cv. Svevo *T. turgidum* ssp. *durum* (CR), número de copias y resultado de BLASTX (hits con al menos 95% de identidad y un e-value < e⁻⁹), sobre la base de datos de proteínas del cv. Svevo. En negrita se señalan los genes con expresión diferencial significativa (*p-value* < 0,01) y con * los genes seleccionados para análisis de amplificación de secuencias genómicas. El ID del gen representa un código interno del experimento de ARN-seq.

GEN ID	C	F	<i>p-value</i>	AF	NOMBRE	CR	COPIAS	BLASTX
c121319_g1 (726pb)	+	-	0,95		FAD6	2A	1	VAH28640.1
c47609_g1 (1831pb)	+	-	0,38		FAD6	2B	1	VAH44260.1
c47609_g2 (571pb)	+	-	1		FAD6	2B	1	VAH44260.1
c50385_g1 (1617pb)	-	+	2,0e ⁻¹⁰	ω-6 lípido desaturasa	FAD2	6B	4	VAI60151.1
c50567_g1 (2021pb)*	-	+	0,09		FAD2	6B	4	VAI60151.1
c53626_g2 (1850pb)	-	+	0,71		FAD2	3B	2	VAH81099.1
c32913_g1 (1079pb)	-	+	0,20		FAD7/8	4A	1	VAI06765.1
c32973_g1 (625pb)	-	+	0,67	ω-3 lípido desaturasa	FAD7/8	5B	1	VAI30537.1
c37943_g1 (602pb)	-	+	0,77		FAD7/8	5A	1	VAI16255.1
c40809_g1 (814pb)	-	+	0,12		FAD7/8	4B	1	VAI06764.1

(continúa) Tabla 1.6. Transcritos de genes de desaturasas de la línea CBW 0101 de trigo candeal detectados en la condición control (C) y frío (F); los símbolos + y - indican mayor o menor expresión, respectivamente. Anotación funcional (AF), nombre según nomenclatura de *A. thaliana*, localización cromosómica en el genoma del cv. Svevo *T. turgidum* ssp. *durum* (CR), número de copias y resultado de BLASTX (hits con al menos 95% de identidad y un e-value < e⁻⁹), sobre la base de datos de proteínas del cv. Svevo. En negrita se señalan los genes con expresión diferencial significativa (*p-value* < 0,01) y con * los genes seleccionados para análisis de amplificación de secuencias genómicas. El ID del gen representa un código interno del experimento de ARN-seq.

GEN ID	C	F	<i>p-value</i>	AF	NOMBRE	CR	COPIAS	BLASTX
c44655_g1 (1380pb)*	+	-	1	ω-3 lípido desaturasa	FAD7/8	2B	1	VAH41657.1
c5398_g1 (485pb)	+	-	0,98		FAD3	4B	1	VAI04314.1
c63399_g1 (357pb)	+	0	1		FAD7/8	2B	1	VAI41656.1
c34401_g1 (1005pb)	+	-	1	Esfingolípido desaturasa	-	2A	1	VAH34297.1
c72884_g1 (268pb)	-	+	1		-	2A	1	VAH34297.1
c46917_g1 (1813pb)	-	+	0,65		-	5A	1	VAI17523.1
c50666_g1 (2230pb)	-	+	1	Fitoeno-desaturasa	-	4A	1	VAH86851.1
c49042_g1 (2019pb)	-	+	0,88	Zeta-caroteno desaturasa	-	2A	1	VAH45615.1

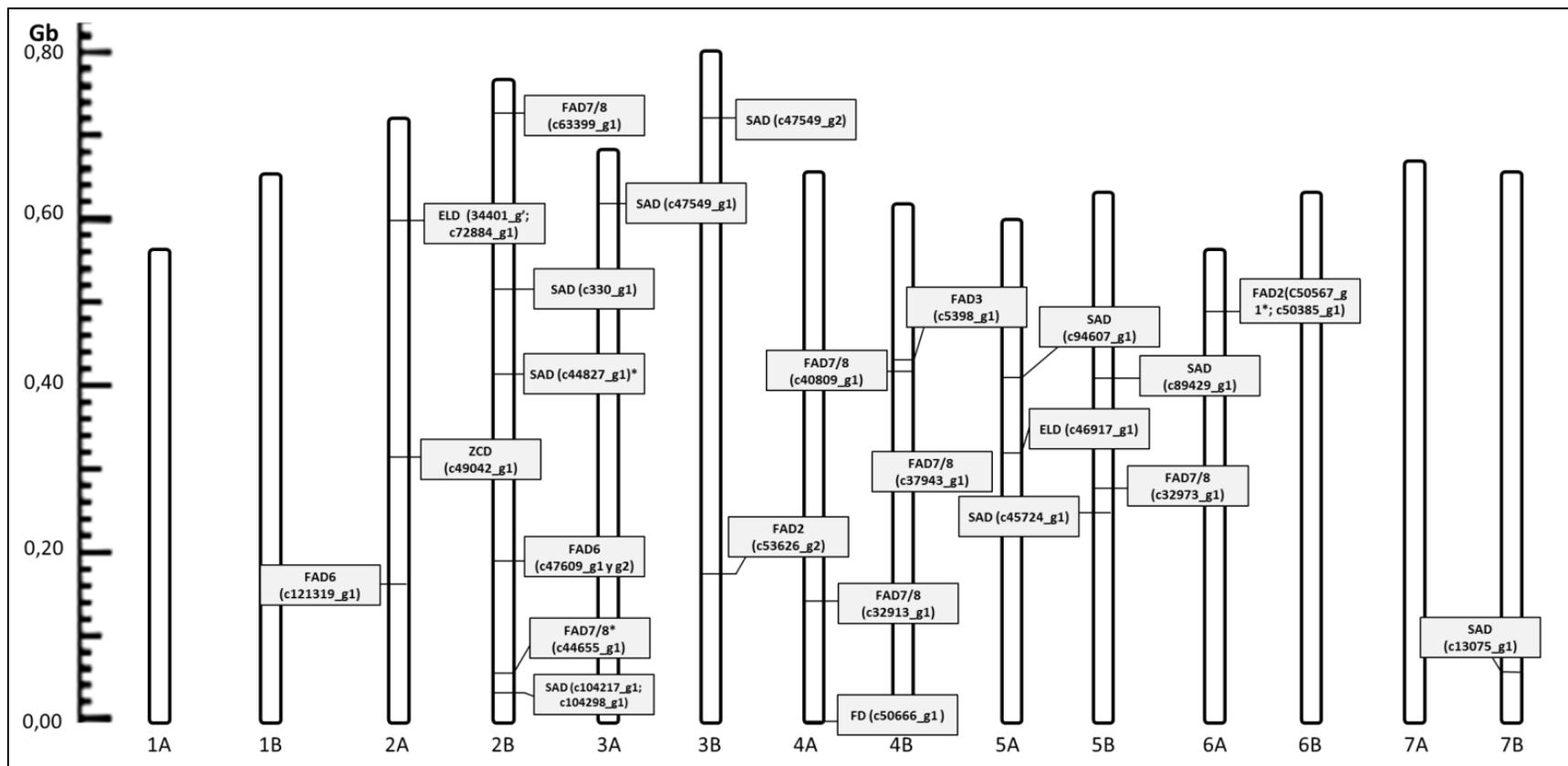


Figura 1.1. Mapeo *in silico* de genes de desaturasas de trigo candeal, sobre el genoma del cv. Svevo. SAD: estearoil-ACP desaturasa, FAD2/FAD6: ω - 6 lípido desaturasa, FAD7/FAD8: ω - 3 lípido desaturasa, ELD: esfingolípido desaturasa, FD: fitoeno desaturasa y ZCD: zeta-caroteno desaturasa. Con * los genes seleccionados para el análisis de amplificación de secuencias genómicas.

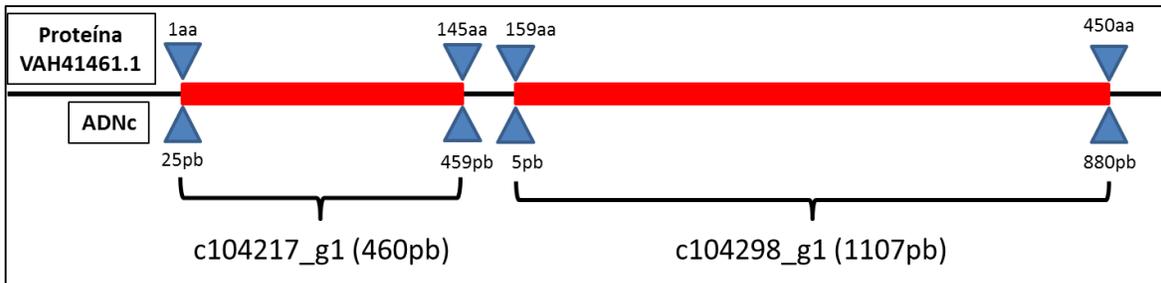


Figura 1.2. Esquema del alineamiento, mediante BLASTX, de los transcritos c104217_g1 y c104298_g1 de la línea CBW 0101 con la proteína VAH4146.1 de la base de datos del cv. Svevo. Ambos transcritos, en conjunto, cubren el 96,88% de la secuencia de la proteína. Se indican las posiciones en aminoácidos (arriba) y en nucleótidos (abajo).

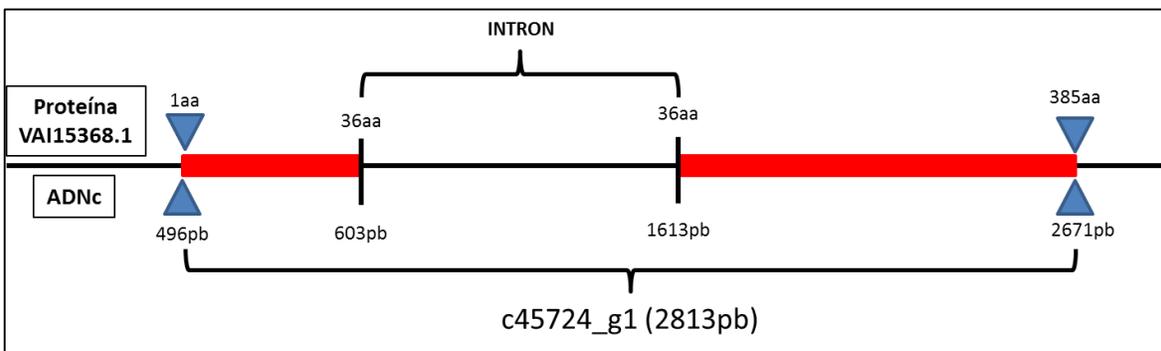


Figura 1.3. Esquema del alineamiento, mediante BLASTX, del transcripto c45724_g1 de la línea CBW 0101, con la proteína VAI15368.1 de la base de datos del cv. Svevo. El transcripto cubre el 100% de la secuencia de la proteína y presenta un intrón desde la base 603 a la 1613 del transcripto.

Mapeo in silico y análisis de la variabilidad de las secuencias genómicas y proteicas de SAD, FAD2 y FAD8 de trigo candeal

Se amplificaron las secuencias de ADN genómico correspondientes a *SAD*, *FAD2* y *FAD8* de cinco genotipos de trigo candeal. Las mismas fueron denominadas como *Td-SAD*, *Td-FAD2* y *Td-FAD8*, respectivamente.

a) Estearoil-ACP-desaturasa (*SAD*)

La longitud de la secuencia genómica amplificada es de 3737 pb y posee tres exones y dos intrones (Fig. 1.4 a). Es un gen que se localiza en el cromosoma 2 de ambos genomas; las secuencias amplificadas en este estudio corresponden en todos los casos al genoma B.

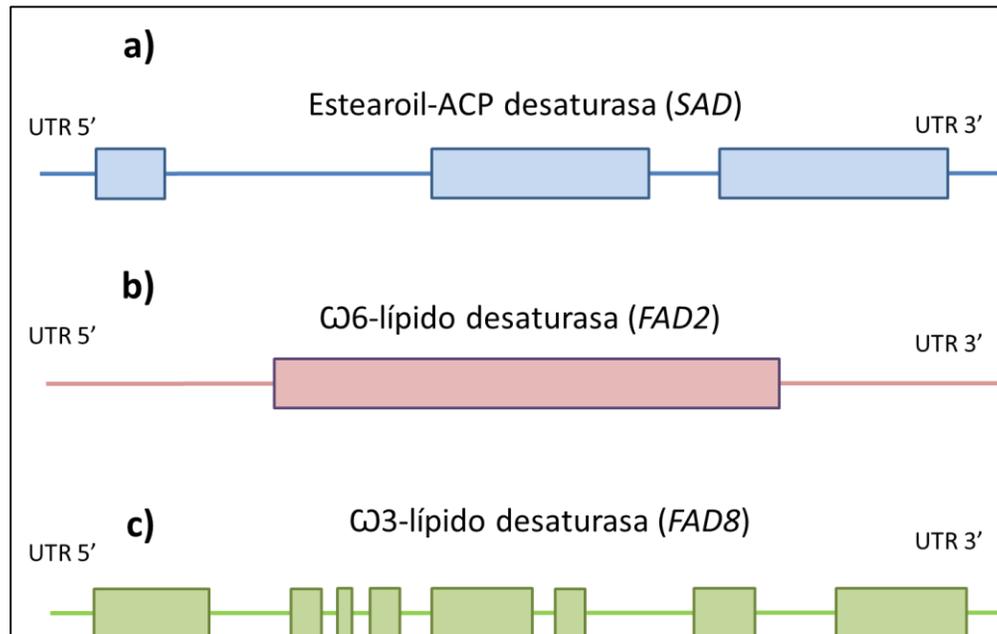


Figura 1.4. Estructura de los genes de desaturasas de *T. turgidum ssp. durum*: *SAD* (a), *FAD2* (b) y *FAD8* (c). Se indican los extremos UTR-5' y 3'. Rectángulos son exones y líneas intrones.

El alineamiento local de las secuencias *Td-SAD-2B* de los cinco genotipos permitió identificar tres polimorfismos, uno en el primer intrón (C/T) en posición 480 y dos en el tercer exón, de los cuales, uno se localiza en la posición 3116 y resulta sinónimo, mientras que el otro, ubicado en la posición 3395, produce una sustitución Aspartato/Glutamato (Tabla 1.7). La proteína predicha posee 392 aminoácidos y se obtuvieron dos secuencias; una denominada *Td-SAD-2Ba* correspondiente a los genotipos B. AMBAR, MVTD 10-98, B. I. CUMENAY y CBW 0101, y otra *Td-SAD-2Bb* correspondiente a 80-IAT2 (Fig. A1.2; ANEXO).

Tabla 1.7. Polimorfismos en el gen estearoil-ACP-desaturasa *Td-SAD-2B* identificados a partir del alineamiento de secuencias de cinco genotipos de trigo candeal. Exones en gris.

Genotipo/Ubicación	480	3116*	3395**
BUCK AMBAR	T	C	C
MVTD 10-98	C	T	C
80-IAT2	T	T	A
B. I. CUMENAY	T	T	C
CBW 0101	T	T	C

(*) polimorfismos sinónimos

(**) polimorfismos no sinónimos

b) ω- 6 lípido desaturasa (FAD2)

La longitud de la secuencia amplificada del gen ω- 6 lípido desaturasa varió según el genotipo; en MVTD 10-98, 80-IAT2 y CBW 0101 fue de 1183 pb, en B. AMBAR 1195 pb y en B. I. CUMENAY de 1155 pb. Este gen no posee intrones (Fig. 1.4 b). Se obtuvo una secuencia por genotipo. Al realizar el mapeo *in silico* sobre el genoma del cv. Svevo se identificaron copias múltiples (cuatro) en tándem en el cromosoma 6 de ambos genomas (*FAD2-6*) (Fig. 1.5), las que fueron denominadas de acuerdo a su orden físico como: *Td-FAD2-6A.1*, *Td-FAD2-6A.2*, *Td-FAD2-6A.3*, *Td-FAD2-6A.4*, *Td-FAD2-6B.1*, *Td-FAD2-6B.2*, *Td-FAD2-6B.3* y *Td-FAD2-6B.4*. El análisis de las copias mencionadas en el genoma del cv. Svevo demostró que los cebadores utilizados amplificaron distintas copias según los genotipos (Fig. 1.5). La secuencia *Td-FAD2-6B.3* fue obtenida de las líneas MVTD 10-98 y CBW 0101 (*e-value*: 0,0 e identidad del 100% y 99,83% con secuencias de Svevo, respectivamente). Por otro lado, la secuencia correspondiente a la copia *Td-FAD2-6B.1* fue amplificada del genotipo B. I. CUMENAY (*e-value*: 0,0 e identidad 99,31% con Svevo), *Td-FAD2-6A.1* fue amplificada de

80-IAT2 (e-value: 0,0 e identidad del 100%) y *Td-FAD2-6A.3* de B. AMBAR (e-value: 0,0 e identidad 99,92%) (Fig. 1.5).

La identificación de copias múltiples de *FAD2* en trigo candeal resultó de interés y para la caracterización del gen y sus respectivas proteínas deducidas, se analizaron las secuencias de todas las copias halladas (8) a partir del genoma del cv Svevo. Por otro lado, debido a que se amplificaron copias diferentes, la comparación de sitios polimórficos solo se pudo realizar entre los genotipos MVTD 10-98 y CBW 0101. El alineamiento de estas secuencias reveló dos polimorfismos: uno en la región 5' UTR (T/C) y otro en la región codificante (C/T), que resultó sinónimo. Por esta razón, y dado que se dispone del genoma de trigo candeal, el estudio posterior se llevó a cabo considerando el análisis de las cuatro copias pertenecientes a cada genoma del cv Svevo. Así mismo se dedujeron las secuencias proteicas, las que fueron incluidas además en el estudio *in silico* general de desaturasas de gramíneas.

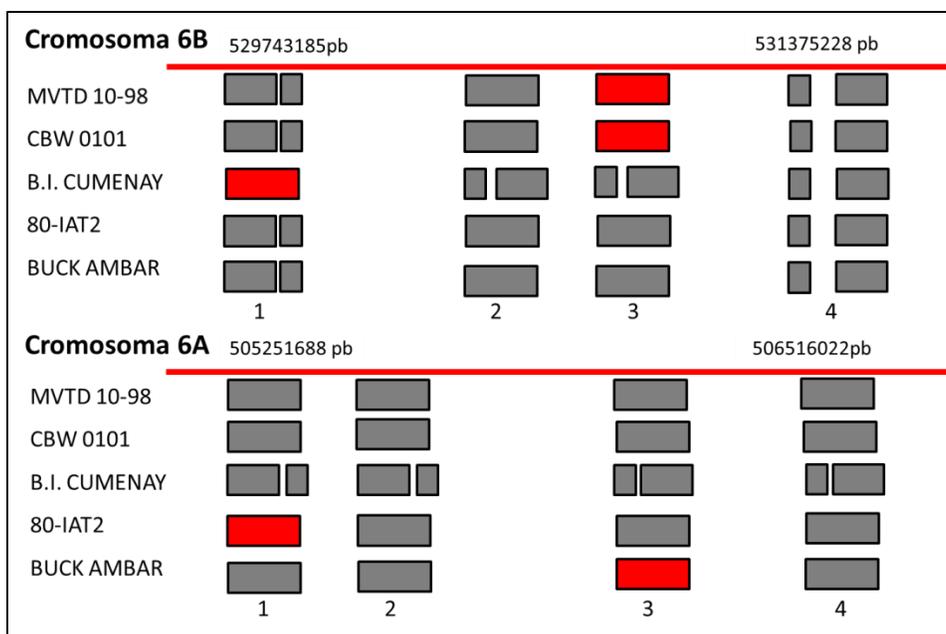


Figura 1.5. Mapeo *in silico* del gen *FAD2* sobre los cromosomas 6A y 6B del genoma de Svevo. Los rectángulos en rojo indican las copias de cada genotipo amplificadas y secuenciadas en este estudio. Los rectángulos en gris representan las copias identificadas en Svevo, al mapear *in silico* las copias amplificadas.

Caracterización funcional de *FAD2* del cv. Svevo

Se realizó la caracterización de todas las copias (genómicas y proteicas) de *FAD2* del cv Svevo. La comparación entre las secuencias genómicas y proteicas permitió determinar copias estructuralmente funcionales, no funcionales y la presencia de un retrotransposón en una de ellas. Las secuencias de *Td-FAD2-6B.1* y *Td-FAD2-6A.3* poseen un codón de terminación prematuro en las posiciones 286 y 160, respectivamente. Con respecto a *Td-FAD2-6B.4* se observó que, aunque en sus extremos posee las regiones correspondientes a una ω -6 lípido desaturasa, en su interior se posee una región correspondiente a un retrotransposón LTR (Long Terminal Repeat) de alrededor de 5 kb, que mostró una identidad del 90 % con uno encontrado previamente en el cromosoma 3B de *T. aestivum* (AM932681) (Charles *et al.*, 2008). El alineamiento de la copia *Td-FAD2-6B.4* mediante BLASTX en GenBank, permitió la identificación de diferentes regiones: una ω -6 lípido desaturasa (presente en los extremos de la secuencia), un dominio central integrasa (rve), una ribonucleasa de tipo 1 (RNase_HI_RT_Ty1) y una transcriptasa reversa (RVT_2) (Tabla 1.8; Fig. 1.6).

Tabla 1.8. Estructura genética de la copia *Td-FAD2-6B.4* de trigo candeal.

Nombre	Accesión	Descripción	Intervalo	Longitud (pb)	<i>e-value</i>
PLN02505	PLN02505	omega-6 fatty acid desaturase	4-435	431	1.68e-71
rve	pfam00665	Integrase core domain	2749-3084	335	3.04e-06
RVT_2	pfam07727	Reverse transcriptase (RNA-dependent DNA polymerase)	4052-4777	725	1.16e-51
RNase_HI_RT_Ty1	cd09272	Ty1/Copia family of RNase HI in long-term repeat retroelements	5036-5443	407	3.00e-36
Delta12-FADS-like	cd03507	Delta12 Fatty Acid Desaturase	5788-6384	455	1.69e-30

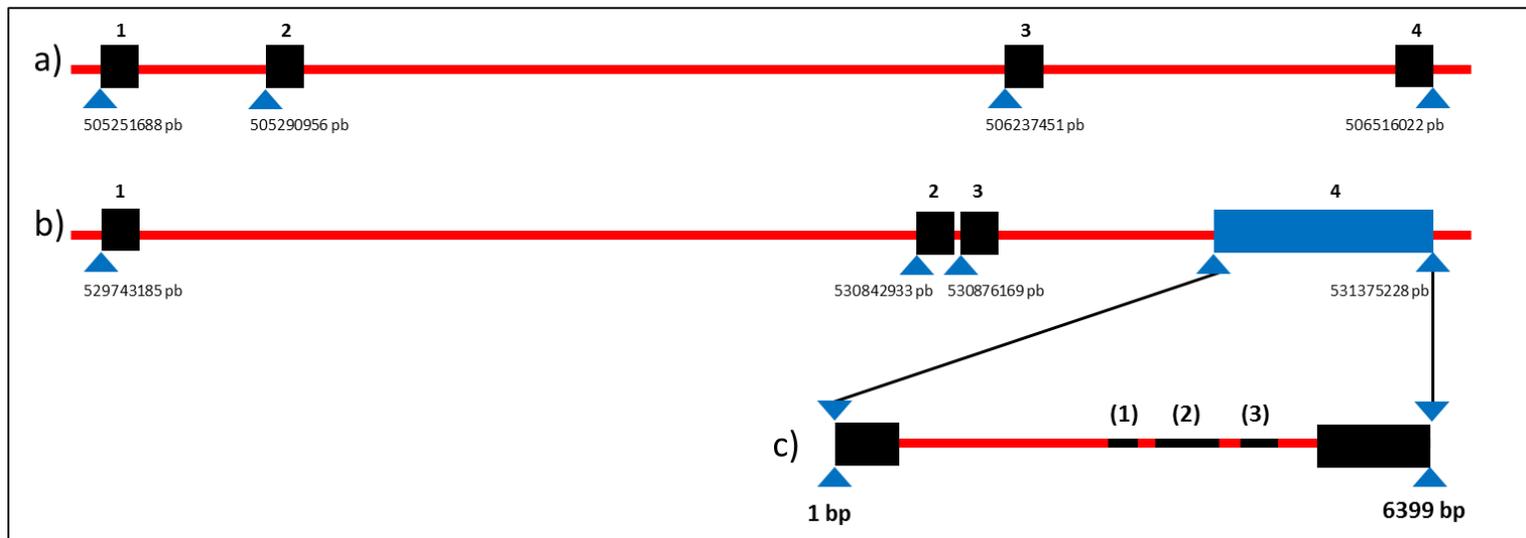


Figura 1.6. Copias en tandem del gen *FAD2* de trigo candeal deducidas del genoma del cv Svevo. La línea roja representa: a) el cromosoma 6 A y b) el cromosoma 6 B. Las copias múltiples en cada cromosoma se indican con cuadrados negros. En c) detalle de la cuarta copia del cromosoma 6B conteniendo un retroleto que incluyó las regiones (1) rve, (2) RVT_2 y (3) RNase_HI_RT_Ty1.

La Tabla 1.9 presenta los valores de identidad (%) a nivel de nucleótidos y de aminoácidos obtenidos al realizar el alineamiento entre las copias de *Td-FAD2* de trigo candeal de ambos genomas. No se obtuvieron los valores de identidad con *Td-FAD2-6B.4*, dada las características mencionadas.

Tabla 1.9. Porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos/aminoácidos entre las copias de *FAD2* de trigo candeal. En negrita las copias ortólogas.

Genoma A/Genoma B	1B	2B	3B	4B
1A	87,3/65,15	91,06/89,77	96,82/99,48	-
2A	86,53/62,15	96,82/95,1	91,9/88,49	-
3A	92,96/67,41	86,91/76,2	88,39/79,08	-
4A	84,98/60,6	88,09/82,61	89,69/84,53	-

En la Figura A1.3 del ANEXO se muestra el alineamiento múltiple correspondiente a las proteínas deducidas de las ocho copias (ambos genomas). En los análisis de proteínas realizados en este capítulo, se incluyeron únicamente cinco secuencias correspondientes a copias consideradas funcionales, excluyendo las que en su secuencia genómica mostraron codones de stop prematuros y *Td-FAD2-6B.4* con el retrotransposón (Tabla 1.10). La longitud de la proteína para las copias consideradas como funcionales, fue de 387 aminoácidos (A1.3; ANEXO).

Tabla 1.10. Caracterización de las copias del gen *FAD2* del cromosoma 6 de trigo candeal. Información deducida a partir de la proteína predicha, BLASTX y alineamiento local.

Número de copia/Genoma	A	B
1	Proteína funcional	Codón de terminación prematuro
2	Proteína funcional	Proteína funcional
3	Codón de terminación prematuro	Proteína funcional
4	Proteína funcional	Retroelemento

c) ω -3 lípido desaturasa (*FAD8*)

En este estudio, se amplificó la secuencia correspondiente al gen de ω -3 lípido desaturasa, que resultó homóloga a la *FAD8* plastidial de *Arabidopsis thaliana*. Se trata de un gen localizado en el cromosoma 2 y las secuencias amplificadas corresponden al genoma B. La longitud de la secuencia varió de acuerdo al genotipo: 3724 pb (B. AMBAR, MVTD 10-98 y 80 IAT2), 3739 pb (B. I. CUMENAY) y 3753 pb (CBW 0101). La estructura génica consta de ocho exones y siete intrones (Fig. 1.4 c). Se observaron diez polimorfismos de nucleótido simples (siete en exones y tres en intrones) y tres indels en intrones (una inserción de 15 pb en el intrón uno de CBW 0101 y B. I. CUMENAY y otra de 14 pb en intrón siete de CBW 0101). De los polimorfismos en exones, tres constituyen cambios no sinónimos: en posición 261 (Prolina/Histidina), 1512 (Isoleucina/Metionina) y 1535 pb (Prolina/Leucina) (Tabla 1.11). La proteína posee 472 aminoácidos y se obtuvieron dos secuencias; una correspondiente a B. AMBAR, 80-IAT2 y MVTD 10-98 (Td-FAD8-2Ba) y otra a CBW 0101 y B. I. CUMENAY (Td-FAD8-2Bb) (Fig. A1.4; ANEXO).

Tabla 1.11. Polimorfismos en secuencias del gen *FAD8* del cromosoma 2B obtenidas de cinco genotipos de trigo candeal. En gris se marcan los exones.

Genotipo/Ubicación	261**	337*	677-692	1329	1398*	1503*	1512**	1535**	2358	3013*	3155	3345-3359
B. AMBAR	A	T	-	T	A	T	G	T	G	T	T	-
MVTD 10-98	A	T	-	T	A	T	G	T	G	C	T	-
80-IAT2	A	T	-	T	A	T	G	T	G	C	T	-
B. I. CUMENAY	C	C	(1)	C	G	C	A	C	T	C	T	-
CBW 0101	C	C	(1)	C	G	C	A	C	G	C	C	(2)

(*) polimorfismos sinónimos

(**) polimorfismos no sinónimos

(1) inserción TCTCCGGCCTCAGTT

(2) inserción GCACCTGTTATACA

Secuencias de desaturasas obtenidas desde GenBank

Utilizando la denominación funcional como instrumento de búsqueda se obtuvieron 82 secuencias de ADN de desaturasas de GenBank, pertenecientes a diez especies de gramíneas: *Aegilops tauschii* (2), *Brachypodium distachyon* (12), *Hordeum vulgare* (7), *Oryza brachyantha* (5), *O. sativa* (7), *Setaria italica* (5), *Sorghum bicolor* (10), *T. aestivum* (6), *T. urartu* (2) y *Zea mays* (26) (Tabla A1.1; ANEXO). Si bien se identificaron desaturasas de dos grupos, acil-ACP y acil-lípido, la mayoría corresponde a este último. Desde la base de datos *Gramene*, se obtuvieron 121 desaturasas de gramíneas de ambos grupos, representados en las siguientes especies: *A. tauschii* (15), *B. distachyon* (4), *H. vulgare* (5), *O. brachyantha* (6), *O. barthii* (4), *O. glaberrima* (3), *O. glumaepatula* (3), *O. nivara* (3), *O. punctata* (2), *O. sativa* Indica (8), *O. sativa* subsp. *japonica* (20), *S. italica* (4), *S. bicolor* (3), *T. aestivum* (9), *T. urartu* (20) y *Z. mays* (12). Los análisis siguientes se realizaron utilizando solo aquellas secuencias de GenBank para las cuales el ARN mensajero (ARNm) o el ADN complementario (ADNc) estaban disponibles y caracterizados y se excluyeron las obtenidas a partir de secuenciación masiva de genomas, con la excepción de siete desaturasas que en la Tabla A1.1 (ANEXO) se distinguen con el número de identificación "XP_". Se detectaron algunas secuencias incompletas como por ejemplo *FAD8* en maíz (BAA22440), a la que le faltaban 49 aminoácidos, por lo tanto, fue excluida de este análisis. También se identificaron secuencias de ADN o proteínas duplicadas con diferentes números de acceso: en maíz una Δ -12 *FAD* (BAE93382.1) y *FAD2* (ABF50053.1) y en arroz una *FAD8* (AAW32557.1 y BAE79784.1) correspondientes a la misma secuencia genómica que se indicaban como inducida por frío y reprimida ante la infección de un patógeno, respectivamente. Por estos motivos, estas secuencias duplicadas se incluyeron solo una vez.

Mapeo de los genes de desaturasas de gramíneas

Al realizar el mapeo *in silico* de las secuencias de desaturasas se observó que los genes se distribuyen en diferentes cromosomas en las diez especies analizadas (Tabla A1.1; ANEXO). Por ejemplo, en maíz se identificaron genes en los diez cromosomas de su complemento haploide. Además, en el caso del trigo hexaploide, fue posible asignar el genoma (A, B o D) en función de las diferencias entre los valores *e-value* y *score*. En este análisis no se incluyeron los genes de *T. turgidum* ssp. *durum* ya que el mismo se realizó previamente.

Análisis de regiones génicas reguladoras

En los genomas disponibles de *T. aestivum* y *T. turgidum* ssp. *durum* se examinaron las regiones promotoras de los siguientes genes: cinco de estearoil-ACP desaturasa, siete de ω -6 lípido desaturasa y tres de ω -3 lípido desaturasa. Se detectaron 34 motivos de unión de factores de transcripción (FT) diferentes, de los cuales 12 familias están asociadas a la respuesta a estrés abiótico: AP2/ERF, bHLH, bZIP, HD-ZIP, C2H2-ZF, CG-1, GATA, LEA, Myb, NAC: NAM, NF-YB y WRKY.

Los resultados del análisis mostraron que en las estearoil-ACP desaturasas, AP2/ERF fue el motivo más abundante. Otros motivos importantes fueron los correspondientes a: NF-YB presente en todos los promotores analizados, bHLH mayormente en el gen identificado con la sonda de maíz ACG41542.1 y GATA en trigo candeal (Fig. 1.7). Por otro lado, en las ω -6 lípido desaturasas, bHLH fue el sitio de unión a FT más abundante en las copias uno, dos y cuatro del cromosoma 6A y en la copia tres del cromosoma 6B de trigo candeal, mientras que bZIP fue el más representado en los promotores de todas las copias funcionales de trigo candeal (1A, 2A, 4A, 2B y 3B). En una menor proporción se observaron sitios para GATA, Myb y NF-YB (Fig. 1.8). En cuanto a los promotores de las ω -3 lípido desaturasas, los motivos más abundantes en todos los genes fueron los correspondientes a bHLH, bZIP, WRKY, NF-YB mientras que AP2 fue abundante solo en el gen detectado con la sonda de maíz NP_001266540.1 (Fig. 1.9).

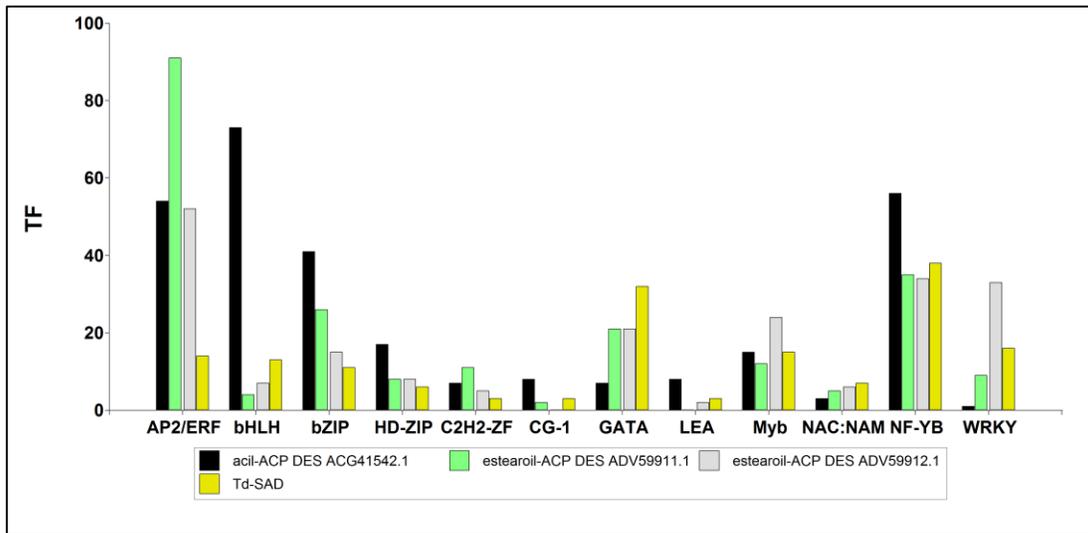


Figura 1.7. Abundancia de sitios de unión a FT que responden a estrés abiótico, como resultado del análisis con PlantPAN, en la región 5' de cuatro genes de estearoil-ACP desaturasas. Los nombres de las enzimas corresponden a los ID de proteínas (Tabla A1.1; ANEXO) utilizadas como sondas en genes de *T. aestivum* (URGI) y a *SAD* en *T. turgidum ssp. durum* (cv. Svevo).

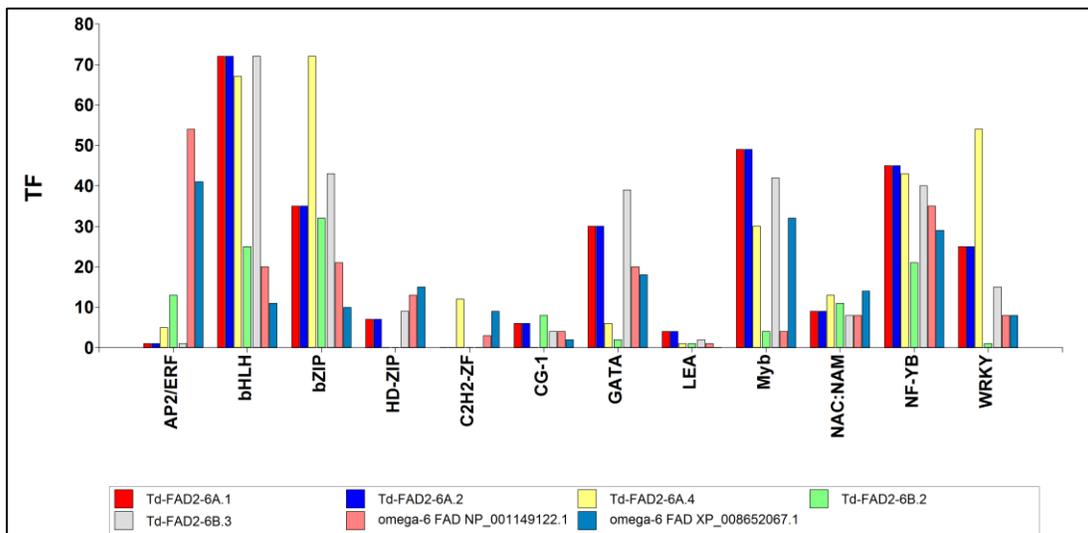


Figura 1.8. Abundancia de sitios de unión a FT que responden a estrés abiótico, identificados mediante la herramienta PlantPAN, en la región 5' de siete genes de ω -6 lípido desaturasas (*FAD2*). Los nombres de las enzimas corresponden a los ID de proteínas (Tabla A1. 1; ANEXO) utilizadas como sondas en genes de *T. aestivum* (URGI) y a *FAD2* en *T. turgidum ssp. durum* (cv. Svevo).

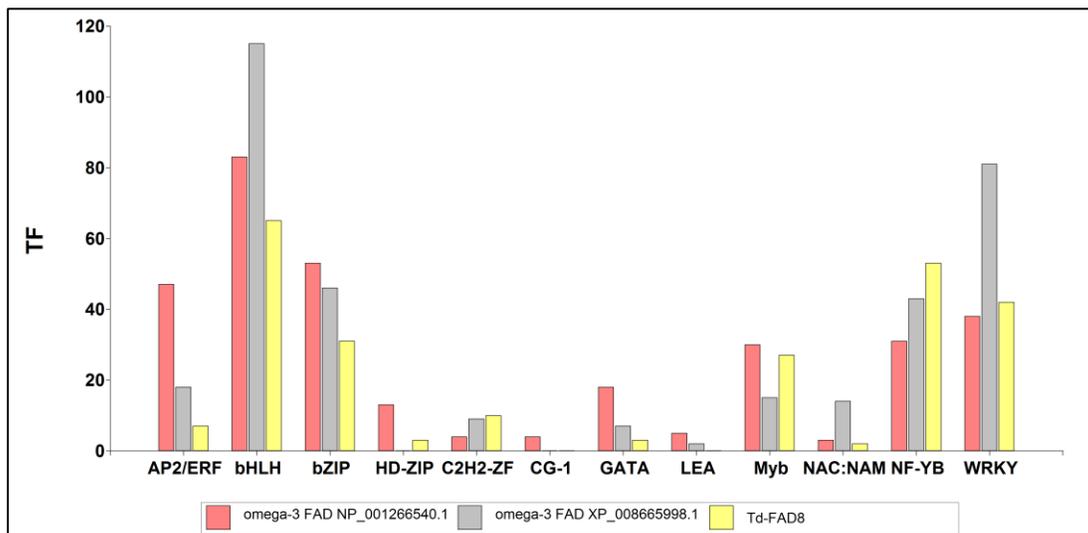


Figura 1.9. Abundancia de sitios de unión a FT que responden a estrés abiótico, identificados mediante la herramienta PlantPAN, en la región 5' de tres genes de ω -3 lípido desaturasas. Los nombres de las enzimas corresponden a los ID de proteínas (Tabla A1. 1; ANEXO) utilizadas como sondas en genes de *T. aestivum* (URGI) y a FAD8 en *T. turgidum* ssp. *durum* (cv. Svevo).

Análisis de transcripción

Se realizó el análisis del perfil de transcripción *in silico* (WheatExp), sobre secuencias de ADNc para los tres genes de trigo candeal (*Td-SAD*, *Td-FAD2* y *Td-FAD8*) y para tres genes de trigo pan: dos *SAD* (*SAD1*: HQ589252.1 y *SAD2*: HQ589253.1) y una ω -3 lípido desaturasa (D84678.1). Con respecto al ADNc de trigo candeal, para los tres genes (*SAD*, *FAD2* y *FAD8*), se utilizó solo una secuencia de cada uno, dado que no se encontraron diferencias en el nivel de expresión entre las variantes (*SAD*, *FAD8* y copias de *FAD2* del cv. Svevo).

Las esteroil-ACP desaturasas (*SAD*) HQ589253.1 (*SAD2*) de trigo pan y *Td-SAD* de trigo candeal, presentaron homología con los mismos transcritos (Tabla 1.12). Todas las *SAD* se encontraron expresadas de manera bastante uniforme en diferentes tejidos vegetales. Desde el punto de vista de las condiciones de estrés por sequía y calor, en general, los tratamientos no aumentaron el nivel de las transcripciones de desaturasas, sino que se mantuvieron constantes o disminuyeron después del estrés. Por otro lado, en el experimento de senescencia, los perfiles de transcripción en la hoja bandera no se modificaron después de la antesis.

En relación a ω - 6 lípido desaturasa, para *Td-FAD2* de trigo candeal, se observaron niveles de expresión muy bajos en todos los tejidos y también, en el experimento de sequía más calor, tanto en la condición control como en el tratamiento. Por otro lado, el experimento de senescencia presentó valores intermedios de expresión, aunque solo en el transcripto correspondiente al genoma A (6AL_34DB986AA.1) (Tabla 1.12).

El gen ω - 3 lípido desaturasa *Td-FAD8* de trigo candeal, presentó altos niveles en hojas (>100) e intermedio en tallos, mientras que el mismo gen de trigo pan mostró niveles bajos y similares en todos los tejidos. Por otro lado, *Td-FAD8* mostró niveles superiores en el tratamiento de sequía más calor y en senescencia, que la correspondiente de trigo pan (D84678.1) (Tabla 1.12).

Todas las copias homeólogas de los genes *SAD1* de trigo pan (HQ589252.1), ω -3 lípido desaturasa de trigo pan (D84678.1) y *Td-FAD2* mostraron niveles de expresión similares entre los genomas A, B, y D, mientras que *SAD2* (HQ589253.1) de trigo pan y *Td-SAD* de trigo candeal, presentaron un nivel de expresión relativamente más bajo en el genoma B (Tabla 1.12).

Tabla 1.12 Perfiles transcriptómicos de los genes homeólogos correspondientes a los genomas A, B y D obtenidos usando BLASTN (*e-value*: 0,0) en WheatExp. El nivel de expresión indicado se obtuvo con FPKM (*T. aestivum* - órgano y tratamiento) y RPKM (hojas en senescencia de *T. turgidum ssp. durum*) de acuerdo con la siguiente escala: + <10, ++ 10–20, +++ 20–60, ++++ 60–100, +++++ > 100. HD: en espigazón, 12 DAA y 22 DAA (días después de antesis), SD sin datos. Los hits para cada gen están ordenados de mayor a menor *score* e *e-value*.

ID	WheatExp match	Órgano					Tratamiento			Senescencia de hojas		
		Grano	Hoja	Raíz	Espiga	Tallo	Control	Sequía+1- h Calor	Sequía+6- h Calor	HD	12DAA	22DAA
SAD1 (HQ589252.1) <i>T. aestivum</i>	3AL_335725B58.2	++++	+++++	+++	+++++	+++	++++	+++	+++	+++++	++++	+++++
	3B_F091600090CFD	++++	+++++	+++	++++	++++	+++	+++	+++	+++++	+++++	+++++
	3DL_3D1319ECF.1	+++	+++	++	+++	++	++	+	++	SD	SD	SD
SAD2 (HQ589253.1) <i>T. aestivum</i> - <i>Td-SAD T.</i> <i>turgidum ssp.</i> <i>durum</i>	2AL_D4BF4AE24.1	+++	++	+++	+++	+++	++	+	++	+	+	+
	2BL_11A4F903B.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2DL_8F04980F0.1	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+	SD	SD	SD
ω-6 desaturasa <i>Td-FAD2 T.</i> <i>turgidum ssp.</i> <i>durum</i>	6AL_34DB986AA.1	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+++	++++
	6DL_55B96A9DC.2	+	++	+	+	+	+	++	++	SD	SD	SD
	6DL_877D98185.1	+	+	+	+	+	+	+	+	SD	SD	SD

(continúa) Tabla 1.12 Perfiles transcriptómicos de los genes homeólogos correspondientes a los genomas A, B y D obtenidos usando BLASTN (*e-value*: 0,0) en WheatExp. El nivel de expresión indicado se obtuvo con FPKM (*T. aestivum* - órgano y tratamiento) y RPKM (hojas en senescencia de *T. turgidum* ssp. *durum*) de acuerdo con la siguiente escala: + <10, ++ 10–20, +++ 20–60, ++++ 60–100, +++++ > 100. HD: en espigazón, 12 DAA y 22 DAA (días después de antesis), SD sin datos. Los hits para cada gen están ordenados de mayor a menor *score* e *e-value*.

ID	WheatExp match	Órgano					Tratamiento			Senescencia de hojas		
		Grano	Hoja	Raíz	Espiga	Tallo	Control	Sequía+1-h Calor	Sequía+6-h Calor	HD	12DAA	22DAA
ω-3 desaturasa (D84678.1) <i>T. aestivum</i>	5BL_6E77F2A0D.2	+	++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+
	5AL_2A9F62419.1	+	++	++	+++	++	+	+	+	+	+	+
	5DL_398615728.2	+	++	++	+++	++	+	+	+	SD	SD	SD
ω-3 desaturasa <i>Td-FAD8 T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i>	2AS_0607B91CB.2	+	+++++	+	+	+++	+++	+++	+	+++++	++++	+++++
	2BS_D7ED8BF9A.1	+	+++++	+	++	+++	+++	+++	+	+++++	+++++	+++++
	2DS_AE6E354A9.1	+	+++++	+	+	+++	+++	+++	+	SD	SD	SD

Análisis de secuencias y localización subcelular

En este análisis, se incluyeron las secuencias de aminoácidos de 30 desaturasas correspondientes a las especies *T. aestivum*, *Z. mays*, *O. sativa*, *S. bicolor* y *T. turgidum* ssp. *durum*. El peso molecular de las proteínas, calculado con el predictor *ProtParam*, varió entre 42,25 y 45,39 kDa para las acil-ACP desaturasas, mientras que para las acil-lípido desaturasas el rango fue entre 43,68 y 52,48 kDa. Veintitrés proteínas presentaron un punto isoeléctrico (pI) superior a 8, lo que sugiere un carácter básico general para las desaturasas de gramíneas (Tabla 1.13).

La herramienta *CELLO* predijo para todas las acil-ACP desaturasas, una localización en cloroplasto, aunque para *SAD1* (ADV59911.1) también predijo una localización en las mitocondrias con un valor de confiabilidad significativo de 1,867 (Tabla 1.13). Las acil-lípido desaturasas se encontraron principalmente en el RE, excepto *FAD7* (BAA22441.1) de *Z. mays* y *FAD7* (BAE79783.1) y *FAD8* (AAW32557.1) de *O. sativa* que se localizaron en cloroplastos y las citocromo b5 desaturasas en la membrana plasmática (Tabla 1.13).

Además, todas las desaturasas con localización en el RE contienen el motivo responsable de recuperar estas proteínas desde otros compartimientos al RE en el extremo carboxilo terminal (C-terminal) (Mc Cartney *et al*, 2004), a excepción de ACG28208.1 de *Z. mays* (Tabla 1.14).

Tabla 1.13. Propiedades fisicoquímicas, localización subcelular, número de aminoácidos, peso molecular (kDa) y punto isoeléctrico (pI) de las desaturasas de gramíneas. RE: retículo endoplasmático; Cl: cloroplasto, M: mitocondria.

Proteína	Localización subcelular	Nº de aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	Punto isoeléctrico (pI)
<i>Triticum durum</i>				
Td-FAD2-6B.3	RE	387	44,41	8,43
Td-FAD2-6A.1	RE	387	44,38	8,43
Td-FAD2-6A.2	RE	387	44,04	8,60
Td-FAD2-6B.2	RE	387	44,20	8,41
Td-FAD2-6A.4	RE	387	44,82	8,19
Td-FAD8-2Ba	Cl	472	52,48	9,16
Td-FAD8-2Bb	Cl	472	52,41	9,16
Td-SAD-2Ba	Cl	392	44,64	6,04
Td-SAD-2Bb	Cl	392	44,65	6,04
<i>Triticum aestivum</i>				
SAD1 (ADV59911.1)	M/Cl	392	44,45	8,15
SAD2 (ADV59912.1)	Cl	392	44,65	6,05
ω -3 FAD (BAA28358.1)	RE	383	43,68	6,96
<i>Zea mays</i>				
acil-desaturasa (ACG49052.1)	Cl	380	42,45	6,58
acil -desaturasa (ACG38263.1)	Cl	368	42,25	5,85

(continúa) Tabla 1.13. Propiedades fisicoquímicas, localización subcelular, número de aminoácidos, peso molecular (kDa) y punto isoeléctrico (pI) de las desaturasas. RE: retículo endoplasmático; Cl: cloroplasto, M: mitocondria.

Proteína	Localización	Nº de aminoácidos	Peso molecular (kDa)	Punto Isoeléctrico (pI)
Zea mays				
acil -desaturasa (ACG41759.1)	Cl	408	45,39	6,1
ω -3 FAD (ACG37273.1)	RE	384	44,07	8,69
ω -6 FAD (ACG34271.1)	RE	392	44,13	8,57
ω -3 FAD (ACG28208.1)	RE/Cl	408	45,90	8,87
FAD2 (ABV44669.1)	RE	390	43,74	8,16
FAD2 (ABF50053.1)/(BAE93382.1)	RE	387	43,97	8,39
FAD7 (BAA22441.1)	Cl	443	49,43	9,3
desaturasa/citocromob ₅ (ACG40941)	MP	463	51,25	8,23
desaturase/citocromob ₅ (ACG36537)	MP	462	51,33	8,48
Oryza sativa				
FAD8 (AAW32557.1)/(BAE79784.1)	Cl	413	47,01	8,81
FAD7(BAE79783.1)	Cl	459	51,37	9,66
Δ -12 FAD2 (ACN87220.1)	RE	388	44,35	8,17
Sorghum bicolor				
DES2 (ABN49520.1)	RE	385	44,2	8,59
DES3 (ABN49521.1)	RE	389	44,77	8,83
DES1 (ABN49519.1)	RE	388	44,66	8,66
FAD (ACA28704.1)	RE	387	44,37	8,38

Tabla 1.14. Secuencia de aminoácidos C-terminal de las desaturasas localizadas en RE.

Accesión	Extremo C-terminal
<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (FAD2-6B.3) (1)	FWYSNKF
<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (FAD2-6A.1) (1)	FWYSNKF
<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (FAD2-6A.2) (1)	FWYSNKF
<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (FAD2-6B.2) (1)	FWYSNKF
<i>T. turgidum</i> ssp. <i>durum</i> (FAD2-6A.4) (1)	FWYSNKF
<i>O. sativa</i> (ACN87220.1) (1)	FWYNNKF
<i>Z. mays</i> (ACG34271.1) (1)	FWYNSKF
<i>Z. mays</i> (ABV44669.1) (1)	FWYNSKF
<i>S. bicolor</i> (ABN49520.1) (1)	FWYNKF
<i>Z. mays</i> (ABF50053.1) (1)	FWYNKKF
<i>Z. mays</i> (BAE93382.1) (1)	FWYNKKF
<i>S. bicolor</i> (ACA28704.1) (1)	FWYNKKF
<i>Z. mays</i> (ACG28208.1) (2)	TISCSGPFT
<i>T. aestivum</i> (BAA28358.1) (2)	WTGTDKQK
<i>Z. mays</i> (ACG37273.1) (2)	NQNHHKQK
<i>S. bicolor</i> (ABN49519.1) (2)	HHLNDTTKQK
<i>S. bicolor</i> (ABN49521.1) (2)	HHLNDTTTDDAHKQK

(1): ω -6 lípido desaturasa

(2): ω -3 lípido desaturasa

Dominios transmembrana y acil-lípido desaturasas

Se analizó la presencia de dominios transmembrana en un set de 16 ω - lípido desaturasas de las especies: *T. turgidum ssp. durum*, *T. aestivum*, *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Sorghum bicolor*. El número de dominios transmembrana varió entre uno y seis. Las cinco copias de FAD2 y las dos secuencias de FAD8 de *T. turgidum ssp. durum* presentaron la misma cantidad de hélices transmembrana, por ese motivo aparecen solo una vez en la Tabla 1.15. En el caso de Td-FAD8 de trigo candeal, se observó que, aunque posee tres dominios transmembrana, las hélices no llegaron a atravesar la membrana y por esa razón el predictor devuelve como resultado un valor de hélices igual a “cero” (Tabla 1.15).

Tabla 1.15. Dominios transmembrana de las proteínas ω - 3 y ω - 6 lípido desaturasas de gramíneas utilizando el predictor TMHMM

Proteína (ID)	Nombre	Especie	TMHMM
Td-FAD8-2B		<i>T. turgidum ssp. durum</i>	0
BAA28358.1		<i>T. aestivum</i>	3
ACG37273.1		<i>Zea mays</i>	5
ACG28208.1	ω - 3 desaturasa	<i>Zea mays</i>	2
BAA22441.1		<i>Zea mays</i>	2
BAE79784.1		<i>Oryza sativa</i>	1
BAE79783.1		<i>Oryza sativa</i>	5
ABN49521.1		<i>Sorghum bicolor</i>	4
ABN49519.1		<i>Sorghum bicolor</i>	5
Td-FAD2		<i>T. turgidum ssp. durum</i>	3
ACG34271.1	ω - 6 desaturasa	<i>Zea mays</i>	6
ABV44669.1		<i>Zea mays</i>	5
BAE93382.1		<i>Zea mays</i>	4
ACA28704.1		<i>Sorghum bicolor</i>	6
ABN49520.1		<i>Sorghum bicolor</i>	6
ACN87220.1		<i>Oryza sativa</i>	5

Análisis de los motivos

Este estudio permitió detectar cinco motivos conservados en 27 desaturasas utilizando el servidor *MEME-Suite*. En las acil-ACP desaturasas, dos de los motivos contienen los dominios de histidina característicos que se asocian con el sitio activo, D/EEX₂H (EENRH y DEKRH) incluidos en los motivos 2 y 3 (Fig. 1.10). En las acil-lípido desaturasas, tres de los motivos incluyen los dominios o cajas de histidina característicos para este grupo. El primer dominio de histidina está incluido en el motivo 1, el segundo en el motivo 2 y el tercero en el motivo 4 (Fig. 1.11). En el grupo de las ω -3 lípido desaturasas, estas cajas de histidina fueron HDCGH, HRTHH y HXXHH y en las ω -6 lípido desaturasas; HECGH, HRRHH y HXXHH. En esta última caja de histidina, "XX" está en su mayoría representado por los aminoácidos Valina (V) y Alanina (A), excepto en Td-FAD2-6B.4 de trigo candeal que presentó los aminoácidos Isoleucina (I) y Leucina (L). En el grupo de las FED, las cajas de histidina fueron: HDSGH, HNTHH y QYEHH.

Posteriormente, se integró el análisis de motivos realizado en MEME con los dominios transmembrana (TMHMM). La topología de la proteína resultante correspondió a una estructura con los extremos carboxilo y amino terminal hacia el interior de la célula (C_{in}-N_{in}) (Fig. 1.12). Se observó que los motivos 1, 2 y 4, que forman parte del sitio activo de la proteína, se disponen hacia el interior de la célula (citosol).

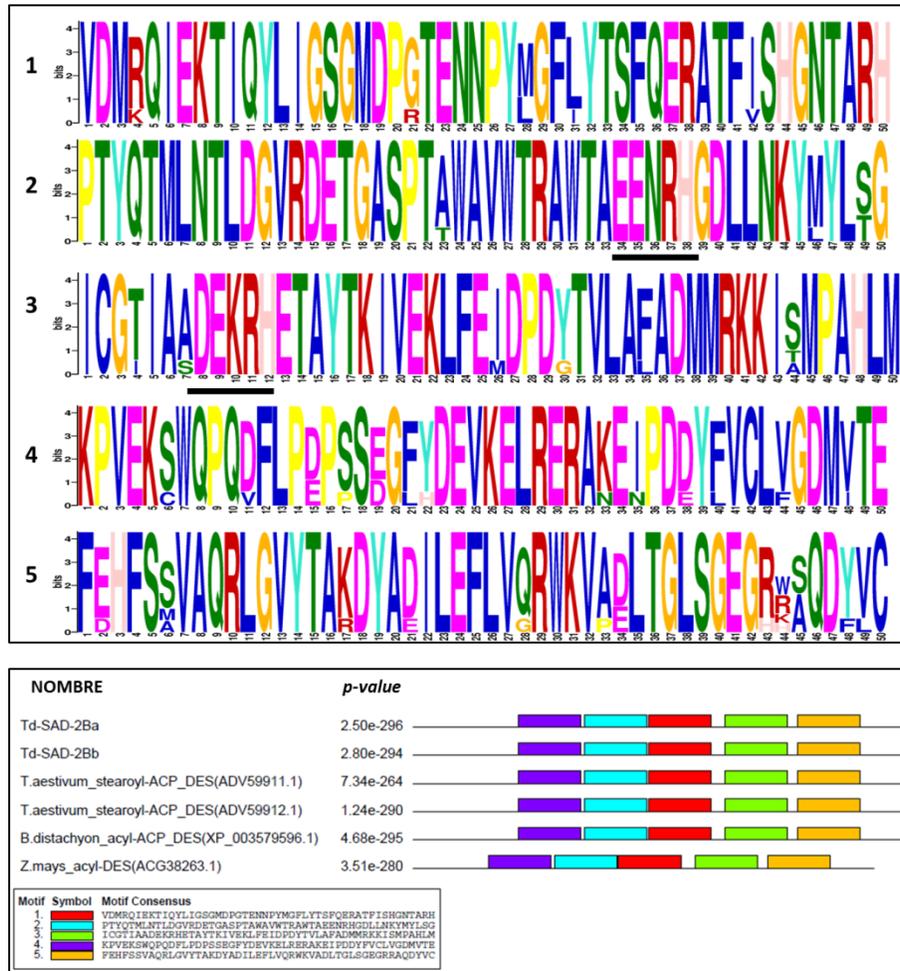


Figura 1.10. Logo de seis Acil-ACP desaturasas. Los motivos 2 y 3 incluyen los dominios o cajas de histidina característicos representados por D/EEX₂H.

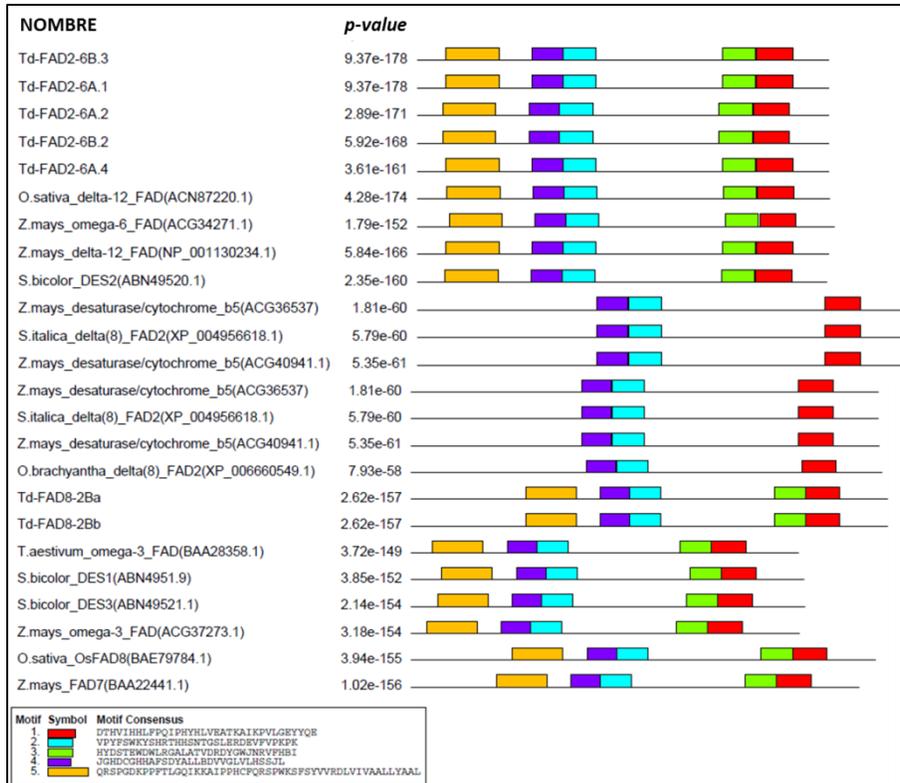


Figura 1.11. Logo de 21 acil lípido desaturasas. Los motivos 1, 2 y 4 incluyen los dominios o cajas de histidina (HXXHH, HXXHH, HXXXH).

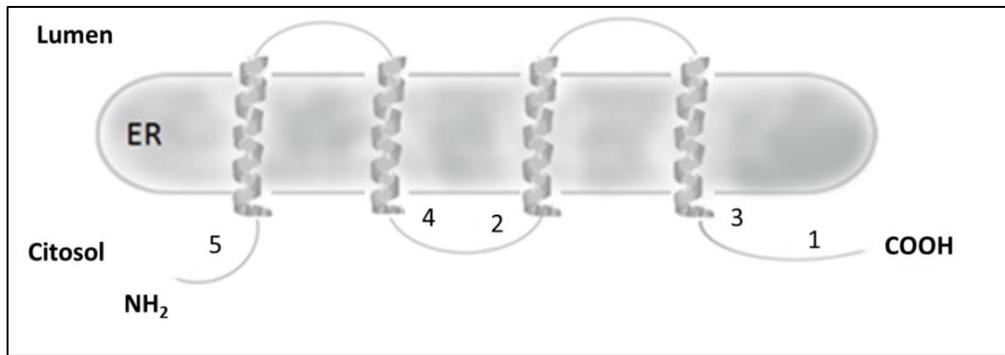


Figura 1.12. Representación de la estructura secundaria de la ω - 3 lípido desaturasa (ABN49521.1-*S. bicolor*). Los números corresponden a los motivos de la Figura 1.11.

Modelado por homología

Al realizar el modelado de las acil-ACP desaturasas, utilizando como molde la proteína cristalizada de *Ricinus communis* se observó que las mismas están compuestas por 11 hélices. La Fig. 1.13 muestra el modelado correspondiente a la estearoil-ACP desaturasa de *T. aestivum* (ADV59911.1). El gráfico de Ramachandran, modelo de validación del servidor RAMPAGE, reveló que más del 90% se encontraban en regiones favorecidas, lo que demuestra una alta confiabilidad.

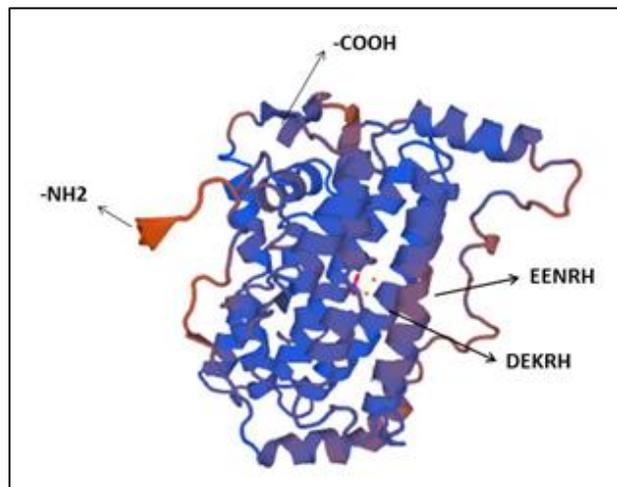


Figura 1.13. Modelado por homología de estearoil-ACP desaturasa de *T. aestivum* (ADV59911.1), usando como molde la acil-ACP desaturasa de *Ricinus communis*. Se indican las secuencias de los dominios de histidina asociados con el sitio activo, el amino y el carboxilo terminal.

Análisis filogenético

Para evaluar las relaciones entre las proteínas FAD de diferentes especies de gramíneas, se construyó un árbol filogenético a partir del alineamiento de 30 secuencias proteicas completas que pertenecen a los grupos acil-ACP y acil-lípido desaturasas de ocho especies de gramíneas (Fig. 1.14).

Según el diagrama de árbol, se reconocen cinco grupos principales (I – V) con valores altos de bootstrap. Los grupos I, III y IV incluyeron acil-lípido desaturasas y el V las acil-ACP desaturasas. El grupo I y III corresponden a las desaturasas ω -6 y ω -3, respectivamente. Dentro del grupo I, este análisis agrupó a las copias de ω -6 lípido desaturasa de trigo candeal Td-FAD2-6B.3 y Td-FAD2-6A.1 por un lado y a Td-FAD2-6B.2 y Td-FAD2-6A.2 por otro. El grupo IV incluyó la clase de esfingolípido desaturasas y el grupo II las FED. La zeta-caroteno desaturasa se utilizó como “outgroup”.

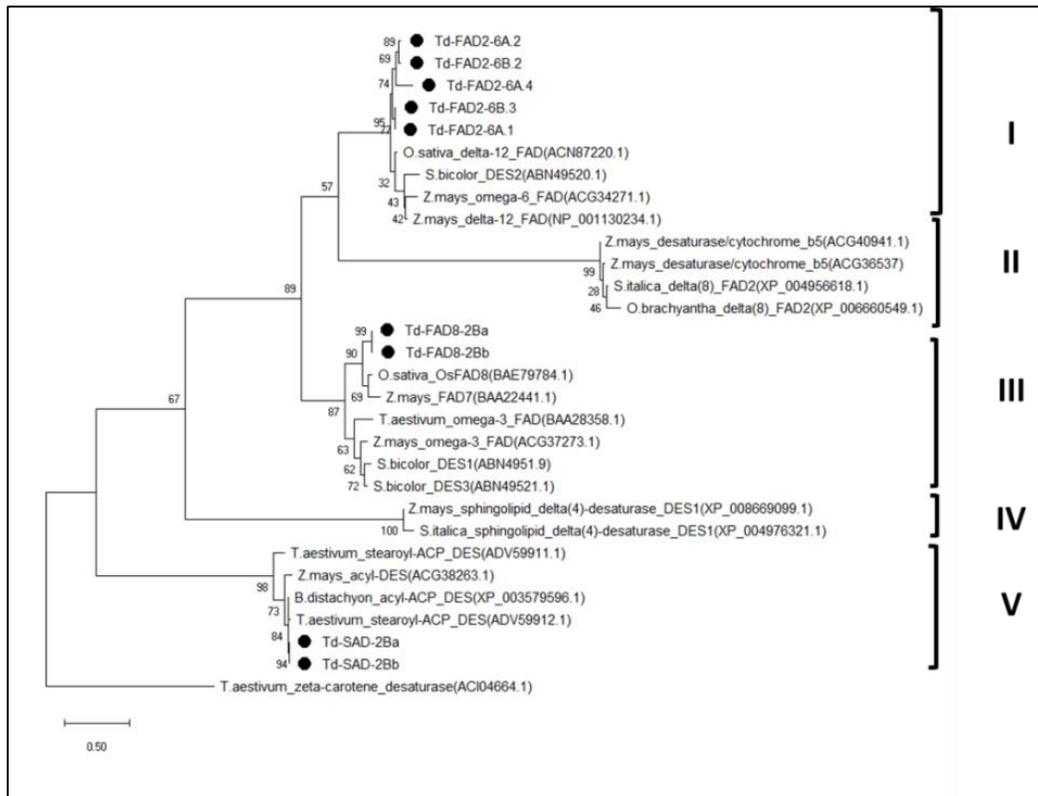


Figura 1.14. Árbol filogenético enraizado derivado de las secuencias de proteínas desaturasas, inferido mediante el método Máxima Verosimilitud y con 1000 réplicas de bootstrap. I: ω -6 lípido desaturasas; II: FED (Front-End Desaturase); III ω -3 lípido desaturasa; IV: Esfingolípido desaturasas y V: Acil-ACP desaturasas. Con “•” las desaturasas de *T. turgidum* ssp. *durum*.

DISCUSIÓN

Numerosos estudios se han focalizado en el rol de las desaturasas en la respuesta a las bajas temperaturas (Golizadeh y Kumleh, 2019; Hernández *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Karabudak *et al.*, 2014; Heidarvand & Amiri, 2010). En concordancia con la Hipótesis 1, en nuestro trabajo identificamos 28 transcriptos correspondientes a 24 genes de desaturasas, de los distintos grupos que componen esta familia de proteínas, a partir del análisis del transcriptoma de plantas creciendo a 5°C durante cinco horas. Al mapearlos *in silico* se observó la existencia de genes con más de una copia y que se encuentran distribuidos en diez cromosomas. La duplicación génica cumple un rol significativo en la expansión de familias de genes en el genoma (Cannon *et al.*, 2004). Una distribución dispersa de genes de desaturasas en el genoma se ha descrito en otras especies tales como *Medicago trunculata*, donde se localizaron en seis de ocho cromosomas (Zhang *et al.*, 2018), algodón en sus 13 cromosomas (Liu *et al.*, 2015) y soja en 15 de 20 cromosomas (Chi *et al.*, 2011). Por otro lado, el alineamiento de los transcriptos de desaturasas presentes en las genotecas con el genoma de referencia (cv. Svevo) permitió identificar la existencia de isoformas representando transcriptos incompletos, algunos conteniendo intrones y en otros casos isoformas que tenían diferente identificación (ID) pero pertenecían al mismo gen. Estas observaciones demuestran la importancia de analizar detalladamente la información que se genera a partir de experimentos de secuenciación masiva de ARNm, y ponen en evidencia la complejidad de este tipo de estudios.

Por otra parte, dos de los transcriptos identificados en ambas genotecas, mostraron expresión diferencial ($p < 0,01$). De éstos, solo uno presentó mayor expresión a bajas temperaturas. En este sentido y considerando que las enzimas desaturasas se encuentran involucradas en la respuesta a bajas temperaturas, podría interpretarse que las condiciones de temperatura y tiempo de exposición utilizados en este experimento previo no resultaron inductivas para la expresión de estos genes en plantas tratadas. La mayoría de los experimentos de expresión, confirman la inducción de genes de desaturasas en períodos superiores o iguales a 24 horas de exposición a bajas temperaturas (Román *et al.*, 2008; Matteucci *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2019). Sin embargo, dos estudios en algodón, identificaron expresión diferencial de una ω -6 lípido desaturasa a las 8 horas a 5 °C en hojas (Kargiotidou *et al.*, 2008) y de una ω -3 lípido desaturasa cloroplástica a las 3 horas de exposición a 10 °C (Liu *et al.*, 2015). Por otro lado, Zhang *et al.* (2018), también identificaron inducción de dos genes, ω -3 y ω -6 lípido desaturasas, en hojas de *Medicago truncatula* sometidas a 4 °C durante 6 horas. Cabe comentar que las condiciones del experimento para

analizar el transcriptoma de CBW 0101, fueron definidas para simular el descenso de temperatura previo a una helada en espigazón, y de este modo refleja las etapas iniciales de la respuesta de la planta al frío. No obstante, la información de secuencia que aportó este experimento, junto con la del genoma de trigo pan disponible inicialmente, nos permitió avanzar sobre la Hipótesis 2 de este capítulo. En este contexto, se caracterizó un gen de cada grupo de desaturasa (estearoil-ACP desaturasa y ω -6 y ω -3 lípido desaturasa) en cinco genotipos de trigo candeal.

El gen de la enzima estearoil-ACP desaturasa (*Td-SAD*) de trigo candeal presentó tres exones y dos intrones en todos los genotipos. La organización exon-intron en los genes *SAD* se encuentra muy conservada entre las especies (Zhang *et al.*, 2018). La comparación de la secuencia de la proteína deducida, con la de otras gramíneas como *Triticum aestivum* (ADV59911.1 y ADV59912.1), *Hordeum vulgare* (KAE8772761.1), *A. tauschii* ssp. *tauschii* (XP_020152465.1), *T. urartu* (EMS62676.1) y *Oryza brachyanta* (XP_006652203.1), depositadas en las bases de datos públicas, mostró un porcentaje de identidad superior al 95%. El análisis de las secuencias genómicas de los genotipos evaluados, no mostró polimorfismos SNPs que sugieran efectos importantes sobre la funcionalidad de la proteína ya que se obtuvieron dos secuencias con un solo cambio aminoacídico ubicado en una región que no corresponde a ninguno de los dominios que forman parte del sitio activo (Fig. A1.2; ANEXO) (Shanklin & Cahoon, 1998). Por otro lado, los polimorfismos no diferenciaron los genotipos de acuerdo a su grado de tolerancia a bajas temperaturas (Tabla 1.2)

El gen de ω -6 lípido desaturasa (*FAD2*) no posee intrones (su estructura génica consta de un único exón). Estos resultados, coinciden con lo observado en el gen *FAD2* de *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max* (Okuley *et al.*, 1994; Sharma & Chauhan, 2012) y gramíneas tales como *A. tauschii* ssp. *tauschii* (XM_020333693.1), *B. distachyon* (XM_003570187.4), *Oryza* sp. (XM_015770141.2), *Setaria itálica* (XM_022827384.1), *Zea mays* (XM_020552996.2) y *Sorghum bicolor* (EU424174.1).

El mapeo *in silico* de *Td-FAD2* en trigo candeal identificó cuatro copias en tándem presentes en el cromosoma 6 de ambos genomas (A y B). Estas copias pueden ser interpretadas como isoformas del gen *FAD2* (*FAD2-1*, *FAD2-2*, *FAD2-3* y *FAD2-4*) presentes en otras especies de plantas (Dar *et al.*, 2017).

En relación a la comparación entre copias ortólogas del gen *FAD2*, Krasileva *et al.* (2013), determinaron que 95 % es un valor de identidad promedio a considerar cuando se comparan copias homeólogas de los genomas de trigos alopoliploides. En nuestro caso, el porcentaje de identidad entre copias homeólogas fue menor al 90 % entre *Td-FAD2-6A.1* y

Td-FAD2-6B.1 y entre *Td-FAD2-6A.3* y *Td-FAD2-6B.3* (Tabla 1.8), aunque superior al 95 % entre *Td-FAD2-6A.2* y *Td-FAD2-6B.2*. La comparación entre *Td-FAD2-6A.4* y *Td-FAD2-6B.4*, no se realizó debido a la presencia del retrotransposón en la segunda. Una posible hipótesis para poder explicar los porcentajes de identidad inferiores al 90 % entre las copias homeólogas, es que tanto *Td-FAD2-6B.1* como *Td-FAD2-6A.3* poseen codones de terminación prematuros, resultando en copias no funcionales de *FAD2* de trigo candeal, lo que permite una mayor acumulación de mutaciones y divergencia. Por otro lado, llamativamente, se confirmó un valor de 96,82 % entre copias no homeólogas *Td-FAD2-6B.3* y *Td-FAD2-6A.1*.

El gen *FAD2* se informó por primera vez en *A. thaliana* con una sola copia (Beisson *et al.*, 2003), sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, en Liu *et al.* (2015), identificaron copias en tándem de *FAD2* en *Gossypium raimondii* (*GrFAD2.3* y *GrFAD2.4* en el cromosoma 2 y *GrFAD2.1* y *GrFAD2.2* en el cromosoma 13 y, en Chi *et al.* (2011) encontraron dos *FAD2* (*FAD2.3* y *FAD2.4*) en el cromosoma 19 de *Glycine max*. Además, se ha identificado más de un gen *FAD2* en otros cultivos como *Sesamum indicum* (Jin *et al.*, 2001), *Zea mays* (Pirtle *et al.*, 2001) y *Brassica napus* (Kinney *et al.*, 2002).

Se deduce que las copias múltiples de *FAD2* en *T. turgidum* ssp. *durum* podrían provenir de eventos de duplicación en especies ancestrales al trigo, dada la presencia de las mismas en los tres genomas de *T. aestivum*, con el genoma D aportado por *T. tauschii*. La duplicación genética es una fuente importante de nuevas características evolutivas que puede ocurrir a través de la duplicación de genes individuales, segmentos cromosómicos o genomas completos (poliploidización) (Kanazawa *et al.*, 2009). Los eventos de duplicación de genes, pueden experimentar al menos tres vías: no funcionalización (pérdida de funciones originales), neo-funcionalización (adquisición de funciones nuevas) o subfuncionalización (partición de funciones originales), durante el proceso de evolución (Lynch & Conery, 2000). A los productos de la primera, se los denominan en general “pseudogenes”. En este sentido, se observó que tres de las ocho copias (genomas A y B) de *FAD2* del cv. Svevo son aparentemente no funcionales. Como se mencionó anteriormente, en *Td-FAD2-6B.1* y *Td-FAD2-6A.3* se detectaron codones de terminación prematuros. En concordancia con nuestras observaciones, en *Brassica napus* detectaron seis copias de este gen con numerosos codones de terminación (Xiao *et al.*, 2010) y en *Gossypium raimondii* caracterizaron una de las copias como un posible pseudogen (Liu *et al.*, 2015).

En el marco de lectura de la copia *Td-FAD2-6B.4* se reconoció una secuencia perteneciente a un elemento móvil de alrededor de 5 kb del tipo LTR (Long Terminal Repeat) que contiene

las regiones: *rve*, *RVT_2* y *RNase_HI_RT_Ty1*. Este retrotransposon (RT) pertenece a la familia *Ty1/Copia-RNase-HI*, que está ampliamente distribuida entre los genomas de plantas, hongos y animales (Kanazawa *et al.*, 2009). Los retrotransposones se propagan a través de los genomas mediante un proceso denominado retrotransposición, que consiste en la transcripción del elemento, su transcripción reversa y la reinserción en una nueva ubicación genómica (Alzohairy *et al.*, 2014). Las versiones truncadas de los elementos móviles se originan en procesos como recombinaciones ilegítimas o desiguales, que son parte de las estrategias de los genomas vegetales para mantener bajo control la transposición (Orozco-Arias *et al.*, 2019). Este retrotransposon resultó específico del genoma B de trigo candeal y trigo pan (genoma cv Svevo y sitio web URGI) por lo que se deduce que es preexistente a los procesos de hibridación que originaron las especies poliploides de trigo. En este sentido, según Charles *et al.* (2008), la proliferación de los elementos transponibles (TE, Transposable Elements) ocurrió principalmente antes de los eventos de alotetraploidización, hace más de 0,5 millones de años y el análisis de TE en los genomas A y B mostró que los mismos sufrieron caminos de diferenciación distintos en ambos genomas de trigo.

Coincidente con los resultados de esta tesis, según Tao *et al.* (2006), la longitud de la región ORF de *FAD2* en plantas es de alrededor de 1164 bp y codifica en la mayoría de los casos 387 aminoácidos (Fig. A1.3; ANEXO), siendo la secuencia proteica muy similar entre especies de plantas. Debido a que solo se obtuvieron secuencias *FAD2* ortólogas de dos genotipos (MVTD 10-98 y CBW 0101) no fue posible analizar relaciones entre polimorfismos y tolerancia a frío.

De una manera similar que con el gen de ω -6 lípido desaturasa (*FAD2*) de *T. turgidum* ssp. *durum*, en *Z. mays* se determinó que *FAD2* (BAE93382.1) se localiza en dos posiciones en el cromosoma cinco (separados a 77169 bp) y en una posición adicional en el cromosoma cuatro (Zhang *et al.*, 2013). Las dos posiciones contiguas en el cromosoma cinco se interpretaron como los productos de mecanismos de duplicaciones en tándem que operan en la evolución del genoma, a menudo mediadas por transposones. Además, en esta especie, más de una copia en diferentes cromosomas ha sido atribuido a un antiguo evento de poliploidización con evolución posterior, mediante el cual las copias adicionales de cada gen fueron retenidas o perdidas de manera desigual (Schnable, 2015).

La estructura génica compleja (ocho exones) del gen ω -3 lípido desaturasa (*FAD8*) de trigo candeal, es conservada y coincide con la de otras gramíneas depositadas en GenBank: *T. aestivum* (D43688.3), *A. tauschii* ssp. *tauschii* (XM_020307218.1), *Hordeum vulgare*

(AK362552.1) y *B. distachyon* (XM_003562352.4) e incluso con la de otras especies más alejadas como *A. thaliana* (Matsuda *et al.*, 2005), *Medicago truncatula* (Zhang *et al.*, 2018) y *Glycine max* (Chi *et al.*, 2011). El análisis de los polimorfismos de las secuencias genómicas de los cinco genotipos evaluados, mostró SNPs en intrones y exones por un lado e indels en intrones. En este sentido se predijeron dos secuencias proteicas *FAD8* con tres cambios aminoacídicos. Los polimorfismos no diferenciaron los genotipos de acuerdo a su grado de tolerancia a bajas temperaturas (Tabla 1.2).

La búsqueda de secuencias de genes de desaturasas de gramíneas en GenBank permitió abordar la Hipótesis 3 planteada. Se obtuvo información de diez especies pertenecientes a la familia Poaceae, a las que se sumaron las de *T. turgidum ssp. durum*, aquí descritas. Todas las desaturasas conocidas se caracterizan por la presencia de dominios de histidina localizados en posiciones altamente conservadas que se cree que son responsables de la unión di-hierro en el centro catalítico (Alonso *et al.*, 2003; Shanklin & Cahoon, 1998). Estos dominios de histidina resultan cruciales para la función enzimática dado que la sustitución de los mismos produce la pérdida de función de la proteína (Shanklin & Cahoon, 1998). Los resultados obtenidos con el predictor *MEME* confirmaron la presencia de tres dominios de histidina en las acil-lípido desaturasas (Murata & Wada, 1995; Los & Murata, 1998). Las variaciones en el último dominio en la subfamilia ω -6, (HXXHH), no modificarían la funcionalidad ni las propiedades físico-químicas de la proteína porque pertenecen al mismo grupo aminoacídico y son parte de las variaciones que pueden encontrarse en el interior de esta caja (Dar *et al.*, 2017). En el caso de las FED (Front End Desaturase), el tercer dominio de histidina se ha definido como H/QX₂-₃HH (Sayanova *et al.*, 1997). En todas las FED de gramíneas analizadas en este estudio, el primer residuo en este dominio que es crucial para la actividad enzimática, fue una glutamina (Q) en lugar de histidina (H). En relación al grupo acil-ACP, se identificaron dos cajas de histidina asociadas también al sitio activo (Shanklin & Cahoon, 1998). Los motivos detectados por *MEME* en las acil-ACP desaturasas fueron más homogéneos (conservados) que en las acil-lípido desaturasas, lo que sugiere que un motivo detectado por *MEME* en un grupo de proteínas estructuralmente heterogéneas podría incluso contener diferencias importantes entre las secuencias, por lo tanto, la equivalencia de los motivos debe considerarse con precaución.

Los ácidos grasos en las plantas se sintetizan en los plástidos y se insaturan en éstos o en el RE, estando las acil-ACP asociadas al cloroplasto y las acil-lípido desaturasas tanto al RE (Dyer & Mullen, 2001) como a cloroplasto (Ferro *et al.*, 2003). Nuestros resultados están en concordancia con los estudios previos mencionados, aunque se predijeron ubicaciones

adicionales para una acil-ACP desaturasa en mitocondria y dos acil-lípido FED en membrana plasmática. La presencia de desaturasas en las mitocondrias se ha sugerido en las células animales (Beauchamp *et al.*, 2009) y hasta donde se sabe, no se ha informado la presencia de desaturasas en las mitocondrias de plantas. Mientras tanto, se han encontrado algunas acil-lípido desaturasas asociadas a las membranas plasmáticas, además de su localización típica, en la membrana reticular (Todorova, 2008).

Las acil-lípido desaturasas de retículo presentan motivos de secuencia característicos en sus extremos carboxilo que están involucrados en la recuperación de las proteínas de membrana que deben regresar al RE (Pagny *et al.*, 1999) (Tabla 1.14). Se han descrito dos tipos diferentes de motivos, uno rico en aminoácidos aromáticos con FWYNN/S/KKF y otro más variable con sus residuos de lisina (K) conservados y descritos como señales dilisina dirigidas al RE (Mc Cartney *et al.*, 2004). Dentro del conjunto de desaturasas localizadas en el RE, se observó que las enzimas responsables de agregar un doble enlace en el sitio C6-C7 con respecto al extremo metilo (CH₃), es decir, las ω -6 lípido desaturasas, contenían el primer motivo (FWYNN/S/KKF), mientras que las ω -3 lípido desaturasas poseían el motivo dilisina, como por ejemplo "WTGTDKQK" en BAA28358.1 de *T. aestivum*. Una excepción fue ACG28208.1 de *Z. mays*, una ω -3 que las predicciones de CELLO la localizaron en el RE y cloroplastos, aunque carecen del típico motivo de recuperación del RE. Esta característica podría sugerir que el cloroplasto es la ubicación más probable para ACG28208.1.

En cuanto a la estructura secundaria de la proteína, la disponibilidad de predictores de hélices adquiere especial relevancia en las proteínas asociadas a las membranas, debido a que la disponibilidad de la estructura cristalina, que permite un modelado preciso, es limitada. Se observó que el número de hélices transmembrana predichas varió entre una y seis. Aunque el número de hélices transmembrana basadas en la hidrofobicidad en cada residuo es variable (Sperling *et al.*, 2003), la topología más frecuente supone que la enzima atraviesa la membrana cuatro veces (Lindqvist *et al.*, 1996). Podría pensarse además que el número de hélices que atraviesan la membrana no resulta esencial para la funcionalidad de la proteína, siempre que no alteren la interacción entre los dominios asociados al sitio activo. En varios estudios se han observado variaciones en el número de hélices predichas (Beló *et al.*, 2008; Berberich *et al.*, 1998).

El análisis *in silico* en la base *WheatExp* reveló diferencias de expresión entre los genes de desaturasas y entre tejidos y/o tratamientos (Tabla 1.12). Por ejemplo, en el caso de las acil-ACP desaturasas: *SAD1* (HQ589252.1), *SAD2* (HQ589253.1) de trigo pan y *Td-SAD* de trigo candeal, la primera mostró un mayor nivel de transcripción en condiciones de estrés y

durante la senescencia de las hojas en comparación con *SAD2* y *Td-SAD*, y por otro lado su expresión fue relativamente estable en la mayoría de los órganos y condiciones de crecimiento, principalmente en las copias de los genomas A y B. También se detectaron diferencias entre copias homeólogas, en particular, una menor expresión en tejidos de *SAD2* (HQ589253.1) de trigo pan en el genoma B en relación a los transcritos de los genomas A y D. Los niveles de expresión relativos de genes homeólogos en el trigo poliploide con frecuencia difieren, lo que causa perfiles de transcripción específicos de genoma (Basualdo *et al.*, 2015). Esta regulación génica diferencial se ha asociado con mecanismos de compensación de dosis que operan en las especies aloploidoides y con interacciones intergenómicas (Feldman y Levy, 2012). En el caso de las ω -3 lípido desaturasas no se encontraron diferencias de expresión entre los transcritos de los tres genomas (A, B o D) pero sí entre los genes D84678.1 de trigo pan y *Td-FAD8* de trigo candeal, que probablemente se deba a que corresponden a enzimas que actúan en diferentes compartimentos celulares (RE y cloroplasto). Esta observación coincide con lo informado para *Medicago truncatula* y *Glycine max* donde se observaron diferencias en la expresión de ω -3 lípido desaturasas (reticular y cloroplástica), en plantas creciendo en condiciones de estrés por frío (Zhang *et al.*, 2018; Román *et al.*, 2012).

Con respecto al experimento de senescencia, hasta donde se sabe, el papel de las desaturasas en la senescencia de gramíneas no ha sido estudiado. No obstante, en este estudio se determinó que la esteroil-ACP desaturasa (*SAD1*) de trigo pan (HQ589252.1) es altamente inducida durante la senescencia de hojas, con un nivel de expresión superior a *SAD2* de trigo pan y *Td-SAD* de trigo candeal. En este sentido, una $\Delta 9$ acil-ACP desaturasa de flores de rosa se ha identificado como un gen inducible por senescencia (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 1995)

Los métodos computacionales capaces de detectar sitios de unión de factores de transcripción (FT) en las regiones reguladoras de un gen, han proporcionado información esencial para el análisis funcional y para la construcción de modelos para redes reguladoras transcripcionales (Blais y Dynlacht, 2005). En este estudio se identificaron, mediante la herramienta *PlantPAN*, los sitios de unión a FT en las regiones promotoras de genes de desaturasas mapeados en el genoma de trigo. Se ha informado que cuando las plantas están expuestas a bajas temperaturas, hay cambios en la expresión de desaturasas que se correlacionan con la tolerancia a frío (Domínguez *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, se identificaron numerosos sitios de unión de FT relacionados con la respuesta a bajas temperaturas, como las familias MYB, NAC y AP2/ERF (Agarwal *et al.*, 2006; Xia *et al.*,

2010). Los sitios de reconocimiento para AP2, B3, NAC-NAM, bZIP, NF-YB están implicados en una variedad de procesos vinculados con el desarrollo y respuesta a estrés (Akpinar *et al.*, 2018). Entre los FT asociados con la respuesta a estrés abiótico, la familia bHLH, representa un grupo de proteínas reguladoras moduladas por salinidad y/o sequía (Abe *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2018) y en este estudio, presentó también una elevada abundancia. En nuestro estudio, el análisis de motivos en las secuencias promotoras, sugirió que la expresión de los genes de desaturasas podrían regularse bajo estrés abiótico por al menos 12 familias de FT diferentes (Fig. 1.7, 1.8 y 1.9).

La vía evolutiva de las FAD puede inferirse combinando su rol bioquímico con la posición taxonómica en un amplio rango de especies (Los & Murata, 1998; Sperling *et al.*, 2003). Sobre la base de las secuencias de aminoácidos, se pudo confirmar que las proteínas acil-ACP y acil-lípido desaturasas constituyen dos grupos de enzimas no relacionadas a pesar de algunas similitudes con respecto al uso del cofactor y la disposición espacial durante la eliminación de hidrógeno (Shanklin & Cahoon, 1998).

Dentro de las proteínas acil-lípido desaturasas o de membrana, se ha sugerido un antepasado común para las ω -3 y ω -6 después de analizar aproximadamente 400 desaturasas de diferentes especies eucariotas (Feldman y Levy, 2012), un punto que también se evidencia por la topología de árbol obtenido en este trabajo. Las esfingolípido desaturasas y las FED, aparecen en una posición más distante a pesar de que todas las enzimas incluidas en los grupos I, II y III comparten la función de agregar un doble enlace en una cadena insaturada con al menos un doble enlace existente. El grupo de las FED puede explicarse por características comunes, como la presencia de citocromo b_5 N-terminal, una estructura génica sin intrones (Sperling *et al.*, 1998) y una glutamina como primer residuo en la tercera caja de histidina. Todas estas características compartidas admiten un origen común de las FED de gramíneas.

CONCLUSIONES

En el presente capítulo, se realizó un análisis de 24 genes de desaturasas presentes en las genotecas de ADNc de la línea CBW 0101 observando expresión diferencial únicamente en dos transcritos, inducidos por la condición control (22 °C) y por el tratamiento con frío (5 horas a 5 °C). El escaso número de diferenciales podría explicarse por las condiciones del tratamiento de frío, principalmente en lo que se refiere al tiempo de exposición. En tiempos

superiores a 24 horas, se ha observado inducción de *FAD2* en hojas de tres genotipos de trigo candeal (Capítulo 2 de esta tesis) que incluyó la línea CBW 0101.

La identificación de genes de desaturasas en las genotecas de trigo candeal, permitió la amplificación de tres de estos genes en cinco genotipos y además analizar su variabilidad y estructura y se obtuvieron y caracterizaron las secuencias proteicas, que fueron incorporadas al análisis *in silico* de gramíneas.

Este estudio, representa el primer aporte con información de secuencias de genes de desaturasas de trigo duro. No se encontró relación entre los polimorfismos en secuencia y el grado de tolerancia a frío de los genotipos.

Por otro lado, las desaturasas de gramíneas, fueron asignadas a grupos funcionales específicos que se distinguen de acuerdo al número de dobles enlaces que adicionan, a la posición de los mismos en la cadena hidrocarbonada y a la localización subcelular. Además, se realizó un análisis de la estructura primaria de un set de proteínas de gramíneas, que permitió identificar motivos conservados que incluyeron los dominios que forman parte del sitio catalítico de la enzima. También se identificaron motivos en los promotores de genes de trigo pan y candeal que constituyen sitios de unión de factores de transcripción involucrados en las vías de respuesta a estrés abiótico, reafirmando el rol de las desaturasas en este tipo de estrés.

La amplia disponibilidad de herramientas bioinformáticas y bases de datos de secuencias públicas, abre la posibilidad de hacer predicciones estadísticamente seguras y confiables, de la estructura y función de genes y proteínas. Sin embargo, para poder avanzar en el mejoramiento de la especie, es esencial tener una visión integrada entre las predicciones *in silico* y el conocimiento biológico.

CAPÍTULO 2

Efecto del frío sobre el contenido de ácidos grasos, permeabilidad de la membrana celular y expresión del gen ω - 6 lípido desaturasa (*FAD2*)

El desarrollo de este capítulo corresponde a las siguientes hipótesis y objetivos:

Hipótesis 2

Hipótesis 2.1: Plantas de trigo candeal sometidas a bajas temperaturas experimentan cambios en la composición lipídica de las membranas celulares de tejidos vegetativos y los genotipos más tolerantes presentan niveles más elevados de ácidos grasos insaturados.

Hipótesis 2.2: El frío provoca variaciones en los niveles de expresión del gen ω - 6 lípido desaturasa en etapa vegetativa y los genotipos de trigo candeal que son más tolerantes, presentan niveles más altos de expresión.

Hipótesis 2.3: La permeabilidad de las membranas celulares de hojas de plántulas de trigo candeal es afectada por exposición a bajas temperaturas. Sin embargo, los genotipos más tolerantes conservan una mayor integridad de membrana que puede ser estimada mediante la pérdida de electrolitos.

Objetivo 2

En un set de genotipos de trigo candeal con diferente comportamiento frente a bajas temperaturas:

Objetivo 2.1: Evaluar el perfil y contenido de ácidos grasos de plántulas creciendo a 4 °C durante diferentes periodos de tiempo.

Objetivo 2.2: Analizar la variabilidad en la expresión del gen ω -6 lípido desaturasa (*FAD2*).

Objetivo 2.3: Evaluar la integridad de la membrana celular mediante la medición de la fuga de electrolitos de hojas sometidas a temperaturas bajo cero.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia a estrés por frío en plantas involucra procesos complejos que incluyen diferentes vías metabólicas y compartimentos celulares (Hannah *et al.*, 2005). El frío produce la reducción de la actividad enzimática, el aumento en la rigidez de las membranas, la desestabilización de las proteínas y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Ruelland & Zachowski, 2010).

La capacidad de las plantas para tolerar disminuciones de temperatura aumenta si éstas son previamente expuestas a bajas temperaturas sin congelación (2-6 °C) (Thomashow, 1999), proceso que se denomina aclimatación al frío. Es un rasgo multigénico que se asocia a cambios fisiológicos y bioquímicos complejos. Estos cambios afectan el crecimiento y el equilibrio hídrico, la composición de la membrana y la pared celular, la producción de antioxidantes, la expresión génica regulada por frío (COR) y los niveles de proteínas; además se reduce la actividad enzimática y la capacidad fotosintética (Dubey, 1999). Se interpreta que la membrana plasmática sufre cambios durante la aclimatación que permiten tolerar las tensiones generadas durante el congelamiento, principalmente en relación a su fluidez (Vega *et al.*, 2004). El daño que provoca el frío en las membranas celulares, se ha cuantificado en base a la fuga de electrolitos y cambios en la conductividad eléctrica (CE) sumergiendo los tejidos vegetales en una solución acuosa (Simon, 1974). La CE es una medida de la capacidad de una solución acuosa para transmitir una corriente eléctrica. Dicha capacidad depende de la presencia de iones, de su concentración, movilidad, valencia y temperatura ambiental. El daño provocado por diversos estreses abióticos en tejidos de una amplia gama de especies, ha sido estudiado a partir de la medición de la CE tales como bajas temperaturas en trigo (Golizadeh & Kumleh, 2019; Cuevas *et al.*, 2015) y en soja (Martineu *et al.*, 1979), calor en cebada (Gonzalez, 2008), sequía en trigo (Chandrasekar *et al.*, 2000).

La fuga de electrolitos se puede estimar a través de dos relaciones: REL (Relative Electrolyte Leakage) que compara la CE de la muestra tratada con la correspondiente a la fuga máxima de electrolitos de la misma muestra sometida a una temperatura de congelación extrema (Zhong *et al.*, 2011) y EL (Electrolyte Leakage) que representa no solo la fuga de electrolitos de tejidos dañados en relación al porcentaje de fuga de tejidos completamente destruidos por congelación (100 %), sino que además excluye el efecto de la CE de la muestra control (Nazari *et al.*, 2012). El análisis de estos índices en experimentos controlados, es un criterio

utilizado para evaluar el daño debido al estrés por frío en las plantas (Shahryar & Amiri, 2016).

La mayoría de los mecanismos de adaptación a temperaturas subóptimas de crecimiento, comprenden la remodelación de la composición lipídica de la membrana con el fin de mantener su integridad y las funciones proteicas asociadas (Tasseva, 2004). Cuando la planta comienza a percibir un descenso de temperatura, la fluidez de las membranas disminuye y la membrana plasmática experimenta una transición del estado cristalino-líquido a gel que provoca la reducción de la fluidez de la misma, fuga de iones y la desactivación de las proteínas de membrana (Upchurch, 2008). Esta señal es transmitida hacia moléculas reguladoras que directa o indirectamente interactúan con las regiones de genes de desaturasas de los ácidos grasos, promoviendo su activación.

Los ácidos grasos (AG) están formados por cadenas hidrocarbonadas abiertas, que contienen un número par de átomos de carbono, en cuyo extremo se encuentra un grupo carboxilo. La definición más amplia incluye todas las longitudes, entre 4 carbonos y 24, siendo los de 18 carbonos los mayoritarios. La biosíntesis *de novo* de ácidos grasos tiene lugar exclusivamente en los cloroplastos (Harwood, 1997); es llevada a cabo a partir de los precursores acetil-CoA y malonil-CoA con la participación de al menos siete enzimas que forman el complejo Ácido Graso Sintasa (FAS, Fatty Acid Sintase) (Harwood, 2005). El complejo FAS sintetiza la cadena hidrocarbonada, mediante la adición sucesiva de dos unidades de carbono cedidas por moléculas del malonil-CoA. La primera subunidad del FAS en intervenir es la enzima malonil-CoA: ACP transacilasa que une el grupo malonilo a otra proteína del complejo denominada Proteína Transportadora de Acilos (ACP, Acyl Carrier Protein). El ácido graso permanecerá unido a ésta durante su elongación hasta 16 ó 18 átomos de carbono. De esta manera, el complejo FAS sintetiza el ácido palmítico (16:0-ACP) y ácido esteárico (18:0-ACP), los que serán incorporados a la síntesis de lípidos del cloroplasto o se transportarán al retículo endoplasmático (RE) para su modificación, elongación, sucesivas insaturaciones, unión a moléculas lipídicas u otras vías (Fig. 2.1) (Bhunja *et al.*, 2016). Dos enzimas acil - desaturasas cloroplásticas participan en la producción de los AG monoinsaturados 16:1-ACP (ácido palmitoleico) y 18:1-ACP (ácido oleico), a partir de los cuales comienza la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) (Fig. 2.1).

Los PUFA poseen nomenclatura específica, que se constituye de acuerdo a la posición y número de dobles enlaces. Se denomina *n*- o Δ - si los carbonos se numeran desde el extremo carboxilo (-COOH) y ω - desde el extremo metilo (-CH₃) (Yadav *et al.*, 1993). Así, en

la primera insaturación de AG de 18 carbonos, el ácido oleico ($18:1^{\Delta 9}$) es generado por la introducción de un doble enlace en el $18:0$, entre el carbono 9 y 10. Las sucesivas insaturaciones ocurren de a tres carbonos, siendo el ácido linoleico ($18:2^{\Delta 9,12}$) el producto de la introducción de un segundo doble enlace en la posición 12 del ácido oleico. A partir de aquí la ruta se bifurca: una vía produce ácido γ -linolénico o GLA ($18:3^{\Delta 6,9,12}$) y la otra ácido α -linolénico o ALA ($18:3^{\Delta 9,12,15}$), que difieren en la posición del doble enlace. Además, los dobles enlaces pueden estar en configuración *cis* (en el mismo plano espacial) o en *trans* (en distinto plano). Como la mayoría de los AG insaturados en plantas son isómeros *cis*, no se especifica la conformación en su nomenclatura, excepto si son *trans* (ej.: $16:1^{\Delta 3t}$) (Pastor, 2015).

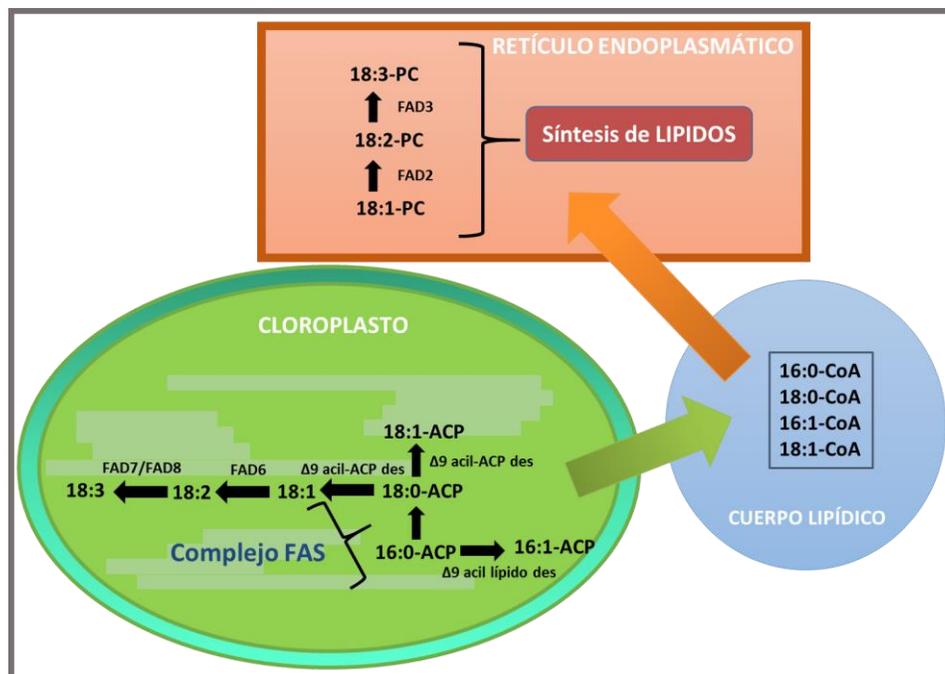


Figura 2.1. Esquema simplificado de la síntesis de ácidos grasos a partir del complejo **FAS:** AG Sintasa. **CoA:** Coenzima A, **PC:** fosfatidilcolina, **ACP:** Proteína Transportadora de Acilos, **des:** desaturasa, **FAD2/FAD6:** ω - 6 lípido des, **FAD3/FAD7/FAD8:** ω - 3 lípido des.

La introducción del primer doble enlace, en condiciones de estrés por bajas temperaturas, es esencial para la transformación del estado de la membrana, desde gel a cristalino-líquido (Bossie y Martin, 1989). En este sentido, la acumulación acelerada de ácidos grasos insaturados lleva a la reconstrucción de la fluidez de la membrana y a la restauración de la actividad de enzimas asociadas a la membrana (Los & Murata, 1998).

Los PUFA principales son el ácido linoleico (18:2^{Δ9,12}) y el ácido α-linolénico (18:3^{Δ9,12,15}). Es el contenido de los ácidos grasos dienoicos (18:2) y trienoicos (18:3) el que se incrementa particularmente bajo estrés por frío (Cheng *et al.*, 2013; Makarenko *et al.*, 2011). Un perfil típico de ácidos grasos en hojas y tallos de plantas está constituido principalmente por 16:0, 16:1, 18:0, 18:2 y 18:3. Esta composición se observó en arroz (Shi *et al.*, 2012), soja (Román *et al.*, 2012), algodón (Kargiotidou *et al.*, 2008), trigo pan y candeal (Nejadsadeghi *et al.*, 2014), coincidiendo en todos los casos, con niveles elevados de 18:2 y 18:3.

Las enzimas desaturasas de ácidos grasos (FAD, Fatty Acid Desaturase) participan en la tolerancia a estrés por frío, modificando el contenido de los PUFA en las plantas. Numerosos estudios han demostrado su participación en este estrés utilizando mutantes de procariontes, así como también sobreexpresando el gen tanto en la especie en estudio como en organismos menos complejos como *Saccharomyces cerevisiae*. En este sentido, en el estudio de Roman *et al.* (2012) sobreexpresaron un gen de ω-3 lípido desaturasa (GmFAD3) de soja en levadura a dos temperaturas distintas y observaron cambios en la composición de los AG, principalmente en el contenido de 18:3. La introducción del gen FAD7 de *A. thaliana* en tabaco resultó en un aumento significativo de los niveles de ácidos grasos trienoicos en plantas creciendo a 1 °C (Kodama *et al.*, 1994). Por otro lado, la introducción del gen *desA* que codifica la Δ-12 desaturasa en *Anacystis nidulans* comprobó que un aumento en la cantidad de ácidos grasos insaturados en los lípidos de membrana confiere tolerancia al frío en las cianobacterias (Murata & Wada, 1995).

Tal como se describió en el Capítulo 1, los genes FAD han sido extensamente estudiados sobre mutantes de *A. thaliana*, desde donde se obtuvo la convención de su nomenclatura, siendo FAB2 (SAD) la enzima soluble que produce la primera insaturación en el AG 18:0, FAD4 y FAD5 actúan insaturando el AG 16:0, FAD2 y FAD6 sobre 18:2 y FAD3, FAD7 y FAD8 sobre 18:3. Aunque las FAD están codificadas por genes nucleares, el proceso de insaturación ocurre en diversos compartimentos subcelulares. Así, FAD2 y FAD3 están localizados en RE y FAB2 (SAD), FAD4, FAD5, FAD6, FAD7 y FAD8, en los cloroplastos (Zhang *et al.*, 2018) (Fig. 2.1).

La mayoría de los estudios de ácidos grasos y enzimas desaturadas en plantas, se realizaron en especies como maíz (Berberich *et al.*, 1998), lino (Rajwade *et al.*, 2014), soja (Román *et al.*, 2012) y girasol (Venegas - Calerón *et al.*, 2010) por la importancia que poseen los AG esenciales (ω -9, ω -6 y ω -3) en la dieta de los seres humanos. Sin embargo, debido a la importancia que poseen los PUFA en la respuesta a estrés abiótico, la identificación, caracterización y función de los genes FAD son más ampliamente estudiados.

La expresión de estos genes varía entre las especies y depende del órgano de la planta y de su estado fenológico. Así mismo, el estudio de las isoformas del gen también posee relevancia ya que éstas pueden responder de manera diferencial frente a ciertas condiciones ambientales y en diferentes tejidos. Se han descrito cuatro isoformas de ω -6 lípido desaturasa reticular (*FAD2-1*, *FAD2-2*, *FAD2-3*, *FAD2-4*) y seis de ω -3 lípido desaturasa (*FAD3-1*, *FAD3-2*, *FAD7-1*, *FAD7-2*, *FAD8-1* y *FAD8-2*). En este sentido, en cotiledones, hojas y raíces de algodón y frente a estrés por frío (10 °C) los genes *FAD2-2*, *FAD2-3* y *FAD2-4* variaron en sus niveles de expresión (Kargiotidou *et al.*, 2008). También en algodón, las isoformas de ω -3 lípido desaturasa (*GrFAD8-1* y *GrFAD8-2*) mostraron diferente respuesta en hojas tratadas a 10 °C (Liu *et al.*, 2015). Por otro lado, *FAD2-2* de soja se expresó constitutivamente en semillas, hojas y tallos, mientras que *FAD2-1* mostró niveles más altos de expresión en semillas a 4 °C (Heppard *et al.*, 1996). En particular, los genes *FAD2* se expresan diferencialmente en los distintos tejidos de la planta y su sobreexpresión conduce a un aumento en el contenido de ácidos grasos dienoicos que se traduce en un aumento de la tolerancia a frío (Dar *et al.*, 2017).

Los trabajos previos a esta tesis, relacionados con desaturadas en trigo, han sido desarrollados en su mayoría, sobre *Triticum aestivum*. Así, se caracterizó molecularmente el gen de la ω -3 lípido desaturasa de cloroplasto y se estudió el efecto de luz y oscuridad sobre la composición de ácidos grasos en hojas (Horiguchi *et al.*, 1996). Por otra parte, se caracterizaron molecularmente dos genes SAD (*SAD1* y *SAD2*) (Guo *et al.*, 2011). En relación a estrés por frío; se observaron cambios en la expresión de ω -3 lípido desaturasa en raíces de plantas de trigo creciendo a bajas temperaturas (Horiguchi *et al.*, 2000). Más recientemente, el estudio de la expresión de *FAD2* a bajas temperaturas (6 °C) en dos variedades de trigo pan (uno tolerante y otro susceptible) demostró que este gen se expresó en el genotipo tolerante a niveles superiores que el control a los nueve días de exposición a frío (Golizadeh & Kumleh, 2019). En nuestro conocimiento, en *Triticum turgidum* ssp. *durum*, la bibliografía relacionada con la actividad de las desaturadas comprende aquellas

implicadas en la vía de síntesis de los β -carotenos (Fitoeno y Zeta-caroteno desaturasas) (Schulthess & Schwember, 2013; Cenci *et al.*, 2004).

En este capítulo, se describieron y analizaron los efectos de las bajas temperaturas en plántulas de trigo candeal, en relación al perfil y contenido de ácidos grasos, la permeabilidad de la membrana celular y los niveles de expresión de ω - 6 lípido desaturasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de ácidos grasos

Material vegetal

Se utilizaron tres genotipos de trigo candeal (*Triticum turgidum* ssp. *durum*): BUCK AMBAR (primaveral), CBW 0101 (primaveral) y MVTD 10-98 (invernal). Las semillas fueron sembradas en macetas de 14 cm³ con tierra sin limitaciones de nutrientes ni agua, fertilizadas con fosfato diamónico (PDA) y colocadas en cámara a 22°C y 16/8 hs luz/oscuridad hasta estadio de 2-3 hojas (Z1.2 de la Escala Zadoks, Fig. 2.2). Dos días antes de iniciar el tratamiento de frío, las plantas fueron expuestas a luz continua a baja intensidad (23 $\mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$), medida con un Luxómetro AMPROGE LM631-A.



Figura 2.2. Material vegetal utilizado en experimento de ácidos grasos, conductividad eléctrica y expresión del gen ω -6 lípido desaturasa. **Izquierda:** estadio de 2-3 hojas según esquema de escala Zadoks (Z1.2) **Derecha:** plantas creciendo en cámara de cultivo antes de la toma de muestra.

Toma de muestras

Se colectaron las hojas de plantas creciendo a 22°C (temperatura control) inmediatamente antes de iniciar el descenso de la misma. El diseño comprendió tres plantas por genotipo por maceta y se tomó material de más de una planta para la obtención de tres muestras por genotipo (tres réplicas biológicas). El tratamiento consistió en la aplicación de una rampa de descenso de temperatura desde 22°C a 4°C (1°C.h⁻¹). Las muestras fueron

tomadas luego de transcurridas 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4°C e inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta la extracción de los lípidos.

Extracción y metanólisis alcalina con KOH/MeOH de lípidos totales. Cuantificación de ácidos grasos.

Los lípidos totales fueron extraídos con una solución metanol/cloroformo (2:1, v/v) y posterior adición de KCl (1 %, w/v) siguiendo el protocolo previamente descrito por Bligh & Dyer (1959) con algunas modificaciones (Protocolo en ANEXO). Luego se adicionó 1 ml de n-hexano al 99 % y posteriormente los lípidos fueron transesterificados con KOH en metanol, método alternativo de AOCS Oficial Método Ce 2-66 en metanol (AOCS Oficial Método Ce 2-66 en metanol, 2009) (Fig. 2.3). El metanol del KOH/MeOH incorpora el grupo metilo de los ácidos grasos para la formación de metilésteres (los ácidos grasos libres no son esterificados por el KOH). Los metilésteres de ácidos grasos fueron analizados y cuantificados utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A, equipado con una columna SP2380 (30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno, 0.2 µm de espesor de film) y un detector de ionización de llama (FID) facilitado por el Área de Ingeniería en Alimentos del Instituto PLAPIQUI (Planta Piloto de Ingeniería Química), CCT (Centro Científico Tecnológico), Bahía Blanca. Estos análisis se realizaron con la colaboración y asistencia de la Dra. Amalia Carelli y el Dr. Federico Delucchi, de dicho instituto. Para lograr la mayor separación de los picos de ácidos grasos y sus isómeros se utilizó una solución estándar compuesta por una mezcla de 37 metilésteres de ácidos grasos denominado "Supelco 37 component FAME Mix, CRM47885". El análisis en el cromatógrafo se realizó por duplicado sobre cada muestra (réplicas metodológicas).

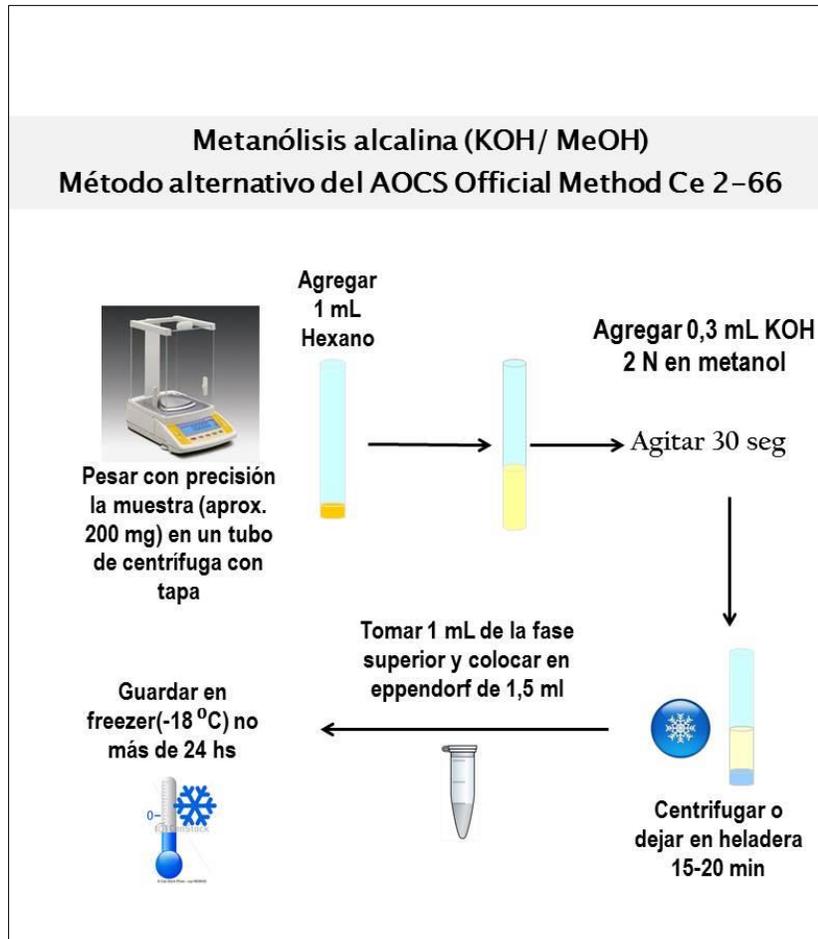


Figura 2.3. Protocolo de Metanólisis alcalina (KOH/MeOH) Método Alternativo del AOCS Official Method Ce2-66.

Expresión del gen ω -6 lípido desaturasa (FAD2)

Se colectaron las hojas de plantas creciendo a 22°C (temperatura control) (Fig. 2.2) inmediatamente antes de iniciar el descenso de la misma. El diseño comprendió tres plantas por genotipo (réplicas biológicas). El tratamiento consistió en la aplicación de una rampa de descenso de temperatura desde 22°C a 4°C (1°C/h). Las muestras fueron tomadas luego de transcurridas 24, 72 y 144 horas a 4°C e inmediatamente sumergidas en nitrógeno líquido y permanecieron a -80°C hasta la extracción de ARN total.

La extracción de ARN total se realizó a partir de 30 mg de hojas utilizando el kit SV Total RNA Isolation System (PROMEGA, USA) y se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop DS-11 (DeNovix inc., USA). A partir de una solución de ARN de 100 ng.µl⁻¹, se sintetizó la

primera hebra de ADNc utilizando el kit Revert-Aid M-MuLV Reverse Transcriptase (Thermo Scientific).

El nivel de expresión relativa del gen *FAD2* fue determinado mediante la técnica de PCR en Tiempo Real (qRT-PCR). Para la reacción de PCR, se probaron las diluciones de ADNc: 1:10, 1:100 y 1:300, resultando óptima la segunda (1:100). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 15 μ l utilizando una Master Mix (Biodynamics, Argentina) que incluye el agente intercalante SYBER Green. Se agregaron 5 μ l de ADNc (dilución 1:100) y los siguientes iniciadores: Forward: 5' –CCTACGGCCCGATCTACAA-3', Reverse: 5' –GACGACACGAGCTTCAACAA-3' (concentración: 10 μ M). La secuencia del gen *FAD2* es la obtenida en el CAPÍTULO 1 (*Td-FAD2*). El diseño de los cebadores tuvo en cuenta la amplificación de todas las copias funcionales (isoformas) de este gen para la especie *Triticum turgidum ssp. durum*.

Para la amplificación se utilizó el ciclador Rotor-Gene (Qiagen) con el siguiente programa: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C por 15 seg, 50°C por 20 seg, 72°C por 30 seg, seguido por un paso final a 72°C por 5 min. Con las tres réplicas biológicas por tratamiento se realizó un pool de ADNc y se amplificó por triplicado. Para la cuantificación de la expresión relativa se utilizó el gen de referencia *β -actin* (ACTINA) (AK362208) utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) y los siguientes iniciadores: Forward: 5' –ATGTGGATATCAGGAAGGA-3' y Reverse: 5' –CTCATACGGTCAGCAATAC-3' (concentración: 10 μ M).

Análisis de integridad de la membrana

Se determinó el daño causado por frío sobre la membrana celular a través de la medición de cambios en la conductividad eléctrica (CE) según Pra's'il & Jir'i' Za'mec'ni'k (1998) con algunas modificaciones. Plántulas en estadio de 2-3 hojas (Fig. 2.2) fueron expuestas a una rampa desde 22°C a 2°C (1°C/h) y mantenidas a esta temperatura por 24 hs con el objetivo de aclimatarlas antes del tratamiento con temperaturas bajo cero. Luego las hojas fueron lavadas tres veces con agua destilada y posteriormente cortadas en segmentos de 1 cm de largo, los que fueron colocados en tubos cónicos tipo Falcon de 15 ml (0,25 gr por muestra). Las muestras control (C) consistieron en un set de tubos por genotipo (tres réplicas biológicas) mantenidos a 2 °C durante 12 hs. El primer tratamiento consistió en un set de tubos expuestos a una rampa de temperatura desde 2°C (1°C/h) hasta -4 °C donde permanecieron por 12 horas. En el segundo tratamiento se expusieron a la misma rampa y se transfirieron a -13 °C por 12 horas. En todos los casos los tubos se mantuvieron en condiciones de oscuridad. Al finalizar los tiempos definidos, se adicionaron 15 ml de agua

destilada a cada tubo y se colocaron en agitación a 150 rpm durante 5 hs. Luego, se midió la CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) con un conductímetro ORION 5 STAR Thermo Electron Corporation, en muestras control (CE_0) y tratadas (CE_t). Finalmente, todos los tubos fueron transferidos a -70°C durante 24 hs para lograr la fuga máxima de electrolitos (CE_f). En todos los casos, las mediciones se realizaron cuando la solución alcanzó la temperatura ambiente. La fuga de electrolitos fue calculada utilizando los siguientes índices:

$$\text{-REL (\%)} = (\text{CE}_{t/0}/\text{CE}_f) * 100$$

$$\text{-EL (\%)} = (\text{CE}_t - \text{CE}_0)/(\text{CE}_f - \text{CE}_0) * 100$$

El índice EL sustrae el efecto de la condición control (CE_0) a la conductividad del tejido tratado (CE_t) y a la conductividad máxima (CE_f).

Análisis estadístico

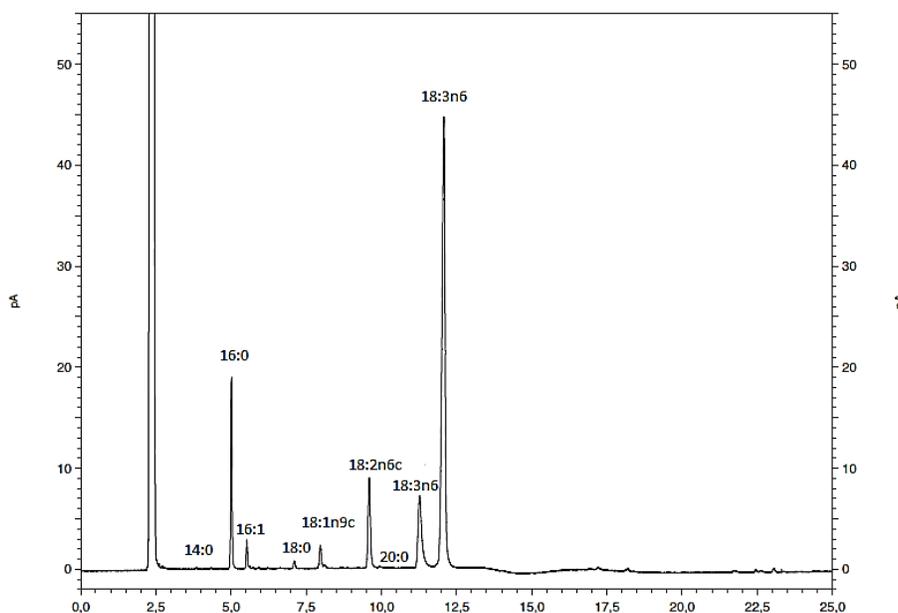
Las diferencias entre genotipos y tratamientos para las variables: *contenido de ácidos grasos, conductividad eléctrica y expresión relativa del gen FAD2*, fueron evaluadas a partir de un Análisis de la Varianza (ANOVA) de dos factores con un diseño completamente aleatorizado. La comparación entre los valores medios se realizó mediante el test de Fisher (LSD). Este análisis se llevó a cabo utilizando el programa Infostat versión 2019 (Di Rienzo *et al.*, 2019).

En el caso de *contenido de ácidos grasos*, para cumplir los supuestos de normalidad y homocedasticidad; fue necesaria la transformación de la variable, usando logaritmo decimal.

RESULTADOS

Composición de ácidos grasos en hojas de trigo candeal

La Figura 2.4 muestra una salida del cromatógrafo de gases con el contenido y composición de ácidos grasos en hojas de trigo candeal no tratadas. Se detectaron cadenas de 14 a 20 carbonos.



Pico	Tiempo de retención	Área	Área (%)	Nombre
1	4,367	6557	0,17	C14:0
2	5,035	424197	11,16	C16:0
3	5,620	71913	1,89	C16:1
4	7,123	22792	0,6	C18:0
5	7,994	92061	2,42	C18:1n9
6	9,625	362132	9,53	C18:2n6
7	10,987	2408	0,06	C20:0
8	11,298	450297	11,85	C18:3n6
9	12,11	2367098	62,3	C18:3n3
Total		3799455	100	

Figura 2.4. Cromatografía gaseosa de metilésteres de ácidos grasos extraídos de hojas de trigo candeal correspondiente a una muestra de CBW 0101 de plantas no tratadas (22 °C). Arriba: eje Y en picoampere (pA), unidad de medida del detector de ionización del cromatógrafo; en el eje X el tiempo de retención. El primer pico corresponde a la liberación del hexano. Abajo: información adicional correspondiente a cada pico de AG del gráfico.

En la Figura 2.5 se muestra el perfil de ácidos grasos de las plantas no tratadas de los tres genotipos. Los AG considerados fueron los que superaron el contenido relativo de 0,40 %: ácido palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), alfa-linolénico (18:3 n-3) y gamma-linolénico (18:3 n-6), todos en su configuración *cis*. Se excluyeron los ácidos mirístico 14:0 y araquídico 20:0. Para los fines de este estudio, los valores de los isómeros n-3 y n-6 de 18:3 se unificaron.

El contenido de ácidos grasos insaturados promedio fue de 88,1 %, mientras que el de saturados 11,8 %. El ácido graso más abundante fue el linolénico 18:3 con valores superiores al 70 %. Los ácidos, palmítico 16:0 y linoleico 18:2, presentaron valores alrededor del 10 % y los ácidos palmitoleico 16:1, esteárico 18:0 y oleico 18:1 valores inferiores al 3 % (Fig. 2.5). Estas tendencias se observaron en todos los genotipos analizados.

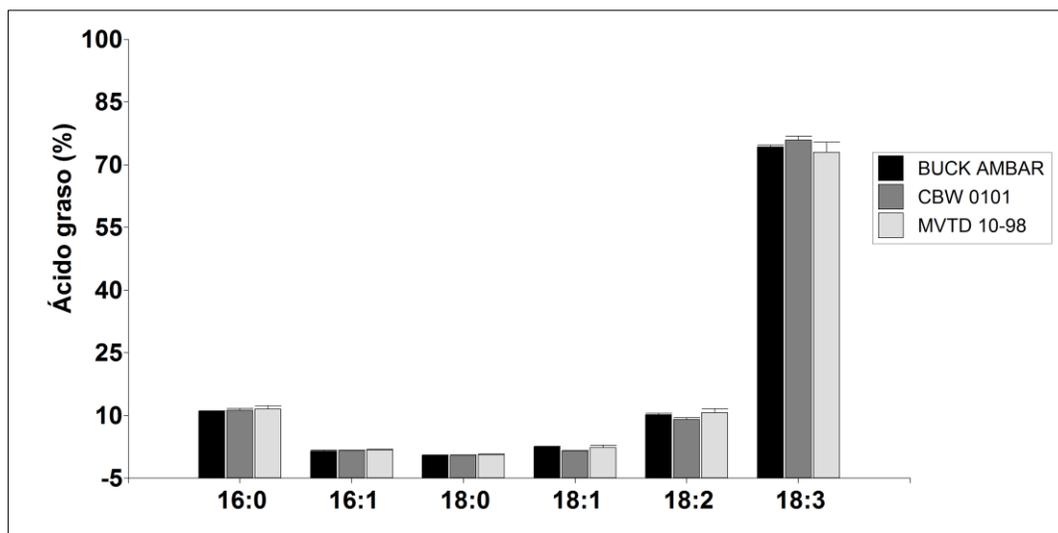


Figura 2.5. Valores promedio de ácidos grasos (16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3) de los genotipos B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 en las plantas control.

La Tabla 2.1 muestra los valores obtenidos del análisis de ácidos grasos en las muestras control y los tratamientos con frío en los tres genotipos de trigo candeal.

Tabla 2.1. Contenido de ácidos grasos (%) en hojas de trigo candeal de plantas control a 22 °C (0 horas) y tratadas a 4 °C (8, 24, 48, 72 y 144 horas). Los valores son los promedios \pm SD (desvío estándar) de tres réplicas biológicas.

GENOTIPOS	AG	Tiempo a 4 °C (horas)					
		0	8	24	48	72	144
BUCK AMBAR	C16:0	11.05 \pm 0.14	13.26 \pm 0.39	11.62 \pm 0.84	10.15 \pm 1.64	11.51 \pm 0.56	11.59 \pm 1.49
	C16:1	1.5 \pm 0.36	1.24 \pm 0.3	1.14 \pm 0.05	1.18 \pm 0.22	1.43 \pm 0.13	1.17 \pm 0.3
	C18:0	0.51 \pm 0.11	3.66 \pm 0.22	0.5 \pm 0.04	0.43 \pm 0.03	0.45 \pm 0.03	1.41 \pm 0.26
	C18:1	2.47 \pm 0.28	2.92 \pm 0.03	3.03 \pm 0.41	2.8 \pm 0.5	3.18 \pm 0.2	2.14 \pm 0.23
	C18:2	10.16 \pm 0.71	11 \pm 1.47	10.4 \pm 0.77	9.59 \pm 0.93	11.06 \pm 0.69	9.85 \pm 0.98
	C18:3	74.25 \pm 0.75	67.62 \pm 1.63	73.2 \pm 2.07	75.77 \pm 2.73	72.32 \pm 1.24	73.68 \pm 2.7
CBW 0101	C16:0	11.24 \pm 0.77	13.01 \pm 0.74	10.47 \pm 0.62	10.97 \pm 1.03	12.06 \pm 0.2	11.84 \pm 1.25
	C16:1	1.62 \pm 0.17	1.43 \pm 0.37	1.26 \pm 0.27	1.29 \pm 0.29	1.65 \pm 0.15	1.3 \pm 0.37
	C18:0	0.5 \pm 0.07	3.28 \pm 0.61	0.43 \pm 0.03	0.46 \pm 0.04	1.77 \pm 0.06	1.55 \pm 0.47
	C18:1	1.55 \pm 0.12	1.95 \pm 0.38	2.09 \pm 0.1	2.59 \pm 0.2	2.8 \pm 0.17	2.47 \pm 0.14
	C18:2	9.06 \pm 0.72	8.88 \pm 0.37	8.36 \pm 0.33	10.21 \pm 0.38	10 \pm 0.56	10.68 \pm 0.67
	C18:3	75.91 \pm 1.59	71.29 \pm 1.9	77.3 \pm 0.59	74.36 \pm 1.42	71.6 \pm 0.74	72.03 \pm 2.43
MVTD 10-98	C16:0	11.51 \pm 1.42	12.71 \pm 0.91	10.75 \pm 2.37	10.34 \pm 1.06	10.87 \pm 1.24	13.14 \pm 1.12
	C16:1	1.74 \pm 0.23	1.25 \pm 0.27	1.39 \pm 0.11	1.35 \pm 0.13	1.9 \pm 0.24	0.97 \pm 0.37
	C18:0	0.6 \pm 0.25	3.29 \pm 0.98	0.61 \pm 0.13	0.45 \pm 0.04	0.46 \pm 0.01	2.27 \pm 0.71
	C18:1	2.37 \pm 0.99	2.67 \pm 0.36	2.82 \pm 0.42	3.02 \pm 0.65	3.03 \pm 0.5	3.69 \pm 1.01
	C18:2	10.67 \pm 1.65	9.96 \pm 1.09	10.85 \pm 2.75	10.31 \pm 1.2	11.08 \pm 1.06	12.87 \pm 2.12
	C18:3	73 \pm 4.23	69.94 \pm 2.34	73.49 \pm 5.58	74.44 \pm 2.7	72.6 \pm 2.56	66.79 \pm 4.55

En la Figura 2.6 se muestra el perfil completo de AG de BUCK AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 en muestras control y tratadas.

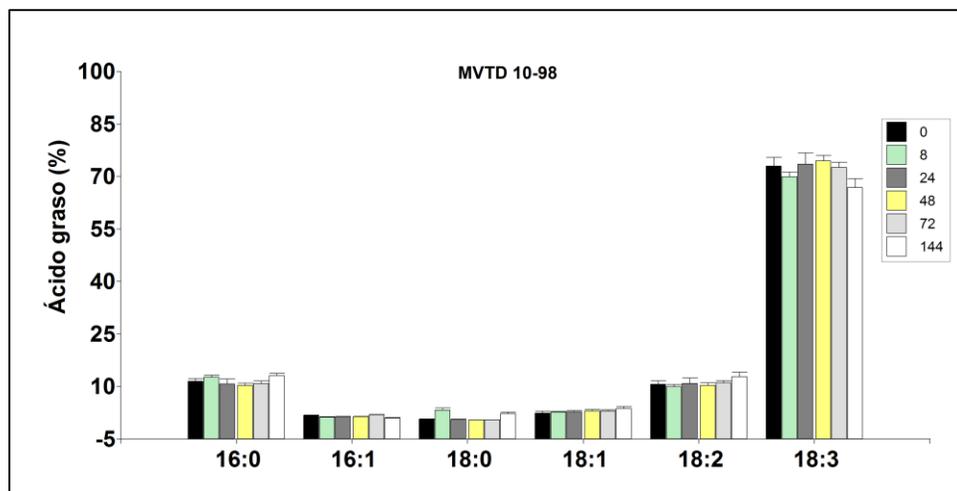
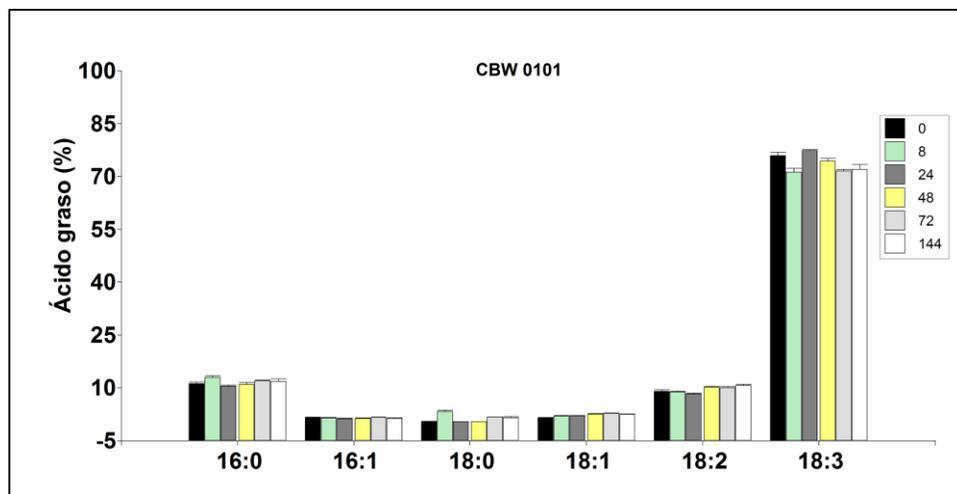
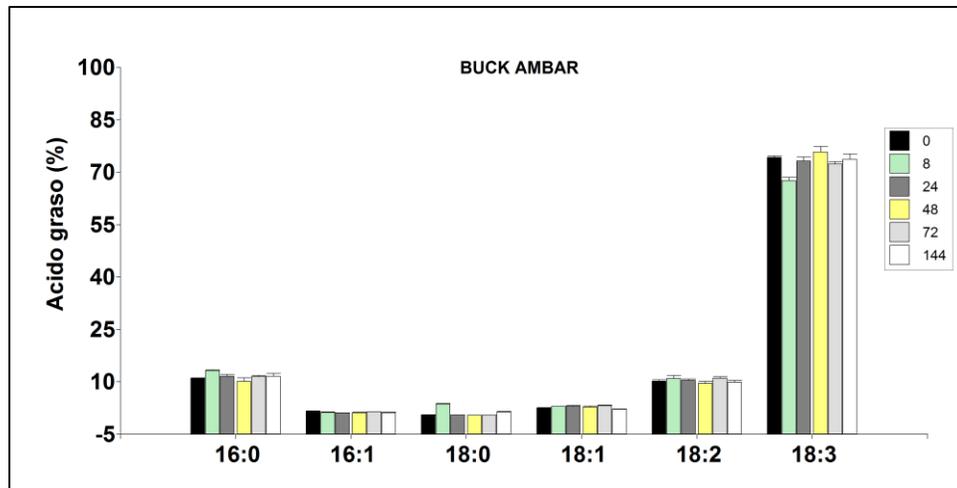


Figura 2.6. Valores promedio de ácidos grasos (16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 18:2 y 18:3) de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 0, 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C.

Los resultados del análisis de la varianza mostraron diferencias significativas entre tratamientos para todos los AG excepto 18:2, y entre genotipos en los AG 18:0, 18:1 y 18:2 (Tabla A2.1; ANEXO). Teniendo en cuenta la presencia de interacciones significativas y el interés particular de analizar el comportamiento de cada genotipo a lo largo del tratamiento, se decidió realizar ANOVA individuales para cada AG en cada genotipo.

En todos los genotipos, los niveles del AG 16:0 a las 8 horas a 4°C se incrementaron y posteriormente, a las 24 hs descendieron respecto del tiempo anterior, siendo significativo ($p < 0,05$) en CBW 0101 y MVTD 10-98. A las 72 y 144 hs se observa una recuperación superando en todos los casos (aunque no estadísticamente significativo) el valor inicial (control) (Fig. 2.7).

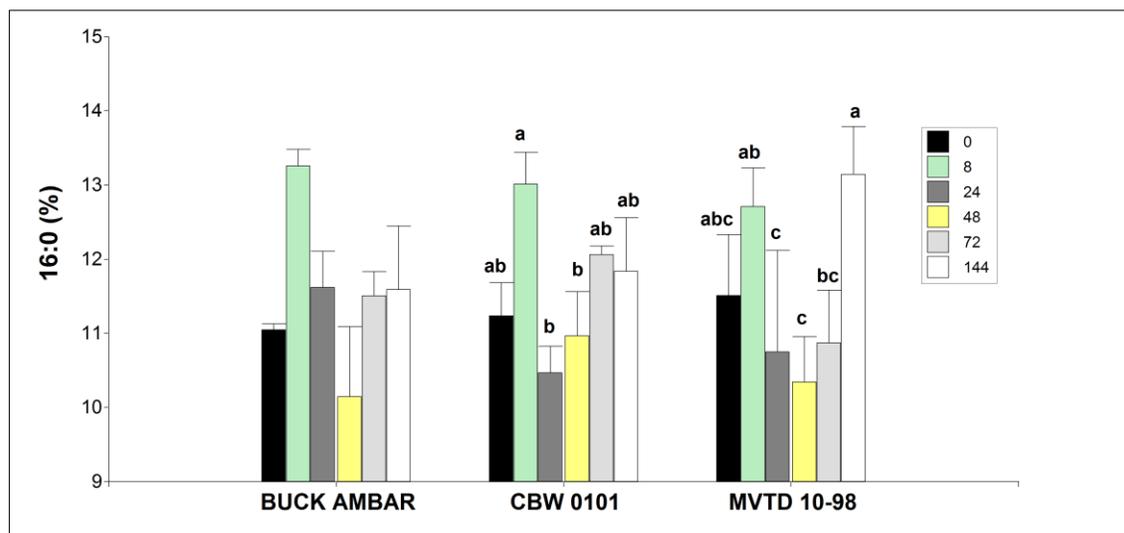


Figura 2.7. Valores promedio del contenido de 16:0 de B. AMBAR, MVTD 10-98, CBW 0101 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

En relación a 18:0, los tres genotipos presentaron similares valores promedio entre las 0 y las 48 horas incluyendo un pico pronunciado a las 8 horas y un descenso a valores basales a las 24 hs. Hacia el final del período de exposición a frío (144 hs) la respuesta en todos los genotipos fue incrementar significativamente ($p < 0,0001$) el nivel de 18:0 aunque en el caso de CBW 0101, ese incremento ocurrió más tempranamente (72 hs) (Fig. 2.8).

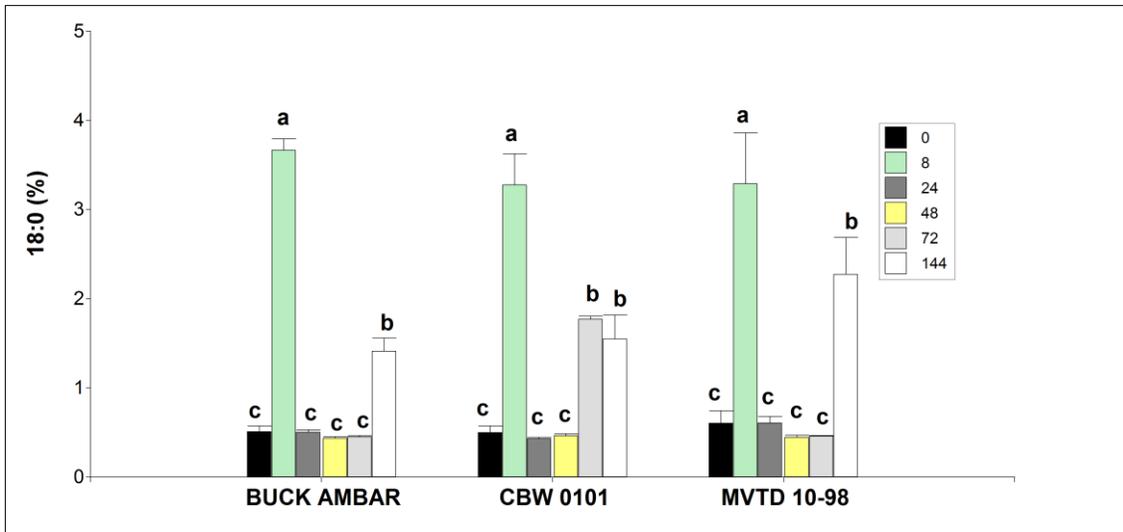


Figura 2.8. Valores promedio del contenido de 18:0 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

Los niveles del AG 16:1 fueron menores en comparación con el AG saturado 16:0 en todos los genotipos (Fig. 2.6). No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición a frío, excepto en MVTD 10-98 a las 144 hs donde el valor descendió significativamente ($p < 0,01$) con respecto a los tiempos anteriores (Fig. 2.10). Cabe señalar que los tres genotipos incrementaron consistentemente (aunque no estadísticamente significativo) el nivel de 16:1 a las 72 hs, presentando el genotipo invernal el valor máximo (Fig. 2.9).

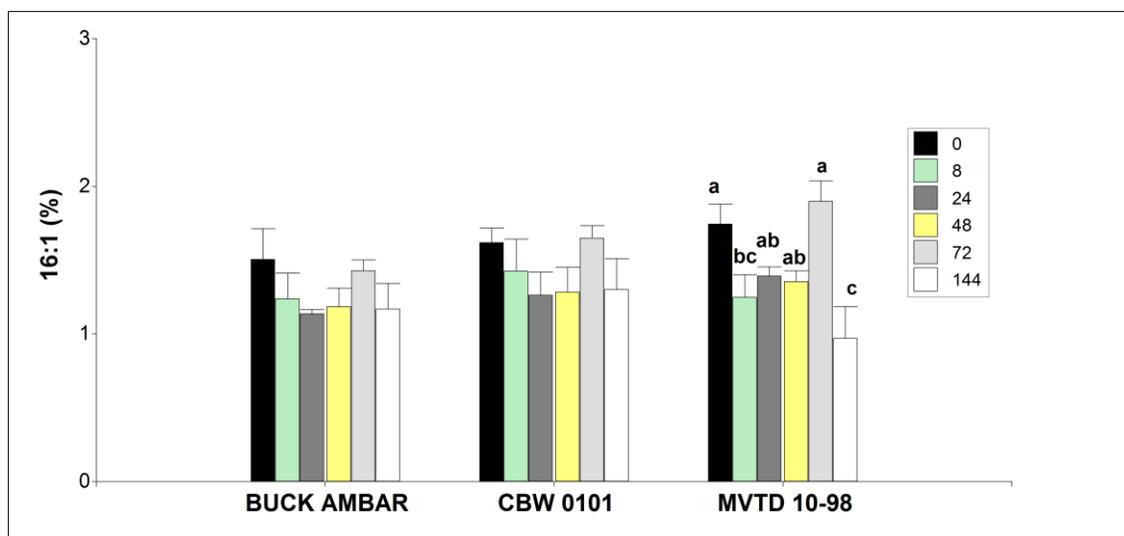


Figura 2.9. Valores promedio del contenido de 16:1 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

En relación a 18:1, CBW 0101 mostró valores significativamente mayores ($p < 0,001$) que el control en los tratamientos de 24, 48, 72 y 144 hs. En el caso de B. AMBAR solo se observó una disminución significativa ($p < 0,01$) del contenido de 18:1 a las 144 hs en relación a los tratamientos de 8, 24 y 72 hs. Por otra parte, en MVTD 10-98 los niveles de 18:1 aumentaron desde la condición control hasta el final de tratamiento, con diferencias significativas en relación al control a partir de las 48 hs (Fig. 2.10).

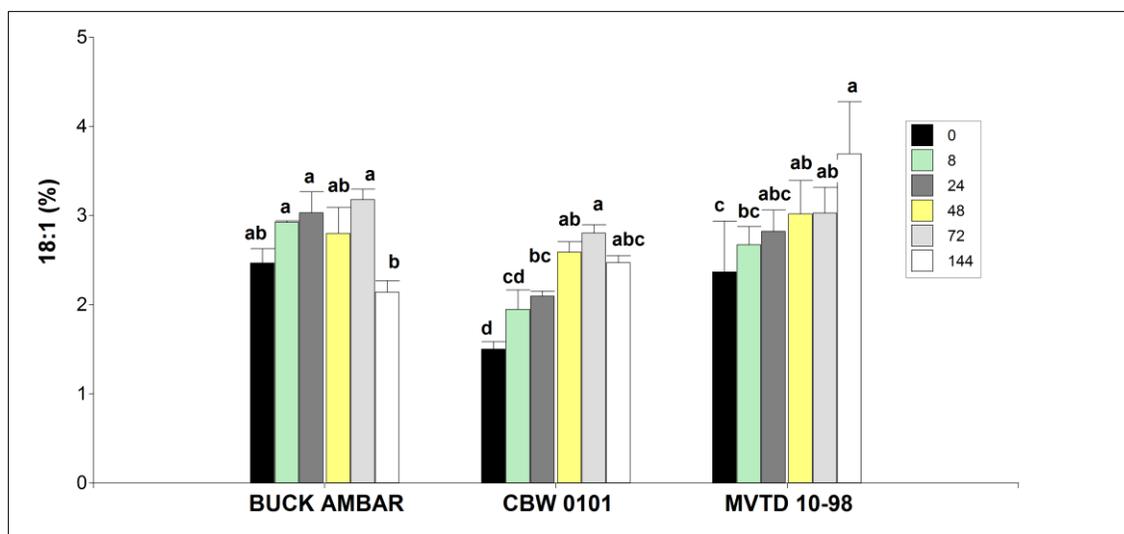


Figura 2.10. Valores promedio del contenido de 18:1 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

Con respecto a 18:2, se observó que el contenido fue mayor que 18:0 y 18:1 para todos los genotipos analizados (Fig. 2.6). En CBW 0101, la exposición a frío causó un incremento significativo ($p < 0,01$) desde las 48 hs que se mantuvo hasta el final. El genotipo MVTD 10-98 mostró una tendencia similar, aunque no resultó significativa. Por otro lado, en B. AMBAR el frío no provocó variaciones significativas en el nivel de 18:2 (Fig. 2.11).

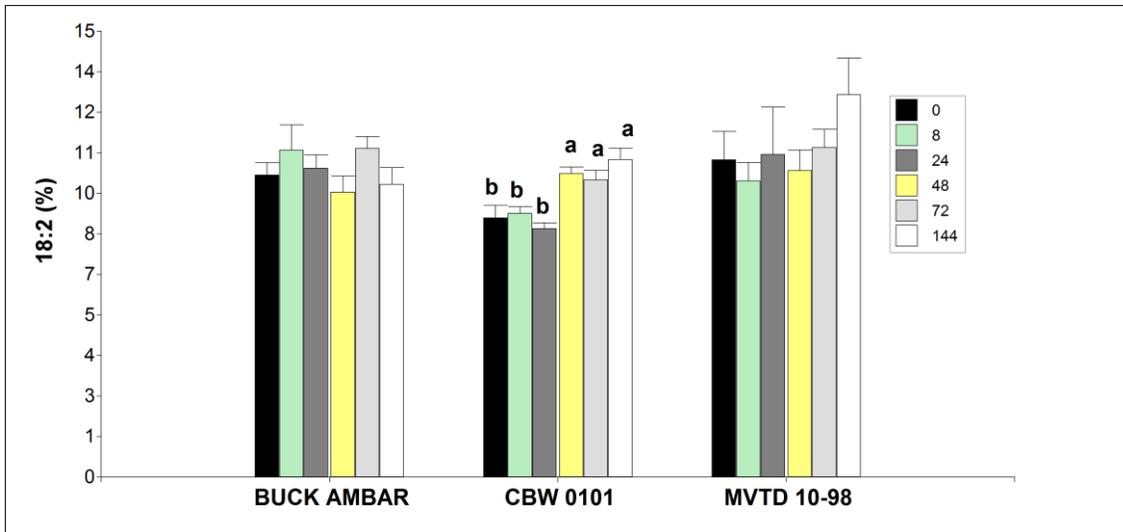


Figura 2.11. Valores promedio del contenido de 18:2 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.

El AG 18:3 fue el más abundante en todas las condiciones y genotipos (Fig. 2.6). En los tres genotipos, se observó un descenso (significativo en B. AMBAR y CBW 0101, $p < 0,01$) al someter las plantas a frío durante 8 hs respecto de las plantas no tratadas (Fig. 2.12). Luego, la tendencia fue incrementar los valores desde las 24 a las 48 hs hasta valores cercanos al control y posteriormente, descendiendo con las exposiciones más prolongadas (72 y 144 hs) (Fig. 2.12).

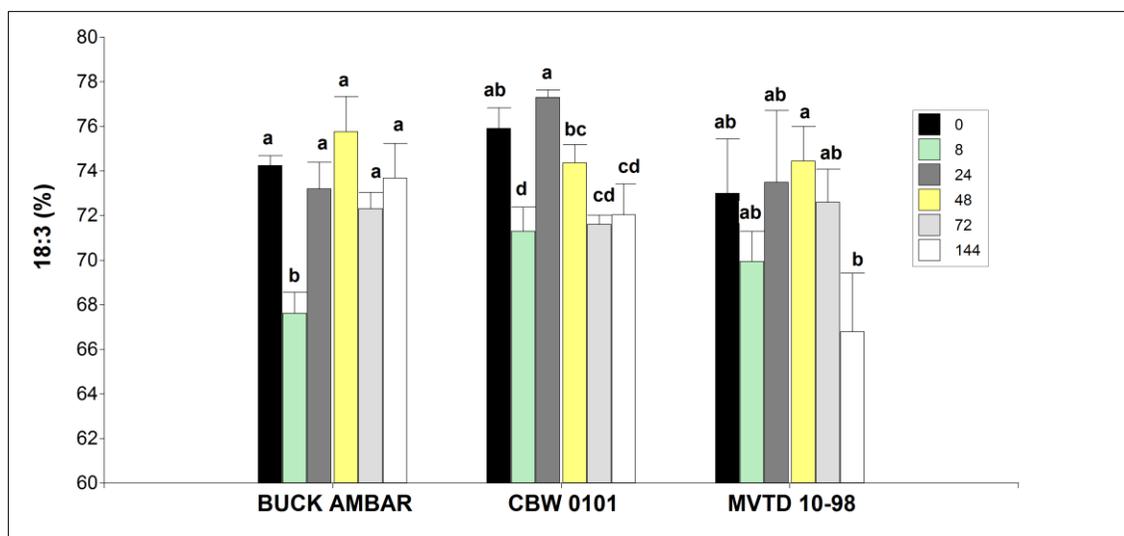


Figura 2.12. Valores promedio del contenido de 18:3 de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (0 horas) y 8, 24, 48, 72 y 144 horas a 4 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La variación entre réplicas de genotipos se indica mediante la barra de error estándar.

Efecto de la exposición a frío sobre la expresión del gen FAD2 en hojas de trigo candeal

Los resultados del análisis de la varianza para la expresión del gen *FAD2* (expresión relativa) en hojas de plántulas tratadas a 4°C durante 24, 72 y 144 horas, reveló diferencias significativas entre tratamientos, genotipos e interacción genotipo tratamientos (Tabla A2.4; ANEXO). El análisis de esta variable consistió en la comparación de medias entre tratamientos.

Durante 24 hs de exposición a frío, la respuesta fue distinta entre los genotipos primaverales (B. AMBAR y CBW 0101) y el invernal (MVTD 10-98). En los primaverales se incrementó significativamente ($p < 0,0001$) el nivel de expresión, de 0,98 a 3,11 en B. AMBAR y de 1,00 a 1,52 en CBW 0101, mientras que en el genotipo invernal disminuyó significativamente de 1,00 a 0,24 ($p < 0,0001$) (Fig. 2.13). A las 72 horas, los promedios de ambos genotipos primaverales disminuyeron en comparación con la condición anterior, siendo 0,77 y 0,66 en B. AMBAR y CBW 0101, respectivamente. En cambio, en MVTD 10-98 en la misma condición, el nivel de expresión aumentó de 0,24 a 0,69 (Fig. 2.13). Finalmente, a las 144 horas, aumentaron los valores promedio de todos los genotipos en relación al tratamiento anterior, siendo: 1,77 en B. AMBAR, 1,52 en CBW 0101 y 1,24 en el invernal (Fig. 2.13).

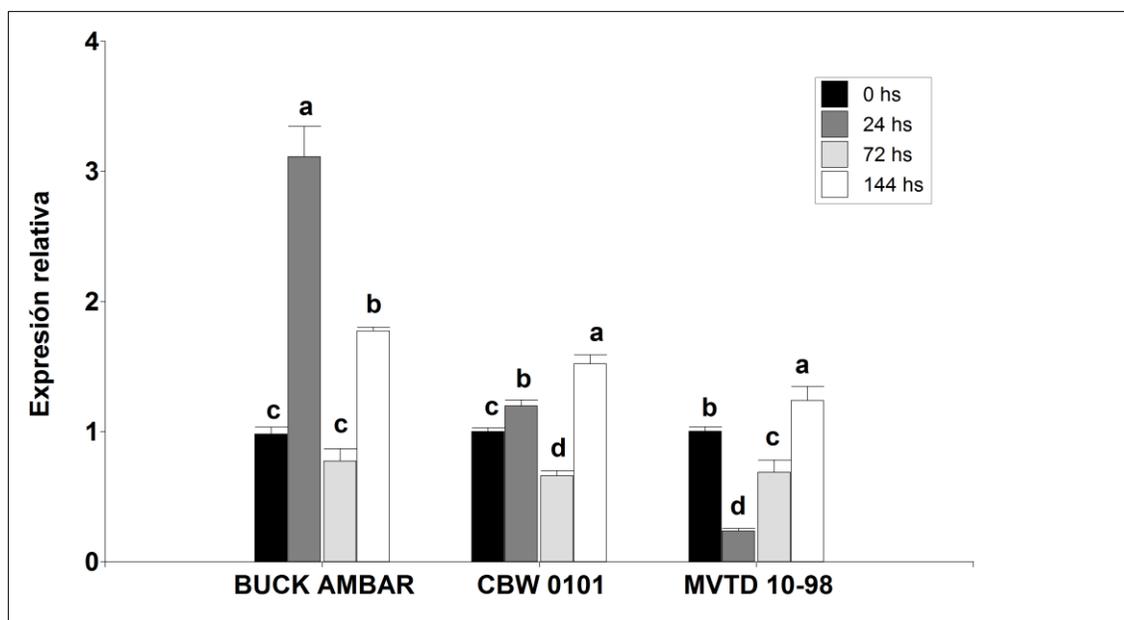


Figura 2.13. Expresión relativa de *FAD2* en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 a 22 °C (control) y a las 24, 72 y 144 horas de exposición a 4 °C. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). Las letras indican diferencias entre tratamientos dentro de cada genotipo. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.

Daño en la membrana celular

Para evaluar el daño causado por la exposición a las bajas temperaturas en la membrana celular de hojas, se consideraron tres condiciones: 12 hs a 2 °C (control), 12 hs a -4 °C y 12 hs a -13 °C. Los resultados fueron expresados como REL (Relative Electrolyte Leakage) y EL (Electrolyte Leakage). Los resultados del análisis de la varianza mostraron diferencias significativas entre genotipos, entre tratamientos e interacción genotipo-tratamiento significativa en ambas variables (REL y EL) (Tabla A2.2 - A2.3; ANEXO).

En la variable REL, se analizó la comparación de medias entre tratamientos. A las 12 hs a -4 °C, los genotipos MVTD 10-98 y CBW 0101 mantuvieron los valores de REL observados en la temperatura control, mientras que B. AMBAR lo incrementó significativamente ($p < 0,0001$) (Fig. 2.14). A -13 °C los valores resultaron muy cercanos a los correspondientes a la liberación máxima de electrolitos variando entre 87,4 y 92,18 % y fueron significativamente más altos ($p < 0,0001$) que en las condiciones previas (Fig. 2.14).

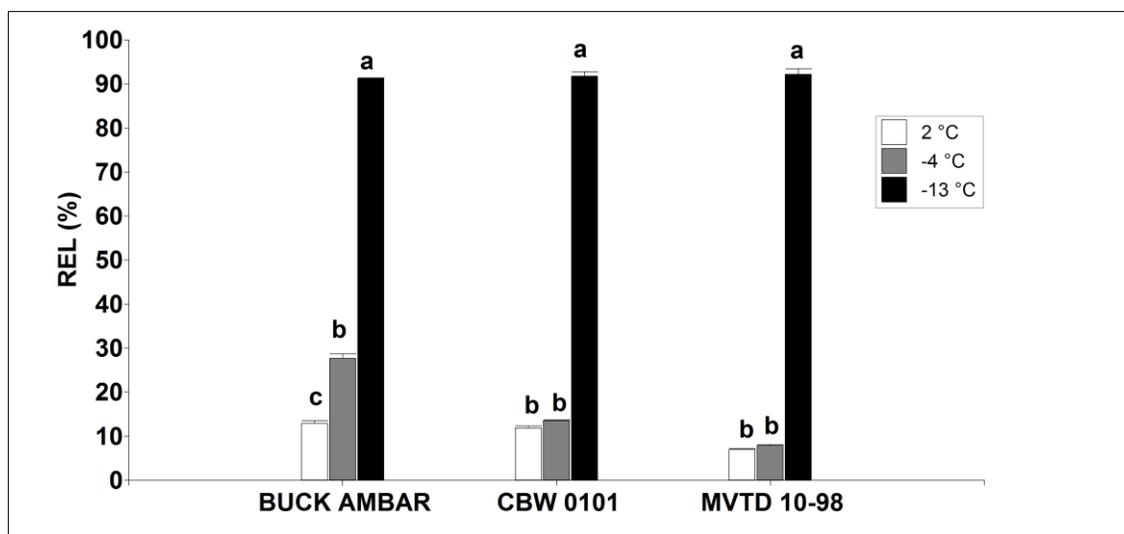


Figura 2.14. Conductividad eléctrica (REL) en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98 luego de 12 horas de exposición a 2 °C (CONTROL), -4 y -13 °C. Las letras corresponden a comparaciones entre tratamientos. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.

A diferencia de REL, en la variable EL se analizó la comparación entre genotipos. En el tratamiento de -4 °C las diferencias de EL entre genotipos fueron altamente significativas ($p < 0,0001$), siendo MVTD 10-98 (1,33 %) y CBW 0101 (2,61 %) menores que B. AMBAR (15,74 %) (Fig. 2.15). Las diferencias entre MVTD 10-98 y CBW 0101 no resultaron significativas. A la temperatura -13 °C, no se detectaron diferencias significativas entre genotipos presentando valores de EL muy similares, cercanos al 90 % (Fig. 2.16).

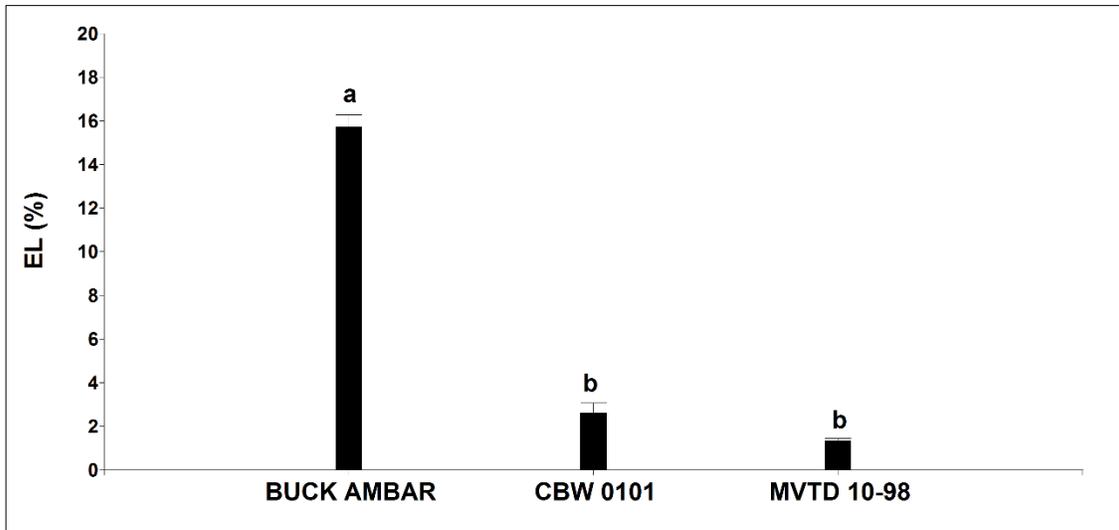


Figura 2.15. Conductividad eléctrica (EL) en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98. Los valores medios corresponden a EL a las 12 horas de exposición -4 °C. Promedio con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). Las letras indican diferencias entre genotipos. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.

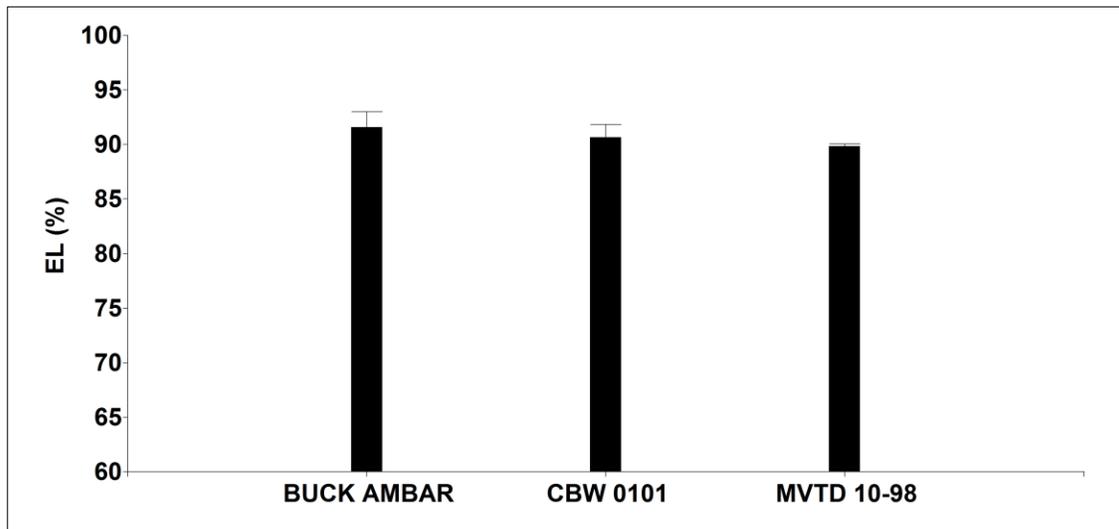


Figura 2.16. Conductividad eléctrica (EL) en hojas de B. AMBAR, CBW 0101 y MVTD 10-98. Los valores medios corresponden a EL a las 12 hs de exposición -13 °C. La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre genotipos. La variación entre réplicas se indica mediante la barra de error estándar.

DISCUSIÓN

Los ácidos grasos han sido estudiados en diferentes especies de plantas y condiciones. Un especial interés poseen los ω_9 , ω_6 y ω_3 en oleaginosas por el rol que cumplen en la dieta de seres humanos y animales. Por otro lado, numerosos autores han estudiado la importancia que poseen los PUFA en la tolerancia a estreses abióticos en plantas, tales como salinidad (Bybordi *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012; Yeilaghi *et al.*, 2012; Ebrahimian & Bybordi, 2012; Mansour *et al.*, 2015), temperaturas extremas (Heppard *et al.*, 1996; Dias *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2018; De Palma *et al.*, 2008; Nejadsadeghi *et al.*, 2015) y sequía (Dakhma *et al.*, 1995; Torres-Franklin *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2011; Klinkenberg *et al.*, 2014).

En esta tesis se obtuvieron los perfiles completos de ácidos grasos en hojas de tres genotipos de *Triticum turgidum* ssp. *durum*; dos primaverales (BUCK AMBAR y CBW 0101) y uno invernal (MVTD 10-98), siendo AG palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3 n-3 y n-6), los mayoritarios. Los perfiles obtenidos poseen elevado contenido de ácidos grasos de 18 átomos de carbono, principalmente de 18:3 (alrededor del 70 %) con ausencia de 16:2 y 16:3, coincidente con los obtenidos en hojas de soja (Román *et al.*, 2012), arabidopsis (Matsuda *et al.*, 2005), lino (Rajwade *et al.*, 2014), arroz (Abe *et al.*, 2018) y trigo (Kan, 2015; Nejadsadeghi *et al.*, 2015). En concordancia con la Hipótesis 1, se observaron cambios en la composición de los ácidos grasos en todos los genotipos, generados por los distintos períodos de exposición a 4 °C. En la respuesta del contenido de AG de 16 carbonos, se detectaron incrementos del AG insaturado 16:0 (muy marcado a las 8 hs) mientras que el producto del primer paso de insaturación, el AG 16:1, se mantuvo estable y aún disminuyó. Por su parte el AG insaturado 18:0 mostró incrementos a las 8 y 72-144 hs. Estos resultados podrían interpretarse como que la vía de síntesis de 18:0 (elongación desde 16:0) es favorecida en comparación con la insaturación de 16:0 (Shanklin & Cahoon, 1998).

En general, los tres genotipos mostraron una respuesta bastante homogénea en los perfiles de AG de 16 átomos de carbono. Fue en los casos de AG de 18 carbonos donde los genotipos respondieron más diferencialmente al tratamiento de frío (Fig. 2.10; 2.11; 2.12). De un análisis simultáneo de los perfiles de 18:0 y 18:1 se observa que durante la exposición a frío hasta las 48 hs, la disminución de los niveles de 18:0 ocurre al mismo tiempo que el aumento de 18:1 lo que puede interpretarse como una activación del proceso de insaturación de 18:0. Por otro lado, los niveles de 18:1 aumentaron ante la exposición a frío de forma similar en los tres genotipos hasta las 24 hs. A partir de las 48 hs la respuesta de los genotipos fue

diferente, observando una disminución significativa de 18:1 en B. AMBAR hasta valores menores que el control, y valores superiores al control en MVTD 10-98 y CBW 0101.

Cambios correlacionados se observaron entre los contenidos de AG 18:1 y 18:2 en CBW 0101 y MVTD 10-98 donde el incremento de 18:1 fue acompañado de un aumento de la síntesis del AG con el grado de insaturación siguiente, aunque los cambios del contenido de 18:2 en el genotipo invernal no fueron significativos, debido probablemente al error estándar. Tomadas en conjunto, las observaciones de 18:1 y 18:2 representan casos de respuesta diferencial a bajas temperaturas (4 °C), donde los genotipos más tolerantes CBW 0101 y MVTD 10-98 pudieron aumentar su contenido relativo de ácidos grasos insaturados. Altos niveles de ácido linoleico 18:2 han sido asociados con aumento de la tolerancia a frío en papa (Vega *et al.*, 2004), algodón (Kargiotidou *et al.*, 2008) y arroz (Bertin *et al.*, 1998). Al iniciar el tratamiento de bajas temperaturas, la respuesta del AG 18:3 fue la inmediata disminución de sus niveles en todos los genotipos con una recuperación a valores cercanos al control a las 24 horas, resultados que coinciden con los obtenidos en hojas de soja (Román *et al.*, 2012). Aumentos en los niveles de linoleico 18:2 desde las 48 hs en MVTD 10-98 y CBW 0101 ocurrieron conjuntamente con disminuciones en el contenido de linolénico 18:3 en el mismo período. Estos resultados parecen sugerir que en la respuesta a frío el proceso de insaturación de 18:2 a 18:3 ocurre a menor velocidad o no es favorecido. En este contexto, en plantas transgénicas de arroz en las que se ha introducido el gen ω -3 lípido desaturasa (*FAD7*) de *A. thaliana*, el incremento de la tolerancia observada en el fenotipo fue menor al esperado, sugiriendo que el efecto del AG 18:3 sobre la tolerancia a bajas temperaturas podría limitarse a determinadas especies, tejidos o estados de desarrollo (Iba, 2002).

Para interpretar las diferencias en el contenido de ácido linoleico (18:2) en diferentes tiempos de exposición a frío, se analizó la expresión del gen ω -6 lípido desaturasa (*FAD2*), que participa en la conversión de 18:1 a 18:2. El nivel de transcritos de *FAD2* observado en la condición control en hojas de trigo candeal, muestra que el gen se expresa constitutivamente (Fig. 2.13). Este comportamiento fue también observado en diversos tejidos vegetativos de especies como *Glycine max* (Heppard *et al.*, 1996), *Brassica napus* (Xiao *et al.*, 2014) y *Oryza sativa* (Shi *et al.*, 2012). Además, los niveles de transcritos en la condición control fueron muy similares (cerca de 1) en los tres genotipos. El frío (4 °C) provocó variaciones en los niveles de expresión del gen *FAD2* en todos los genotipos y condiciones, demostrando un control transcripcional y apoyando la Hipótesis 2 planteada. Los genotipos primaverales presentaron una tendencia similar desde la condición control

hasta el final del tratamiento, incrementando los niveles de transcriptos a las 24 hs, continuando con una disminución a las 72 hs y posteriormente un aumento a las 144 hs. Por el contrario, en MVTD 10-98, los niveles disminuyeron a las 24 hs de exposición a frío y posteriormente aumentaron sostenidamente hasta las 144 hs. Estos resultados sugieren que, aunque los tres genotipos coinciden en mayores niveles de expresión en relación al control a las 144 hs, el genotipo invernal muestra una respuesta diferente en las primeras horas de exposición a frío. En este sentido, Golizadeh & Kumleh (2019) obtuvieron la misma tendencia que MVTD 10-98 en un genotipo invernal de *Triticum aestivum* a una temperatura de 6 °C durante 1, 3, 6 y 9 horas. Por otro lado, el pico de expresión de *FAD2* en B. AMBAR y CBW 0101 a las 24 hs puede verse como una respuesta rápida de un genotipo primaveral al estrés, aunque posteriormente se observe una disminución a un tiempo mayor de exposición (72 hs).

Cuando se analiza la relación entre el nivel de expresión de *FAD2* y el contenido de 18:2, se observa que en CBW 0101 y MVTD 10-98 ambos valores se comportan de manera esperada, es decir al final del tratamiento de frío el aumento de expresión de la enzima en comparación con el control se traduce en un incremento del producto de reacción. Entonces, a nivel de composición lipídica; CBW 0101 mostró un comportamiento similar al genotipo invernal MVTD 10-98 (Fig. 2.11). En un trabajo previo a esta tesis (Miguel *et al.*, 2015) realizado con los mismos materiales, el efecto de frío (4 °C) en la expresión de *Wcor410* y *DREB-1A* (induce la expresión de dehidrasas), mostró un nivel de transcriptos en CBW 0101 intermedio entre MVTD 10-98 y B. AMBAR. Por el contrario, en el caso de B. AMBAR, la acumulación de transcriptos de *FAD2*, muy evidente sobre todo en la fase inicial de la respuesta a frío, no se refleja en un incremento de insaturación a 18:2. La reducción en el grado de asociación entre el nivel de transcripción de una desaturasa y el contenido del AG correspondiente se ha atribuido en plantas a la ocurrencia de controles post-transcripcionales de la enzima (Dyer *et al.*, 2001). Además, según Lei *et al.* (2010), la conversión de 18:1 a 18:2 involucra otros mecanismos aparte de la acción de las desaturasas. Esos mecanismos podrían ser ajustes de alteraciones metabólicas como estabilización osmótica celular y aumento de antioxidantes (Heidarvand & Amiri, 2010). Li *et al.* (2007) encontraron que los cambios en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados en hojas tratadas con frío, no presentaron correlación directa con la expresión del gen *FAD2* de soja. Según lo expuesto y en relación al estudio de expresión y el perfil de AG de B. AMBAR se podría pensar en una regulación postranscripcional de la enzima ω -6 lípido desaturasa donde el nivel de transcriptos (aumento o disminución) no se vio reflejado en

los cambios del contenido de 18:2. Esto último, fue también propuesto en otros estudios de genes de desaturasas realizados en diferentes tejidos y especies (Berberich *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2005; Kargiotidou *et al.*, 2008; Upchurch, 2008; Matteucci *et al.*, 2011; Román *et al.*, 2012).

Algunas consideraciones al analizar los perfiles de expresión y la composición de ácidos grasos. La primera tiene que ver con el hecho de que en plantas el AG 18:2 se sintetiza a través de dos vías, una en retículo endoplasmático a cargo del gen *FAD2* y otra activa en cloroplasto codificada por el gen *FAD6* (Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2018). Aunque se trate de genes con una secuencia, estructura y tamaño diferentes, ambos codifican la misma enzima ω -6 lípido desaturasa. No obstante, las secuencias de aminoácidos, con un 24 % de identidad (datos no mostrados) y diferencias en su longitud, contienen los tres dominios de histidina característicos de una ω -6 lípido desaturasa. Estos resultados coinciden con los informados por Li *et al.* (2007), donde *FAD2* y *FAD6* de soja poseen los dominios de histidina y una baja identidad en su secuencia proteica (~10 %). En este contexto, los valores observados de 18:2 deben asumirse como el contenido total de este AG proveniente de la combinación de las dos vías. La otra consideración tiene que ver con el análisis de expresión de *FAD2*. En el Capítulo 1 de esta tesis se describió la existencia de cuatro copias de este gen localizadas en el cromosoma 6 de ambos genomas (A y B), con diferencias en sus secuencias e incluyendo copias no funcionales (pseudogenes) (Fig. 1.5 y Tabla 1.10 de CAPITULO 1). Para el análisis de expresión de *FAD2*, los iniciadores se diseñaron en regiones conservadas de las cinco copias funcionales, de modo que el nivel de transcriptos detectado mediante qRT-PCR correspondería a la suma de la expresión de todas las isoformas ya que el objetivo fue cuantificar la transcripción de *FAD2* de manera global. Se desconoce si existen diferencias entre copias en cuanto a su tasa de transcripción en trigo candeal; como ya hemos descrito las copias poseen diferencias en sus regiones promotoras en cuanto a la abundancia de sitios de unión de factores de transcripción que están involucrados en la respuesta a estrés abiótico. Esto último, podría causar variabilidad en la forma en la que cada copia es regulada. A modo de ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se ha encontrado que la isoforma *FAD2.2* fue inducida luego de 24 hs a 4 °C mientras que *FAD2.3* presentó niveles de transcriptos significativamente inferiores al control (Zhang *et al.*, 2018). En el caso de soja, los dos genes de *FAD2* (isoformas) se expresan en tejidos distintos, semilla o vegetativo (Panpoom *et al.*, 1998). Estudios futuros podrían incluir análisis de expresión específicos de copia.

La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que regulan la insaturación de ácidos grasos en plantas (Dar *et al.*, 2017). Diferentes estudios presentan evidencias de la correlación positiva entre el grado de insaturación de los ácidos grasos que componen los lípidos de las membranas celulares y la tolerancia a frío en arábidopsis (Gibson *et al.*, 1994; Matsuda *et al.*, 2005), maíz (Berberich *et al.*, 1998), olivo (Matteucci *et al.*, 2011), trigo (Nejadsadeghi *et al.*, 2015), arroz (Shi *et al.*, 2012). Esta asociación se fortaleció ante la posibilidad de obtener plantas mutantes o genéticamente modificadas con silenciamiento o sobreexpresión de los genes de desaturasas en el marco de ensayos de tolerancia a frío. Por ejemplo, la transformación de plantas de *Oryza sativa* a partir del gen *GmFAD3* de soja, condujo a un mayor contenido de lípidos, mayor porcentaje de germinación y mayor crecimiento de tejidos vegetativos a bajas temperaturas (15 °C), que en el fenotipo salvaje (Iba, 2002). Resultados similares, obtuvieron en Shi *et al.* (2012), donde la transformación de *Saccharomyces cerevisiae* con el gen *OsFAD2* de arroz mostró un mayor crecimiento celular que las no transformadas a 10 °C y en Khodakovskaya *et al.* (2006) plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas con el gen *FAD7* de *A. thaliana*, mostraron una mayor tasa de supervivencia a bajas temperaturas (0,5 – 3,5 °C) que las no transformadas. De este modo, la transformación y subsiguiente análisis de expresión resultan de utilidad para conocer más precisamente el rol de un gen dado en la determinación de un fenotipo. Sin embargo, algunos estudios cuestionan la asociación generalizada entre insaturación de ácidos grasos y tolerancia a frío. En un trabajo Shanklin & Cahoon (1998) proponen que cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática en plantas, podrían ser el resultado de un ajuste metabólico a temperaturas bajas, no necesariamente ligado a un aumento de la tolerancia. En el mismo sentido, Ariizumi *et al.* (2002) confirmaron que genotipos de plantas de arroz con diferentes grados de tolerancia a frío poseían los mismos niveles de ácidos grasos insaturados.

En concordancia con la Hipótesis 3, el análisis del daño en las membranas por exposición a temperaturas de congelamiento en hojas, permitió observar que los valores de conductividad eléctrica (CE) medidos como índices REL y EL, fueron menores en MVTD 10-98 y CBW 0101 en comparación con B. AMBAR en todas las condiciones dadas. El tratamiento de 12 hs a -4 °C fue el que arrojó mayores diferencias entre genotipos para ambos índices (REL y EL); mientras que el tratamiento a -13 °C no resultó informativo porque provocó la máxima fuga de electrolitos. El análisis de CE muestra que los genotipos CBW 0101 y MVTD 10-98 mantuvieron los valores REL del control aun después de ser expuestos a -4°C, mientras que en el caso de B. AMBAR la conductividad aumentó

significativamente. En el caso de la variable EL obtenida de las muestras a -4°C por 12 hs, las comparaciones estadísticamente posibles entre genotipos mostraron los mayores valores de conductividad en B. AMBAR, seguido por CBW 0101 y MVTD 10-98 con el menor valor (Fig. 2.15), sugiriendo que estos dos genotipos conservan una mayor integridad de membrana cuando son expuestos a estas temperaturas. Considerados en forma conjunta los índices REL y EL muestran una mayor capacidad de CBW 0101 y MVTD 10-98 para mantener la integridad de la membrana, que podría relacionarse con el incremento en los niveles de ácidos grasos 18:1 y 18:2 que estos materiales mostraron luego de la exposición a bajas temperaturas. Este resultado, se combina con el mayor contenido de 18:2 en CBW 0101 y MVTD 10-98; un aumento en la proporción de ácidos grasos diinsaturados ha sido asociado a la reducción del daño en la membrana plasmática provocado por frío (Hannah, 2005). Estos resultados coinciden con los observados en *Oryza sativa* donde el genotipo tolerante mostró valores de fuga de electrolitos similares al control, mientras que el susceptible los superó (Huang y Guo, 2005) y con Nejadsadeghi *et al.* (2014) donde el genotipo de trigo candeal tolerante mostró un menor valor de EL (12 horas a -5°C) que el genotipo sensible.

CONCLUSIONES

En este capítulo se obtuvieron la composición y los perfiles de ácidos grasos de hojas de trigo candeal en tres genotipos con variabilidad en la tolerancia a frío. Los materiales fueron bastante homogéneos en la respuesta de los AG de longitud de 16 carbonos y en el ácido oleico (18:0).

En los casos de 18:1 y 18:2 se observó una respuesta diferencial más acentuada frente a las bajas temperaturas (4°C), donde los genotipos más tolerantes CBW 0101 y MVTD 10-98 incrementaron su contenido relativo de ácidos grasos insaturados. El genotipo primaveral CBW 0101 presentó cambios en el contenido de los AG 18:1, 18:2 y 18:3 que siguieron un patrón más similar al invernal tolerante MVTD 10-98 que al primaveral susceptible B. AMBAR.

El análisis de conductividad de membrana se relacionó con la caracterización fenotípica previa: en evaluaciones de tolerancia en cámara a temperaturas bajo cero, el porcentaje de hojas dañadas (en etapa de macollaje) fue 96,88 % en B. AMBAR, 15 % en CBW 0101 y 5 % en MVTD 10-98. En etapa de encañazón bajo las mismas condiciones, los porcentajes de

daño fueron 93.75 %, 60 % y 57.5 %, respectivamente (Basualdo 2013, Tesis doctoral; Díaz *et al.*, 2014; Miguel *et al.*, 2015).

En esta tesis, CBW 0101 mostró perfiles de conductividad REL similares a MVTD 10-98 y perfiles intermedios a los restantes genotipos en conductividad EL y expresión de *FAD2*. El perfil de expresión de la desaturasa *FAD2* varió en respuesta a frío y entre genotipos.

Los resultados obtenidos de las tres hipótesis planteadas en este capítulo, contribuyen a interpretar las diferencias fenotípicas que observamos previamente en los materiales.

CAPÍTULO 3

Evaluación del rendimiento en genotipos de *Triticum turgidum* ssp. *durum* con diferencias en la duración del ciclo de crecimiento

El desarrollo de este capítulo corresponde a la siguiente hipótesis y objetivo:

Hipótesis 3: El efecto de la fecha de siembra en genotipos de trigo candeal que difieren en su ciclo de crecimiento, se ve reflejado en cambios en el rendimiento, medidas relacionadas y en el grado de daño por heladas en estadio reproductivo.

Objetivo 3: Evaluar los efectos de la fecha de siembra en un grupo de genotipos de trigo candeal, en relación a la variable rendimiento y sus componentes, días a floración y producción de biomasa. Así mismo, cuantificar el daño causado por temperaturas bajo cero en espigazón.

INTRODUCCIÓN

El rendimiento en trigo está determinado por la acción combinada del genotipo y el ambiente (Fischer, 2001) y es el resultado final de las interacciones entre procesos de crecimiento y desarrollo que ocurren durante todo el ciclo del cultivo (Richards, 1996). A lo largo de su ciclo, se producen cambios tanto en su morfología externa como en los ápices meristemáticos encargados de la generación de primordios de órganos vegetativos y reproductivos. Los estados ontogénicos del cultivo de trigo han sido descritos mediante el uso de diferentes escalas. La escala Zadoks (Zadoks *et al.*, 1974) es una de las más utilizadas para la descripción de los estados fenológicos externos (Tabla 3.1). Luego de que se produce la germinación de la semilla, se puede dividir al ciclo en tres grandes etapas: vegetativa, reproductiva y llenado de granos (Fig. 3.1). La primera se caracteriza por la iniciación foliar y el macollaje. La segunda etapa comienza cuando el ápice de la planta cambia de estado vegetativo a reproductivo, momento en el cual cesa la iniciación de hojas y comienza la diferenciación de espiguillas. Este cambio, denominado estado de doble lomo o doble arruga, ocurre en términos generales entre la aparición de la hoja dos a la seis, dependiendo del cultivar y de los estímulos ambientales más importantes (temperatura, fotoperiodo y vernalización) (Miralles *et al.*, 2014). La aparición de hojas continúa hasta que la última hoja (la hoja bandera) se expande. La tercera etapa, de llenado de granos, tiene dos períodos principales: el de cuaje y el de llenado efectivo de los granos (peso final de granos). La fase de cuaje comprende los primeros 15-20 días desde la antesis del cultivo y se caracteriza por una activa división celular que define el peso potencial de los granos (PG). Al finalizar la fase de cuaje queda definido el número de granos (NG) en el cultivo, componente principal del rendimiento. La fase de llenado efectivo termina en madurez fisiológica (MF), momento en el que se alcanza el máximo peso seco del grano. La humedad de los granos al momento de la MF oscila entre 36 y 41 % (Prado *et al.*, 2013). En este momento, el rendimiento del cultivo ya está determinado. De aquí a cosecha el grano sólo pierde humedad hasta un valor de ~14 % (Fig. 3.1).

Tabla 3.1. Fases principales de la escala Zadoks (Satorre *et al.*, 2004)

0-Germinación	5-Emergencia de la inflorescencia
1-Crecimiento de plántula (*)	6-Antesis
2-Macollaje (**)	7-Desarrollo lechoso del grano
3-Elongación del tallo	8-Desarrollo pastoso del grano
4-Estado de bota	9-Madurez

(*) 11 a 19 refleja el número de hojas expandidas en el vástago principal

(**) 21 a 29 refleja el número de macollos visibles en la planta

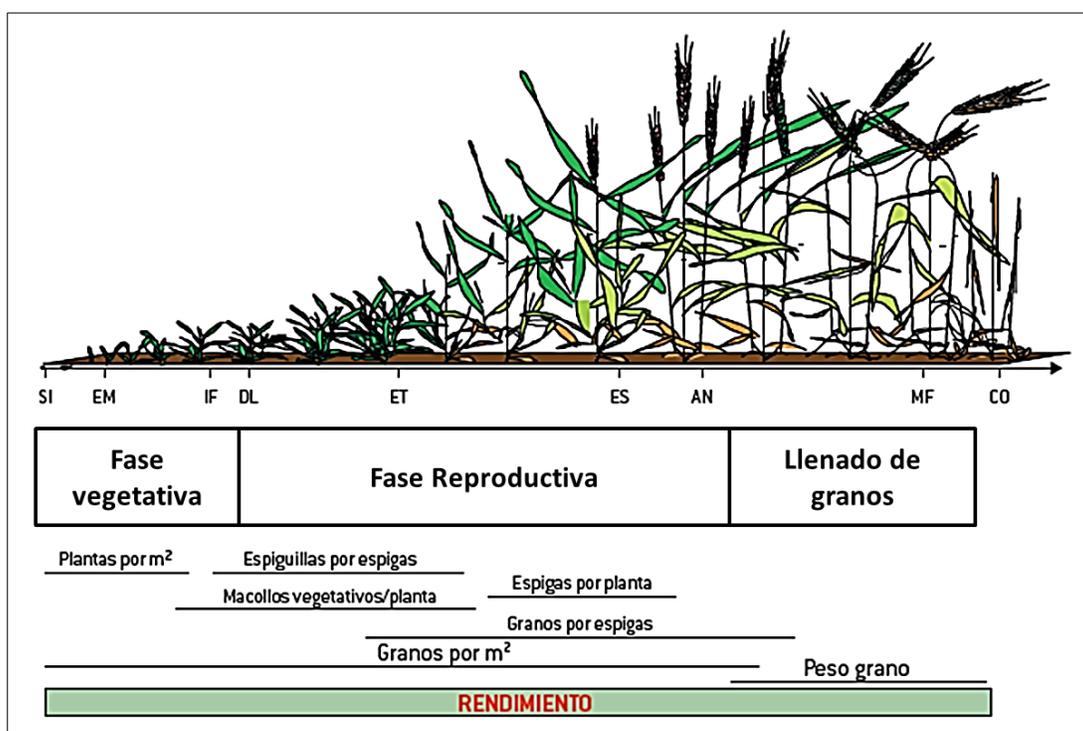


Figura 3.1. Etapas del ciclo de cultivo de trigo y generación de componentes numéricos del rendimiento (Modificado de Slafer y Rawson, 1994, en Miralles *et al.*, 2014). SI: siembra, EM: emergencia, IF: iniciación foliar, DL: doble lomo o diferenciación de espiguillas, ET: espiguilla terminal, ES: espigazón, AN: antesis, MF: madurez fisiológica, CO: cosecha.

Generación del rendimiento en trigo

Si bien el rendimiento es generado a lo largo de todo el ciclo del cultivo (Fig. 3.1), las etapas cercanas al momento de floración resultan claves para la definición del mismo. El NG está definido por el número de espigas por unidad de área (NE) y el número de granos por espiga (NGE). A su vez el NGE está conformado por el número de espiguillas por espiga ($e \cdot E^{-1}$) y el número de granos por espiguilla. Por otra parte, el PG se establece a partir del producto entre la tasa y la duración del llenado.

Puede definirse al *rendimiento potencial* como aquel que es alcanzado por un determinado cultivar en un ambiente (radiación solar, temperatura, fotoperiodo, y características del suelo no modificables con manejo) sin limitaciones hídrico-nutricionales, y con un control efectivo de plagas, malezas, enfermedades y otros estreses (Evans y Fischer, 1999). La complejidad en la determinación del rendimiento ha causado que los planes de mejora generalmente se enfoquen en el rendimiento *per se*, ya que es de fácil medición (Richards *et al.*, 2010). Sin embargo, para analizar el rendimiento potencial, Slafer *et al.* (1994) propusieron dos aproximaciones que son ampliamente utilizadas: a) la biomasa producida y el índice de cosecha (IC; relación entre rendimiento de grano y biomasa aérea total) y b) el NG y el PG. El análisis de estas aproximaciones permite comprender qué característica del cultivo podría ser manipulada con el objetivo de incrementar el rendimiento potencial en un plan de mejoramiento (García, 2012). Aunque en los inicios del mejoramiento de esta especie, las ganancias genéticas en rendimiento fueron explicadas principalmente por incrementos en el IC, en la actualidad se dispone de variedades que han arribado a una meseta en relación al valor de este índice. Por este motivo, Miralles & Slafer (2007), proponen una mejora en la biomasa producida más que en el IC. El muestreo de biomasa proporciona información sobre la tasa de crecimiento del cultivo, tamaño de órganos, área foliar y partición de la materia seca entre los componentes de la planta. Las condiciones ambientales adversas, como sequía o estrés por temperaturas extremas, pueden reducir considerablemente la producción de biomasa, lo que a su vez reduce la habilidad del cultivo para interceptar la radiación solar, y por consiguiente ralentiza la fotosíntesis y/o la eficiencia de uso de la radiación (Pask *et al.*, 2013). La identificación de genotipos capaces de mantener la producción de biomasa durante condiciones de estrés, es una característica importante en la selección de líneas con mejor adaptación.

Comprender los cambios en el rendimiento, sus componentes y los rasgos asociados a través del tiempo, es un paso esencial para mejorar el conocimiento de factores limitantes

del rendimiento e información sobre las futuras estrategias de reproducción (Royo *et al.*, 2007). El estudio de la fisiología de la generación del rendimiento proporciona una estructura sólida de conocimiento que puede ser útil para complementar al mejoramiento empírico tradicional (Foulkes *et al.*, 2011). Existen numerosas propuestas que incluyen el estudio de la generación de mejoras en el rendimiento proporcionada por cambios en atributos ecofisiológicos (Arroyo *et al.*, 2014), por lo que evaluar estos atributos podrían resultar en una mejora en los procesos de selección en trigo (Shorter *et al.*, 1991; Calderini *et al.*, 1999). Por otro lado, muchos trabajos intentan explicar las relaciones entre el rendimiento de grano en trigo y rasgos agronómicos y morfológicos utilizando coeficientes de correlación simples (Doğan, 2009).

Fecha de siembra y adaptación de la especie a bajas temperaturas

La adaptación del trigo a una región amplia de cultivo requiere que su patrón de desarrollo se adapte a cada ambiente, siendo primordial que la antesis ocurra con bajos riesgos de heladas (Satorre *et al.*, 2004), principalmente en el período más crítico de la generación del número de granos, que comprende 20 días pre-floración y 10 post-floración. Para lograr este nivel tan amplio de adaptación (es cultivado en latitudes desde 60° N en Europa hasta 45° Sur en América y en un rango altitudinal desde pocos metros hasta más de 3000 m.s.n.m) (Rharrabti, 2001), es necesario disponer de un elevado grado de variabilidad en patrones de desarrollo, dado por la interacción entre genotipos y ambientes (Slafer & Whitechurch, 2001). Son las respuestas a la vernalización y el fotoperiodo, los mecanismos más importantes por los cuales el trigo (y otras especies) pueden modular la duración de su ciclo, de modo tal que la floración ocurra con posterioridad a los meses de menor temperatura (Slafer y Whitechurch, 2001).

Es sabido que las bajas temperaturas constituyen una limitante importante de la distribución geográfica de las plantas cultivadas. Si bien el cultivo de trigo está adaptado a condiciones de bajas temperaturas, el descenso de ésta, puede provocar daños en los tejidos generando pérdidas de rendimiento y afectando la calidad (Hannah, 2005).

El cultivo de trigo presenta diferencias en la sensibilidad a bajas temperaturas en función de la etapa del desarrollo, la que generalmente se incrementa en los estadios más avanzados. De esta manera, la sensibilidad a las heladas aumenta después de que las espigas comienzan a emerger (Zheng *et al.*, 2015) pudiendo observar espigas afectadas a una temperatura igual o inferior a -1,8 °C (Săulescu & Braun, 2001). El umbral de

temperaturas por debajo del cual se producen daños, se presenta en la Tabla 3.2, la misma considera una exposición por un lapso de tiempo de dos horas.

Tabla 3.2. Umbral de temperatura y daños que causan las heladas en los diferentes estadios fenológicos del cultivo de trigo.

Estadio	T (°C)	Daño (1)	Efecto sobre Rendimiento
Macollaje	-11	Hojas cloróticas, puntas de hojas necróticas	Bajo
Encañazón	-4	Muerte del ápice de crecimiento; entrenudos curvados	Moderado a severo
Espiga embuchada	-2	Hojas amarillentas, esterilidad de Flores, espigas atrapadas, espigas retorcidas	Moderado a severo
Espigazón	-1	Flores estériles, anteras muertas, aristas y/o espigas blancas	Severo

(1) Se considera una exposición de dos horas, escala arbitraria

En América del Norte y Europa Central, el trigo candeal se siembra en primavera para evitar las condiciones invernales (Sieber *et al.*, 2014), mientras que, en Argentina, la mayoría de las variedades de trigo candeal se siembran en invierno y poseen baja tolerancia a frío en el período más crítico de crecimiento. La siembra comprende el período desde mediados de junio a mediados de agosto y se concentra principalmente en el sur de la provincia de Buenos Aires. En la actualidad, el cultivo de trigo candeal se basa principalmente en el uso de diez variedades comerciales las cuales son primaverales (no poseen requerimientos de vernalización para florecer), casi en su mayoría de ciclo corto a intermedio (Larsen y Jensen, 2016). La denominación *ciclo corto* o *largo* en realidad está asociada a una determinada fecha de siembra y lugar geográfico, el cual se define por el fotoperiodo y las temperaturas vernalizantes a las cuales estarán expuestos los cultivares (Satorre *et al.*, 2004).

Las pérdidas de rendimiento por heladas en trigo candeal han sido registradas, principalmente en estadio de floración, por el Instituto Nacional de Tecnología

Agropecuaria (INTA) siendo muy importante la ocurrida en la campaña 2007/08 con 30-80 % de pérdidas, dependiendo del genotipo (Basualdo, 2013).

La evaluación del daño por heladas en condiciones de campo requiere una temperatura suficientemente baja durante un período específico de tiempo. Como estas condiciones solo se cumplen algunos años, la selección para tolerancia a heladas es difícil por fenotipado convencional a campo. En este contexto, la elección de la fecha de siembra, constituye una de las estrategias más útiles para minimizar los daños por heladas en la etapa más crítica (Turner, 2004). En general, los cambios en las fechas de siembra exponen a los cultivos a distintas condiciones fototermales. Por ejemplo, las fechas de siembra más tardías exponen al cultivo a mayores temperaturas y fotoperiodos más largos que podrían repercutir negativamente en la biomasa aérea. Variaciones en la fecha de siembra requieren en general, un ajuste de la densidad de siembra y el genotipo, a fin de maximizar el aprovechamiento de los recursos (agua, luz, nutrientes) durante la estación de crecimiento (Satorre *et al.*, 2004).

Numerosos estudios han informado un aumento del rendimiento con siembras tempranas y una reducción en el mismo cuando la siembra se retrasa después de la fecha óptima (Anderson & Smith, 1990; Connor *et al.*, 1992; Ehdaie & Waines 2001; Tavakkoli & Oweis, 2004; Turner 2004; Caballero & Abbate, 2013). Una siembra temprana de trigo con genotipos de ciclo intermedio - largo, que evitan el riesgo de heladas en antesis, se espera que compense cierta pérdida de plantas y de biomasa área foliar (Bassu *et al.*, 2009).

Realizar la siembra en el momento óptimo no representa ningún costo adicional, pero depende de factores que pueden ser manejados por el productor y de las condiciones ambientales. En la actualidad no se dispone de datos de rendimiento y sus componentes en la región principal del cultivo de trigo candeal, sembrados en una fecha anterior a las actuales recomendadas.

En este capítulo se realizó la evaluación de la variable rendimiento, sus componentes principales, biomasa en antesis y madurez fisiológica, días a floración y período de llenado de granos, en un grupo de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra y se estudiaron las correlaciones entre rendimiento y variables asociadas. Además, se obtuvieron valores de peso hectolítrico y porcentaje de proteína en grano. Así mismo, se cuantificó el daño por temperaturas bajo cero en estadio de floración.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones experimentales y material vegetal

Durante los años 2016 y 2017 se realizaron ensayos a campo en la Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow (EEAI, INTA) (38° 20' LS, 60° 13' LW, 120 m.s.n.m), Subregión Candealera Centro-Sur (Fig. 1). La siembra de 2016 se realizó sobre un suelo Argiudol petrocálcico, franco arcilloso, con un pH de 5,6 - 7 con profundidad del suelo de 50 cm y lote en descanso durante el año anterior. Las características del suelo en 2017 fueron: Argiudol cálcico, textura fina illítica, 1-3 % de pendiente, bien drenado, con un pH de 5 - 6 con profundidad de 75 cm y trigo como antecesor. La región que comprende a la EEA Barrow se caracteriza por potenciales de rendimiento de trigo moderados a altos, con contenidos de proteína en grano moderados-altos (Larsen, 2017).

Este estudio se realizó con un total de 15 genotipos (Tabla 3.3), pertenecientes a una colección mayor (n=72), analizada en la misma localidad durante el desarrollo de la tesis doctoral de Basualdo J. (2013). Los genotipos se seleccionaron de modo de incluir variabilidad en hábito de crecimiento, longitud de ciclo y grado de daño por bajas temperaturas. En este grupo, se incluyeron variedades y líneas experimentales de distintos orígenes (Tabla 3.3), en su mayoría reunidas en la colección de germoplasma de CERZOS-CONICET, Bahía Blanca.

Los ensayos se llevaron a cabo durante tres fechas de siembra (F1, F2 y F3), sin limitaciones de nutrientes y controlando las adversidades bióticas cuando fue necesario. Las densidades de siembra fueron: 230, 280 y 320 plantas.m⁻² en F1, F2 y F3, respectivamente. El aumento de la densidad de siembra desde F1 a F3, fue considerado, principalmente, debido a dos factores. Por un lado, los genotipos a evaluar poseen una amplia variación en sus ciclos y una tasa de crecimiento distinta. En este sentido, una fecha temprana podría provocar ventajas de crecimiento y mayor acumulación de materia seca en los de ciclo intermedio-largo, mientras que la fecha de julio, podría beneficiar a los de ciclo corto en detrimento de los de ciclo más largo, que crecen a una tasa menor. Además, se consideró la importancia de la transferencia de la información generada en este capítulo hacia el sector productivo, en concordancia con lo que los profesionales de la EEA-INTA Barrow recomiendan para la zona (previa comunicación), que es el aumento de la densidad de siembra hacia fechas más tardías.

En ambos años se aplicó 140 kg.ha⁻¹ de fosfato diamónico (PDA) en presiembra y 150 kg.ha⁻¹ de urea en macollaje y herbicida flurocloridona preemergente a una dosis de 1,5 l.ha⁻¹.

Posteriormente y según necesidad, se realizaron aplicaciones de herbicidas y fungicidas a fin de controlar malezas y enfermedades. En el año 2016 se utilizó fungicida Pyraclostrobin 13,30 gr.l⁻¹ + epoxiconazole 5 gr.l⁻¹, a una dosis de 1 l.ha⁻¹, para control de roya anaranjada del trigo (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*); la primera aplicación fue al momento de aparición de pústulas y la segunda 10 días después. En el año 2017, debido a las condiciones ambientales, no solo se observó presencia de roya anaranjada sino también y con mayor severidad, roya amarilla (*Puccinia striiformis*). Al respecto, se realizaron aplicaciones selectivas de fungicida Cripton X Pro a una dosis de 700 cc.ha⁻¹, según severidad de cada parcela.

Tabla 3.3. Materiales de trigo candeal evaluados a campo durante los años 2016-2017. Entre paréntesis, el año de registro; S/R: Sin Registro.

ACCESION	ORIGEN
Argentina	BUCK AMBAR (1995) ¹ , BUCK ESMERALDA (2000) ¹ , BONAERENSE INTA CARILO (2002) ¹ , BONAERENSE INTA CUMENAY (1995) ¹ , BONAERENSE INTA FACON (1997) ¹ , BONAERENSE INTA QUILLEN (2015) ¹ , BUCK 25 (S/R) ¹ , CBW 0101 (S/R) ² , CBW 0105 (S/R) ² , CBW 0141 (S/R) ² , CBW 0153 (S/R) ²
CIMMyT-México	80-IAT2 (S/R) ² , VF 0154 (S/R) ²
Italia	CONCADORO (1998) ¹
Hungría	MVTD 10-98 (S/R) ²

¹ Variedades

² Líneas experimentales

Diseño experimental

Los materiales se sembraron utilizando un diseño en bloques completamente aleatorizado con cuatro repeticiones, donde cada parcela estuvo compuesta por siete surcos de 5 m de largo separados a 0,20 m (Fig. 3.2).

Se registraron los valores de temperatura media, mínima y máxima diaria, humedad relativa del aire y precipitaciones utilizando una estación Weather Monitor II (Davis Instrumentts, CA, USA) ubicada en el predio donde se desarrollaron los ensayos (Tabla A3.1-A3.2; ANEXO).



Figura 3.2. Vista general del ensayo de trigo candeal en el campo de la Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow, INTA. a) Estadio vegetativo y b) Estadio reproductivo.

Fechas registradas

En los ensayos de ambos años, se registraron las fechas de siembra (F), emergencia (EM), antesis (AT) y madurez fisiológica (MF). En el año 2016 las fechas de siembra fueron: 12 de mayo (F1), 15 de junio (F2) y 20 de julio (F3), mientras que en 2017 fueron: 6 de junio (F1), 5 de julio (F2) y 20 de julio (F3). La diferencia de fechas entre ambos años se debió a una dificultad técnica ocurrida en 2017, que imposibilitó realizar la primera siembra en el mes de mayo como estaba planeado, causando que las fechas 1 y 2 fueran desplazadas unos días hacia adelante.

La fecha del momento de antesis se registró cuando el 50 % de la parcela se encontraba en este estadio. Para cada genotipo, se contabilizaron los días desde la emergencia a AT (D_{AT}) y el período de llenado de granos desde AT a fin de MF (D_{AT-MF}). A diferencia de las demás variables, se obtuvo solo un dato por genotipo.

Mediciones realizadas

En cada parcela se cosecharon las plantas de un metro lineal en AT y en MF, cortadas a ras del suelo; se separaron los tallos de las espigas y se colocaron a estufa a 70°C hasta peso constante. Se estimó la biomasa aérea total a MF (BA_{MF}) y el peso seco de las espigas en AT (PE_{AT}) y MF (PE_{MF}) a fin de determinar el peso que alcanzan las espigas en el período de llenado de granos (PE_{AT-MF}). La altura de plantas fue registrada *in situ* en un total de 20 plantas tomadas al azar por parcela.

Además, se contabilizó el número de espigas por metro lineal (NE) y sobre una muestra de 10 espigas por parcela, se determinaron los siguientes componentes de rendimiento en MF: número de granos por espiga (NGE), número de granos por m^2 (NG), peso de granos por m^2 (PG) y espiguillas/espiga ($e \cdot E^{-1}$). El índice de cosecha (IC) en MF se determinó mediante la relación entre el rendimiento de grano en gramos y biomasa seca (planta entera cortada a ras del suelo).

El rendimiento (Rto) fue estimado a partir de la cosecha de cinco metros lineales de los cinco surcos centrales de cada parcela, excluyendo las pérdidas ocasionadas por la maquinaria y posteriormente expresado a un nivel de 14 % de humedad. Además, se determinó el peso hectolítrico (PH) con la balanza de *Shopper*, el peso en gramos de 1000 granos de cada parcela (PMG), contenido de proteína (base 13,5 % de humedad) y humedad de grano utilizando la tecnología NIR (Near-Infrared Spectroscopy), mediciones realizadas en el Laboratorio de Calidad de Cereales EEAI - Barrow (Fig. 3.3). Las variables NE, NG, PG,

IC y Rto se valoraron sobre una superficie de 1 m² siguiendo las recomendaciones de Bell y Fisher (1994). Los ensayos a campo contaron con la colaboración de la Dra. Adelina Larsen, los Ing. Agr. Liliana Wherhanhe y Francisco Di Pane, y las evaluaciones de Laboratorio con la asistencia de las Ing. Agr. Elena Rosa Molfese y Valentina Astiz.

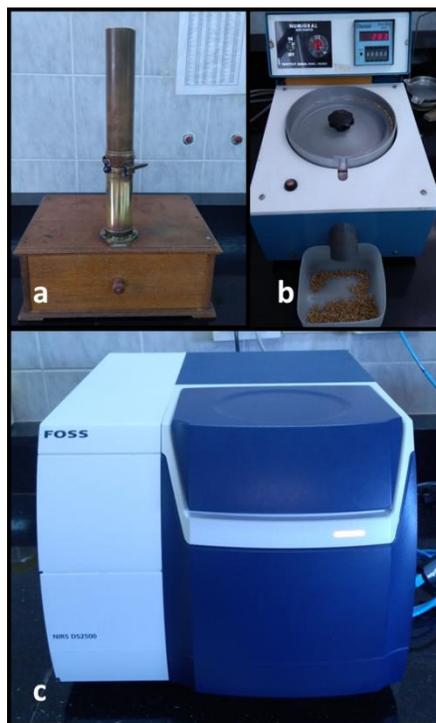


Figura 3.3. Balanza de Shopper para medición de PH (a); contador de granos para medición de peso de mil granos (b); NIR para medición de proteína y humedad del grano (c). Laboratorio de Calidad de Cereales EEAI – Barrow.

Determinación de daño por heladas

Durante el año 2016, las heladas ocurridas en el mes de septiembre permitieron evaluar el daño provocado *in situ*, en estadio reproductivo. Los registros se tomaron en las fechas de siembra F1 y F2, ya que en la F3 no se observaron síntomas de daño. Se registró el número de espigas dañadas en tres repeticiones por parcela de un metro lineal, distribuidas en los surcos: dos, cuatro y seis y a un metro de la cabecera y final de la parcela (Fig. 3.4).

La medición se llevó a cabo teniendo en cuenta la clasificación del daño propuesta en Basualdo (2013): espiga blanca, afectada en zonas y deformada (Fig. 3.5). Los datos se expresaron como porcentajes de espigas dañadas sobre el total de espigas de la muestra (1 m²). Las mediciones realizadas corresponden a los síntomas de la helada del mes de

septiembre del año 2016 (Tabla A3.1; ANEXO). En el año 2017, no se registraron heladas con una intensidad que permita observar espigas afectadas, por lo que no fue posible realizar esta evaluación (Tabla A3.2; ANEXO).

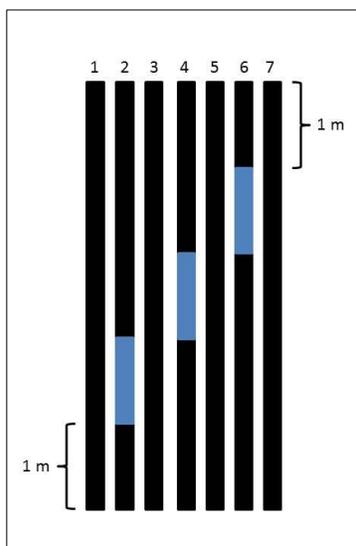


Figura 3.4. Esquema de la toma de muestras por parcela *in situ* del daño por heladas (año 2016). Los rectángulos azules representan la ubicación por hilera (1 metro lineal) donde se contabilizaron las espigas dañadas.



Figura 3.5. Tipos de daño en espiga observadas a campo: a) espiga blanca, b) espiga deformada, c y d) espigas afectadas en zonas.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en tres etapas. En primer lugar, dentro de cada año, todas las variables se utilizaron para un análisis exploratorio basado en componentes principales y se evaluó la correlación entre pares de variables a través del coeficiente de Pearson. En segundo lugar, se realizó un análisis de los dos años en forma conjunta, a través de un análisis de la varianza (ANOVA) para Rendimiento, con el fin de examinar la interacción *año-genotipo* con los factores principales año y genotipo, y las fechas anidadas en los años. Los bloques se incorporaron al modelo anidados en las fechas. En tercer lugar, la interacción significativa *año-genotipo* observada, determinó que la evaluación de las diferencias entre genotipos y fechas se realizara dentro de cada año, mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA), con los factores fechas y genotipos, y los bloques anidados dentro de las fechas. La comparación entre los valores medios se realizó mediante el test de Fisher (LSD) con un nivel de significancia del 5 %. Previo a estos análisis se llevó a cabo un estudio de residuales y el test de Shapiro-Wilks para evaluar normalidad y homocedasticidad de los datos.

Se realizó un análisis descriptivo del daño por heladas a campo del año 2016, mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP) que incluyó las variables: días a antesis (D_{AT}), porcentaje de daño total de espigas y el porcentaje de espigas afectadas según cada tipo de daño (blancas, deformadas y por zonas). Además, para las comparaciones de los valores medios se utilizaron modelos lineales generales mixtos (GLMM), donde el genotipo se definió como un factor fijo con varianzas heterocedásticas y los bloques incorporados como factor aleatorio. También se realizaron comparaciones entre las fechas para cada genotipo mediante un ANOVA. Los análisis se realizaron utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2019) con la asistencia del Dr. Antonio Garayalde, del Dpto. de Matemática de la Universidad Nacional del Sur.

RESULTADOS

Información meteorológica

Los valores climáticos obtenidos en los dos años de ensayos revelaron importantes diferencias, particularmente en cuanto al régimen pluviométrico. El año 2016 se caracterizó por altas temperaturas, vientos desecantes y escasas precipitaciones. El total de precipitaciones acumuladas desde abril a diciembre fue de 389,8 mm siendo abril el mes más lluvioso (88,3 mm) y agosto el de menor pluviometría (4,2 mm). Además, este año presentó valores muy por debajo del promedio histórico para los meses de septiembre a diciembre, período clave para la definición del rendimiento en trigo. Octubre se caracterizó por temperaturas superiores al promedio, reiterándose en los meses siguientes. La helada de mayor intensidad, se produjo el 4 de septiembre con un valor de $-4,7$ °C, registrándose 7 días con heladas en el mismo mes (Tabla A3.1; ANEXO).

En el año 2017, no se registraron limitaciones importantes de humedad siendo 606,3 mm el valor acumulado de precipitaciones desde abril a diciembre. Además, presentó temperaturas más moderadas que en 2016. Las lluvias desde abril a junio (274,6 mm) favorecieron la carga de perfiles. Agosto se caracterizó por abundantes lluvias (99,6 mm) y elevadas temperaturas. En septiembre y octubre los registros térmicos fueron superiores al promedio y noviembre fue menos lluvioso y con temperaturas normales, mientras que diciembre fue cálido y seco. Las heladas registradas este año fueron de baja magnitud, presentando 4 días en septiembre, siendo de $-1,3$ °C la más intensa y no se observaron temperaturas bajo cero en octubre (Tabla A3.2; ANEXO).

La Figura 3.6 muestra el registro mensual de las precipitaciones durante 2016 y 2017.

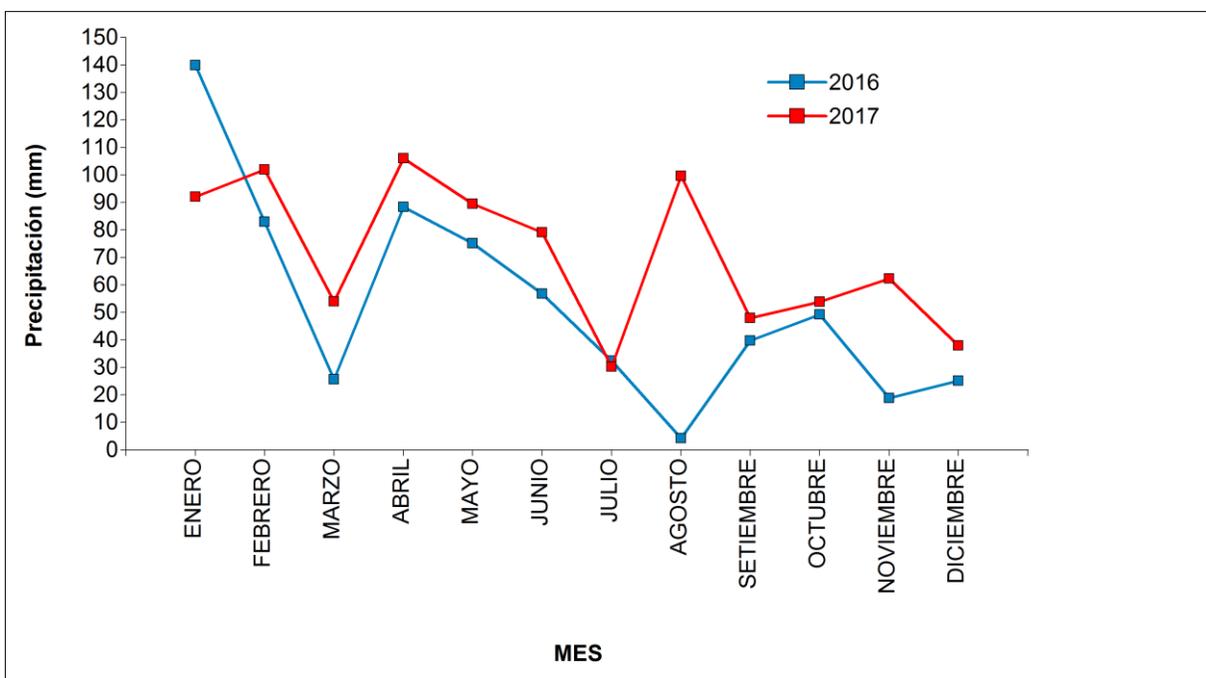


Figura 3.6. Precipitaciones (mm) registradas en los años 2016 y 2017. Datos provenientes de la estación meteorológica de la Estación Experimental Agropecuaria Integrada (EEAI) - Barrow-INTA.

Evaluación del rendimiento

Se obtuvieron los rendimientos de 15 genotipos para las tres fechas de siembra de los años 2016 y 2017 (Fig. 3.7). La interacción *genotipo-año* resultó altamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabla A3.3; ANEXO), por lo que los siguientes análisis se realizaron considerando cada año por separado.

En el año 2016 se obtuvieron menores rendimientos que en 2017, junto con valores más bajos en todas las variables excepto en proteína en grano (Tabla 3.4).

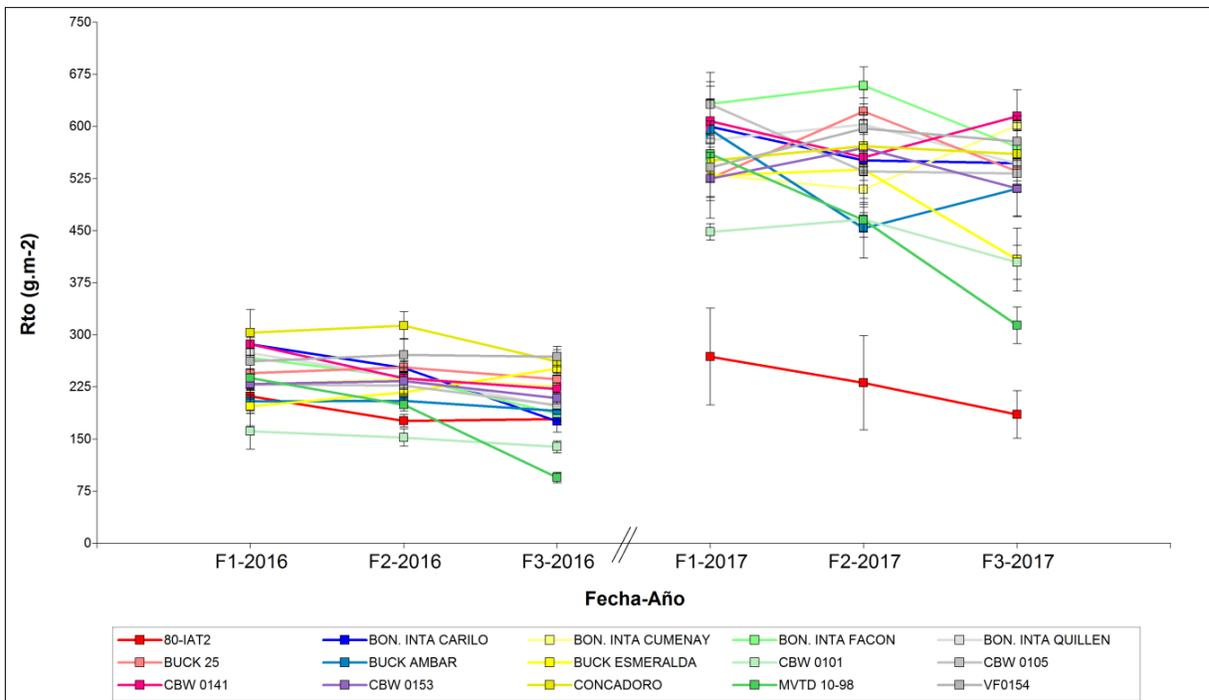


Figura 3.7. Rendimiento ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) promedio de cuatro réplicas de 15 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F1, F2 y F3). Las barras “//” sobre el eje X indican separación entre años: izquierda; año 2016, derecha; año 2017.

Las comparaciones generales de valores entre fechas de la Tabla 3.4 muestran que en el año 2016 la variable Rto tuvo mayor valor promedio en la F1 acompañado de BA_{MF} (biomasa aérea en madurez fisiológica), PG (peso promedio de granos por m^2), PE_{AT-MF} (peso de las espigas logrado en el período de llenado de granos por m^2), PMG (peso de mil granos), PH (peso hectolítrico) y altura, mientras que la F2 presentó los mayores valores de las variables IC, NE y NG y en la F3; sólo la variable proteína tuvo el valor más alto.

En el año 2017, la F1 volvió a contener los mayores promedios de Rto, BA_{MF} , PG, PE_{AT-MF} y altura y se sumaron NG y proteína; la F2 tuvo el mayor valor de IC y PMG y la F3 incluyó los mayores valores de NE y PH.

Tabla 3.4. Valores promedio de las variables: rendimiento (Rto), biomasa aérea en madurez fisiológica (BA_{MF}), peso promedio de granos por m² (PG), peso de las espigas logrado en el período de llenado de granos por m² (PE_{AT-MF}), índice de cosecha (IC), número de espigas por m² (NE), número de granos por m² (NG), peso de mil granos en gramos (PMG), contenido de proteína en grano (%), peso hectolítrico (PH) y altura obtenidas en los años 2016 y 2017, en 3 fechas de siembra. Promedios con letra común no difieren significativamente (p > 0,05). Entre paréntesis se indica el error estándar.

Año	FECHA	Rto (g.m ⁻²)	BA _{MF} (g.m ⁻²)	PG (g.m ⁻²)	PE _{AT-MF} (g.m ⁻²)	IC (%)	NE	NG (10 ³ .m ⁻²)	PMG	Proteína (%)	PH	Altura (cm)
2016	1	241,37 a (7,38)	873,78 a (14,33)	290,03 a (10,71)	222,20 a (11,70)	32,82 b (0,91)	323,25 b (7,92)	10,03 b (406,53)	33,78 a (0,74)	15,99 c (0,10)	76,35 a (0,23)	73,77 a (2,00)
	2	230,27 a (5,73)	749,29 b (14,72)	276,68 a (9,05)	193,03 b (17,62)	36,43 a (0,78)	375,25 a (9,64)	11,48 a (390,5)	30,52 b (0,66)	16,46 b (0,12)	72,83 b (0,4)	68,85 a (2,64)
	3	202,40 b (6,23)	660,61 c (17,12)	235,53 b (10,34)	166,85 b (13,33)	34,95 a (0,88)	338,75 b (11,09)	11,29 a (458,63)	26,87 c (0,54)	17,42 a (0,13)	70,29 c (0,45)	60,25 b (3,10)
Promedio		224,68	761,23	267,41	194,02	34,73	345,75	10,93	30,39	16,62	73,16	67,62
2017	1	541,73 a (14,79)	1437,16 a (31,86)	824,14 a (19,42)	640,69 a (31,38)	45,51 b (0,77)	382,42 b (11,30)	17,12 a (620,86)	48,17 a (0,92)	13,04 a (0,16)	79,17 c (0,38)	91,84 a (2,08)
	2	528,45 a (15,05)	1390,02 a (26,47)	799,08 a (15,39)	629,04 a (30,11)	47,17 a (0,87)	411,42 a (9,39)	16,52 a (515,58)	48,35 a (0,95)	12,90 a (0,17)	80,84 b (0,35)	88,80 b (1,94)
	3	494,60 b (16,46)	1296,72 b (27,48)	775,48 b (21,2)	591,93 a (37,71)	45,53 b (1,02)	418,50 a (10,10)	16,24 a (515,48)	48,14 a (0,9)	12,85 a (0,21)	81,76 a (0,33)	87,20 b (1,93)
Promedio		521,59	1374,63	799,57	620,55	46,07	404,11	16,63	48,22	12,93	80,59	89,28
2017/2016*		+1,32	+0,81	+1,99	+2,2	+0,33	+0,17	+0,52	+0,59	-0,22	+0,10	+0,32

*Relación entre 2017 y 2016.

El estudio en cada año comprendió el análisis de la variable Rto en relación a medidas de ciclo (D_{AT} y D_{AT-MF}) y luego a variables de biomasa aérea y componentes numéricos, así como también el contenido de proteína en grano y el peso hectolítrico (PH), mediante componentes principales y correlaciones de Pearson.

Rendimiento, días a antesis y período de llenado de granos

En el año 2016 y 2017, los períodos desde emergencia a antesis (D_{AT}) y de llenado de granos (D_{AT-MF}), variaron entre fechas y entre genotipos (Tabla 3.5). Los períodos D_{AT} y D_{AT-MF} en promedio fueron más extendidos en la F1, menores en la F3 e intermedios en la F2 para los dos años, aunque en 2017 las diferencias entre F2 y F3 fueron menores. Teniendo en cuenta el desvío estándar, la diferencia entre genotipos en D_{AT} y D_{AT-MF} fue más marcada en la F1 que en las dos fechas siguientes. La diferencia en D_{AT} entre el genotipo más precoz y el más tardío en 2016 fue de 32 días en F1, 23 días en F2 y 28 días en F3, mientras que en el caso de D_{AT-MF} fue de 15, 12 y 22 respectivamente. En el caso de D_{AT} en 2017 la diferencia fue de 27 días en F1, 26 días en F2 y 28 días en F3 mientras que en el caso de D_{AT-MF} fue de 16, 11 y 12 respectivamente. Los valores de D_{AT} en F1 y F2 de 2017 fueron en general más bajos que en 2016. En cuanto a D_{MF} , los valores mínimos y máximos en todas las fechas de 2017 estuvieron por encima de los observados en 2016 (Tabla 3.5)

Analizando el comportamiento gráficamente (Fig. 3.8 a y b) se observó que independientemente del genotipo, los materiales sembrados en F1 tuvieron los mayores valores de D_{AT} en cada año, y disminuyeron progresivamente hacia F2 y F3. En la comparación de los ensayos 2016 y 2017 se detectó que: i) los valores de D_{AT} alcanzados en F1 y F2 de 2017 fueron menores que las correspondientes en 2016, ii) las diferencias en los valores de D_{AT} entre F2 y F3 fueron mucho menos marcadas en 2017. En el caso de D_{AT-MF} se observaron mayores diferencias de comportamiento entre genotipos y entre años. Ocho de 15 materiales tuvieron en 2016 mayores valores de D_{AT-MF} en F1 mientras que los restantes presentaron valores de D_{AT-MF} cercanos entre F1 y F2. En todos los genotipos D_{AT-MF} fue menor en F3 (Fig. 3.8 c). En 2017 también hubo diferencias entre genotipos y en general la diferencia entre fechas fue de menor magnitud que en 2016 (Fig. 3.8 d).

Tabla 3.5. Días a antesis (D_{AT}) y período de llenado de granos (D_{AT-MF}) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra y dos años (2016 y 2017).

AÑO	2016						2017							
	GENOTIPOS		FECHA 1		FECHA 2		FECHA 3		FECHA 1		FECHA 2		FECHA 3	
	D_{AT}	D_{AT-MF}	D_{AT}	D_{AT-MF}	D_{AT}	D_{AT-MF}	D_{AT}	D_{AT-MF}	D_{AT}	D_{AT-MF}	D_{AT}	D_{AT-MF}	D_{AT}	D_{AT-MF}
80-IAT2	124	49	104	41	75	38	104	59	84	55	77	53		
BON. INTA CUMENAY	130	53	108	44	80	35	110	68	92	55	85	51		
CONCADORO	130	51	108	43	78	37	107	63	89	54	80	54		
VF0154	130	51	108	45	77	38	108	60	86	56	78	58		
BUCK 25	130	51	109	43	81	36	107	63	90	53	83	50		
CBW 0153	130	51	109	44	84	33	110	62	88	57	88	45		
BON. INTA FACON	130	51	111	40	84	31	109	61	91	50	82	50		
CBW 0141	130	51	113	36	78	36	106	61	88	48	82	48		
BUCK AMBAR	146	37	114	38	89	26	122	48	100	45	93	43		
BUCK ESMERALDA	147	34	114	37	87	28	120	51	93	50	88	45		
BON. INTA QUILLEN	142	41	115	37	88	28	120	52	94	52	90	44		
BON. INTA CARILO	146	35	117	34	89	26	128	42	103	40	91	45		
CBW 0105	152	37	121	33	100	19	129	44	102	45	93	47		
CBW 0101	156	33	127	28	101	18	130	44	106	42	100	41		
MVTD 10-98	156	34	127	29	103	16	131	43	110	44	105	41		
Media	138,60	43,93	113,67	38,13	86,27	29,67	116,07	54,73	94,40	49,73	87,67	47,67		
Desvío	11,04	8,06	6,88	5,42	8,99	7,48	9,97	8,81	7,88	5,46	7,95	4,95		

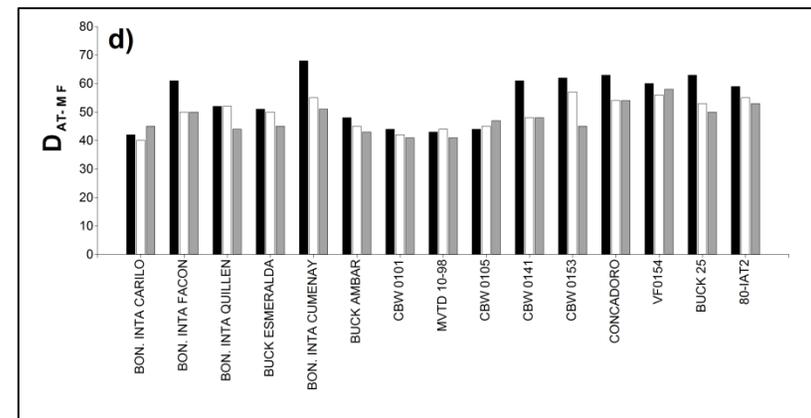
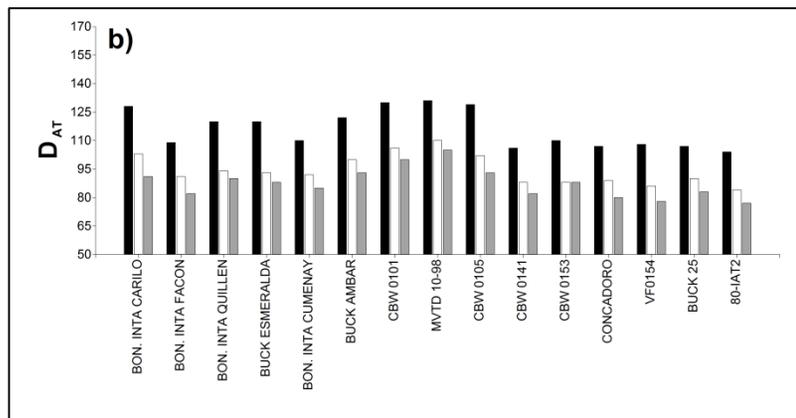
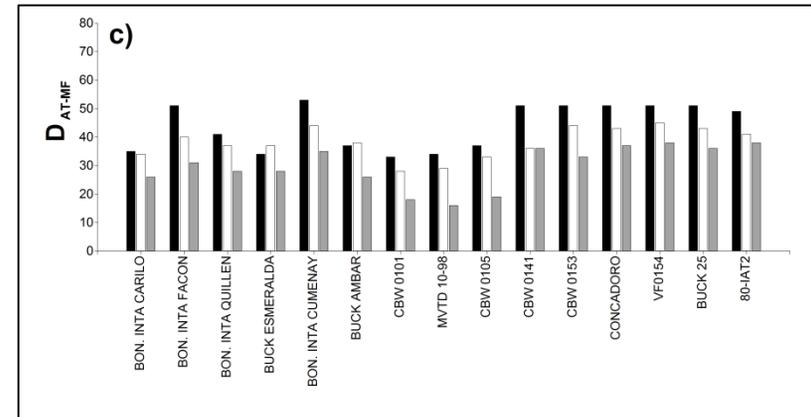
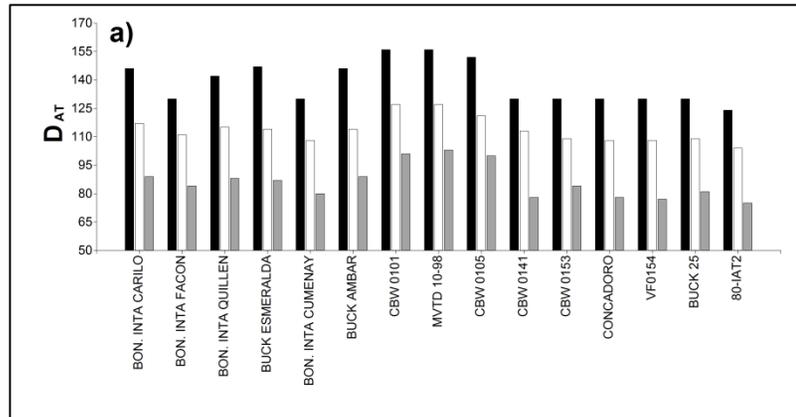


Figura 3.8. Días a antesis (D_{AT}): a) 2016; b) 2017. Período de llenado de granos (D_{AT-MF}): c) 2016; d) 2017, de 15 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F). F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises.

El comportamiento general de las variables Rto, D_{AT} y D_{AT-MF} se estudió, por fecha, mediante el análisis de componentes principales (ACP). En ambos años, el genotipo 80-IAT2 fue excluido de este análisis porque presentó un comportamiento marcadamente divergente afectando fuertemente las correlaciones entre las variables.

En el año 2016, en la F1 las componentes 1 y 2 explicaron el 98,3 % de la variación total. La CP1 que representó un 78,4 % de la varianza total, mostró correlación positiva y elevada ($r = 0,97$) con D_{AT} y negativa ($r > -0,74$) con Rto y D_{AT-MF} . La CP2 mostró correlación intermedia ($r = 0,67$) con Rto (Fig. 3.9 a). En la F2, las componentes 1 y 2 explicaron el 99 % de la variación total y CP1 que capturó el 87,3 % de la varianza total, presentó correlación positiva y elevada ($r = 0,97$) con D_{AT} y negativa ($r > -0,87$) con Rto y D_{AT-MF} (Fig. 3.9 b). Por otra parte, en la F3, las componentes 1 y 2 explicaron el 99,7 % de la variación total. CP1 con el 92,3 % presentó correlación positiva con Rto y D_{AT-MF} ($r > 0,92$) y negativa con D_{AT} ($r = -0,98$) (Fig. 3.9 c).

En la F1 del año 2017, las componentes 1 y 2 explicaron el 98,8 % de la variación total. La CP1 capturó el 65,4 % de la varianza total y presentó correlación positiva y elevada ($r = 0,99$) con D_{AT-MF} y negativa ($r = -0,99$) con D_{AT} . La CP 2 explicó el 100 % de la variación del Rto (Fig. 3. 10 a). En la F2, las componentes 1 y 2 explicaron el 96,1 % de la variación total y la CP1 con el 80 % de la varianza total, presentó correlación positiva y elevada ($r = 0,96$) con D_{AT} y negativa ($r > -0,82$) con Rto y D_{AT-MF} (Fig. 3.10 b). Por otra parte, en la F3 ambas componentes explicaron el 96,7 % de la variación total. CP1 con el 85,6 % presentó correlación positiva con D_{AT} ($r = 0,97$) y negativa con Rto y D_{AT-MF} ($r > -0,89$) (Fig. 3.10 c).

En lo que respecta a los genotipos, en general y en ambos años, en las tres fechas los mayores valores de Rto se observaron en los materiales de menor duración de la etapa hasta antesis D_{AT} y más extendido período de llenado de granos D_{AT-MF} . Estos análisis permiten identificar a CONCADORO, VF 0154, BUCK 25, CBW0141, CUMENAY y B.I. FACON y CBW0153, entre el grupo de materiales con valores más altos de rendimiento en todas las combinaciones fecha x año (Fig. 3. 10 a).

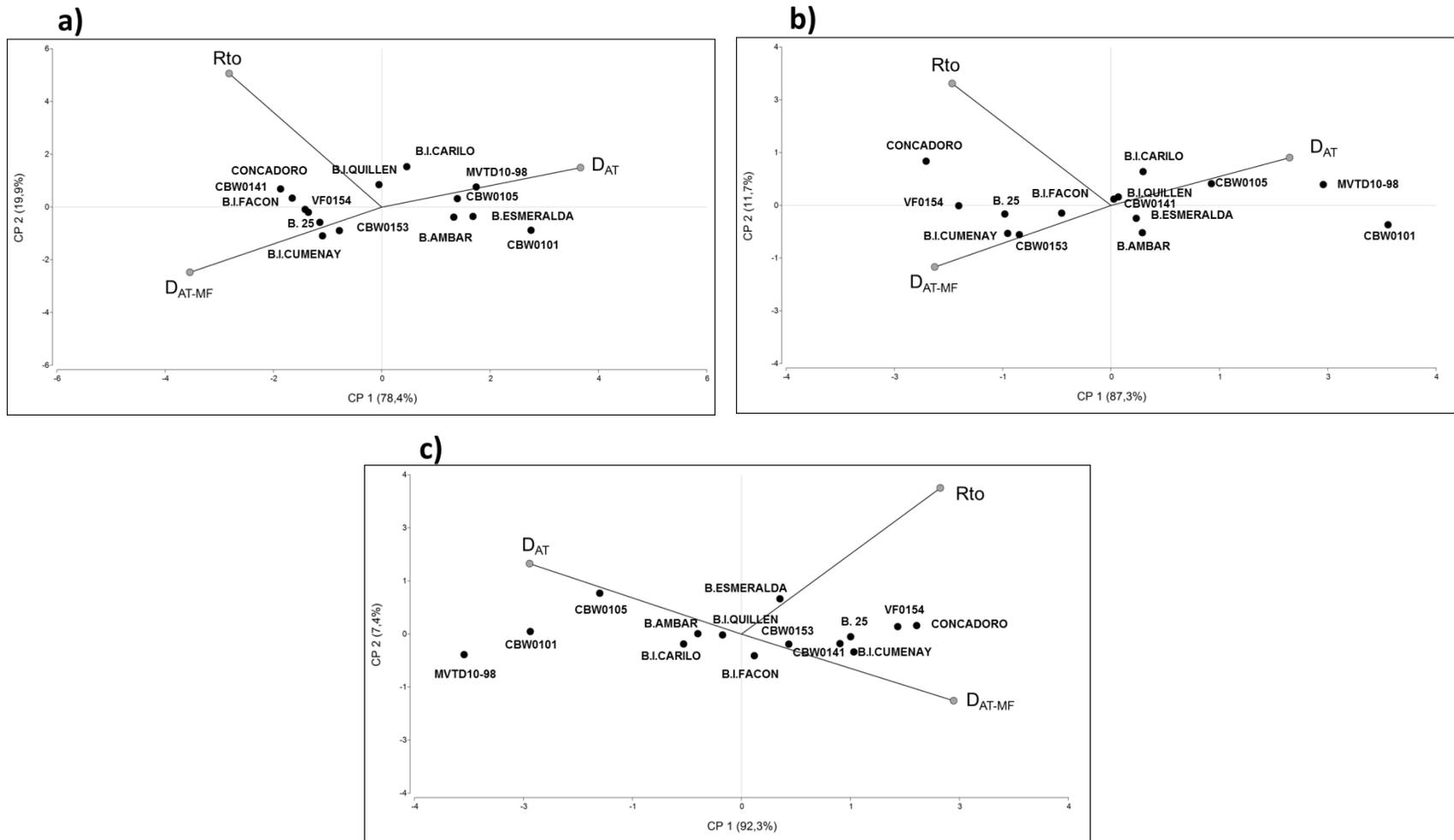


Figura 3.9. Relación entre Rto (rendimiento), D_{AT} (días a AT), D_{AT-MF} (días desde AT a MF). a) F1, b) F2 y c) F3 de 2016. El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros.

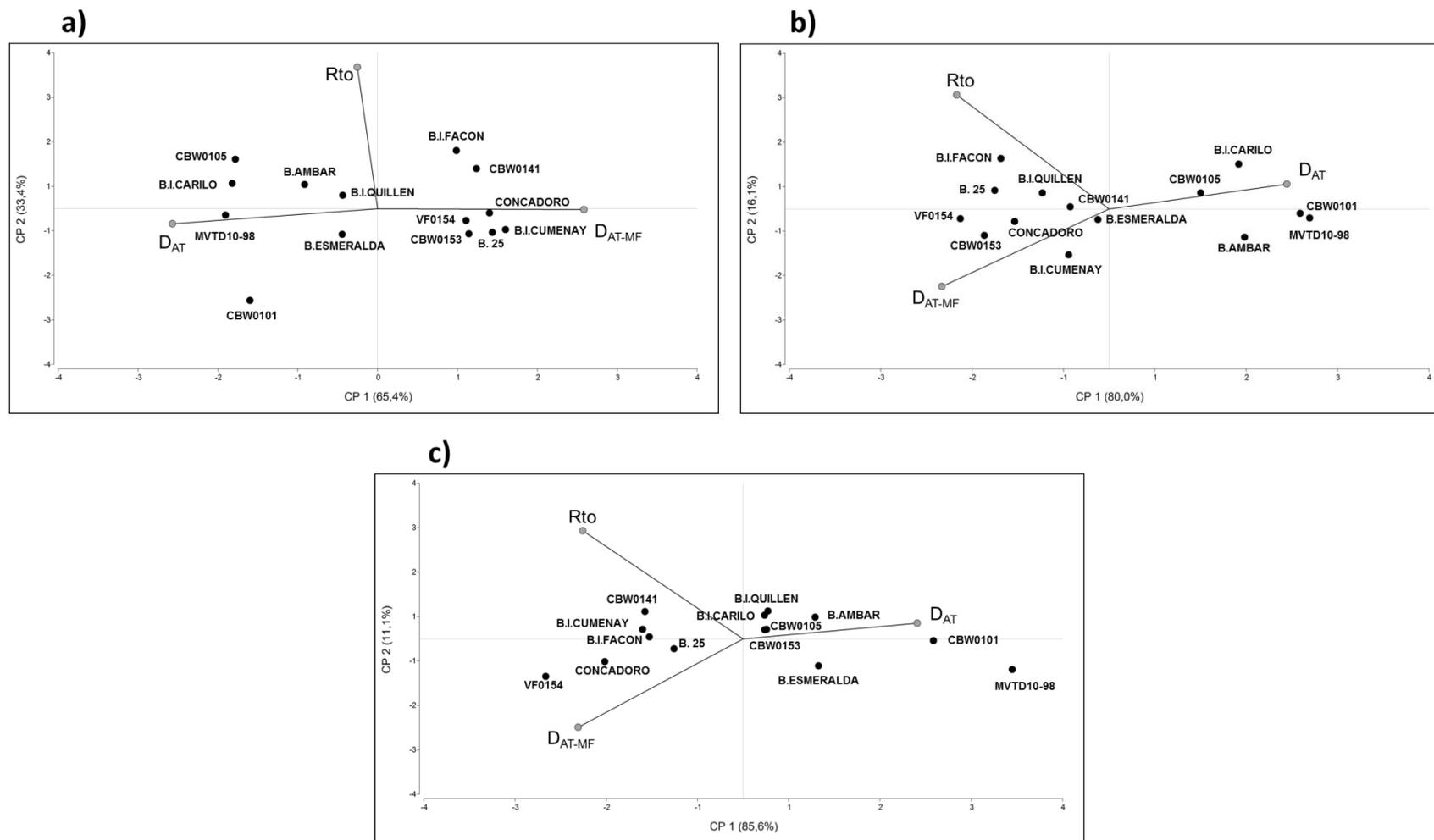


Figura 3.10. Relación entre Rto (rendimiento), D_{AT} (días a AT) y D_{AT-MF} (días desde AT a MF). a) F1, b) F2 y c) F3 de 2017. El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros.

Coefficiente de correlación de Pearson (r) entre rendimiento, ciclo a antesis y llenado de granos

Las correlaciones de Pearson (r) entre R_{to} y D_{AT} fueron negativas y significativas en cinco de las seis comparaciones realizadas (3 fechas, 2 años) indicando que, dentro de cada fecha, a mayor tiempo transcurrido desde la siembra a antesis (D_{AT}), el rendimiento fue menor. Solo en el caso de F1 en 2017 se observó un coeficiente $r \sim 0$ (Fig. 3.11 a y b). Estas figuras también muestran que los puntos determinados por los valores de R_{to} y D_{AT} siguen una distribución bastante ajustada a las fechas de siembra.

A diferencia de D_{AT} el período de llenado de granos (D_{AT-MF}) mostró una relación positiva, media a alta con el R_{to} en cinco de las seis comparaciones realizadas (3 fechas, 2 años) (Fig. 3.11 c y d), indicando que el rendimiento fue más elevado a un mayor período de llenado de granos. Los puntos determinados por los valores de R_{to} y D_{AT-MF} no siguen una distribución de acuerdo a las fechas de siembra, generando grupos solapados. Además, cuando el período hasta antesis se extiende (D_{AT}), D_{AT-MF} es menor, reflejado en un coeficiente de correlación entre D_{AT} y D_{AT-MF} superior a $-0,85$ en todas las condiciones (Tablas A3.4 y A3.5; ANEXO).

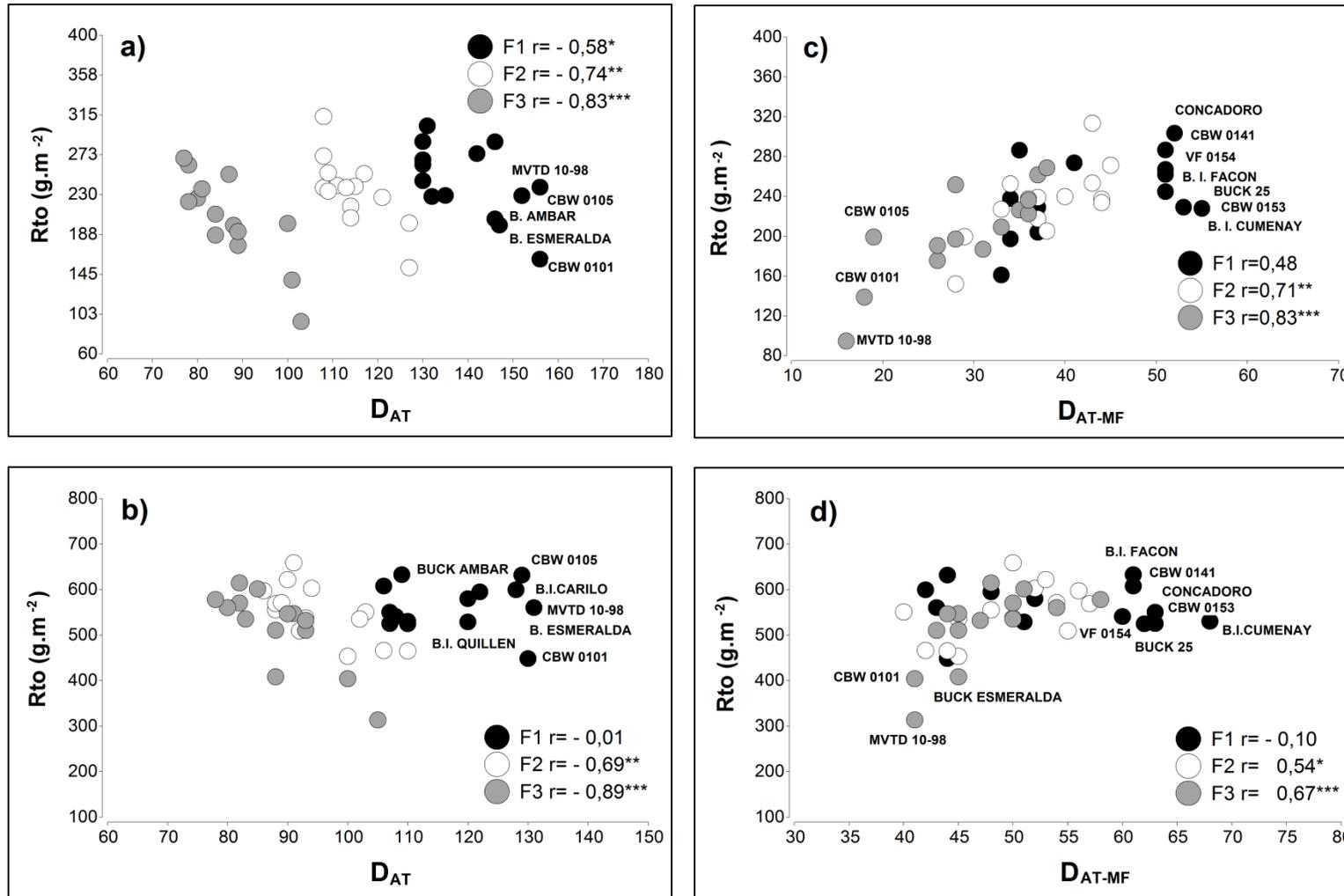


Figura 3.11. Relación entre Rto, D_{AT} y D_{AT-MF} de 14 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F). Rto y D_{AT} : a) 2016; b) 2017 y Rto y D_{AT-MF} : c) 2016; d) 2017. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05, 0,01, y 0,001, respectivamente.

Rendimiento y variables asociadas

El comportamiento general de todos los genotipos y variables, para cada fecha, se estudió mediante el análisis de componentes principales (ACP). En todas las fechas y en ambos años, los genotipos no conformaron grupos definidos, sino que se ubicaron dispersos en todos los cuadrantes, aunque en la F3 fue menos acentuado y se observó una mayor concentración de genotipos en los cuadrantes de la derecha. Genotipos como CBW 0101 y MVTD 10-98 se ubicaron frecuentemente en posiciones extremas de los cuadrantes de la izquierda representando los valores mínimos de Rto, mientras que VF 0154 y CONCADORO y también CBW 0141 mostraron, aunque en años distintos, las posiciones más extremas en cuadrantes de la derecha asociados a los máximos valores de rendimiento. Por otra parte 80-IAT2 se ubicó en los cuadrantes izquierdos del biplot en todas las fechas del 2017, asociado a los mayores valores de altura (Fig. 3.12 y 3.13).

En el año 2016, en la F1 las componentes 1 y 2 explicaron el 66,9 % de la variación total (Fig. 3.12 a). La CP1 que representó un 41,7 % de la varianza total, mostró correlación positiva y elevada ($r > 0,73$) con Rto, PG, PMG, IC y PE_{AT-MF} y, por otro lado, correlación negativa ($r = -0,80$) con $e.E^{-1}$. La CP2 mostró correlación positiva ($r > 0,83$) con: NG y NGE En la F2, las componentes 1 y 2 explicaron el 71 % de la variación total y la CP1 capturó el 54,3 % de la varianza total, presentando correlación positiva y elevada ($r > 0,71$) con Rto, PG, NE, NG, IC, PE_{AT-MF} y BA_{MF} y la CP2 con PMG ($r > 0,60$) (Fig. 3.12 b). Por otra parte, en la F3, las componentes 1 y 2 explicaron el 82,90 % de la variación total. CP1 capturó el 63,70 % de la varianza total presentando correlación significativa ($r > 0,81$) con Rto, PG, NE, NG, IC, PE_{AT-MF} y BA_{MF} y, por otro lado; negativa ($r = -0,64$) con $e.E^{-1}$. Por otra parte, la CP 2 presentó correlación positiva ($r = 0,91$) con NGE y negativa con PMG ($r = -0,81$) (Fig. 3.12 c).

En la F1 del 2017, las componentes 1 y 2 explicaron el 68,1 % de la variación total (Fig. 3.13 a). La CP1 capturó el 46,9 % de la varianza total y presentó correlación positiva y elevada ($r > 0,79$) con las variables: Rto, NG, NGE, PE_{AT-MF} y BA_{MF} . Por otro lado, la CP2 con el 21,2 %, presentó correlación positiva ($r > 0,66$) con PMG e IC. En la F2, las componentes 1 y 2 explicaron el 64,1 % de la variación total. La CP1 con el 37,3 % de la varianza, presentó correlación positiva elevada ($r > 0,66$) con Rto, PG, NG, NGE, IC y PE_{AT-MF} y la CP2 con PMG e IC ($r > 0,69$) (Fig. 3.13 b). En la F3 las componentes 1 y 2 explicaron el 72,60 % de la variación total y CP1 con el 52,60 % presentó correlación elevada y positiva ($r > 0,74$) con Rto, PG, NG, IC, PE_{AT-MF} y BA_{MF} . La CP 2 presentó correlación elevada ($r = 0,90$) con PMG y negativa ($r = -0,82$) con $e.E^{-1}$ (Fig. 3.13 c).

Relación entre las variables a partir del Análisis de Componentes Principales (ACP)

En cada fecha de siembra se generaron grupos de variables que mostraron correlaciones significativas. En el año 2016, en la F1 el grupo de variables Rto, PG, IC y PE_{AT-MF} mostró una correlación positiva y elevada superior a 0,63, mientras que por otro lado el coeficiente de correlación entre NG y NGE fue 0,76. La correlación negativa más significativa fue entre e.E⁻¹ y Rto ($r = -0,70$) (Fig. 3.12 a; Tabla A3.6; ANEXO). La F2 mostró grupos muy similares a la F1. Por un lado, las variables: Rto, PG, IC, PE_{AT-MF} y BA_{MF} presentaron coeficientes de correlación elevados y positivos ($r > 0,62$) y, por otro lado, el grupo NG, PG y NE también mostró una relación positiva y significativa entre sí ($r > 0,61$) (Fig. 3.12 b; Tabla A3.7; ANEXO). En la F3, las correlaciones más significativas la conformaron las variables: Rto, PG, NE, NG, IC, PE_{AT-MF}, y BA_{MF} ($r > 0,65$). Por otra parte, e.E⁻¹ y PG presentaron una relación negativa ($r = -0,60$) (Fig. 3.12 c; Tabla A3.8; ANEXO).

Por su parte, en la F1 de 2017, los siguientes grupos de variables mostraron una correlación positiva y elevada entre sí: Rto, PE_{AT-MF} e IC ($r > 0,81$); NGE y e.E⁻¹ ($r = 0,68$); NG, NGE y BA_{MF} ($r = >0,72$) y PE_{AT-MF} y BA_{MF} ($r = 0,67$). Las correlaciones negativas más significativas fueron: PMG con NG, NGE y e.E⁻¹ ($-0,62 < r < -0,72$) (Fig.3.13 a; Tabla A3.9; ANEXO). En la F2; los grupos que mostraron coeficientes elevados y positivos fueron: Rto, PE_{AT-MF} e IC ($r > 0,62$), NG con PG y NE ($r > 0,71$) y NG con NGE ($r = 0,83$), mientras que las relaciones entre PMG con NG ($r = -0,62$) y con e.E⁻¹ ($r = -0,8$) fueron las correlaciones negativas más importantes (Fig. 3.13 b; Tabla A3.10; ANEXO). Por su parte, en la F3 las correlaciones positivas más significativas fueron: Rto, NG, PG, IC, PE_{AT-MF} y BA_{MF} ($r > 0,70$) y PG, NG y NE ($r > 0,60$) (Fig.3.13 c; Tabla A3.11; ANEXO).

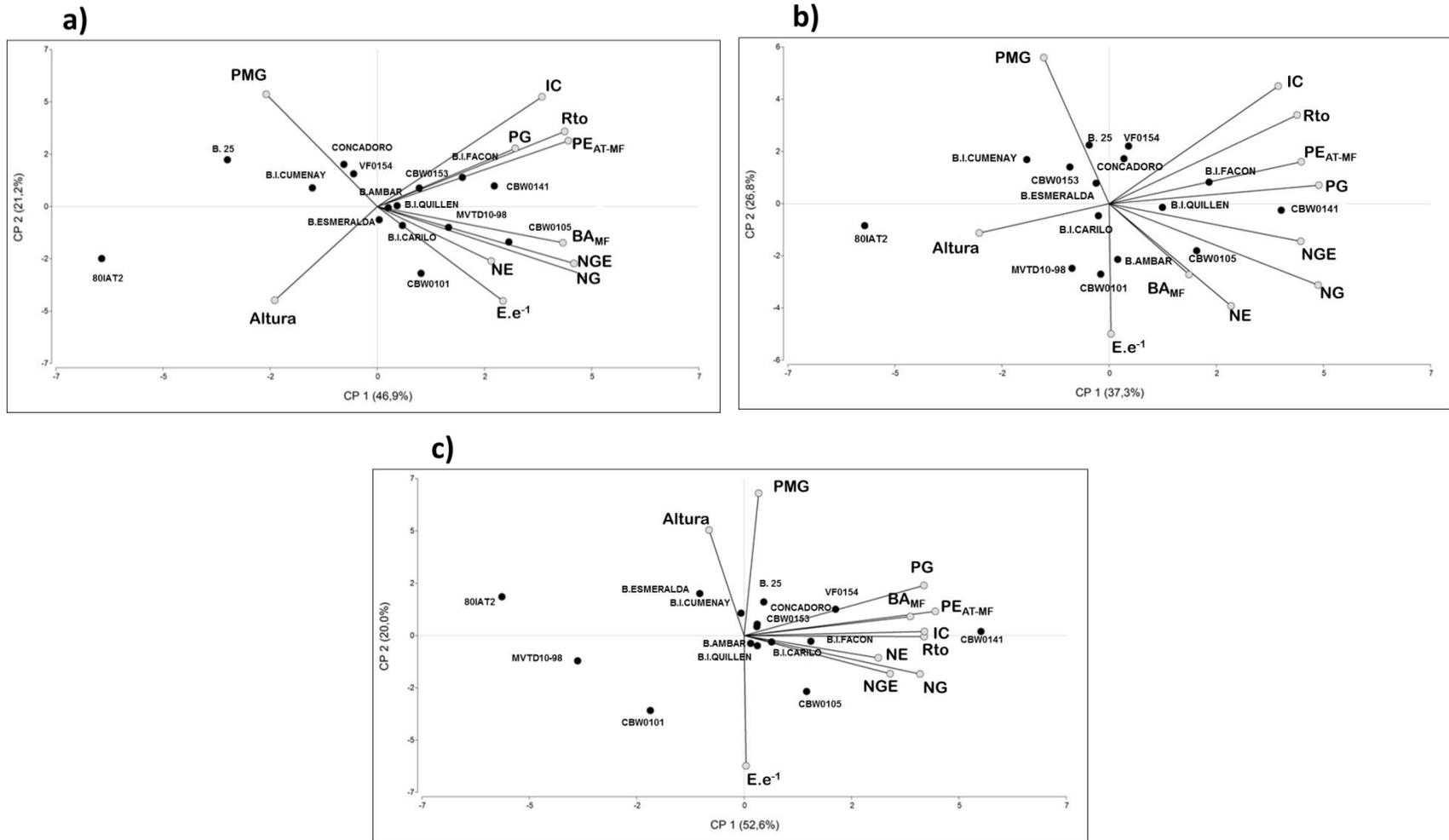


Figura 3.13. Relación entre Rto (rendimiento), PG (peso promedio de granos), NE (número de espigas), NG (número promedio de granos), NGE (número de granos por espiga), e.E⁻¹ (espiguillas/espiga), PMG (peso de mil granos), IC (índice de cosecha), PE_{AT-MF} (peso de la espiga desde AT a MF), BA_{MF} (biomasa aérea en MF) y altura. a) F1, b) F2 y c) F3; fechas de siembra (año 2017). El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros.

Análisis de la varianza (ANOVA)

Se realizó un análisis de la varianza para rendimiento (Rto), altura, índice de cosecha (IC), porcentaje de proteína en grano, peso hectolítrico (PH), número de granos por m² (NG), peso promedio de grano por m² (PG), peso de mil granos (PMG), peso de espigas logrado en el periodo de llenado de granos (PE_{AT-MF}), número de espigas por m² (NE), número de granos por espiga (NGE), espiguillas por espiga (e.E⁻¹), biomasa aérea en madurez fisiológica (BA_{MF}). En las variables que se observó interacción fecha-genotipo (F-G) significativa (Tabla 3.6), se efectuaron test de comparación de medias (LSD) entre fechas y entre genotipos. Se presentan los resultados del análisis de comparación de medias entre fechas y entre genotipos y las relaciones más significativas entre variables a partir del coeficiente de correlación de Pearson (r).

Tabla 3.6. Análisis de la varianza: rendimiento (Rto), altura, índice de cosecha (IC), contenido de proteína en grano, peso hectolítrico (PH), número de granos por m² (NG), peso promedio de granos por m² (PG), peso de mil granos (PMG), peso de espigas logrado en el periodo de llenado de granos (PE_{AT-MF}), número de espigas por m² (NE), número de grano por espiga (NGE), espiguillas por espiga (e.E⁻¹) y biomasa aérea en madurez fisiológica (BA_{MF}).

ANÁLISIS DE LA VARIANZA	2016			2017		
	FECHA (F)	GENOTIPO (G)	F*G	FECHA (F)	GENOTIPO (G)	F*G
Rto (g.m ⁻²)	<0,0001	<0,0001	0,0007*	0,0019	<0,0001	0,0116*
ALTURA (cm)	<0,0001	<0,0001	<0,0001*	<0,0001	<0,0001	0,0049*
IC	0,0004	<0,0001	0,0063*	0,0189	<0,0001	0,0003*
PROTEÍNA (%)	<0,0001	<0,0001	0,0926*	0,6811	<0,0001	0,998
PH (kg.hl ⁻¹)	<0,0001	<0,0001	0,0003*	<0,0001	<0,0001	0,0426*
NG.m ⁻²	0,0019	<0,0001	0,0001*	0,3231	<0,0001	0,2305
PG (g.m ⁻²)	<0,0001	<0,0001	0,1479*	0,0046	<0,0001	0,1396*
PMG (g)	<0,0001	<0,0001	<0,0001*	0,9486	<0,0001	0,4237
PE _{AT-MF} (g.m ⁻²)	<0,0001	<0,0001	0,3698	0,0752	<0,0001	0,1084*
NE.m ⁻²	<0,0001	<0,0001	<0,0001*	0,024	0,0007	0,8097
NGE	0,0078	<0,0001	<0,0001*	<0,0001	<0,0001	<0,0001*
e.E ⁻¹	<0,0001	<0,0001	<0,0001*	<0,0001	<0,0001	<0,0001*
BA _{MF} (g.m ⁻²)	<0,0001	<0,0001	0,3614	0,0008	<0,0001	0,3985

(*) Interacción fecha - genotipo significativa (p < 0,20)

En **negrita** interacción fecha - genotipo no significativa (p > 0,20)

Rendimiento

En el primer año, el promedio de Rto de todas las fechas fue 224,68 g.m⁻², acompañados con altos niveles de proteína (14,42 a 19,12 %) y un valor promedio de PH de 73,16 Kg.hl⁻¹. Los rendimientos desde la F1 a la F3 fueron: 241,366 g.m⁻², 230,27 g.m⁻² y 202,40 g.m⁻² (Tabla 3.4). CBW 0101, MVTD 10-98 y 80-IAT2 estuvieron entre los genotipos con menor rendimiento en las tres fechas y por el contrario CONCADORO, BUCK 25 y VF0154 presentaron altos valores en todas las fechas. Las variedades comerciales B. I. QUILLEN, B. I. FACON, y B. I. CARILO mostraron valores más altos de rendimiento en F1 y F2, mientras que B. ESMERALDA presentó mejor respuesta en F3 (Tabla A3.12; ANEXO). En ocho (8) de los 15 genotipos, el rendimiento fue mayor en la F1, aunque estas diferencias solo fueron significativas ($p < 0,01$) en cinco casos (Fig. 3.14 a).

El promedio global de Rto del ensayo 2017 fue 521,59 g.m⁻² acompañado con un promedio alto de PH (80,59 Kg.hl⁻¹) y un valor de proteína en grano promedio de alrededor del 12,93 %. Los rendimientos expresados en orden desde la F1 a la F3 fueron: 541,73 g.m⁻², 528,45 g.m⁻² y 494,60 g.m⁻² (Tabla 3.4). En todas las fechas, el genotipo de menor Rto fue 80-IAT2, mientras que B. I. FACON presentó el mayor rendimiento en las F1 y F2, y por otro lado CBW 0141 fue el de mayor rendimiento en la F3 (Tabla A3.13; ANEXO). Al comparar cada genotipo entre fechas se observó que cuatro materiales de un total de 15 mostraron valores de rendimiento significativamente diferentes; de los cuales MVTD 10-98 y CBW 0105 fueron más altos en la F1, mientras que B. I. CUMENAY en la F3 y CBW 0101 en la F2. Ocho genotipos presentaron mayor rendimiento promedio en la F2 (Fig. 3.14 b).

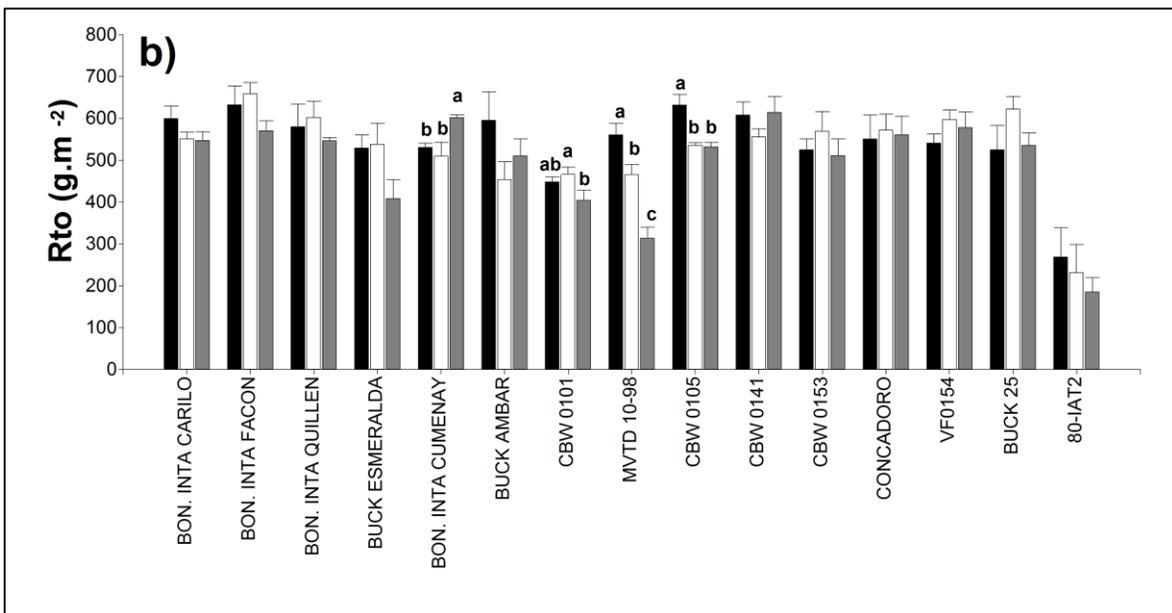
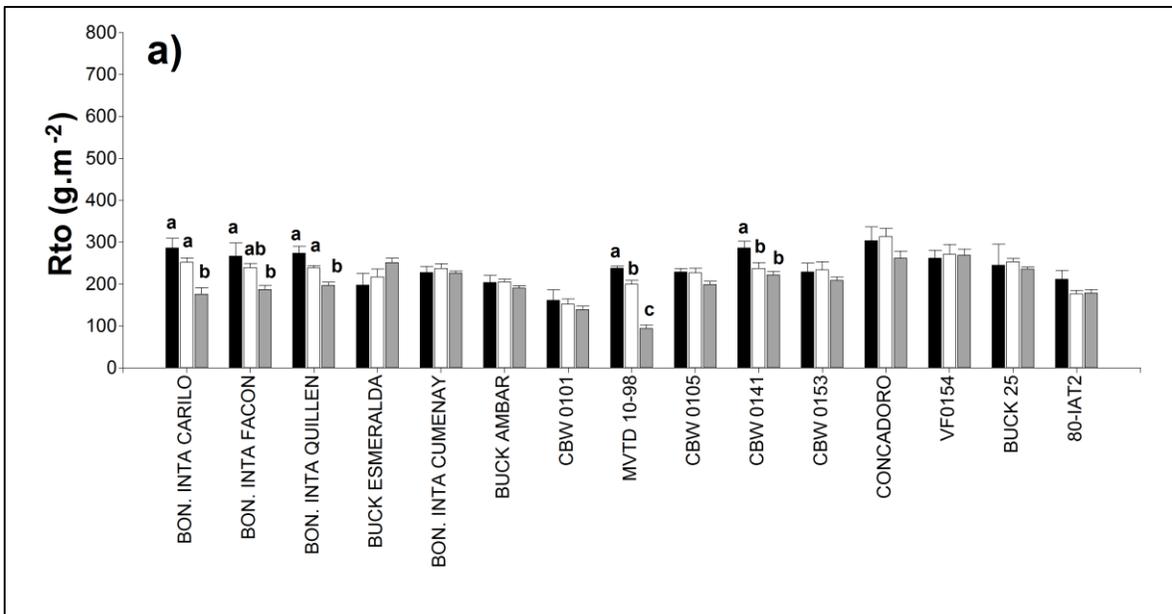


Figura 3.14. Rendimiento (g.m^{-2}) de 15 genotipos de trigo candeal. a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre las fechas. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

Rendimiento y contenido de proteína en grano (Pr)

La variable Pr en el año 2016, mostró interacción fecha - genotipo significativa y varió entre 15,99 y 17,42 %. Los genotipos con menor rendimiento en las tres fechas como por ejemplo CBW 0101, MVTD 10-98 y B. AMBAR, mostraron los valores más altos de proteína (Tabla A3.14; ANEXO). Por otra parte, genotipos como CONCADORO y CBW 0141 con altos rendimientos, obtuvieron menores valores (Tabla A3.14; ANEXO). Este comportamiento se ve reflejado en el coeficiente de correlación entre Rto y Pr, donde si bien los valores de r fueron bajos y no significativos, resultaron negativos en todas las fechas (Tabla A3.16; ANEXO). Para todos los genotipos excepto MVTD 10-98, la F3 generó grano con mayor contenido de proteína que F1 (Fig. 3.15 a).

Los niveles de proteína en 2017, variaron entre 10,61 (F3) y 14,96 (F3) (Tabla A3.15; ANEXO). El análisis de la varianza no presentó interacción significativa fecha -genotipo (Tabla 3.13). Las diferencias entre genotipos fueron significativas ($p < 0,0001$), con una menor variabilidad que en el año 2016 (Fig. 3.15 b). La variable Pr no correlacionó con el Rto, aunque al igual que en 2016, presentó valores de r negativos (Tabla A3.17; ANEXO).

Rendimiento y peso hectolítrico (PH)

En el primer año, el PH fue significativamente diferente entre genotipos (Tabla A3.18; ANEXO) y entre fechas de siembra (Fig. 3.16 a). La mayoría de los genotipos (14) presentaron mayor PH en la F1 y menor en la F3 (Fig. 3.16 a). El mayor valor se observó en la F1 (79,1 kg.h⁻¹, B. I. FACON) y el menor en la F3 (63,6 kg.h⁻¹, B. AMBAR) (Tabla A3.18; ANEXO). En la F1, la correlación entre PH y Rto fue media y significativa ($r = 0,56$, $p < 0,05$); en las F2 y F3, los valores de r se mantuvieron positivos, pero resultaron no significativos (Tabla A3.16; ANEXO).

En el año 2017, el PH fue significativamente diferente entre genotipos (Tabla A3.19; ANEXO) y entre fechas de siembra (Fig. 3.16 b). En ocho (8) genotipos, los valores más altos correspondieron a la F3 y los más bajos a F1 (Fig. 3. 16 b). No se observó una relación significativa entre los valores de PH y Rto, reflejado en coeficientes de correlación (r) muy bajos para las tres fechas ($r < 0,19$) (Tabla A3.17; ANEXO).

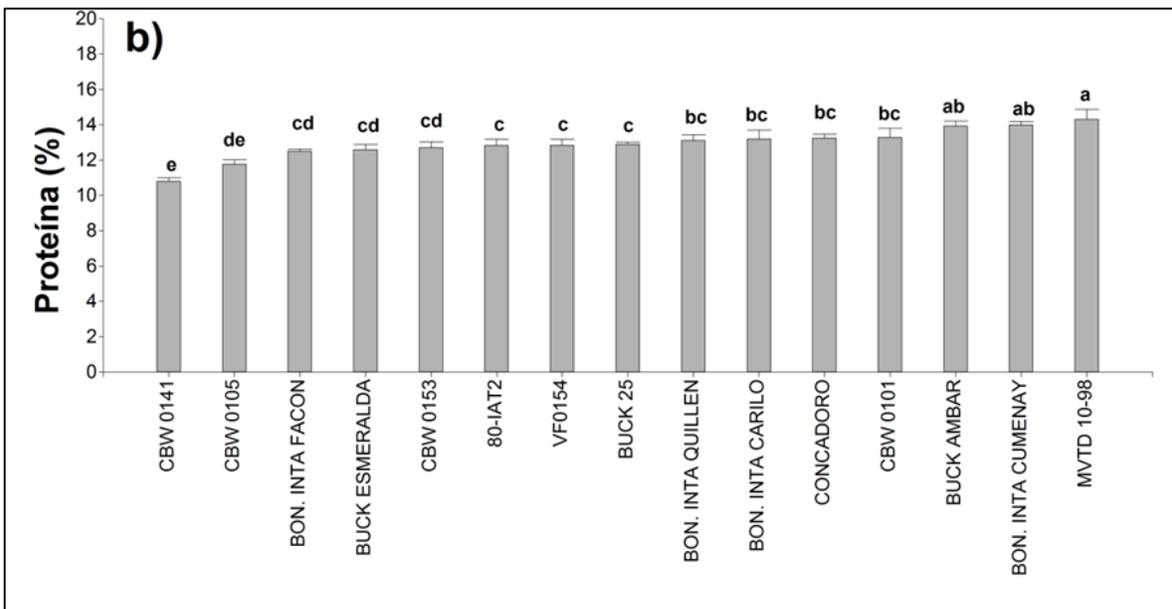
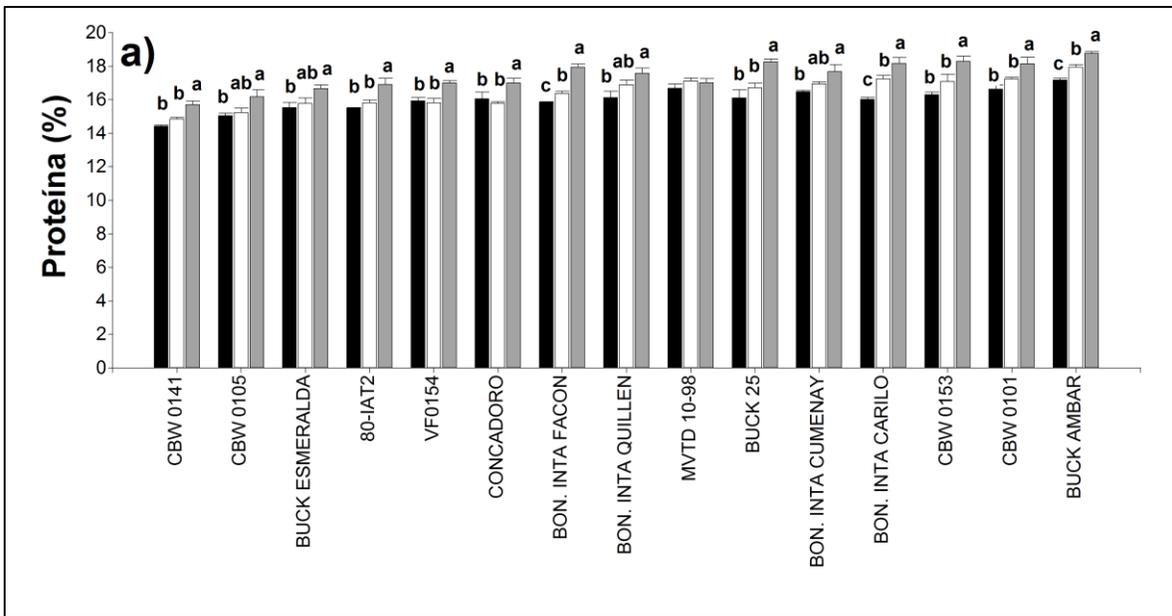


Figura 3.15. Contenido de proteína (%) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016; F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises y b) 2017 (promedio de las tres fechas). Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

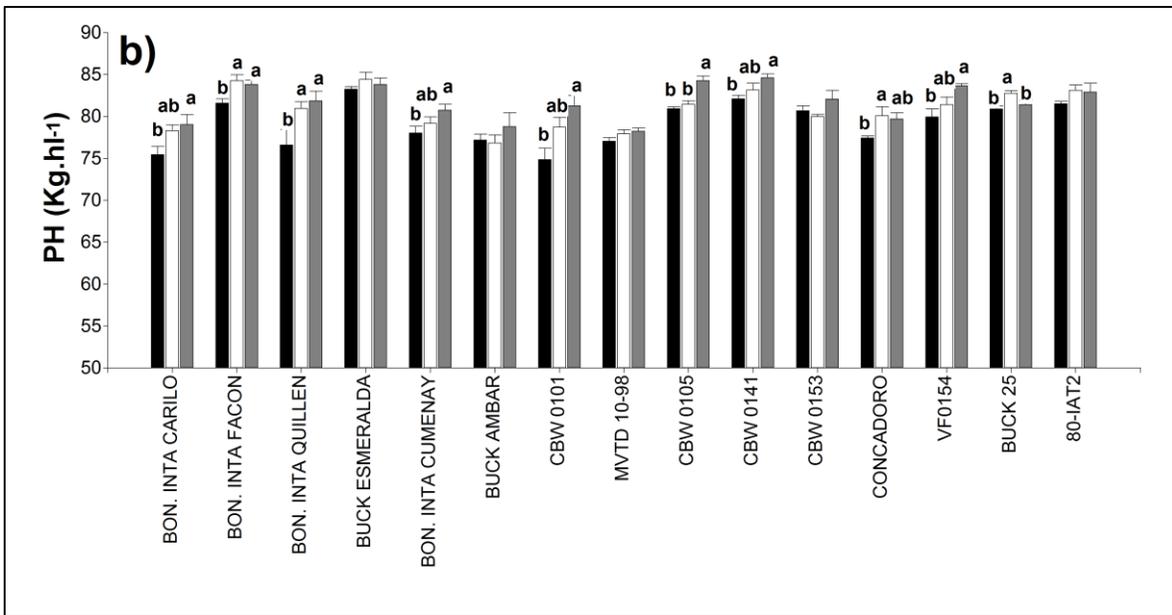
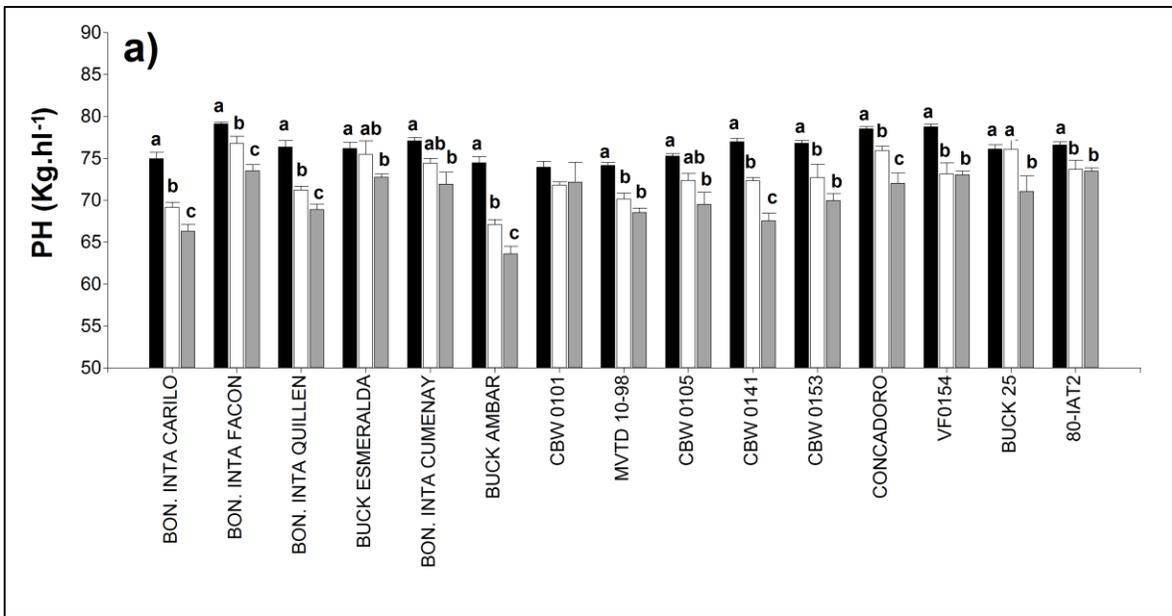


Figura 3.16. Peso hectolítrico PH (kg.hl⁻¹) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

Rendimiento y altura

Los genotipos mostraron una variabilidad elevada en altura en cada fecha. En el año 2016, la mayoría de los genotipos fueron más altos en la F1 y más bajos en la F3, a excepción de 80-IAT2 que mantuvo la misma altura en las tres fechas (Fig. 3.17 a). Se observaron diferencias significativas entre genotipos dentro de cada fecha de siembra (Tabla A3.20; ANEXO). Los valores del coeficiente r entre altura y Rto fueron bajos en las F1 y F2, mientras que en la F3 la correlación fue media y significativa ($r = 0,53$; $p < 0,05$) (Tabla A3.6, A3.7 y A3.8; ANEXO).

En el caso del 2017, aunque los genotipos presentaron una elevada variabilidad en altura, no fue tan pronunciada como en el año 2016 (Tabla A3.21; ANEXO). La mayoría de los genotipos fueron más altos en la F1 y más bajos en la F3, aunque con diferencias significativas sólo en cinco (5) genotipos (Fig. 3.17 b). En las primeras dos fechas, la altura correlacionó con el Rto con valores de r medios, negativos y significativos ($r = -0,57$; $p < 0,05$ y $r = -0,62$; $p < 0,05$), mientras que en la F3, aunque el valor de r también fue también negativo, la correlación fue muy baja y no significativa ($r = -0,33$) (Tabla A3.9, A3.10 y A3.11; ANEXO).

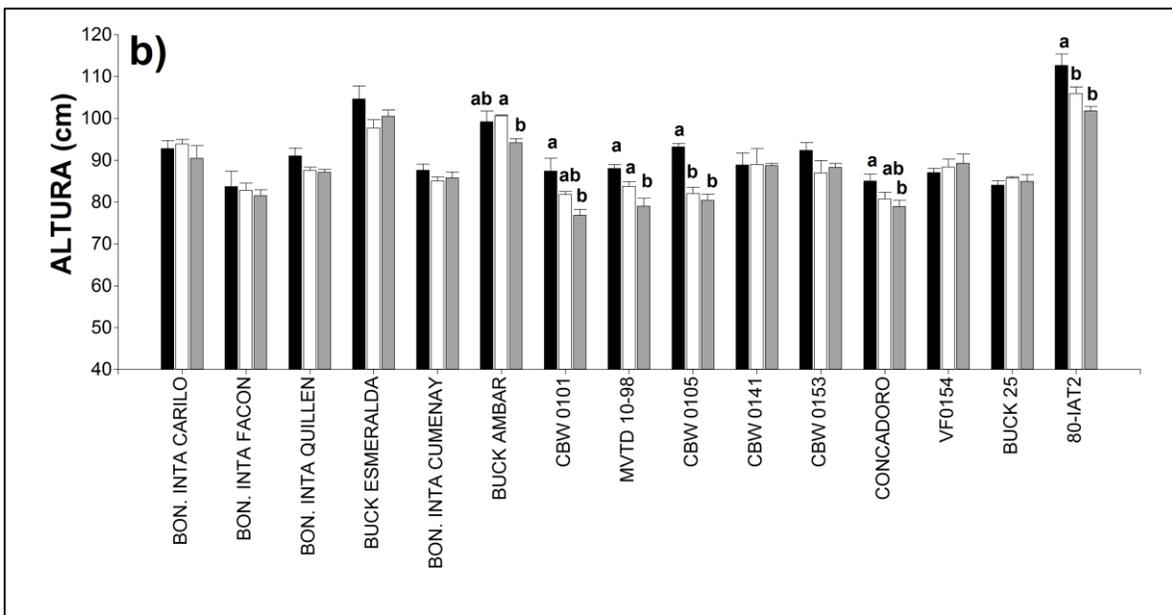
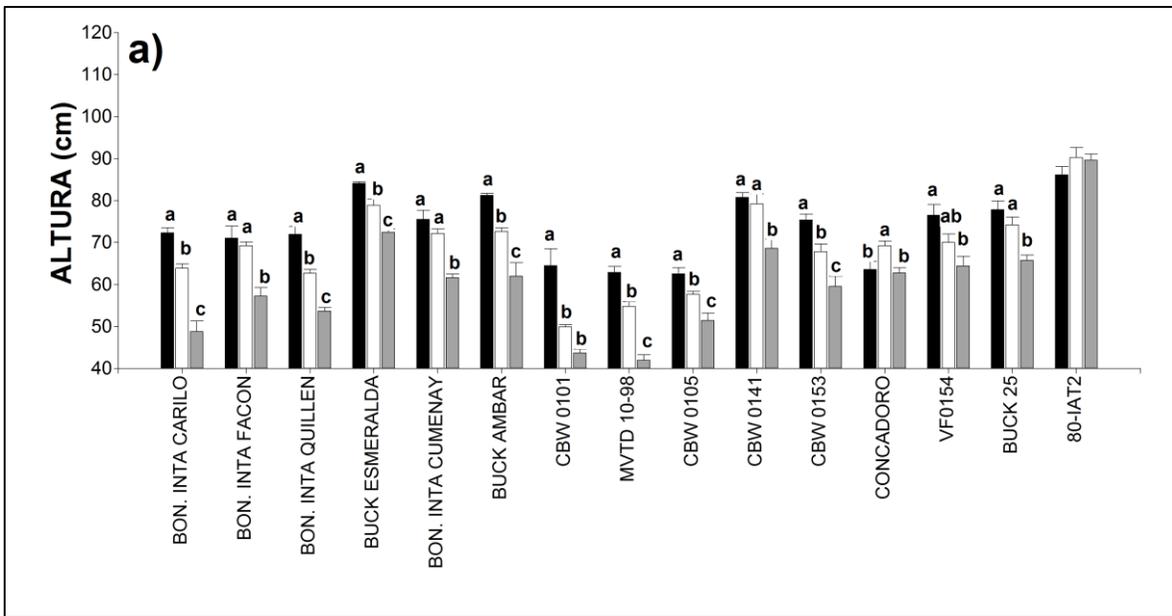


Figura 3.17. Altura (cm) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

Rendimiento e índice de cosecha (IC)

El IC varió entre genotipos y fechas en todo el ensayo en ambos años. En el 2016, presentó un rango de 21,64 (F2) a 44,95 (F2) (Tabla A3.22; ANEXO). En la mayoría de los genotipos (9), el mayor valor promedio de IC se obtuvo en la F2 (Fig. 3.18 a). Los genotipos con mayor IC en todas las fechas fueron CONCADORO, VF0154 y B. I. FACON. Por otro lado, los que presentaron menor valor fueron CBW0101, MVTD 10-98, B. AMBAR y 80-IAT2.

En el año 2017, el IC también varió en todo el ensayo en un rango de 29,78 a 54,91 (Tabla A3.23; ANEXO). En diez (10) genotipos, el mayor valor promedio de IC se obtuvo en la F2, aunque las diferencias fueron significativas solo en dos casos (Fig. 3.18 b).

En análisis de correlación entre IC y Rto reflejó que ambas variables están fuerte y positivamente correlacionadas con valores de r superiores a 0,82 (Fig. 3.19 a y b). Los genotipos que mostraron bajos valores de IC y rendimiento, en ambos años, variaron según la fecha y se encuentran señalados en las Figuras 3.19 a y b.

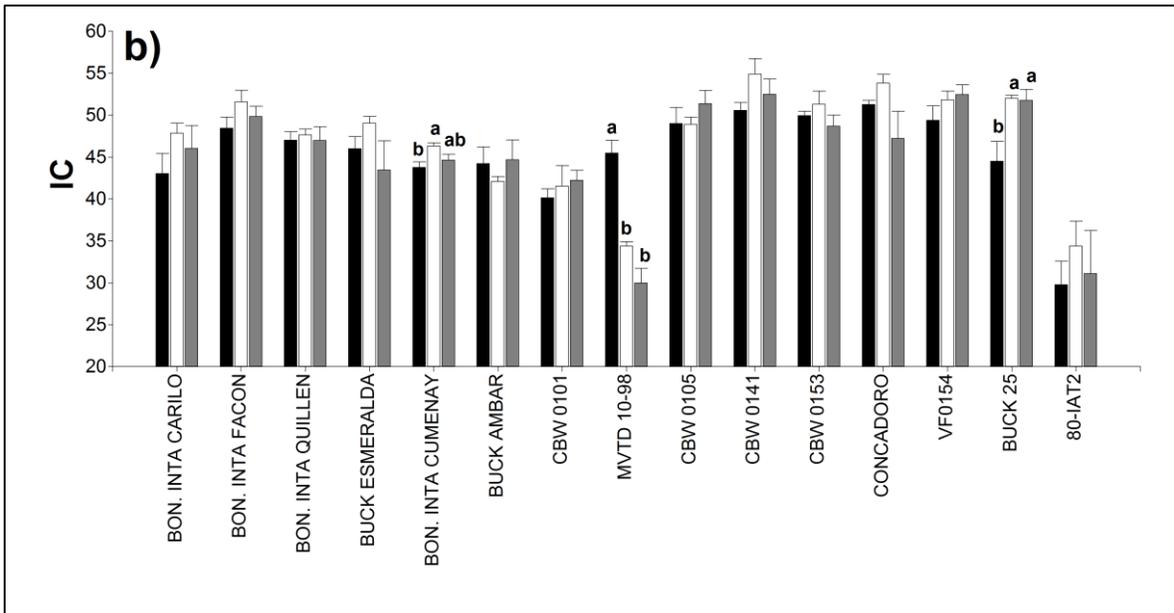
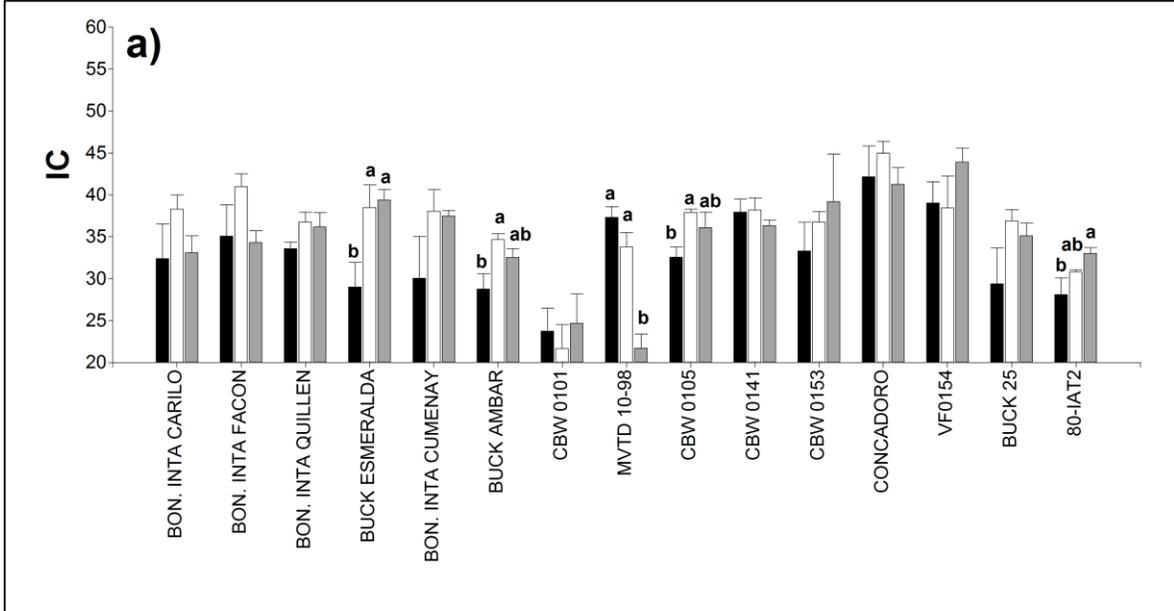


Figura 3.18. Índice de cosecha (IC) de 15 genotipos de trigo candeal; a) 2016 y b) 2017. Las letras corresponden a comparaciones entre fechas. Promedios con letra común no difieren significativamente ($p > 0,05$). La ausencia de letras indica que no hay diferencias significativas entre fechas. F1: barras negras, F2: barras blancas, F3: barras grises. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

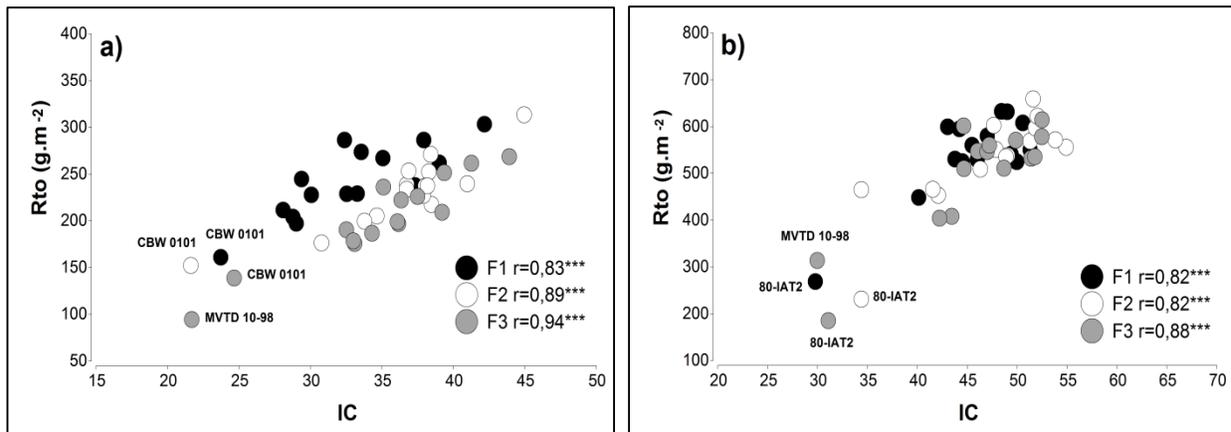


Figura 3.19. Relación entre Rto e IC. F1, F2 y F3: fechas de siembra; a) 2016 y b) 2017. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01 y 0,001, respectivamente.

Índice de cosecha y producción de biomasa

Se analizaron los coeficientes de correlación entre IC, biomasa aérea total acumulada a madurez (BA_{MF}), peso de espigas generado en el período de llenado de granos (PE_{AT-MF}). El IC correlacionó con BA_{MF} , en tres de los seis ensayos (fecha x año) (Fig. 3.20 a y b). Por otra parte, las correlaciones entre IC y PE_{AT-MF} , fueron significativos y superiores a 0,62 en todos los casos (Fig. 3.20 c y d). En la Figura 3.20, para ambos años, se señalan los genotipos que presentaron bajos valores de IC, BA_{MF} y PE_{AT-MF} .

Rendimiento y producción de biomasa

Se observó que la relación entre Rto y BA_{MF} fue positiva y significativa solo en F2 y F3 de 2016 y en F3 de 2017 (Fig. 3.21 a y b). Por otra parte, a mayor peso de espigas generadas en el período desde AT a MF (PE_{AT-MF}), mayor fue el Rto, reflejado en valores de r significativos y superiores a 0,63 en todas las fechas (Fig. 3.21 c y d).

Además, el aumento de BA_{MF} estuvo asociado con aumentos en PE_{AT-MF} en F2 y F3 ($r > 0,85$) de 2016 y en F1 y F3 de 2017 (Fig. 3.22 a y b).

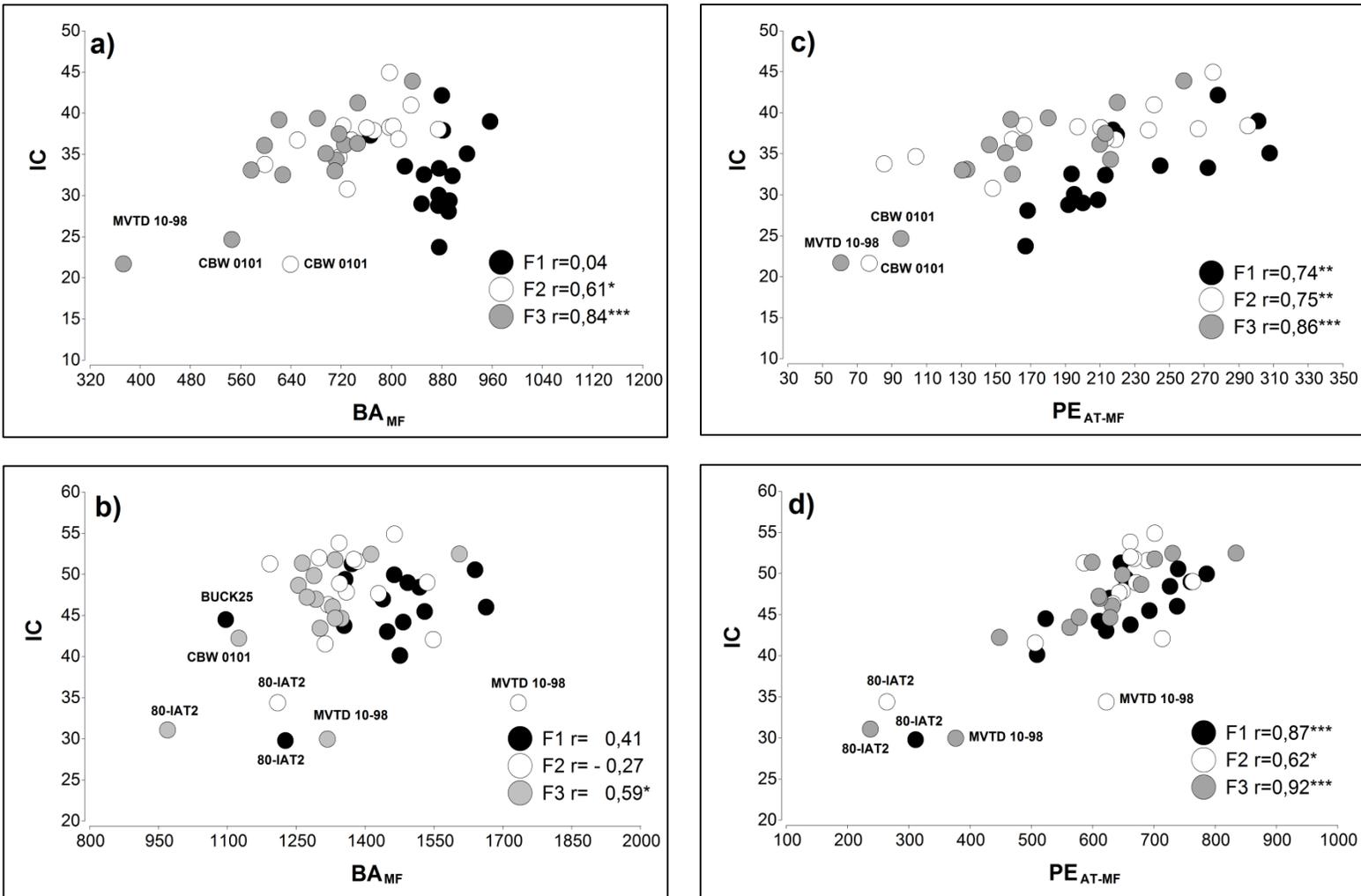


Figura 3.20. Relación entre IC y BA_{MF} : a) 2016 y b) 2017. Relación entre IC y PE_{AT-MF} : c) 2016 y d) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01, y 0,001, respectivamente.

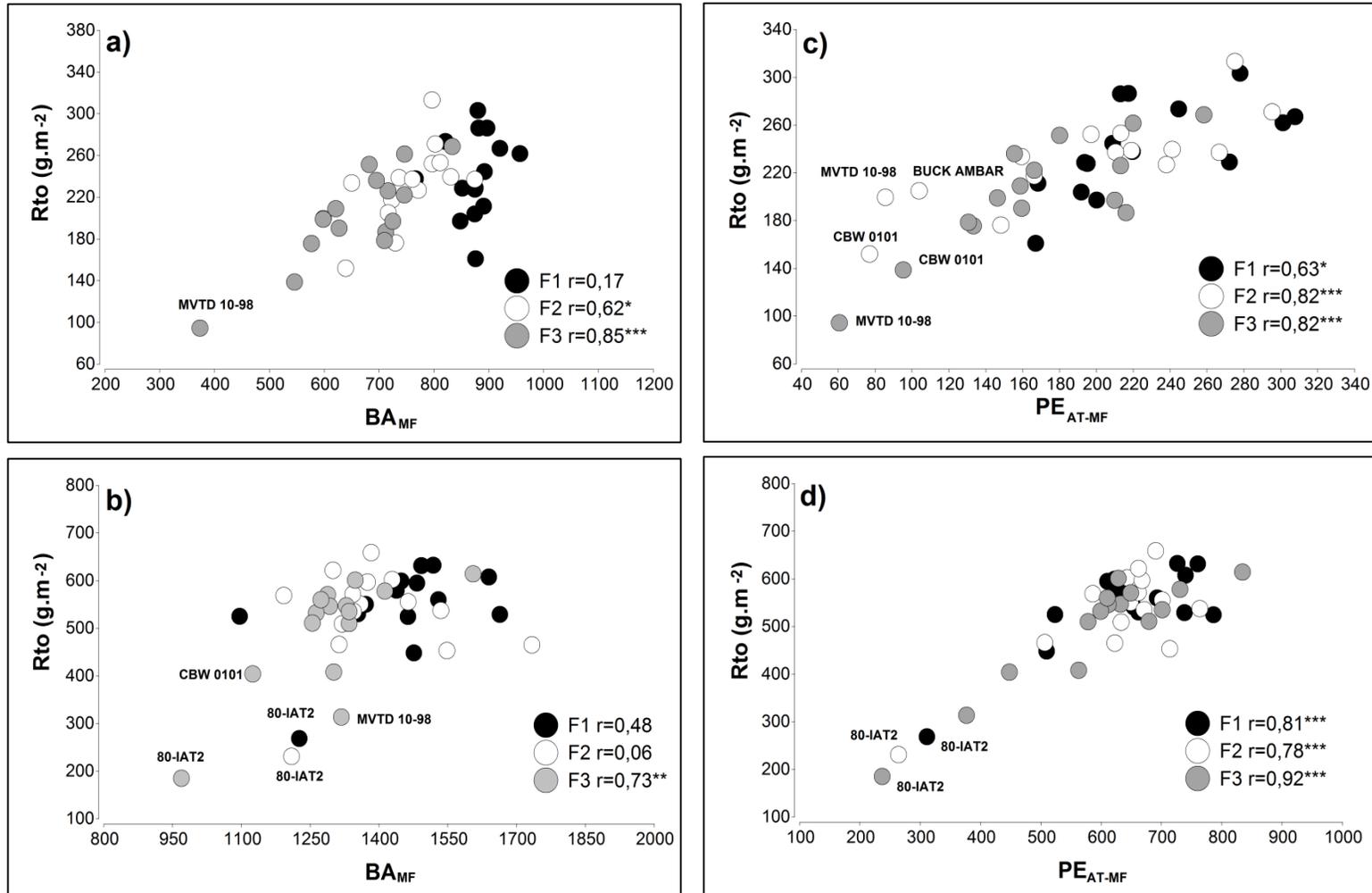


Figura 3.21. Relación entre IC y BA_{MF}: a) 2016 y b) 2017. Relación entre IC y PE_{AT-MF}: c) 2016 y d) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01, y 0,001, respectivamente.

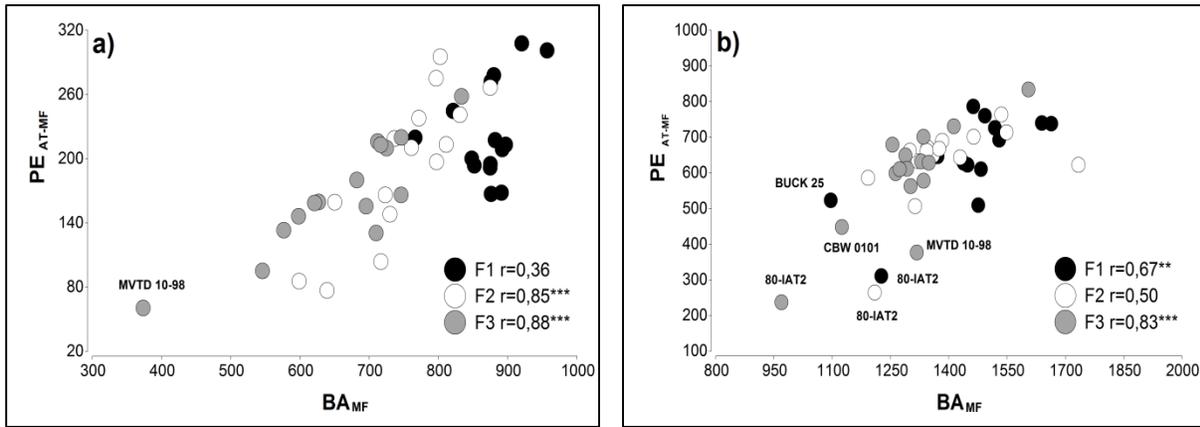


Figura 3.22. Relación entre PE_{AT-MF} y BA_{MF} : a) 2016 y b) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01 y 0,001, respectivamente.

Componentes numéricos del rendimiento

El peso promedio de granos por m^2 (PG) correlacionó con Rto con coeficientes de r positivos y significativos en cinco de los seis ensayos (fecha x año) (Fig. 3.23 a y b). Por otro lado, el NG no presentó una relación alta con el Rto, demostrado en valores de r inferiores a 0,65 (Fig. 3.23 c y d).

La relación entre PG y NG en ambos años, fue positiva y significativa en F2 y F3 (Tablas A3.7, A3.8, A3.10, A3.11; ANEXO).

Tal como se observó en los gráficos del Análisis de Componentes Principales, el número de espiguillas por espiga ($e.E^{-1}$) mostró una relación negativa con el rendimiento en 2016 (Tablas A3. 6 - A3. 8; ANEXO), mientras que, en el año 2017, ambas variables no mostraron correlación (Tablas A3. 9 - A3. 11; ANEXO).

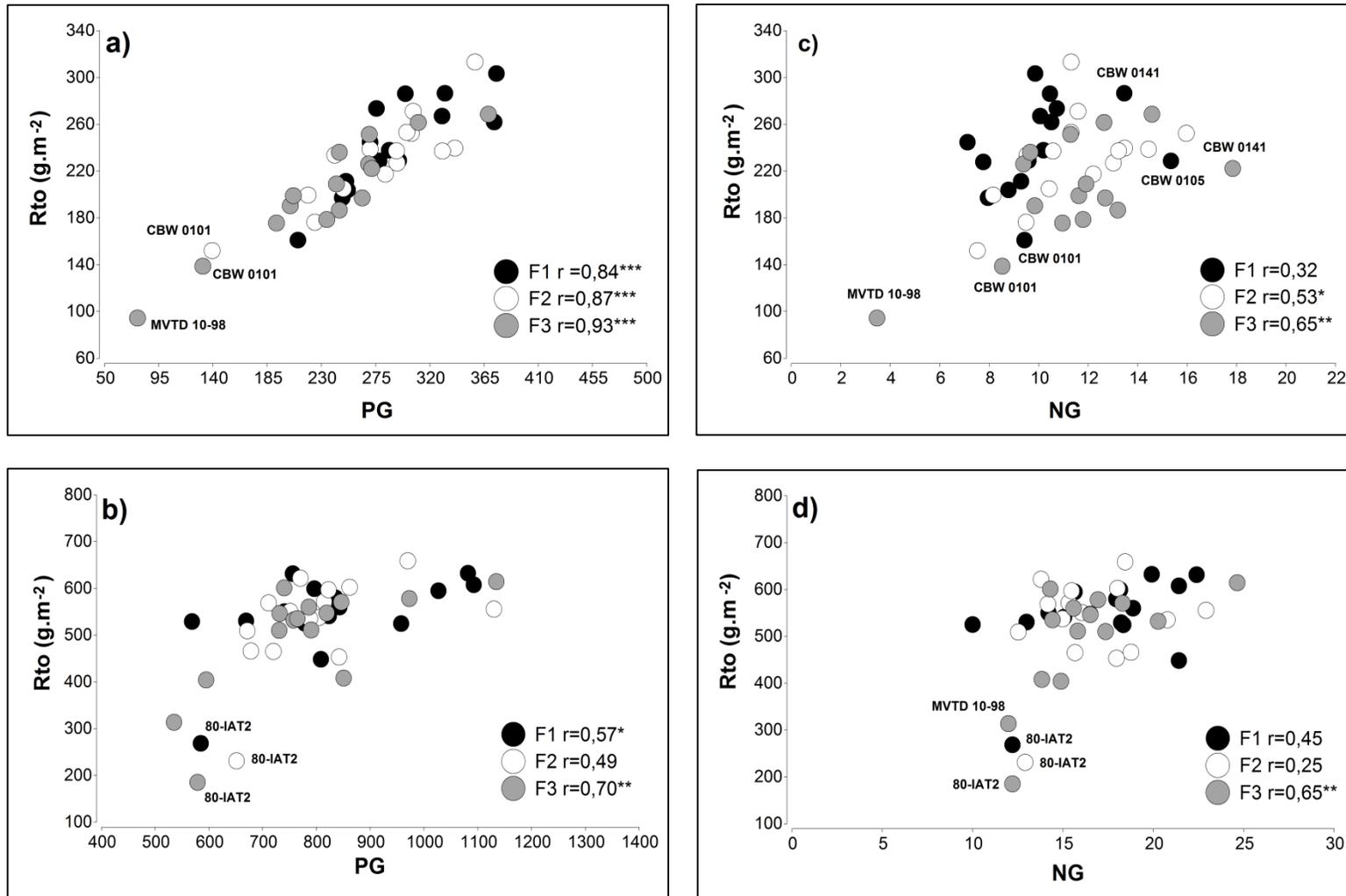


Figura 3.23. Relación entre Rto y PG: a) 2016 y b) 2017. Relación entre Rto y NG: a) 2016 y b) 2017. F1, F2 y F3: fechas de siembra. El valor de r es el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas variables. *, ** y *** corresponden a un nivel de probabilidad significativo menor que 0,05; 0,01 y 0,001, respectivamente.

Heladas en espigazón

La evaluación del efecto de heladas en el año 2016, se realizó solo en F1 y F2 porque en F3 no se observaron síntomas. Los porcentajes de daño no superaron el 10 % en ninguno de los genotipos analizados. Los valores promedio en ambas fechas fueron similares, variando entre 0 % (MVTD 10-98, CBW 0101 y CBW 0105) y 9,48 % (B. ESMERALDA) en la F1 y 0 % (MVTD 10-98, CBW 0101 y CBW 0105) y 9,24 % (B. ESMERALDA) en la F2. En la F1, los genotipos más afectados fueron B. ESMERALDA (9,48 %), CBW 0141 (8,64 %), BON. INTA FACON (6,24 %), 80-IAT2 (5,7 %) y CBW 0153 (5,25 %), mientras que en la F2 fueron B. ESMERALDA (9,24 %), VF 0154 (7,18 %), CONCADORO (7,15 %) y 80-IAT2. En la F1, el 1,89 % fueron espigas afectadas por zonas (Z), 0,55 % completamente blancas (B) y 1,17 % deformadas (De). Por otra parte, en la F2, los porcentajes fueron 1,23 %, 1,90 % y 0 %, respectivamente.

La interacción fecha-genotipo fue no significativa (Tabla A3.24; ANEXO). Sumado a esto, los desvíos fueron muy elevados, por lo que no se encontraron diferencias entre fechas de siembra (Fig. 3.24). A pesar de la ausencia de interacción fecha - genotipo, en la Figura 3.24 se observan algunos genotipos que se comportaron de manera diferente entre las F1 y F2 por lo que decidió realizar un análisis de cada fecha por separado. En este sentido, se encontraron diferencias significativas entre genotipos, sólo en la F1, siendo significativamente diferentes ($p < 0,05$) CBW 0141 (% daño = 8,63) de B. I. CARILLO (% daño = 0,25) (Tabla 3.7). En este estudio se excluyeron los genotipos de ciclo más largo como CBW 0101, CBW 0105 y MVTD 10-98 porque no fueron afectados por heladas (0 % de daño) y a BUCK ESMERALDA debido a que presentó valores de desvíos muy elevados. Se analizó el comportamiento general de todos los genotipos, mediante el análisis de componentes principales (ACP) utilizando como variables días a antesis (D_{AT}), los tres tipos de daños en espiga: blanca (B), deformada (De) y afectada en zonas (Z) y el porcentaje de daño total (%D), para las dos fechas de siembra (Fig. 3.25). En la F1, las componentes explicaron el 91,1 % de la varianza y la CP1 con 61,9 % de la varianza total (Fig. 3.25 a), presentó elevada correlación positiva ($r > 0,72$) con % D y todos los tipos de daño (B, De, Z) y negativa con D_{AT} ($r = -0,67$). Por su parte la CP2 con el 29,2 % de la variación presentó correlación positiva media a alta (0,61 - 0,67) con D_{AT} y De y negativa con espigas afectadas por zonas (Z). Se observó que genotipos con mayor D_{AT} , mostraron menor porcentaje de daño total (%D) ($r = -0,58$, $p < 0,05$).

Como se mencionó anteriormente, en la F2 no se observaron espigas deformadas. Las componentes 1 y 2 explicaron el 93,2 % de la varianza y la CP1 con 77,9 % de la varianza total (Fig. 3.25 b), presentó alta correlación positiva ($r > 0,98$) con %D y todos los tipos de daño de espigas y negativa con D_{AT} ($r = -0,74$). Por su parte la CP2 con el 15,3 % presentó correlación positiva media ($r = 0,63$) con D_{AT} . De la misma manera que en la F1, a mayor D_{AT} , menor es el porcentaje de daño (%D) ($r = -0,61$; $p < 0,05$). Por otro lado, también se observó una relación negativa entre D_{AT} y todas las formas de espigas afectadas (Tabla A3.25; ANEXO). Este análisis permitió agrupar a los genotipos de ciclo más corto y mayores daños en los cuadrantes de la derecha, mientras que en los cuadrantes de la izquierda se agruparon los genotipos de ciclo más largo y menores porcentajes de daño (Fig. 3.25).

Tabla 3.7. Porcentaje de daño de espigas por heladas de 11 genotipos de trigo candeal para la F1 del año 2016. Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,05$).

GENOTIPO	\bar{X}	LSD
CBW 0141	8,64	a
BON. INTA FACON	6,24	ab
80-IAT2	5,70	ab
CBW 0153	5,25	ab
CONCADORO	4,96	ab
BUCK 25	4,39	ab
BON. INTA QUILLEN	3,50	b
BON. INTA CUMENAY	2,63	b
VF0154	2,11	b
BUCK AMBAR	0,98	b
BON. INTA CARILO	0,25	c

Tabla 3.8. Valores promedio de daño en espigas por heladas de 15 genotipos de trigo candeal en dos fechas de siembra y días a antesis (D_{AT}). D: daño total; B: espiga blanca; De: espiga deformada; Z: espiga dañada por zonas.

GENOTIPO	FECHA 1					FECHA 2				
	D _{AT}	Blanca (%)	Deformada (%)	Zona (%)	Daño total (%)	D _{AT}	Blanca (%)	Deformada (%)	Zona (%)	Daño total (%)
80-IAT2	124	1,13	0,77	3,8	5,7	104	3,83	0	2,1	5,93
BON. INTA CARILO	146	0	0	0,25	0,25	117	0,22	0	1,34	1,56
BON. INTA CUMENAY	132	0	0,56	2,07	2,63	108	0	0	0,81	0,81
BON. INTA FACON	130	1,37	1,73	3,14	6,24	111	2,67	0	1,62	4,29
BON. INTA QUILLEN	142	1,45	0,87	1,18	3,5	115	0,2	0	0,44	0,64
BUCK 25	130	0	0,53	3,86	4,39	109	3,22	0	1,3	4,52
BUCK AMBAR	146	0	0	0,98	0,98	114	0,25	0	0,25	0,5
BUCK ESMERALDA	147	2,43	6,25	0,79	9,47	114	3,9	0	5,33	9,23
CBW 0101	156	0	0	0	0	127	0	0	0	0
CBW 0105	152	0	0	0	0	121	0	0	0	0
CBW 0141	130	1,1	1,4	6,13	8,64	113	2,42	0	0	2,42
CBW 0153	135	0,25	3,24	1,76	5,25	109	1,57	0	1,16	2,73
CONCADORO	131	0,48	1,64	2,84	4,96	108	5,28	0	1,87	7,15
MVTD 10-98	156	0	0	0	0	127	0	0	0	0
VF0154	130	0	0,61	1,5	2,11	108	4,95	0	2,23	7,18
Media (\bar{x})	-	0,55	1,17	1,89	3,61	-	1,90	0	1,23	3,13

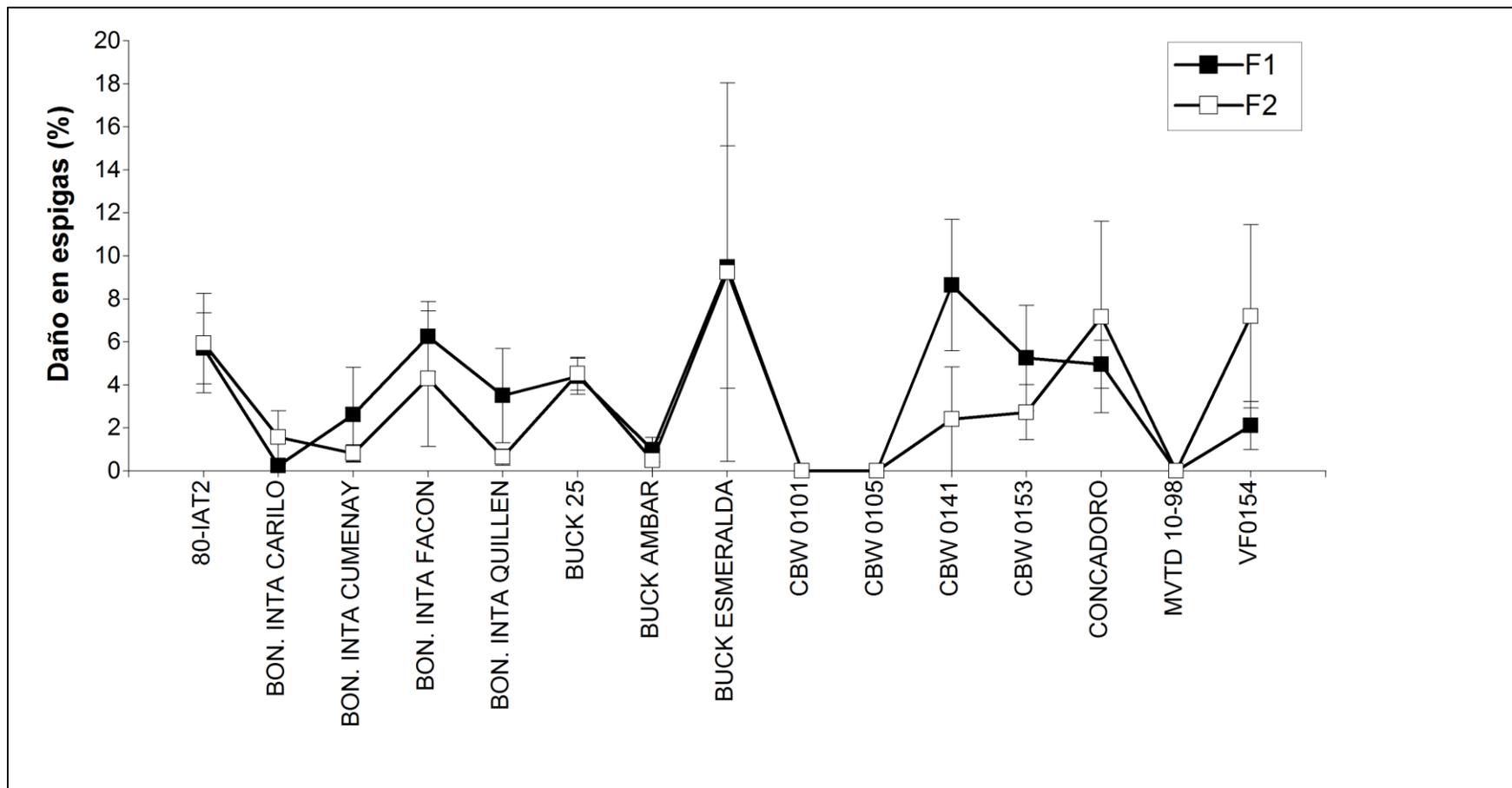


Figura 3.24. Daño provocado por heladas en 15 genotipos de trigo candeal en 2016. F1: fecha 1; F2: fecha 2. La variación entre las réplicas de cada genotipo se indica mediante la barra de error estándar.

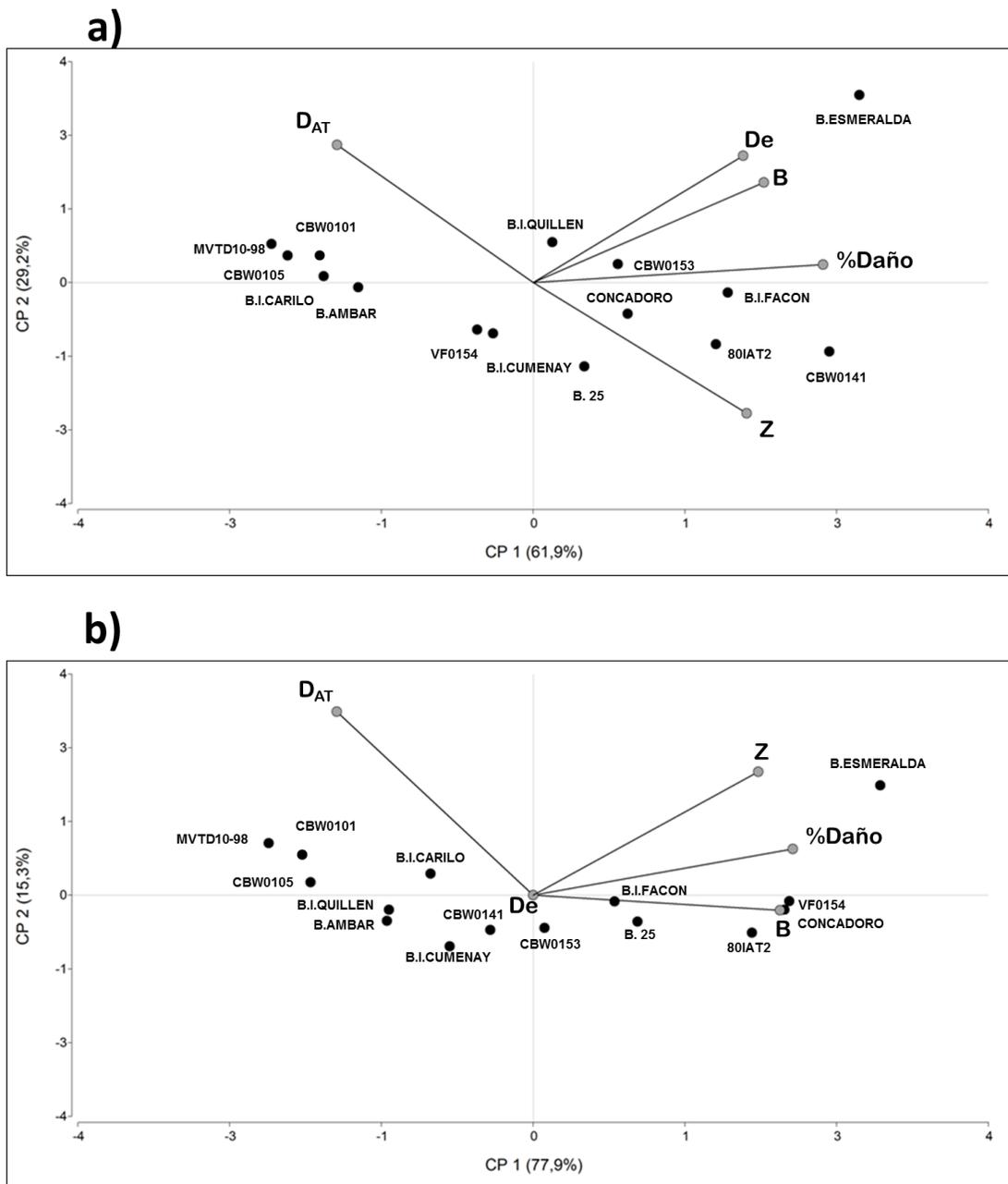


Figura 3.25. Relación entre días a AT (D_{AT}) y porcentaje de daño por frío es espigas: % D (daño total), B (espiga blanca), De (espiga deformada) y Z (espiga afectada por zonas). a) F1, b) F2 (año 2016). El eje X representa la componente 1 (CP1) y el eje Y la componente 2 (CP2) del análisis de componentes principales (ACP). Las variables se encuentran representadas por vectores con un círculo gris y los genotipos por círculos negros.

DISCUSIÓN

En este capítulo se obtuvieron los rendimientos de 15 genotipos de trigo candeal, sembrados en tres fechas (F1, F2 y F3) durante dos años consecutivos (2016 y 2017) en la Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow-INTA (EEAI). Así mismo, se registraron los días a floración y a madurez y las siguientes variables: peso promedio de granos por unidad de superficie (PG), peso de mil granos (PMG), número de granos por unidad de superficie (NG) y sus subcomponentes (NE, NGE, $e.E^{-1}$), biomasa total a madurez fisiológica (BA_{MF}), peso de las espigas logrado en el período de llenado de los granos (PE_{AT-MF}), índice de cosecha (IC), altura, proteína y peso hectolítrico (PH). Para la evaluación del rendimiento y relaciones entre variables, se consideraron los efectos de las fechas de siembra, incluyendo una fecha previa a las habituales de junio y julio, con el objetivo de obtener información del comportamiento de materiales de trigo candeal con variabilidad en su ciclo (Ing. Adelina Larsen INTA Barrow, comunicación personal).

Además del análisis de la varianza y multivariado (análisis de componentes principales), se evaluaron las relaciones entre las variables más importantes y el rendimiento a partir del coeficiente de correlación de Pearson. En este sentido, conocer las correlaciones entre los caracteres fenotípicos, es importante para tener éxito en la selección en los programas de mejora (Reynolds *et al.*, 1994; Larsen, 2017). Además, el análisis de las variables asociadas con el rendimiento *per se*, desconociendo las relaciones entre sí, constituye información incompleta para la determinación de criterios de selección (Royo *et al.*, 2007).

El Rto y variables relacionadas fueron ampliamente afectados por la fecha de siembra (Tabla 3.4), resultados coincidentes con Satorre *et al.* (2004), Ferrise *et al.* (2010), Bassu *et al.* (2009), Ehdaie & Waines (2001). Además, y de acuerdo con Rharrabti (2001) y Elhani *et al.* (2007) se observó variación en las variables medidas debidas al genotipo. Por otro lado, y en concordancia con Reynolds *et al.* (1994) y Doğan (2009), los coeficientes de correlación entre las variables fueron diferentes entre años y fechas.

Interpretación de las diferencias de rendimiento entre años

Los efectos ambientales, contrastantes según año de ensayo, fueron muy importantes en la determinación del rendimiento. La diferencia en el régimen hídrico, observada entre años, ejerció una gran influencia sobre los parámetros medidos. En este sentido, las precipitaciones del año 2016 (638,3 mm) alcanzaron la mínima histórica para la zona (632,06 mm), mientras que en 2017 fueron superiores a la mínima histórica en 98,8 mm (Borda, 2018)

El análisis de la varianza mostró interacción significativa *año – genotipo* ($<0,0001$) (Tabla A3.3; ANEXO).

Los promedios de rendimiento en el año 2017 fueron superiores que en 2016 (~132 %) (Fig. 3.7), explicados principalmente por las condiciones climáticas de mayor humedad previo a la siembra (recarga de perfiles) y durante el período del cultivo. El período clave para la definición del rendimiento de trigo en nuestra región comprende desde principios de octubre hasta principios de diciembre (Larsen, 2017). Se registraron vientos desecantes, temperaturas elevadas y escasas precipitaciones desde mediados de octubre y en el mes de noviembre de 2016. Según Borda (2017), las altas temperaturas durante el período de octubre a diciembre de 2016, causaron un adelantamiento en el desarrollo de los cultivos de cosecha fina. En este contexto, en el año 2016, se observó una mayor fluctuación entre genotipos en la mayoría de las variables, comparado con 2017, sugiriendo que las condiciones más favorables del segundo año probablemente disminuyeron las respuestas diferenciales entre genotipos. Por otra parte, si bien en el segundo año, también se observaron déficits hídricos y temperaturas superiores a la media normal histórica (14,9 °C), se produjo una compensación por las lluvias más abundantes de noviembre (62,3 mm en 2017 vs 18,9 mm en 2016).

Análisis del efecto de la fecha de siembra

Las precipitaciones constituyen una oportunidad para realizar la siembra. Fischer & Armstrong (1990) enfatizan la importancia de las prácticas de manejo para maximizar la humedad del suelo en otoño y aumentar la ventana de tiempo disponible para realizar la siembra. En regímenes climáticos de tipo Mediterráneo, la combinación óptima de fecha de siembra y cultivar son determinantes críticos del rendimiento (Connor *et al.*, 1992). La siembra en una fecha temprana permite un mejor aprovechamiento de la humedad del suelo en la región, considerando que los meses de otoño (marzo-abril y mayo) son más lluviosos que el período desde junio a agosto (Borda, 2015).

En ambos años, los ciclos vegetativos de los genotipos (D_{AT}) fueron superiores en la F1 con respecto a la F3, siendo F2 un valor intermedio. En concordancia, Bassu *et al.* (2009) observaron en trigo un mayor período de siembra a antesis en las fechas más tempranas. Cabe mencionar que D_{AT} de los materiales sembrados en F2 y F3 presentaron valores promedio similares a otros ensayos de trigo candeal realizados en la región (75-90 días) (Larsen *et al.*, 2017).

En lo que respecta al período de llenado de granos (D_{AT-MF}) se observó la misma tendencia que D_{AT} , siendo el valor promedio de la F1 mayor con respecto a la F2 y ésta mayor a F3, aunque en el año 2017 la diferencia entre F2 y F3 no fue tan pronunciada. En este sentido, las observaciones de 2017 pueden explicarse en función de que la F2 y F3 ocurrieron en el mismo mes (Julio) debido a que las fechas de ese año sufrieron un desplazamiento (en comparación con 2016) a causa de un inconveniente en la estación experimental. Además, en Bassu *et al.* (2009), y coincidente con los resultados de esta tesis en el año 2016, las mayores diferencias entre fechas en los cultivares de trigo candeal utilizados, se observaron en condiciones hídricas más limitantes, mientras que, en un ambiente con mayor humedad, la diferencia entre fechas se redujo.

El estudio de ACP entre R_{to} , D_{AT} y D_{AT-MF} , representa un análisis donde el número de variables y objetos están desbalanceados. Teniendo en cuenta esto, los gráficos resultantes se analizaron solo para ver el comportamiento general de los datos, focalizando principalmente en los coeficientes de correlación entre variables. Así, en ambos años y dentro de cada fecha, los genotipos de menor duración hasta la antesis y mayor período de llenado de granos, presentaron mejores rendimientos. A un mayor tiempo transcurrido desde la siembra a antesis (D_{AT}) se observaron menores rendimientos (coeficiente r entre R_{to} y D_{AT} negativo). Por el contrario, con un mayor período de llenado D_{AT-MF} , los rendimientos fueron mayores (coeficiente r positivo) (Tabla A3.4 – A3.5; ANEXO). Además, D_{AT} mostró una elevada y negativa correlación con D_{AT-MF} . La relación negativa entre el ciclo a antesis y la duración del llenado de grano parece ser un carácter común en los cereales como trigo candeal (Motzo *et al.*, 1996). Además, cuando se alarga el período vegetativo, la fase de llenado de granos suele tener lugar bajo condiciones de mayor temperatura y déficit hídrico (Rharrabti, 2001). Los mayores rendimientos en el año 2017 se asociaron a un período vegetativo promedio menor ($\bar{X} = 99,38$ días) en comparación con 2016 ($\bar{X} = 112,86$ días), y a un período de llenado de granos promedio superior ($\bar{X} = 50,71$ días) respecto del 2016 ($\bar{X} = 37,24$ días) (Tabla 3.5). Diferencias en rendimiento de genotipos de trigo candeal entre condiciones con y sin déficit hídrico se asociaron a diferencias en la duración de los períodos vegetativo y de llenado de grano (Rharrabti, 2001).

Los valores de correlación entre D_{AT-Rto} y $D_{AT-MF-Rto}$ fueron en los dos años crecientes desde F1 a F3, lo que sugiere que la variación en ciclo tiene un efecto mayor en las fechas más tardías (Fig. 3.11). En este contexto la F1 del 2017 fue particular dado que los valores de r fueron cercanos a cero. Esta ausencia de correlación podría deberse a que las

condiciones climáticas de ese período resultaron homogéneamente favorables para la mayoría de los genotipos (Fig. 3.11 b y d).

En cuanto al promedio por fechas, en concordancia con Coventry *et al.* (1993), Spink *et al.* (2000) y Ehdai & Waines (2001), los rendimientos disminuyeron en las fechas más tardías de siembra (Tabla 3.4). Los genotipos en las siembras tempranas, se encuentran más desarrollados fenológicamente cuando las temperaturas medias comienzan a elevarse acortando el proceso de llenado y afectando por lo tanto el rendimiento (Andersson, 1983; Sokoto & Singh, 2013). Las variaciones en el rendimiento de acuerdo a la fecha de siembra coinciden con Stapper y Fischer (1990) y con Turner (2004), quienes señalaron que el ciclo a antesis combinado con el efecto de fechas de siembra y diferentes genotipos resultan parámetros adecuados para describir variaciones en el rendimiento.

Comportamiento de genotipos

A partir de los valores de rendimiento de los genotipos en cada fecha y de acuerdo al análisis de la varianza y la comparación entre valores promedio (Tablas A3.12 y A3.13; ANEXO), se pudieron diferenciar materiales relativamente estables (grupo 1) y otros más afectados por la variable fecha (grupo 2). Entre los estables en ambos años, y con bajos rendimientos, se encuentran 80-IAT2 y CBW 0101. En el año 2016, se suman al grupo 1: B. AMBAR, CBW 0153, CBW 0105 (rendimiento intermedio), CONCADORO y VF 0154 (alto rendimiento). En el mismo año, los genotipos del grupo 2 (con respuesta a fecha más marcada) fueron MVTD 10-98, B. I. FACON, B. I. QUILLEN, B. I. CARILO y CBW 0141 (mayor rendimiento en F1 y F2), B. I. CUMENAY y BUCK 25 (mayor rendimiento en F2) y B. ESMERALDA (mayor rendimiento en F2 y F3).

Por otra parte, en el año 2017, el grupo 1 lo conforman: B. I. QUILLEN y CBW 0141, BUCK 25, CBW 0153 CONCADORO y VF 0154 (alto rendimiento), mientras que el grupo 2 lo componen B. I. CUMENAY (mayor rendimiento en F3), MVTD 10-98 y CBW 0105 (mayor rendimiento en F1), B. ESMERALDA, B. I. FACON (mayor rendimiento en F1 y F2), B. AMBAR y B. I. CARILO (mayor rendimiento en F1).

Teniendo en cuenta este análisis se observa que cinco (5) genotipos se mantuvieron en el grupo de estables en los dos años mientras que otros cinco (5) mostraron un efecto más marcado de las fechas sobre el rendimiento y, los restantes presentaron comportamiento dependiente del año. Por ejemplo, la variedad B. ESMERALDA mejoró su rendimiento en F2 y F3 en el año 2016, mientras que en 2017 generó el rendimiento más alto en F1 y F2. Este comportamiento diferencial de B. ESMERALDA, podría en parte explicarse por el grado de

daño provocado por las heladas en esta variedad en las primeras dos fechas del año 2016, ya que fue el genotipo más afectado (Tabla 3.8).

Rendimiento y acumulación de biomasa aérea

El análisis multivariado para ambos años (ACP), permitió observar que IC, PG y PE_{AT-MF} fueron las variables que mejor explicaron cambios en el rendimiento (coeficiente r elevados y positivos), en cada fecha de siembra, determinando que los genotipos con mayor rendimiento fueron los de mayor IC, PG y PE_{AT-MF}. En este sentido, y coincidente con Stapper & Fisher (1990) y Kobata *et al.* (2018), el rendimiento fue fuertemente explicado por el IC ($r > 0,82$) en todas las condiciones. El rendimiento potencial de trigo ha mejorado debido a aumentos en el índice de cosecha (IC) (Curtis, 2002). Igualmente existen umbrales óptimos de IC (50 %) por encima de los cuales se puede producir el vuelco en las plantas (García, 2012). Los valores promedio de IC por fecha en este trabajo, no superaron el 48 % (con un valor máximo de 54,91 % en el año 2017). Si bien el IC fue superior en el año 2017 en comparación con el año 2016, los aumentos en esta variable no mostraron una diferencia tan marcada entre años (32,65 %) como otras variables (Rto, BA_{MF} y PE_{AT-MF}) que tuvieron porcentajes de diferencias $> 80\%$ (Tabla 3.4). Se ha observado que las altas temperaturas y la sequía disminuyen el contenido de biomasa y el rendimiento en trigo pan, aunque no afectan significativamente el índice de cosecha (Mondal *et al.*, 2014). Se observaron diferencias significativas de IC entre fechas en cinco (5) genotipos en el año 2016 y en tres (3) en 2017, lo que sugiere que otras variables han sido probablemente más importantes en la determinación de las diferencias de Rto entre fechas para cada genotipo. En este contexto, Miralles & Slafer (2007), proponen una mejora en la biomasa producida más que en el IC, para lograr mejoras en el rendimiento. Como se mencionó anteriormente, las mejores condiciones del año 2017 provocaron un mayor contenido de materia seca en comparación con el primer año (Tabla 3.4), aunque en ambos años, la biomasa de espigas en el periodo de llenado de granos (PE_{AT-MF}) y la biomasa de granos en gramos.m⁻² (PG) fueron superiores en la F1 (Tabla 3.4). Estos resultados sugieren que la generación de una mayor partición de biomasa a espiga y grano en el periodo de llenado de granos en F1, explica la obtención de valores de Rto promedio decrecientes hacia F3 ($r > 0,63$). En Ehdaie & Waines (2001) y Ferrise *et al.* (2010), la siembra temprana en comparación con la tardía, mostró mayor contenido de biomasa seca, resultando en mayores rendimientos de grano.

Al analizar BA_{MF} entre fechas se ve que los mayores valores también se obtuvieron en F1, sin embargo, en su relación con Rto se observó que en la siembra más temprana la asociación no es significativa, pero aumenta en la última fecha, sugiriendo que BA_{MF} es una variable que cambia su relación con el Rto entre fechas. La baja correlación entre BA_{MF} y Rto en F1 en ambos años puede explicarse considerando que en siembra temprana los genotipos acumulan más homogéneamente valores altos de biomasa aérea total, asociado a un período vegetativo más largo, alcanzando el período de llenado de granos en condiciones más favorables que en las fechas posteriores. Esta observación se refleja también en las correlaciones más bajas de BA_{MF} con PE_{AT-MF} (Fig. 3.22 a y b) y con IC (Fig. 3.20 a y b) en F1 de 2016 y F1 y F2 de 2017.

La biomasa por unidad de superficie puede incrementarse gracias a las prácticas agronómicas (siembra temprana, alta densidad de siembra, dosis adecuadas de fertilizantes, especialmente nitrogenadas) y por medio de la mejora genética (Rharrabi, 2001). Además, según Stapper & Harris (1989), en fechas más tempranas, la intercepción de la radiación solar es mayor y, en consecuencia, es mayor la acumulación de materia seca. En relación a la variable altura, el valor promedio de las plantas no superó los 100 cm y mostró interacción significativa genotipo - fecha. En el año 2017, el valor promedio de altura fue superior al del año anterior en un 32,03 %, indicando que las diferencias climáticas tuvieron un efecto importante sobre esta variable; además las condiciones más favorables del 2017 redujeron la variabilidad entre genotipos. En ambos años, la altura disminuyó con el retraso en la fecha de siembra. En los valores de correlación entre Rto y altura no se observó una tendencia general que describa los datos de los dos años, ya que en 2016 los valores de r cambiaron en magnitud y signo entre fechas y aunque en 2017 también variaron en magnitud, fueron todos negativos. Esto último, refleja que en condiciones favorables de humedad como las del 2017, se ven beneficiados en rendimiento los genotipos de menor altura, en detrimento de los más altos. Los materiales como 80-IAT2, B. ESMERALDA y B. AMBAR son ejemplos de genotipos altos y de rendimientos más bajos. El caso particular de 80-IAT2 muestra un material que independientemente de las condiciones de clima, mantuvo valores promedio de rendimiento similares y bajos, con una diferencia entre años, no mayor a $250 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}$. Parece tratarse de un genotipo ineficiente en la partición a espiga y afectado negativamente por la altura (Maeoka *et al.*, 2020).

Efecto de años y fecha de siembra sobre el contenido de proteína y peso hectolítrico

El contenido promedio de proteína varió entre años (16,62 % en 2016 vs 12,93 % en 2017). Novaro *et al.* (1997) proponen que el efecto del ambiente, comparado al genotípico, es preponderante para esta variable. La diferencia entre años es esperable considerando que las condiciones de régimen hídrico más favorables y por tanto de mayor Rto en el 2017, normalmente se asocian a menores contenidos de proteína. Según Campbell *et al.* (1981), el contenido proteico en grano aumenta bajo condiciones de formación de grano adversas. Los valores en 2016 no solo fueron más altos (rango 15,99 - 17,42 % vs 10,79 - 14,31 %; Fig. 3.15) sino que además fueron afectados por la interacción fecha-genotipo, mientras que en 2017 la interacción no tuvo efecto sobre el contenido proteico (Tabla 3.5).

Alto contenido proteico, no siempre es un buen indicio de mayor calidad, ya que también es importante el tipo de proteínas y la relación gluteninas: gliadinas (Stone & Savin, 1999). Además, se podría producir una pérdida de la calidad por exceso de proteína (Irvine, 1971). Para la elaboración de pasta se requiere un contenido proteico en la sémola en el rango del 12 al 15 % (Sissons, 2008), lo que determina que los valores del 2016 no se ajustan a este requerimiento. Se ha puntualizado que la mejor opción para la industria procesadora es buscar trigos con niveles proteicos entre medianos y altos (Irvine, 1971).

En ambos años, el coeficiente de correlación entre proteína y rendimiento (aunque se trató de valores bajos y no significativos) fue negativo, en concordancia con Coventry *et al.* (1993) y Ehdai & Waines (2001). Las relaciones negativas entre el contenido de proteína y el rendimiento de grano se han atribuido a un efecto de dilución de los compuestos nitrogenados cuando la deposición de carbohidratos aumenta (Cox *et al.*, 1986, Jenner *et al.*, 1991).

En cuanto al efecto de la fecha sobre el contenido proteico, en el año 2017 no se observaron diferencias significativas entre fechas mientras que en el año 2016 y coincidente con los resultados reportados por Coventry *et al.* (1993), el contenido proteico fue superior hacia las fechas más tardías de siembra; reflejado en valores proteicos de los granos cosechados en F2 y F3, más alejados de los parámetros requeridos de calidad.

La correlación negativa entre el rendimiento y el contenido de proteína ha demostrado ser un obstáculo importante en los programas de mejoramiento de trigo candeal que deseen incrementar rendimientos y porcentaje de proteína (Suprayogi *et al.*, 2011). Está generalmente establecido que cuando el porcentaje de proteína ha sido utilizado como criterio de selección en los programas de mejora, los progresos han sido únicamente a costa

del rendimiento en grano (Jenner *et al.*, 1991). Sin embargo, esto no es una regla general ya que la correlación entre rendimiento y proteína para un determinado genotipo puede ser cero, positiva o negativa (Kramer, 1979) y se ha encontrado inclusive, un alto contenido proteico para un mismo nivel de rendimiento en genotipos específicos (Stoddart & Marchall, 1990). Según Larsen (2017), es necesaria la identificación de QTLs implicados en el control de la calidad de grano y que sean independientes del rendimiento.

El peso hectolítrico (PH) es un parámetro importante considerado en las mediciones de calidad industrial de trigo. El PH está altamente influenciado por el tamaño y forma del grano. Factores como la presencia de granos inmaduros, dañados severamente por sequía o por enfermedades disminuyen el peso hectolítrico y por lo tanto el rendimiento harinero (Halverson & Zeleny, 1988). El rango de PH requerido en los estándares de comercialización de trigo en Argentina varía desde 73 a 79 kg.hl⁻¹. En condiciones limitantes como las del primer año, y de acuerdo a los valores de PH observados desde F1 a F3 (76,35, 72,83 y 70,29 kg.hl⁻¹), se observa que las F2 y F3 generaron valores de PH por debajo del mínimo requerido por el estándar de comercialización. En el año 2017, todas las fechas mostraron promedios por encima del grado mayor del estándar (> 79 kg.hl⁻¹), un 10,16 % superior al primer año (Tabla 3.4). Según Peña *et al.* (2007), en condiciones de elevada humedad se obtienen valores altos de peso hectolítrico (82 kg. hl⁻¹)

El comportamiento de la variable peso de mil granos (PMG) fue similar al de PH; significativamente mayor en F1 del 2016, y sin diferencias entre fechas en 2017. En cuanto a los requerimientos de la industria, los valores de PMG en 2016 estuvieron en todas las fechas por debajo de los considerados normales para trigo candeal (41-46 g) con un promedio general de 30,39 g, mientras que en 2017 los valores promedio por fecha se ajustaron e incluso superaron los estándares ($\bar{X} = 48,22$). Si bien el peso final de los granos se considera como una propiedad conservativa del genotipo (Motzo *et al.*, 1996), en esta tesis, las altas temperaturas en el año 2016 durante el período crítico (octubre a diciembre) causaron un bajo peso promedio de mil granos en todos los genotipos.

Rendimiento y componentes numéricos

El número de granos (NG) y peso de los granos (PG) por unidad de superficie, son los dos componentes numéricos principales del rendimiento. En este estudio, el NG mostró una relación moderada con el rendimiento ($r < 0,65$). Esta asociación fue menor a la informada en estudios previos (Slafer & Andrade 1989; Reynolds *et al.*, 1999). Nuestros resultados son consistentes considerando que, aunque bajo condiciones ambientales contrastantes entre

años y con un NG 52,15 % superior en 2017, la relación entre NG y Rto resultó similar entre las correspondientes fechas de ambos años (Tabla A3.6-A3.11; ANEXO). Esta tendencia que se mantuvo en todos los ensayos (año x fecha) podría estar asociada al grupo particular de genotipos seleccionado, y al grado de heterogeneidad en los caracteres evaluados.

En cuanto a PG, estuvo correlacionada con Rto en cinco de los seis ensayos (fecha x año), aunque en 2017 las correlaciones fueron más débiles que en 2016. El número de granos por unidad de superficie (NG) se considera la variable que mejor explica el rendimiento en trigo, aunque cambios en el peso de los granos (PG) pueden afectar el rendimiento final del cultivo una vez establecido el número de granos (Slafer, *et al.*, 2003).

Es sabido que períodos sustanciales con moderadamente altas temperaturas durante el período de llenado de granos, reduce el rendimiento a través de la disminución del peso individual de los granos (Sofield *et al.*, 1977). Esto explica el bajo valor promedio de PG observado en el año 2016 (\bar{X} = 267.4 vs \bar{X} = 799.6 g.m⁻²). En Rharrabti (2001), la sequía durante el período de llenado de granos, provocó similarmente bajo peso de grano y acortamiento del período de llenado en genotipos de trigo candeal. Se ha demostrado una reducción entre el 3 y el 5 % en el peso de los granos por cada grado de aumento de la temperatura por encima de 15 °C en el período de llenado de los granos en condiciones controladas y a campo (Wardlaw & Wrigley, 1994). En trigo pan, las altas temperaturas durante el período inmediatamente previo a la floración también afectan el peso potencial de los granos (Miralles *et al.*, 2010). Los cultivares de trigo pan que exhiben floración temprana pueden escapar efectivamente a los impactos negativos de las condiciones de alta temperatura y escasez de agua en el período de llenado de grano (Kobata *et al.*, 2018). En nuestro estudio esta situación se evidencia en el hecho de que al comparar los valores de PG entre fechas de siembra, la F3 (con mayor exposición a temperaturas elevadas en el período de floración) presentó significativamente menor PG, que en fechas previas (Tabla 3.4). Estos resultados están en concordancia con Caballero & Abbate (2013) donde el PG de varios cultivares de trigo pan disminuyó al atrasar la fecha de siembra en el Sudeste de Buenos Aires.

El NG se relacionó positivamente con el PG en todas las fechas, aunque los valores de r solo fueron significativos en las F2 y F3 de ambos años (0,65- 0,77), indicando que en general los genotipos con mayor NG fueron los que produjeron mayor PG. La menor correlación en F1 de ambos años (0,30-0,42), sugeriría que el mayor PG obtenido en esa fecha no es directamente dependiente del NG. Por otro lado, la ausencia de efecto negativo del número

sobre el peso de los granos, lleva a considerar sobre todo en F2 y F3, la posibilidad de seleccionar ambos caracteres para aumentar el rendimiento (García, 2012).

Con respecto a los subcomponentes del NG, a pesar de las marcadas diferencias en el rendimiento, los promedios del número de espigas (NE) presentaron una baja variabilidad entre años (16,88 %). Además, la fecha de siembra tuvo efecto sobre el NE, reflejado en valores menores en la F1 que en las posteriores. Estos resultados coinciden con lo observado por Spink *et al.* (2000). Por otra parte, el coeficiente de correlación entre NE y NG, reflejó una relación positiva y elevada en ambos años, en todas las fechas ($r > 0,71$), excepto en la F1 de 2016 ($r = 0,39$).

En cuanto a la relación entre NG y el subcomponente número de granos por espiga (NGE), fueron positivos y significativos en ambos años (Tabla A3.6 - A3.11). En este sentido, el NGE suele ser el subcomponente que mejor explica las diferencias en el NG (Slafer & Andrade, 1993; Calderini *et al.*, 1999). Sin embargo, los subcomponentes NE y NGE, presentaron coeficientes r inferiores a 0,34 e incluso negativo en la F1 de 2016 (-0,28), atribuible a una supervivencia diferencial de las flores en cada espiguilla (García, 2012).

Según Miralles *et al* (2010), la idea genérica sería que cuando mejora la disponibilidad de recursos o la eficiencia de captura de esos recursos, permitiendo que más macollos sobrevivan, se generan señales que determinan que dentro de cada vástago menos flores sobrevivan y como consecuencia el NGE se reduce en respuesta al aumento de NE. En el mismo sentido, las correlaciones negativas entre Rto y espiguillas por espiga ($e.E^{-1}$) obtenidas en 2016, podrían también interpretarse como consecuencias de la supervivencia selectiva de espiguillas. Aun cuando el NE no fue muy diferente al del 2017, es posible que el nivel de fotoasimilados y en un año desfavorable, no haya sido suficiente para abastecer la totalidad de las espiguillas. Los coeficientes de correlación entre Rto y $e.E^{-1}$ inferiores a 0,29 de 2017, están en concordancia con Royo *et al.* (2007).

Evaluación del daño por heladas en el año 2016

Si bien en este estudio las evaluaciones de daño por heladas se realizaron en estadio de espigazón, el informe anual de INTA Barrow (Larsen, 2017) señala que en estadio vegetativo las plantas no fueron significativamente dañadas. Registramos daños en espigas por la incidencia de heladas en septiembre de 2016 que tuvieron efecto muy variable en los genotipos analizados.

El daño provocado por las heladas de los primeros días de septiembre (Tabla A3.1; ANEXO) fue cuantificado sobre espigas afectadas de los genotipos sembrados en las dos primeras fechas. Los porcentajes de daño por genotipos, en ambas fechas, no superaron el 10 % y el promedio en F1 y F2 fue de 3,61 y 3,13 %, respectivamente (Tabla 3.8). Además, la ausencia de interacción fecha-genotipo, reflejó que la fecha no tuvo efecto en el porcentaje de daño en espigas por genotipo. En relación al tipo de daño (espigas blancas, deformadas o afectadas por zonas), en la primera fecha se detectó un mayor porcentaje de espigas dañadas por zonas, seguido por espigas deformadas y en menor medida; blancas. Para la segunda fecha, el daño fue principalmente debido a espigas blancas y en menor medida por zonas, mientras que no mostró espigas deformadas. Resultados obtenidos por Basualdo (2013), en genotipos de trigo candeal durante dos años (2008 y 2011) en dos ambientes distintos (Barrow y Cabildo) indicaron que la forma más frecuente de daño fue espiga afectada en zonas.

El análisis de correlación determinó, en ambas fechas, que mientras más largo es el ciclo desde la emergencia a antesis (D_{AT}), menor es el daño provocado por heladas, reflejado en coeficientes de correlación negativos entre esta variable y los tipos de daño en espigas. En este estudio, y en concordancia con Basualdo (2013) y Magra (2005), fue posible agrupar a los genotipos con mayor daño por heladas y ciclo más corto, por un lado, diferenciados de los de ciclo más largo que llegan al momento de la ocurrencia de heladas en estadio de encañazón o espiga embuchada. Sin embargo, se observó que, en el grupo de materiales con valores de daño más bajos, se incluyeron genotipos de ciclo intermedio-largo, pero también otros de ciclo comparativamente más cortos tales como B. I. CUMENAY y BUCK 25. Según Sieber *et al.* (2014), el potencial de rendimiento del trigo candeal podría explotarse mucho mejor si existieran variedades con mayor tolerancia a las heladas, que podrían sembrarse en otoño.

La selección por tolerancia a frío a campo, suele ser una limitante en los programas de mejoramiento e incluso es poco común incluir las mediciones de daño por heladas en los modelos de simulación desarrollados para predecir variaciones en el rendimiento (Asseng *et al.*, 2004). Según Loss & Siddique (1994), el impacto de las heladas durante la antesis, común en muchas regiones de cultivo de tipo mediterráneo, puede reducir los rendimientos en grano. Consideramos que los bajos porcentajes de daño por heladas en nuestras condiciones de campo no permiten identificar diferencias importantes entre genotipos. El hecho de que no se encontraron diferencias en los niveles de daño entre F1 y F2 señala que

ambas fechas serían equivalentes en cuanto a la proporción de espigas afectadas por este estrés ambiental.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo, permitieron cumplir el objetivo planteado que fue evaluar los efectos de la fecha de siembra en un grupo de genotipos de trigo candeal, en relación a la variable rendimiento y sus componentes, días a floración, producción de biomasa y cuantificar el daño causado por temperaturas bajo cero en espigazón a campo.

El rendimiento estuvo altamente afectado por la variable año, asociado principalmente al régimen de precipitaciones. Los menores valores de rendimiento en 2016 estuvieron acompañados por valores más bajos en todas las variables excepto en proteína.

Los períodos D_{AT} y D_{AT-MF} en promedio fueron más extendidos en la F1, menores en la F3 e intermedios en la F2. Los mayores valores de Rto, dentro de cada fecha (excepto en la F1 de 2017), se observaron en los materiales de menor duración de la etapa hasta antesis (D_{AT}) y más extendido período de llenado de granos (D_{AT-MF}).

En ambos años la variable Rto tuvo mayor valor promedio en la F1 acompañado de BA_{MF} , PG, PE_{AT-MF} y altura. Del análisis de componentes principales entre rendimiento y las variables asociadas, se deduce que IC, PG y PE_{AT-MF} , en particular esta última, fueron las que mejor explicaron cambios en el rendimiento (coeficientes de correlación positivos, elevados y significativos en la mayoría las condiciones evaluadas). Los componentes numéricos NE y NG tuvieron aportes menores en la determinación del Rto.

La variedad CONCADORO junto a la línea VF 0154 presentaron los rendimientos más altos y estables entre fechas y años, manteniendo su posición en el ranking de rendimiento ante modificaciones en la fecha de siembra u ocurrencia de limitaciones ambientales. Las variedades B. I. FACON, B. I. CARILO, B. I. CUMENAY y B. ESMERALDA variaron su comportamiento, y mostraron sus mayores valores de rendimiento en fechas específicas.

CONSIDERACIONES FINALES

La información generada a partir del análisis del transcriptoma de la línea CBW 0101, obtenido previamente, permitió abordar el estudio de la variabilidad de genes representantes de distintos grupos de desaturasas en cinco genotipos de trigo candeal. Estos genes presentaron tanto su estructura exón-intrón conservada, como así también su secuencia de aminoácidos y dominios característicos que interactúan con el sitio activo de la proteína. La caracterización de estos genes en trigo candeal, representa el primer estudio realizado en la especie, incluyendo los tres grupos más importantes de desaturasas involucradas en la respuesta a estrés abiótico. El estudio de secuencia, localización cromosómica y número de copias constituye el primer paso hacia cualquier objetivo de modificación de su expresión por ingeniería genética o edición.

Se estima que existen más de 10.000 especies de gramíneas (Poaceae) distribuidas en 700 géneros, agrupados en 30 tribus. En el Capítulo 1 de esta tesis, se incluyeron secuencias pertenecientes a ocho géneros diferentes, representados en seis tribus. Se generó información de utilidad a nivel genético, fisiológico, bioquímico y bioinformático. El análisis *in silico* realizado sobre secuencias proteicas y de ADNc de desaturasas de diferentes especies de gramíneas, permitió la descripción de las características físico-químicas de esta familia de proteína y la localización subcelular, el análisis de expresión de un grupo de genes de desaturasas en trigo pan y trigo candeal en diferentes tejidos y condiciones, el análisis de elementos *cis* reguladores en los promotores de genes de desaturasas que participan en la respuesta a estrés abiótico, la identificación de dominios conservados y finalmente un análisis filogenético que generó cinco grupos diferentes de desaturasas. Estos análisis son necesarios para ordenar la información de un grupo de enzimas altamente complejo en relación al número de genes, localización subcelular y diversidad funcional, que intervienen en una vía activa constitutivamente e inducida por estrés. La comprensión del modo de acción de las desaturasas no solo interesa en relación al consumo de aceites en la alimentación humana sino además en la incorporación más reciente de los aceites como fuentes alternativas de combustibles.

A futuro, sería interesante profundizar el estudio de los genes de desaturasas en respuesta a estrés por frío dado que se desconoce si existen diferencias en la expresión debido a variaciones en los sitios de unión a factores de transcripción en los genotipos utilizados,

teniendo en cuenta que el análisis de los promotores desarrollado en esta tesis, fue realizado en secuencias del genoma del cv. Svevo. Por otra parte, de acuerdo a la bibliografía, esta familia de desaturasas refleja una complejidad importante que incluye un número elevado de genes implicados en la tolerancia a estrés abiótico. En esta tesis se pudieron caracterizar únicamente tres de estos genes de desaturasas de ácidos grasos en relación a estrés por frío, pero el estudio se podría extender al efecto del estrés por sequía sobre estos genes u otros genes de desaturasas. El conocimiento de la secuencia y de la vía metabólica en la que interviene un gen de interés resulta un paso importante para su aplicación en agrobiotecnología. Llamativamente, el trigo transgénico tolerante a sequía recientemente obtenido en nuestro país, contiene un factor de transcripción HB4 de girasol, para el cual no se ha determinado exactamente la forma mediante la cual afecta el transcriptoma de trigo.

El uso de las herramientas bioinformáticas utilizadas en esta tesis, constituye un aporte valioso en relación a la investigación aplicada en ciencias agrarias, teniendo en cuenta que este trabajo es el primero que aborda un estudio general de las desaturasas en gramíneas. Sumado a esto, fue realizado sobre especies como trigo, maíz, arroz y sorgo, que poseen una importancia relevante a nivel agronómico, comercial e industrial para nuestro país.

Los resultados obtenidos en el Capítulo 2 de esta tesis, permitieron avanzar en la caracterización genética-bioquímica del germoplasma de trigo candeal con la información obtenida de un genotipo invernal tolerante a bajas temperaturas (MVTD 10-98), un primaveral susceptible (B. AMBAR) y un primaveral tolerante (CBW 0101). La obtención del perfil de AG completo en condiciones normales de crecimiento y a bajas temperaturas, brinda información de los procesos fisiológicos en plantas bajo condiciones de estrés. Al respecto, se observaron diferencias en la composición relativa de ácidos grasos y en la integridad de la membrana entre los genotipos en respuesta a bajas temperaturas.

En la mayoría de los casos, los ácidos grasos revisten importancia por el valor industrial de los aceites para la alimentación humana y animal. Sin embargo, en los últimos años, han sido estudiados por su participación en la respuesta a estreses abióticos, debido a que son los componentes principales de los lípidos que componen las membranas celulares. Por estas razones, la manipulación del contenido de ácidos grasos en especies vegetales, se convirtió en un tema de interés creciente en relación a la obtención de variedades adaptadas a regiones con limitaciones ambientales.

La técnica utilizada en la medición de la conductividad eléctrica luego de someter los tejidos a temperaturas de congelamiento, es una metodología relativamente sencilla y rápida para interpretar el daño provocado por frío a nivel de membrana celular y constituye una herramienta que posibilita la separación de materiales en tolerantes y susceptibles. El grado de tolerancia estimado mediante evaluación de integridad de membrana resulta un complemento de los ensayos a campo, que en general se dificultan por la alta dependencia de las condiciones de cada año.

Por otra parte, el estudio focalizado sobre el gen *FAD2* es importante para comprender la expresión, regulación y mecanismos que operan en la respuesta a estrés por frío en plantas, en relación a la insaturación de ácidos grasos. Este análisis, representa la primera cuantificación de transcritos provenientes de las cuatro copias de *FAD2* localizadas en los cromosomas 6A y 6B de *T. turgidum* ssp. *durum*. La existencia de copias de este gen en trigo candeal era desconocida a la fecha. Se considera que esta información podrá ser tenida en cuenta en futuras investigaciones tanto en trigo candeal como en especies relacionadas tal como *Triticum aestivum*.

La información generada en el Capítulo 3 es de utilidad para el mejoramiento de trigo candeal, debido a que brinda información no solo de rendimiento y sus tradicionales componentes numéricos, altura, proteína, PMG y PH, sino también de atributos ecofisiológicos como son la producción de materia seca total (BA_{MF}) y biomasa de espigas lograda en el período de llenado de granos (PE_{AT-MF}), que constituyen herramientas útiles de selección. El hecho de que en los seis ambientes evaluados PE_{AT-MF} y el peso de los granos PG mostraron correlaciones con Rto mayores que las mediciones que cuantifican el número de espigas (NE) y de granos (NG), sugiere que, para esta zona y el set de genotipos utilizado, los componentes que se definen en la fase de llenado de grano son más importantes en el Rto que los que poseen definición más temprana en el ciclo de desarrollo fenológico.

Los ensayos se realizaron en una fecha anterior a las habituales de invierno, lo que permitió detectar, principalmente, una mayor producción de materia seca aérea en las fechas más tempranas. En este sentido, el ciclo a anthesis más prolongado en la primera y segunda fecha de siembra en ambos años, permitieron una mayor acumulación de biomasa aérea total que en la fecha más tardía, reflejado también en general, en mayores rendimientos.

El estudio se llevó a cabo con genotipos con amplia variabilidad en la duración de su ciclo, sembrados en tres fechas diferentes. En la actualidad, existe especial interés en la selección de variedades de ciclo intermedio-largo a largo, con el objetivo de poder realizar la siembra en otoño, para aprovechar una mayor carga de humedad en el suelo y, además, atenuar el efecto de temperaturas extremas en el período crítico del cultivo. Sumado a esto, siembras más tempranas, significarían un mejor aprovechamiento de lotes que a ese momento se encuentran ociosos. En el presente, el mercado nacional de variedades de candeal ofrece en su mayoría genotipos de ciclo corto a intermedio.

El estudio realizado a campo, combinando fechas de siembra, años y genotipos con variabilidad en la duración de ciclo, permitió identificar que excepto para algunos genotipos específicos, es recomendable realizar siembras más tempranas en la zona. Estos resultados evidencian la importancia de la fecha de siembra como factor clave en la determinación del rendimiento y sus componentes en el sur de Buenos Aires.

Una consideración importante en cuanto a la región de cultivo, está relacionada con la extensión del mismo hacía otras provincias como San Luis, Córdoba y Tucumán. Al respecto, en la actualidad y ante la disponibilidad de agua en estas regiones, la siembra, a diferencia del sur de Buenos Aires, se realiza bajo riego y se utilizan variedades de ciclo corto. Este escenario justifica plenamente la identificación de genotipos relativamente estables y también con adaptación a ambientes específicos.

En las dos fechas evaluadas en el año 2016, el daño por heladas no superó el 4 % en promedio y las diferencias entre genotipos fueron parcialmente explicadas por la duración del ciclo. Se considera que los porcentajes de daño observados, se deben a la baja intensidad y duración de las heladas, ya que no se produjeron lesiones importantes en las espigas, que puedan afectar directamente el rendimiento.

Aunque a nivel genético no se encontraron polimorfismos de secuencias, que contribuyan a interpretar las diferencias fenotípicas entre genotipos, observados previamente y en esta tesis, la información reunida permitió señalar a CBW 0101 como un material con características sobresalientes en rasgos asociados a la tolerancia a frío, en comparación con otros genotipos primaverales: composición de ácidos grasos, permeabilidad de membrana, niveles de expresión del gen *FAD2* y ciclo largo. Sin embargo, teniendo en cuenta los bajos valores de rendimiento que este genotipo generó en los ambientes ensayados, CBW 0101 resulta un potencial material a ser considerado en futuros cruzamientos, donde la

segregación en progenie permita combinar atributos de tolerancia a estrés y de producción. La línea invernal MVTD 10-98 tuvo un comportamiento similar a CBW 0101 mientras que la variedad primaveral BUCK AMBAR mostró indicadores fisiológicos de mayor susceptibilidad a frío, pero mayores valores de rendimientos que CBW 0101 y MVTD 10-98, y valores cercanos al promedio si se comparan los 15 genotipos ensayados. Considerando solo los datos de campo, las líneas experimentales VF 0154 y CBW 0141 resultan promisorias dado que se ubicaron, frecuentemente, entre los genotipos más productivos, y en particular, la primera mostró a campo bajos niveles de daño por helada en espiga.

Como conclusión general, esta tesis generó información de utilidad para el mejoramiento de *Triticum turgidum* ssp. *durum*, incluyendo ensayos a diferentes niveles: genético, fisiológico, bioquímico y bioinformático, aportando conocimiento a la caracterización de genes de desaturasas en la especie y a la comprensión de las bases de la tolerancia a bajas temperaturas. Además, el estudio realizado a campo, combinando fechas de siembra, años y genotipos con variabilidad en la duración de ciclo, permitió definir las variables ecofisiológicas que más explican las diferencias en rendimiento y las ventajas de realizar siembras anteriores a las actualmente en uso.

ANEXO

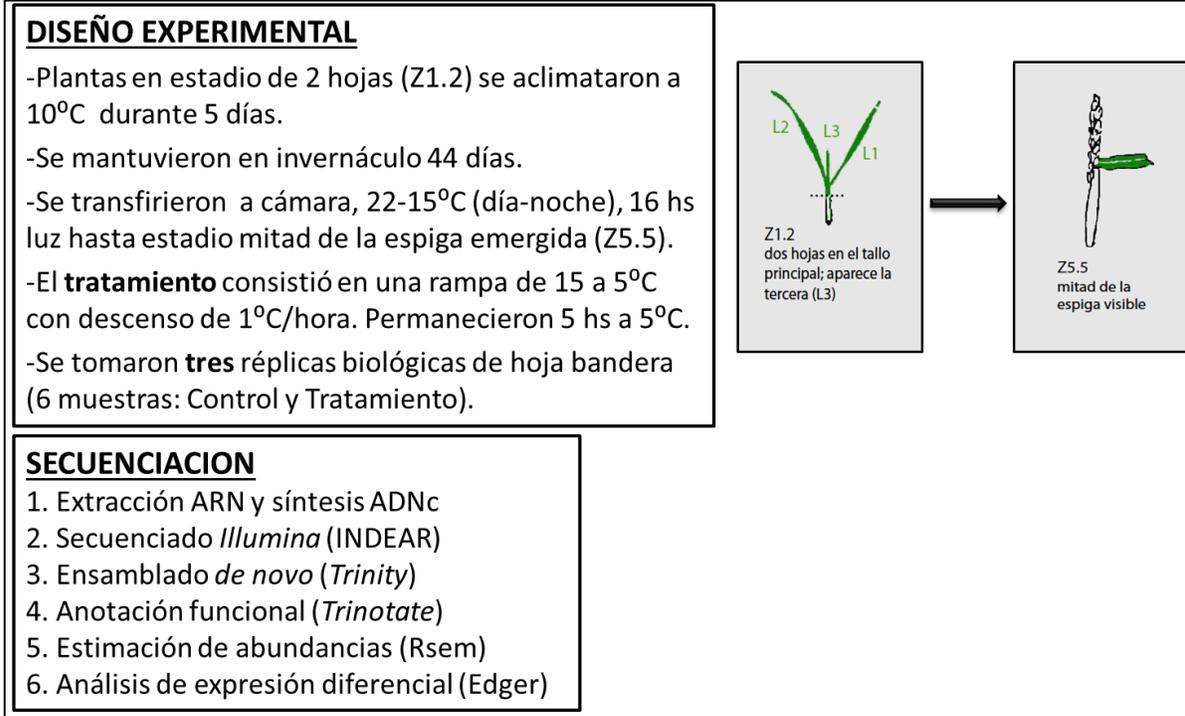


Figura A1.1. Metodología de obtención de genotecas de expresión (ADNc) de CBW 0101 (previo a esta Tesis).

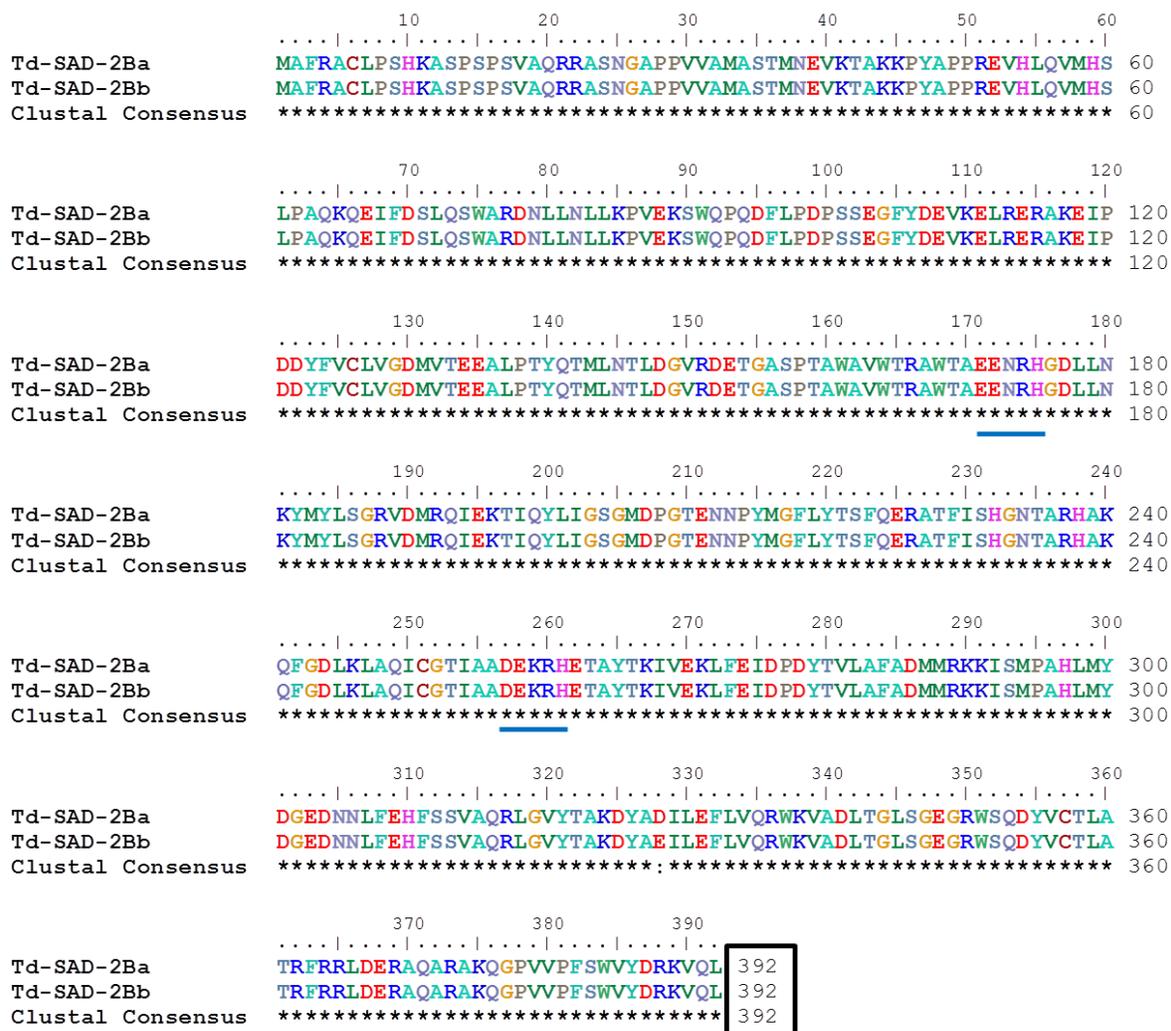


Figura A1.2. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SAD de *T. turgidum* ssp. *durum*. Td-SAD-2Ba corresponde a los genotipos B. AMBAR, MVTD 10-98, CBW 0101 y B. I. CUMENAY y Td-SAD-2Bb a 80-IAT2. Con línea azul están señaladas las cajas de histidina (dominios conservados). Rectángulo negro señala el número de aminoácidos contenidos en cada secuencia.

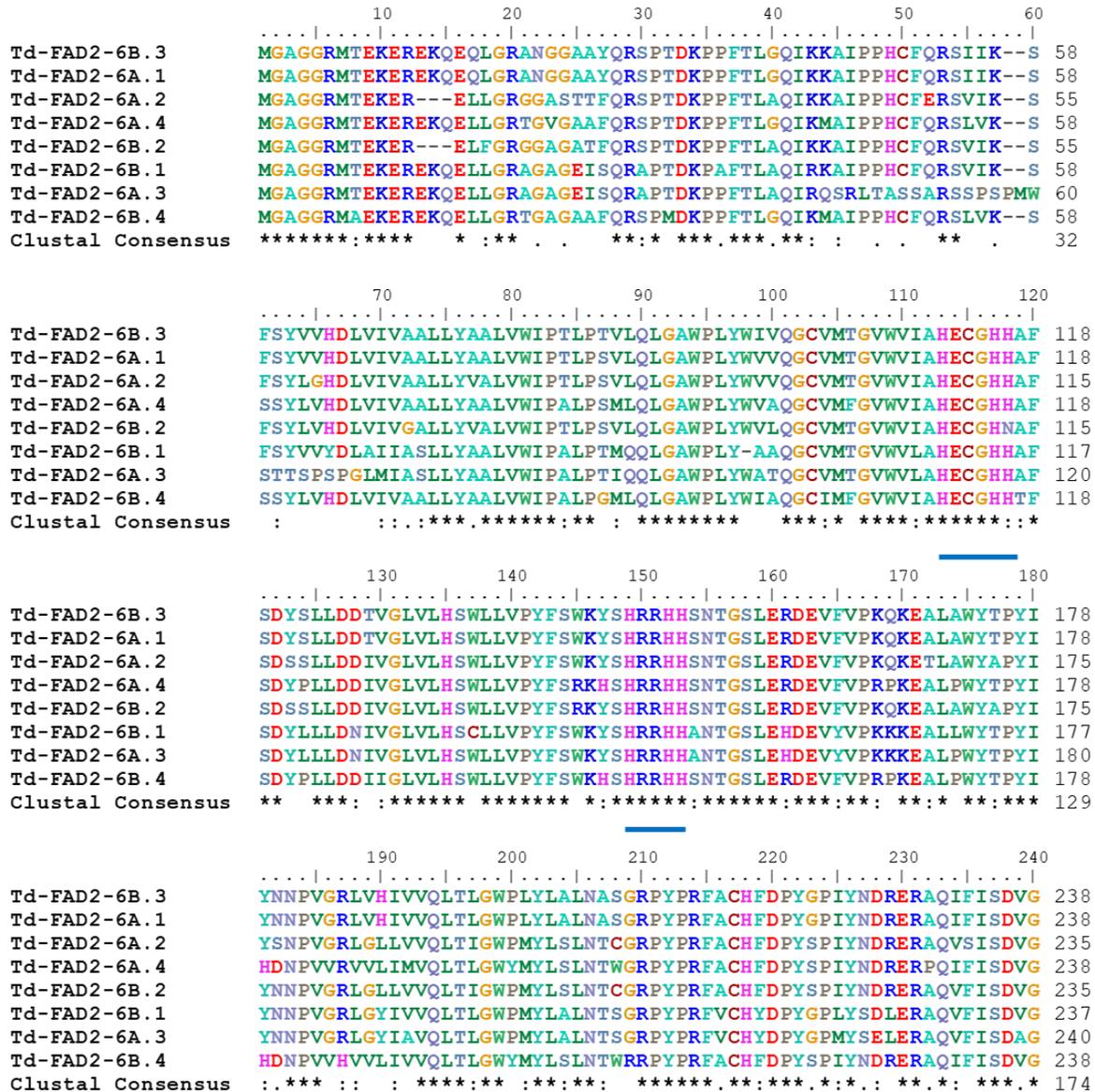


Figura A1.3. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de *FAD2* de cv. Svevo (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) con “CLUSTALW”. Con línea azul están señaladas las cajas de histidina (dominios conservados). Las barras “//” están indicando un corte de secuencia desde los 300 a los 1920 aminoácidos ya que ese segmento no mostró alineamiento debido a las características de la copia Td-FAD2-6B.4. Rectángulo negro señala el número de aminoácidos contenidos en cada secuencia (387 aminoácidos) que corresponden a las copias de *FAD2* funcionales.

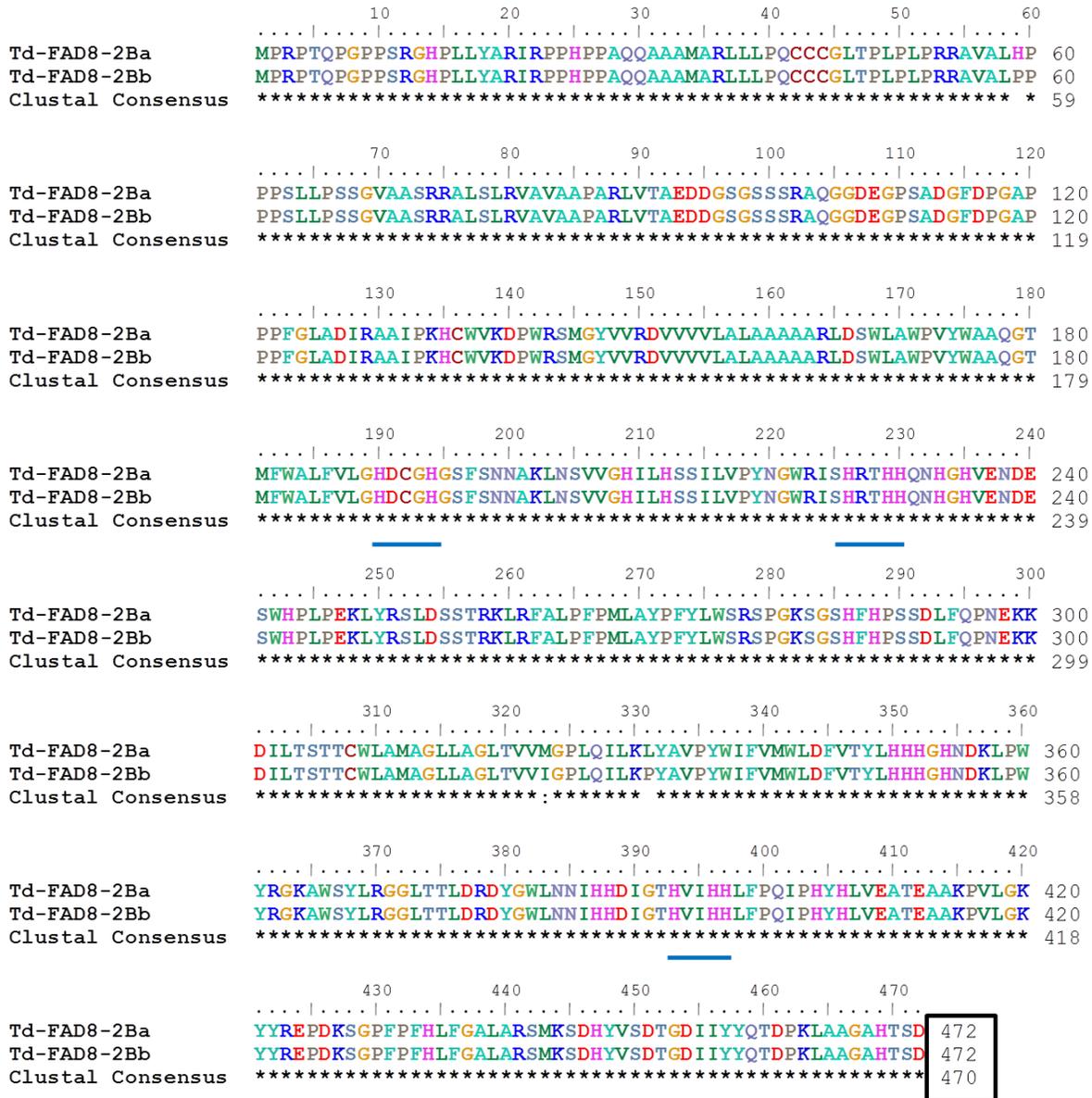


Figura A1.4. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos Td-FAD8 de *T. turgidum* ssp. *durum*. *FAD8-2Ba* corresponde a los genotipos B. AMBAR, MVTD 10-98 y 80-IAT2 y *FAD8-2Bb* a CBW 0101 y B. I. CUMENAY. Con línea azul están señaladas las cajas de histidina (dominios conservados). Rectángulo negro señala el número de aminoácidos contenidos en cada secuencia.

Tabla A1.1. Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>A. tauschii</i>	acil-ACP desaturase (a)	EMT22076		5L
<i>A. tauschii</i>	desaturasa de ácido graso 2 (b)	EMT29164		5L
<i>B. distachyon</i>	stearoil-ACP 9-desaturase 1 (a)	XP_003564771.2		2
<i>B. distachyon</i>	acil-ACP desaturase 5 (a)	XP_003579596.1		5
<i>B. distachyon</i>	acyl-ACP desaturase 4 (a)	XP_003561988.2		1
<i>B. distachyon</i>	acyl-ACP desaturase 4 (a)	XP_003576605.1		4
<i>B. distachyon</i>	acyl-ACP 9 desaturase 5 (a)	XP_003575001.1		3
<i>B. distachyon</i>	acyl-ACP desaturase 7 (a)	XP_003573524.1		3
<i>B. distachyon</i>	omega-3 FAD (b)	XP_003562400.1		1
<i>B. distachyon</i>	omega-3 FAD (b)	XP_003558157.1		1
<i>B. distachyon</i>	omega-3 FAD (b)	XP_003577162.1		4

Tabla A1.1 (continúa). Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesoión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>B. distachyon</i>	omega-6 FAD (b)	XP_003574539.1		7
<i>B. distachyon</i>	delta-8 FAD2(c)	XP_003578001.1		4
<i>B. distachyon</i>	Sphingolipid delta(4)-desaturase (d)	NP_001266858.1		5
<i>H. vulgare</i>	predicted protein (a)*	BAK04000.1	AK372803.1	5
<i>H. vulgare</i>	predicted protein (a)*	BAK06373.1	AK375178.1	5
<i>H. vulgare</i>	predicted protein (a)*	BAK05142.1	AK373945.1	5
<i>H. vulgare</i>	predicted protein (b)*	BAK05824.1	AK374628.1	4
<i>H. vulgare</i>	predicted protein (b)*	BAJ89163.1	AK357949.1	5
<i>H. vulgare</i>	predicted protein (b)*	BAJ93756.1	AK362552.1	2
<i>H. vulgare</i>	predicted protein (b)*	BAK02320.1	AK371122.1	4
<i>O. brachyantha</i>	stearoyl-ACP 9-desaturase 1(a)	XP_006645123.2		1
<i>O. brachyantha</i>	omega-3 FAD (b)	XP_006664265.1		12

Tabla A1.1 (continúa). Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>O. brachyantha</i>	omega-3 FAD (b)	XP_015689854.1		3
<i>O. brachyantha</i>	FAD DES3 (b)	XP_006663143.1		11
<i>O. brachyantha</i>	delta(8) FAD (c)	XP_006660549.1		9
<i>O. sativa</i>	stearoyl-ACP 9-desaturase 1 (a)	XP_015630103.1		1
<i>O. sativa</i>	FAD8 (b)	AAW32557.1/BAE79784.1	AY848920.1/ AB232383.1	7
<i>O. sativa</i>	OsFAD7 (b)	BAE79783.1	AB232382.1	3
<i>O. sativa</i>	delta-12 FAD (b)	ACN87220.1	FJ768953.1	2
<i>O. sativa</i>	delta(8) FAD2 (c)	XP_015651259		9
<i>O. sativa</i>	omega-3 FAD (b)	XP_015627771.1		3
<i>O. sativa</i>	FAD DES3 (b)	XP_015615290.1		11
<i>S. italica</i>	acyl-ACP desaturase 4 (a)	XP_004957294.1		2

Tabla A1.1 (continúa). Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>S. italica</i>	stearoyl-ACP 9-desaturase 1 (a)	XP_004970798.1		5
<i>S. itálica</i>	delta(8) FAD2(c)	XP_004956618		2
<i>S. itálica</i>	omega-3 FAD (b)	XP_004984851.1		9
<i>S. italica</i>	Sphingolipid delta(4)-desaturase	XP_004976321.1		
<i>S. bicolor</i>	hypothetical protein (a)*	XP_002456738.1		3
<i>S. bicolor</i>	hypothetical protein (a)*	XP_002460495.1		2
<i>S. bicolor</i>	hypothetical protein (a)*	XP_002437471.1		10
<i>S. bicolor</i>	hypothetical protein (a)*	XP_003561988.2		1
<i>S. bicolor</i>	DES2 (b)	ABN49520.1	EF206347	4
<i>S. bicolor</i>	DES3 (b)	ABN49521.1	EF206348	5

Tabla A1.1 (continúa). Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>S. bicolor</i>	DES1 (b)	ABN49519.1	EF206346	8
<i>S. bicolor</i>	FAD (b)	ACA28704.1	EU424174.1	4
<i>S. bicolor</i>	hypothetical protein (b)*	XP_002465418.1		1
<i>S. bicolor</i>	proteína hipotética (b)*	XP_002461278.1		2
<i>T. aestivum</i>	clone: WT006_M03 (a)*		AK333552.1	5DL
<i>T. aestivum</i>	stearoyl-ACP desaturase (SAD1) (a)	ADV59911.1	HQ589252.1	3AL
<i>T. aestivum</i>	stearoyl-ACP desaturase (SAD2) (a)	ADV59912.1	HQ589253.1	2AL
<i>T. aestivum</i>	omega-3 FAD (b)	BAA28358.1	D84678.1	5BL
<i>T. aestivum</i>	clone: SET6_I24 (b)*		AK331177.1	2AS
<i>T. aestivum</i>	clone: WT003_E20 (b)**		AK332163.1	5BL
<i>T. urartu</i>	FAD 3 (b)	EMS63061		7L

Tabla A1.1 (continúa). Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesoión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>T. urartu</i>	omega-6 FAD (b)	EMS65425		6L
<i>Z. mays</i>	ZmFAD7 (b)	BAA22441.1	D63954	9
<i>Z. mays</i>	omega-6 FAD (b)	XP_008662593.1		10
<i>Z. mays</i>	omega-6 FAD (b)	XP_008652067.1		7
<i>Z. mays</i>	omega-3 FAD (b)	XP_008665998.1		1
<i>Z. mays</i>	omega-3 FAD (b)	ACG37273.1	EU965155.1	3
<i>Z. mays</i>	omega-6 FAD (b)	ACG34271.1	EU962153.1	4
<i>Z. mays</i>	omega-3 FAD (b)	ACG28208.1	EU956090.1	2
<i>Z. mays</i>	esfingolípido delta(4)-desaturasa (d)	XP_008669099.1		2
<i>Z. mays</i>	FAD2 (b)	ABV44669.1	EF687907.1	4
<i>Z. mays</i>	FAD2 (b)	BAE93382.1/ABF50053.1	AB257309.1/DQ496227.1	5 y 4

Tabla A1.1 (continúa). Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>Z. mays</i>	omega-3 FAD (b)	NP_001266540.1		9
<i>Z. mays</i>	omega-3 FAD (b)	NP_001149938.1		3
<i>Z. mays</i>	proteína predicha (b)*	ACN27637.1	BT062940.1	6
<i>Z. mays</i>	omega-6 FAD (b)	NP_001149122.1		4
<i>Z. mays</i>	FAD7 (b)	NP_001105303.1		9
<i>Z. mays</i>	delta-12 FAD (b)	NP_001130234.1		5
<i>Z. mays</i>	desaturase/cytochrome b5 (c)	ACG40941.1	EU968823	7
<i>Z. mays</i>	desaturase/cytochrome b5 (c)	ACG36537	EU964419	2
<i>Z. mays</i>	acyl-ACP desaturase 6 (a)	XP_008659500.1		1
<i>Z. mays</i>	acyl-desaturase (a)	NP_001151082.1		
<i>Z. mays</i>	acyl-desaturase (a)	ACG41542.1	EU969424.1	7

Tabla A1.1 (continúa). Desaturasas de ácidos grasos con nombres de especie y gen, número de accesoión de proteínas, ADNc y localización cromosómica, obtenidas de GenBank. Cuando el ID del ADNc no está indicado, la secuencia de la proteína ha sido deducida de la secuencia genómica. (a) acil-ACP desaturasa; (b) acil-lípido omega; (c) acil-lípido front-end; (d) esfingolípido desaturasa. Con * secuencia identificada a partir de una segunda búsqueda utilizando BLASTN (e-value > 2e⁻⁸⁰) con acil-ACP desaturasa (EF687907) de *Z. mays* y acil-lípido desaturasa (AB232382.1) de *O. sativa* como sondas.

Especie	Nombre de la Proteína	Proteína (ID)	ADNc (ID)	Cromosoma
<i>Z. mays</i>	acyl-desaturase (a)	ACG49052.1	EU976934.1	8
<i>Z. mays</i>	acyl-desaturase (a)	ACG38263.1	EU966145.1	10
<i>Z. mays</i>	acyl-desaturase (a)	ACG41759.1	EU969641.1	2
<i>Z. mays</i>	uncharacterized protein (a)*	NP_001141697.2		8
<i>Z. mays</i>	uncharacterized protein (a)*	XP_008663776.1		10

PROTOCOLO DE EXTRACCION DE ACIDOS GRASOS EN HOJAS DE TRIGO CANDEAL

MATERIALES E INSUMOS

- Tubos de vidrio base redonda para centrífuga (T1)
- Tubos de vidrio para coleccionar fase superior (T2)
- Frascos color caramelo de 50 ml
- Ampollas de decantación y soporte
- Morteros
- Pipetas Pasteur
- Pipetas de vidrio (5 y 2 ml)
- Filtros

EQUIPOS

- Vortex
- Sonicador
- Centrífuga de mesada para 3000 rpm
- Balanza de 4 dígitos
- Cronómetro
- Planchuela de telgopor para sonicar los tubos

INSUMOS

- Hielo
- Nitrógeno líquido
- Nitrógeno gaseoso
- Solución metanol: cloroformo 2:1
- KCl 1% (W/V)

PROCEDIMIENTO

1. Rotular todos los tubos T1.
2. Poner todos los materiales en hielo y oscuridad.
3. Pesar frascos color caramelo y colocar rótulo.
4. Colocar el material liofilizado y volver a pesar, anotar su valor.
5. Moler material liofilizado (el equivalente a 1 g de tejido vegetal fresco, aprox. 200 mg) con mortero y N₂ líquido. Transferir a un tubo de vidrio fresco (T1).
6. Añadir 3,5 mL de metanol: cloroformo.
7. Agitar con vortex durante 30 segundos.
8. Sonicar durante 20 min.
9. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. Recoger fase superior cuidadosamente con una pipeta Pasteur y transferir a otros tubos (T2).

10. Repetir 3 veces pasos 2 a 5 y juntar las fases superiores en el mismo tubo de paso 5.
11. Transferir a ampolla de decantación (colocar embudo con papel de filtro) y añadir 1,1 ml de KCl (se forman 2 fases). Recuperar fase inferior en frascos color caramelo.
12. Evaporar con nitrógeno gas a 4 °C y oscuridad (producto: sedimento seco que contiene los lípidos y los pigmentos fotosintéticos). El rendimiento debe ser de 0,1 g. Pesar hasta peso constante.
13. Almacenar a -20 °C en los mismos tubos color caramelo y en oscuridad hasta su posterior utilización.

Tabla A2.1. Análisis de la Varianza (ANOVA) para los ácidos grasos evaluados a 22 °C (control) y a 4 °C durante 8, 24, 48, 72 y 144 hs.

Fuente de Variación	ACIDOS GRASOS (%)		
	g.l.	F	<i>p</i> -valor
LOG10_C16:0			
Genotipo	2	0,04	0,96
Tratamientos	5	5,58	0,0007
Genotipo*Tratamientos	10	0,81	0,62
LOG10_C16:1			
Genotipo	2	1,49	0,24
Tratamientos	5	5,33	0,0009
Genotipo*Tratamientos	10	0,74	0,68
LOG10_C18:0			
Genotipo	2	5	0,01
Tratamientos	5	159,28	<0,0001
Genotipo*Tratamientos	10	10,58	<0,0001
LOG10_C18:1			
Genotipo	2	13,50	<0,0001
Tratamientos	5	5,78	0,0005
Genotipo*Tratamientos	10	2,53	0,02
LOG10_C18:2			
Genotipo	2	6,71	0,003
Tratamientos	5	1,88	0,1219
Genotipo*Tratamientos	10	1,55	0,16
LOG10_C18:3			
Genotipo	2	2,73	0,08
Tratamientos	5	6,10	0,0003
Genotipo*Tratamientos	10	1,58	0,15

Tabla A2.2. Análisis de la Varianza (ANOVA) para el índice REL (%) a las 12 horas a la temperatura control (2 °C), -4 °C y -13°C.

Fuente de Variación	g.l.	REL (%)	
		F	<i>p-valor</i>
12 horas			
Genotipo	2	54,81	<0,0001
Tratamientos	2	37780,46	<0,0001
Genotipo*Tratamientos	4	26,03	<0,0001

Tabla A2.3. Análisis de la Varianza (ANOVA) para el índice EL (%) a las 12 hs a -4 °C y -13°C.

Fuente de Variación	g.l.	EL (%)	
		F	<i>p-valor</i>
Genotipo	2	56,29	<0,0001
Tratamientos	1	15483,82	<0,0001
Genotipo*Tratamientos	2	37,68	<0,0001

Tabla A2.4. Análisis de la Varianza (ANOVA) para Expresión Relativa de FAD2 a 22 °C y en cada uno de los tiempos evaluados (24, 72 y 144 hs) a 4 °C.

Fuente de Variación	g.l.	Expresión relativa	
		F	<i>p-valor</i>
Genotipo	2	130,37	<0,0001
Tratamientos	3	73,62	<0,0001
Genotipo*Tratamientos	6	79,85	<0,0001

Tabla A3.1. Registro de las condiciones meteorológicas de la estación ubicada en la EEAI Barrow (Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow), año 2016.

MES	LLUVIA (mm)	HUMEDAD RELATIVA (%)	TEMPERATURA ABRIGO (°C)					NUMERO HELADAS	TEMPERATURA MINIMA	
			MEDIA	MAXIMA	MAXIMA	MINIMA	MINIMA		5 centímetros (°C)	
				MEDIA	ABSOLUTA	MEDIA	ABSOLUTA		MEDIA	ABSOLUTA
ENERO	139,9	61	22,9	28,6	36,0	14,9	8,0	0	14,4	7,4
FEBRERO	82,9	68	22,6	28,8	33,0	15,2	7,7	0	14,6	7,5
MARZO	25,7	66	18,1	26,1	33,0	10,1	1,4	0	9,4	1,0
ABRIL	88,3	74	13,6	19,3	26,0	8,5	0,0	1	8,0	-0,2
MAYO	75,1	82	9,5	14,2	18,0	4,9	-0,8	3	4,4	-1,2
JUNIO	56,8	81	7,2	12,9	17,0	1,7	-5,6	8	1,2	-6,0
JULIO	32,4	82	7,2	12,5	19,0	2,5	-3,0	6	1,8	-4,1
AGOSTO	4,2	65	9,9	17,4	26,0	3,1	-4,7	7	2,2	-5,6
SETIEMBRE	39,8	69	11,2	18,0	28,0	4,8	-4,7	7	3,7	-6,0
OCTUBRE	49,2	68	14,7	20,9	27,4	8,6	-1,4	1	7,7	-1,8
NOVIEMBRE	18,9	50	18,8	26,1	34,0	9,7	1,0	0	9,0	0,6
DICIEMBRE	25,1	44	23,4	31,2	38,0	13,5	5,5	0	13,1	4,3
TOTAL	638,3							33,0		

Tabla A3.2. Registro de las condiciones meteorológicas de la estación ubicada en la EEAI Barrow (Estación Experimental Agropecuaria Integrada Barrow), año 2017.

MES	LLUVIA (mm)	HUMEDAD RELATIVA (%)	TEMPERATURA ABRIGO (°C)					NÚMERO HELADAS	TEMPERATURA MINIMA	
			MEDIA	MAXIMA	MAXIMA	MINIMA	MINIMA		5 centímetros (°C)	
				MEDIA	ABSOLUTA	MEDIA	ABSOLUTA		MEDIA	ABSOLUTA
ENERO	92,0	45	25,2	32,0	39,0	14,6	5,8	0	14,0	5,5
FEBRERO	101,9	68	23,0	29,9	39,0	16,7	10,7	0	16,0	9,2
MARZO	54,0	68	19,2	25,9	30,0	12,6	4,4	0	11,7	3,8
ABRIL	106,0	75	14,8	20,7	28,0	9,1	1,2	0	8,3	0,5
MAYO	89,5	80	12,0	18,1	26,4	6,7	-0,9	2	5,7	-1,8
JUNIO	79,1	75	9,3	14,6	22,0	4,3	-4,1	4	3,6	-5,1
JULIO	30,2	77	9,3	14,5	20,0	4,2	-3,3	7	3,3	-4,2
AGOSTO	99,6	72	10,5	16,3	23,0	4,8	-1,1	6	3,6	-3,4
SETIEMBRE	47,9	71	11,8	17,5	25,0	6,1	-1,3	4	5,2	-2,3
OCTUBRE	53,8	63	14,7	20,9	29,0	7,6	0,0	1	6,8	-1,0
NOVIEMBRE	62,3	63	16,3	22,7	33,0	9,3	1,9	0	8,4	1,5
DICIEMBRE	37,9	55	21,6	29,2	38,0	13,2	3,9	0	12,5	2,5
TOTAL	854,2							24,0		

Tabla A3.3. Análisis de la Varianza para Rendimiento.

Fuente de Variación	Rendimiento (g.m ⁻²)		
	g.l.	F	<i>p</i> -valor
Modelo	51	54,988	<0,0001
Año	1	2212,692	<0,0001
Genotipo	14	27,224	<0,0001
Año*Genotipo	14	9,947	<0,0001
Año>Fecha	4	9,747	<0,0001
Año*Fecha>Bloque	18	1,794	0,0252
Error	308		
Total	359		

Interacción significativa con un $p < 0,20$

Tabla A3.4. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, D_{AT} y D_{AT-MF} de 15 genotipos de trigo candeal, año 2016. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	FECHA 1			FECHA 2			FECHA 3		
	Rto	D _{AT}	D _{AT-MF}	Rto	D _{AT}	D _{AT-MF}	Rto	D _{AT}	D _{AT-MF}
Rto	1			1			1		
D _{AT}	-0,58*	1		-0,74**	1		-0,83***	1	
D _{AT-MF}	0,48	-0,94***	1	0,71**	-0,97***	1	0,83***	-0,99***	1

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

Tabla A3.5. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, D_{AT} y D_{AT-MF} de 15 genotipos de trigo candeal, año 2017. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	FECHA 1			FECHA 2			FECHA 3		
	Rto	D _{AT}	D _{AT-MF}	Rto	D _{AT}	D _{AT-MF}	Rto	D _{AT}	D _{AT-MF}
Rto	1			1			1		
D _{AT}	-0,01	1		-0,69**	1		-0,81***	1	
D _{AT-MF}	-0,10	-0,96***	1	0,54*	-0,85***	1	0,67**	-0,87***	1

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

Tabla A3.6. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E⁻¹, PMG, IC, PE_{AT-MF}, BA_{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F1 del año 2016. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	Rto	PG	NE	NG	NGE	e.E ⁻¹	PMG	IC	PE _{AT-MF}	BA _{MF}	Altura
Rto	1										
PG	0,84***	1									
NE	0,40	0,12	1								
NG	0,32	0,30	0,39	1							
NGE	0,06	0,22	-0,28	0,76**	1						
e.E ⁻¹	-0,70**	-0,70**	-0,28	-0,04	0,17	1					
PMG	0,46	0,59*	-0,17	-0,54*	-0,47	-0,61*	1				
IC	0,83***	0,93***	0,10	0,40	0,35	-0,58*	0,45	1			
PE _{AT-MF}	0,63*	0,82***	0,14	0,08	-0,01	-0,52*	0,55*	0,74**	1		
BA _{MF}	0,17	0,40	0,09	-0,09	-0,19	-0,46	0,42	0,04	0,36	1	
Altura	-0,16	-0,17	-0,01	-0,38	-0,39	-0,35	0,25	-0,30	-0,19	0,34	1

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

Tabla A3.7. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E⁻¹, PMG, IC, PE_{AT-MF}, BA_{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F2 del año 2016. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	Rto	PG	NE	NG	NGE	e.E ⁻¹	PMG	IC	PE _{AT-MF}	BA _{MF}	Altura
Rto	1										
PG	0,87***	1									
NE	0,47	0,61*	1								
NG	0,53*	0,65**	0,89***	1							
NGE	0,40	0,42	0,19	0,61*	1						
e.E ⁻¹	-0,41	-0,40	-0,37	-0,26	0,08	1					
PMG	0,55*	0,52*	-0,09	-0,15	-0,05	-0,32	1				
IC	0,89***	0,94***	0,53*	0,61*	0,50*	-0,33	0,47	1			
PE _{AT-MF}	0,82***	0,87***	0,53*	0,57*	0,36	-0,52*	0,46	0,75**	1		
BA _{MF}	0,62*	0,84***	0,66**	0,59*	0,17	-0,50	0,41	0,61**	0,85***	1	
Altura	0,13	0,32	0,19	0,13	0,02	-0,73**	0,30	0,29	0,22	0,37	1

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

Tabla A3.8. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E⁻¹, PMG, IC, PE_{AT-MF}, BA_{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F3 del año 2016. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	Rto	PG	NE	NG	NGE	e.E ⁻¹	PMG	IC	PE _{AT-MF}	BA _{MF}	Altura
Rto	1										
PG	0,93***	1									
NE	0,74**	0,88***	1								
NG	0,65**	0,76**	0,9***	1							
NGE	0,26	0,24	0,34	0,68**	1						
e.E ⁻¹	-0,52*	-0,60*	-0,56*	-0,34	0,31	1					
PMG	0,52*	0,50	0,17	-0,12	-0,55*	-0,55*	1				
IC	0,94***	0,95***	0,78***	0,71**	0,31	-0,48	0,43	1			
PE _{AT-MF}	0,82***	0,92***	0,78***	0,65**	0,16	-0,46	0,53*	0,86***	1		
BA _{MF}	0,85***	0,95***	0,94***	0,80***	0,28	-0,58*	0,37	0,84***	0,88***	1	
Altura	0,53*	0,57*	0,62*	0,47	0,03	-0,69**	0,15	0,49	0,33	0,64*	1

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

Tabla A3.9. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E⁻¹, PMG, IC, PE_{AT-MF}, BA_{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F1 del año 2017. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	Rto	PG	NE	NG	NGE	e.E ⁻¹	PMG	IC	PE _{AT-MF}	BA _{MF}	Altura
Rto	1										
PG	0,57*	1									
NE	0,13	0,33	1								
NG	0,46	0,42	0,74**	1							
NGE	0,53*	0,34	0,22	0,82***	1						
e.E ⁻¹	0,29	0,01	0,11	0,53*	0,68**	1					
PMG	-0,15	-0,08	-0,26	-0,62*	-0,68**	-0,72**	1				
IC	0,82***	0,48	0,10	0,36	0,40	0,02	0,08	1			
PE _{AT-MF}	0,81***	0,41	0,33	0,55*	0,50	0,24	-0,001	0,87***	1		
BA _{MF}	0,48	0,34	0,55*	0,82***	0,72**	0,39	-0,21	0,41	0,67**	1	
Altura	-0,57*	-0,45	0,12	-0,12	-0,24	-0,11	0,15	-0,63*	-0,40	0,06	1

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

Tabla A3.10. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E⁻¹, PMG, IC, PE_{AT-MF}, BA_{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F2 del año 2017. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	Rto	PG	NE	NG	NGE	e.E ⁻¹	PMG	IC	PE _{AT-MF}	BA _{MF}	Altura
Rto	1										
PG	0,49	1									
NE	-0,04	0,59*	1								
NG	0,25	0,72**	0,71***	1							
NGE	0,37	0,51	0,20	0,83***	1						
e.E⁻¹	-0,19	-0,40	0,17	0,25	0,23	1					
PMG	0,18	0,04	-0,39	-0,62*	-0,59*	-0,80***	1				
IC	0,82***	0,58*	-0,18	0,26	0,46	-0,46	0,34	1			
PE_{AT-MF}	0,78***	0,55*	0,21	0,35	0,28	-0,005	0,10	0,62*	1		
BA_{MF}	0,06	0,30	0,67**	0,28	-0,13	0,23	-0,15	-0,27	0,50	1	
Altura	-0,62*	-0,10	0,12	-0,25	-0,46	-0,12	0,14	-0,40	-0,33	0,02	1

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

Tabla A3.11. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, PG, NE, NG, NGE, e.E⁻¹, PMG, IC, PE_{AT-MF}, BA_{MF} y Altura de 15 genotipos de trigo candeal, F3 del año 2017. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	Rto	PG	NE	NG	NGE	e.E ⁻¹	PMG	IC	PE _{AT-MF}	BA _{MF}	Altura
Rto	1										
PG	0,70**	1									
NE	0,49	0,60*	1								
NG	0,65**	0,77***	0,71**	1							
NGE	0,58*	0,61*	0,22	0,84***	1						
e.E ⁻¹	-0,03	-0,18	-0,001	0,20	0,28	1					
PMG	0,09	0,34	-0,28	-0,19	-0,06	-0,62*	1				
IC	0,88***	0,76***	0,54*	0,70**	0,60*	0,07	0,19	1			
PE _{AT-MF}	0,92***	0,86***	0,56*	0,70**	0,58*	-0,10	0,22	0,92***	1		
BA _{MF}	0,73**	0,78***	0,52*	0,64**	0,49	-0,15	0,07	0,59*	0,83***	1	
Altura	-0,33	0,16	-0,06	-0,14	-0,18	-0,34	0,47	-0,20	-0,15	-0,12	1

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

Tabla A3.12. Rendimiento ($\text{g}\cdot\text{m}^{-1}$) de 15 genotipos de trigo candeal en 3 fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,01$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
CBW 0101	161,00	a	CBW 0101	152,08	a	MVTD 10-98	94,48	a
BUCK ESMERALDA	197,29	ab	80-IAT2	176,29	ab	CBW 0101	138,67	b
BUCK AMBAR	203,95	ac	MVTD 10-98	199,54	bc	B. I. CARILO	175,62	c
80-IAT2	211,40	ac	BUCK AMBAR	205,03	bd	80-IAT2	178,6	c
B. I. CUMENAY	227,83	ad	BUCK ESMERALDA	217,42	ce	B. I. FACON	186,75	cd
CBW 0105	228,77	ad	CBW 0105	227,01	ce	BUCK AMBAR	190,46	cd
CBW 0153	229,02	ad	CBW 0153	233,67	cf	B. I. QUILLEN	197,04	ce
MVTD 10-98	237,85	be	B. I. CUMENAY	237,20	cf	CBW 0105	199,05	cf
BUCK 25	244,68	be	CBW 0141	237,41	cf	CBW 0153	209,07	cg
VF0154	261,97	be	B. I. QUILLEN	238,79	df	CBW 0141	222,31	eg
B. I. FACON	266,98	ce	B. I. FACON	239,68	df	B. I. CUMENAY	226,06	fh
B. I. QUILLEN	273,60	ce	B. I. CARILO	252,33	ef	BUCK 25	236,16	gi
B. I. CARILO	286,30	de	BUCK 25	253,17	ef	BUCK ESMERALDA	251,47	hj
CBW 0141	286,49	de	VF0154	271,13	f	CONCADORO	261,57	ij
CONCADORO	303,36	e	CONCADORO	313,33	g	VF0154	268,72	j
Media	241,37			230,27			202,4	
Desvío	38,946			38,393			46,188	

Tabla A3.13. Rendimiento (g.m⁻²) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,001$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
80-IAT2	268,64	a	80-IAT2	230,96	a	80-IAT2	185,26	a
CBW 0101	448,28	b	BUCK AMBAR	453,43	b	MVTD 10-98	313,63	b
CBW 0153	524,83	bc	MVTD 10-98	465,38	bc	CBW 0101	404,15	c
BUCK 25	525,20	bc	CBW 0101	466,14	bc	BUCK ESMERALDA	408,11	c
BUCK ESMERALDA	529,16	bc	B. I. CUMENAY	509,47	bd	BUCK AMBAR	510,16	d
B. I. CUMENAY	530,61	bc	CBW 0105	535,37	be	CBW 0153	511,02	d
VF0154	541,03	bc	BUCK ESMERALDA	537,88	be	CBW 0105	532,19	de
CONCADORO	550,45	bc	B. I. CARILO	551,10	be	BUCK 25	535,53	de
MVTD 10-98	560,25	bc	CBW 0141	555,58	ce	B. I. QUILLEN	546,62	de
B. I. QUILLEN	580,25	c	CBW 0153	569,21	df	B. I. CARILO	547,22	de
BUCK AMBAR	595,23	c	CONCADORO	571,54	df	CONCADORO	560,38	de
B. I. CARILO	599,61	c	VF0154	597,21	df	B. I. FACON	570,58	de
CBW 0141	607,72	c	B. I. QUILLEN	602,73	df	VF0154	578,26	de
CBW 0105	631,93	c	BUCK 25	621,85	ef	B. I. CUMENAY	601,41	e
B. I. FACON	632,77	c	B. I. FACON	658,93	f	CBW 0141	614,47	e
Media	541,73			528,45			494,6	
Desvío	89,859			101,15			118,34	

Tabla A3.14. Contenido de proteína en grano (%) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
CBW 0141	14,42	a	CBW 0141	14,85	a	CBW 0141	15,71	a
CBW 0105	15,04	ab	CBW 0105	15,23	ab	CBW 0105	16,18	ab
80-IAT2	15,50	bc	BUCK ESMERALDA	15,78	bc	BUCK ESMERALDA	16,66	bc
BUCK ESMERALDA	15,54	bc	CONCADORO	15,79	bc	80-IAT2	16,91	bc
B. I. FACON	15,84	cd	VF0154	15,81	bc	CONCADORO	16,99	bc
VF0154	15,94	ce	80-IAT2	15,81	bc	VF0154	17,01	bc
B. I. CARILO	16,01	cf	B. I. FACON	16,38	cd	MVTD 10-98	17,01	cd
CONCADORO	16,05	cf	BUCK 25	16,72	de	B. I. QUILLEN	17,57	cd
BUCK 25	16,11	cf	B. I. QUILLEN	16,90	de	B. I. CUMENAY	17,68	de
B. I. QUILLEN	16,13	cf	B. I. CUMENAY	16,95	de	B. I. FACON	17,94	de
CBW 0153	16,29	df	CBW 0153	17,09	e	CBW 0101	18,15	de
B. I. CUMENAY	16,48	dg	MVTD 10-98	17,12	e	B. I. CARILO	18,17	de
CBW 0101	16,63	eg	CBW 0101	17,24	e	BUCK 25	18,26	de
MVTD 10-98	16,69	fg	B. I. CARILO	17,25	e	CBW 0153	18,29	de
BUCK AMBAR	17,17	g	BUCK AMBAR	17,94	f	BUCK AMBAR	18,75	e
Media	15,99			16,46			17,42	
Desvío	0,681			0,8711			0,866	

Tabla A3.15. Contenido de proteína en grano (%) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).

F1		F2		F3	
Genotipo	\bar{X}	Genotipo	\bar{X}	Genotipo	\bar{X}
CBW 0141	10,97	CBW 0141	10,800	CBW 0141	10,61
CBW 0105	11,92	CBW 0105	12,08	CBW 0105	11,26
BON. INTA FACON	12,48	BON. INTA FACON	12,33	CBW 0153	12,42
BUCK ESMERALDA	12,76	80-IAT2	12,35	80-IAT2	12,59
BUCK 25	12,83	BUCK ESMERALDA	12,36	BUCK ESMERALDA	12,62
CBW 0153	13,04	VF0154	12,54	BON. INTA FACON	12,70
VF0154	13,11	CBW 0153	12,67	VF0154	12,87
BON. INTA QUILLEN	13,24	BUCK 25	12,78	BON. INTA QUILLEN	12,92
MVTD 10-98	13,32	CONCADORO	13,07	BON. INTA CARILO	12,94
CBW 0101	13,39	BON. INTA QUILLEN	13,17	CONCADORO	13,02
BON. INTA CARILO	13,44	BON. INTA CARILO	13,20	BUCK 25	13,07
80-IAT2	13,55	CBW 0101	13,24	CBW 0101	13,18
CONCADORO	13,63	BON. INTA CUMENAY	13,86	BUCK AMBAR	13,43
BON. INTA CUMENAY	13,95	BUCK AMBAR	14,400	BON. INTA CUMENAY	14,14
BUCK AMBAR	13,95	MVTD 10-98	14,66	MVTD 10-98	14,96
Media	13,04		12,9		12,85
Desvío	0,786		0,955		1,019

Tabla A3.16. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, Proteína y PH de 15 genotipos de trigo candeal (año 2016). En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	FECHA 1			FECHA 2			FECHA 3		
	Rto	Proteína	PH	Rto	Proteína	PH	Rto	Proteína	PH
Rto	1			1			1		
Proteína	-0,34	1		-0,28	1		-0,20	1	
PH	0,56*	-0,34	1	0,36	-0,50	1	0,29	-0,21	1

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

Tabla A3.17. Coeficiente de correlación de Pearson entre Rto, Proteína y PH de 15 genotipos de trigo candeal (año 2017). En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	FECHA 1			FECHA 2			FECHA 3		
	Rto	Proteína	PH	Rto	Proteína	PH	Rto	Proteína	PH
Rto	1			1			1		
Proteína	-0,38	1		-0,19	1		-0,29	1	
PH	-0,07	-0,61*	1	0,19	-0,79***	1	0,13	-0,76**	1

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

Tabla A3.18. Peso hectolítrico (kg.hl⁻¹) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
CBW 0101	73,94	a	BUCK AMBAR	67,09	a	BUCK AMBAR	63,60	a
MVTD 10-98	74,14	a	B. I. CARILO	69,16	ab	B. I. CARILO	66,29	ab
BUCK AMBAR	74,47	a	MVTD 10-98	70,14	bc	CBW 0141	67,55	bc
B. I. CARILO	74,97	ab	B. I. QUILLEN	71,23	bd	MVTD 10-98	68,54	bd
CBW 0105	75,27	ac	CBW 0101	71,83	be	B. I. QUILLEN	68,87	be
BUCK 25	76,10	bd	CBW 0141	72,35	ce	CBW 0105	69,51	bf
B. ESMERALDA	76,18	bd	CBW 0105	72,38	ce	CBW 0153	69,98	cg
B. I. QUILLEN	76,37	bd	CBW 0153	72,72	ce	BUCK 25	71,04	dh
80-IAT2	76,60	cd	VF0154	73,16	dg	B. I. CUMENAY	71,92	eh
CBW 0153	76,79	d	80-IAT2	73,71	dg	CONCADORO	72,02	eh
CBW 0141	76,97	d	B. I. CUMENAY	74,44	eh	CBW 0101	72,17	fh
B. I. CUMENAY	77,08	de	B. ESMERALDA	75,48	fh	B. ESMERALDA	72,75	h
CONCADORO	78,53	ef	CONCADORO	75,93	gh	VF0154	73,03	gh
VF0154	78,75	f	BUCK 25	76,08	gh	80-IAT2	73,49	h
B. I. FACON	79,10	f	B. I. FACON	76,76	h	B. I. FACON	73,52	h
Media	76,35			72,83			70,29	
Desvío	1,618			2,723			2,904	

Tabla A3.19. Peso hectolítrico (kg.hl⁻¹) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
CBW 0101	74,85	a	BUCK AMBAR	76,85	a	MVTD 10-98	78,23	a
B. I. CARILO	75,44	ab	MVTD 10-98	77,93	ab	BUCK AMBAR	78,80	ab
B. I. QUILLEN	76,59	ac	B. I. CARILO	78,30	ab	B. I. CARILO	79,03	ac
MVTD 10-98	77,04	ac	CBW 0101	78,74	ab	CONCADORO	79,70	ad
BUCK AMBAR	77,18	bc	B. I. CUMENAY	79,16	bc	B. I. CUMENAY	80,75	ae
CONCADORO	77,43	bc	CBW 0153	79,98	bd	CBW 0101	81,26	bf
B. I. CUMENAY	78,01	cd	CONCADORO	80,08	bd	BUCK 25	81,43	cg
VF0154	79,95	de	B. I. QUILLEN	80,98	ce	B. I. QUILLEN	81,88	dh
CBW 0153	80,69	e	VF0154	81,43	de	CBW 0153	82,09	di
BUCK 25	80,88	e	CBW 0105	81,44	de	80-IAT2	82,93	ei
CBW 0105	80,93	e	BUCK 25	82,79	ef	VF0154	83,66	fi
80-IAT2	81,51	ef	80-IAT2	83,11	ef	B. I. FACON	83,84	gi
B. I. FACON	81,60	ef	CBW 0141	83,16	ef	B. ESMERALDA	83,84	gi
CBW 0141	82,13	ef	B. I. FACON	84,28	f	CBW 0105	84,28	hi
B. ESMERALDA	83,26	f	B. ESMERALDA	84,41	f	CBW 0141	84,61	i
Media	79,17			80,84			81,76	
Desvío	2,645			2,376			2,113	

Tabla A3.20. Altura (cm) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
CBW 0105	62,56	a	CBW 0101	49,89	a	MVTD 10-98	41,96	a
MVTD 10-98	62,90	a	MVTD 10-98	54,80	b	CBW 0101	43,71	ab
CONCADORO	63,57	a	CBW 0105	57,63	b	B. I. CARILO	48,79	bc
CBW 0101	64,49	a	B. I. QUILLEN	62,71	c	CBW 0105	51,44	c
B. I. FACON	71,05	b	B. I. CARILO	63,89	cd	B. I. QUILLEN	53,66	cd
B. I. QUILLEN	72,00	b	CBW 0153	67,88	de	B. I. FACON	57,26	de
B. I. CARILO	72,36	bc	CONCADORO	69,24	ef	CBW 0153	59,57	ef
CBW 0153	75,40	bd	B. I. FACON	69,27	ef	B. I. CUMENAY	61,67	eg
B. I. CUMENAY	75,51	bd	VF0154	70,04	eg	BUCK AMBAR	62,01	eg
VF0154	76,52	be	B. I. CUMENAY	72,18	fg	CONCADORO	62,78	fg
BUCK 25	77,87	ce	BUCK AMBAR	72,68	fg	VF0154	64,43	fh
CBW 0141	80,74	df	BUCK 25	74,18	g	BUCK 25	65,77	gh
BUCK AMBAR	81,28	ef	B. ESMERALDA	78,85	h	CBW 0141	68,65	hi
B. ESMERALDA	84,15	f	CBW 0141	79,21	h	B. ESMERALDA	72,48	i
80-IAT2	86,12	f	80-IAT2	90,28	i	80-IAT2	89,62	j
Media	73,77			68,85			60,25	
Desvío	7,754			10,24			11,99	

Tabla A3.21. Altura (cm) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,0001$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
B. I. FACON	83,73	a	CONCADORO	80,68	a	CBW 0101	76,85	a
BUCK 25	84,08	a	CBW 0101	81,83	ab	CONCADORO	78,98	ab
CONCADORO	85,05	ab	CBW 0105	82,00	ab	MVTD 10-98	79,03	ab
VF0154	87,08	ac	B. I. FACON	82,80	ac	CBW 0105	80,40	ab
CBW 0101	87,40	ac	MVTD 10-98	83,80	ad	B. I. FACON	81,55	bc
B. I. CUMENAY	87,58	ac	B. I. CUMENAY	85,03	ae	BUCK 25	84,95	cd
MVTD 10-98	88,03	ac	BUCK 25	85,75	be	B. I. CUMENAY	85,78	cd
CBW 0141	88,90	ac	CBW 0153	87,00	ce	B. I. QUILLEN	87,13	de
B. I. QUILLEN	91,00	bc	B. I. QUILLEN	87,55	ce	CBW 0153	88,28	de
CBW 0153	92,35	c	VF0154	88,35	de	CBW 0141	88,75	de
B. I. CARILO	92,78	c	CBW 0141	89,00	ef	VF0154	89,30	de
CBW 0105	93,18	cd	B. I. CARILO	93,93	fg	B. I. CARILO	90,50	ef
BUCK AMBAR	99,18	de	B. ESMERALDA	97,70	gh	BUCK AMBAR	94,20	f
B. ESMERALDA	104,65	e	BUCK AMBAR	100,63	h	B. ESMERALDA	100,50	g
80-IAT2	112,65	f	80-IAT2	105,98	i	80-IAT2	101,75	g
Media	91,84			88,80			87,19	
Desvío	8,06			7,51			7,48	

Tabla A3.22. Índice de cosecha (IC) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2016). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,01$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
CBW 0101	23,73	a	CBW 0101	21,64	a	MVTD 10-98	21,70	a
80-IAT2	28,09	ab	80-IAT2	30,78	b	CBW 0101	24,67	a
BUCK AMBAR	28,78	ac	MVTD 10-98	33,78	bc	BUCK AMBAR	32,52	b
BUCK ESMERALDA	29,01	ac	BUCK AMBAR	34,66	bc	80-IAT2	33,01	bc
BUCK 25	29,38	ad	CBW 0153	36,74	cd	B. I. CARILO	33,1	bc
B. I. CUMENAY	30,07	ad	B. I. QUILLEN	36,75	cd	B. I. FACON	34,31	bd
B. I. CARILO	32,39	be	BUCK 25	36,88	cd	BUCK 25	35,12	be
CBW 0105	32,55	be	CBW 0105	37,89	cd	CBW 0105	36,09	be
CBW 0153	33,29	be	B. I. CUMENAY	38,04	cd	B. I. QUILLEN	36,17	be
B. I. QUILLEN	33,56	be	CBW 0141	38,19	cd	CBW 0141	36,35	be
B. I. FACON	35,08	bf	B. I. CARILO	38,29	cd	B. I. CUMENAY	37,50	be
MVTD 10-98	37,32	cf	VF0154	38,42	cd	CBW 0153	39,21	cf
CBW 0141	37,93	df	BUCK ESMERALDA	38,48	cd	BUCK ESMERALDA	39,37	df
VF0154	39,01	ef	B. I. FACON	40,98	d	CONCADORO	41,26	ef
CONCADORO	42,17	f	CONCADORO	44,95	e	VF0154	43,91	f
Media	32,82			36,43			34,95	
Desvío	4,88			5,168			5,756	

Tabla A3.23. Índice de cosecha (IC) de 15 genotipos de trigo candeal en tres fechas de siembra (F) (año 2017). Medias con una letra distinta son significativamente diferentes (LSD $\alpha=0,01$).

Genotipo	F1		Genotipo	F2		Genotipo	F3	
	\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD		\bar{X}	LSD
80-IAT2	29,78	a	80-IAT2	34,39	a	MVTD 10-98	29,98	a
CBW 0101	40,14	b	MVTD 10-98	34,39	a	80-IAT2	31,08	a
B. I. CARILO	43,03	bc	CBW 0101	41,55	b	CBW 0101	42,23	b
B. I. CUMENAY	43,77	bc	BUCK AMBAR	42,09	b	B. ESMERALDA	43,45	bc
BUCK AMBAR	44,21	bd	B. I. CUMENAY	46,31	c	B. I. CUMENAY	44,63	bc
BUCK 25	44,51	be	B. I. QUILLEN	47,65	cd	BUCK AMBAR	44,67	bc
MVTD 10-98	45,48	cf	B. I. CARILO	47,87	cd	B. I. CARILO	46,04	bd
B. ESMERALDA	46,01	cg	CBW 0105	48,89	ce	B. I. QUILLEN	46,98	bd
B. I. QUILLEN	47,00	ch	B. ESMERALDA	49,03	ce	CONCADORO	47,22	bd
B. I. FACON	48,44	dh	CBW 0153	51,29	df	CBW 0153	48,68	bd
CBW 0105	49,00	eh	B. I. FACON	51,59	df	B. I. FACON	49,86	cd
VF0154	49,40	fh	VF0154	51,82	ef	CBW 0105	51,38	d
CBW 0153	49,95	fh	BUCK 25	52,02	ef	BUCK 25	51,77	d
CBW 0141	50,57	gh	CONCADORO	53,81	f	VF0154	52,46	d
CONCADORO	51,29	h	CBW 0141	54,91	f	CBW 0141	52,48	d
Media	45,51			47,17			45,53	
Desvío	5,38			6,423			6,922	

Tabla A3.24. Análisis de la Varianza para % de daño por heladas en espigas. Año 2016.

Fuente de variación	g.l.	F	p-valor
Modelo	65	4,02	<0,0001
Fecha	1	0,54	0,4651
Genotipo	10	2,03	0,0554
Fecha*Genotipo	10	1,11	0,3788
Fecha>Bloque	4	2,2	0,0861
Bloque*Fecha*Genotipo	40	3,24	<0,0001
Error	132		
Total	197		

Interacción significativa con un $p < 0,20$

Tabla A3.25. Coeficiente de correlación de Pearson entre D_{AT} , % de Daño total de espigas por frío y tipos de daño: Blanca, Deformada y Zonas de 15 genotipos de trigo candeal, año 2016. En negrita correlaciones significativas.

VARIABLE	FECHA 1					FECHA 2				
	D_{AT}	% Daño	Blanca	Deformada	Zona	D_{AT}	% Daño	Blanca	Deformada	Zona
D_{AT}	1					1				
% Daño	-0,58*	1				-0,61*	1			
Blanca	-0,19	0,80***	1			-0,65**	0,94***	1		
Deformada	-0,12	0,77***	0,74**	1		0,00	0,00	0,00	1	
Zona	-0,82***	0,69**	0,28	0,10	1	-0,43	0,88***	0,67**	0,00	1

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

REFERENCIAS

- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell*, 15(1), 63-78.
- Abe, K., Araki, E., Suzuki, Y., Toki, S., & Saika, H. (2018). Production of high oleic/low linoleic rice by genome editing. *Plant Physiology and Biochemistry*, 131, 58-62.
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.-H., Fujii, H., Zheng, X., & Zhu, J.-K. (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), 37636-37645.
- Akpinar, B. A., Biyiklioglu, S., Alptekin, B., Havránková, M., Vrána, J., Doležel, J., . . . Budak, H. (2018). Chromosome-based survey sequencing reveals the genome organization of wild wheat progenitor *Triticum dicoccoides*. *Plant Biotechnology Journal*, 16(12), 2077-2087.
- Alonso, D. L., Garcia-Maroto, F., Rodriguez-Ruiz, J., Garrido, J., & Vilches, M. (2003). Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(10), 1111-1124.
- Alzohairy, A. M., Sabir, J. S., Gyulai, G., Younis, R. A., Jansen, R. K., & Bahieldin, A. (2014). Environmental stress activation of plant long-terminal repeat retrotransposons. *Functional Plant Biology*, 41(6), 557-567.
- Anderson, W., & Smith, W. (1990). Yield advantage of two semi-dwarf compared with two tall wheats depends on sowing time. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41(5), 811-826.
- Andersson, B. (1983). Studies on cultivation technique of winter wheat. Influence of sowing time, seed rate, row space, nitrogen fertilization and harvest time combined with different cultivars. Rapport-Sveriges Lantbruksuniversitet, Institutionen foer Vaextodling (Sweden).
- AOCS, O. (1998). Methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA.
- Ariizumi, T., Kishitani, S., Inatsugi, R., Nishida, I., Murata, N., & Toriyama, K. (2002). An increase in unsaturation of fatty acids in phosphatidylglycerol from leaves improves the rates of photosynthesis and growth at low temperatures in transgenic rice seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 43(7), 751-758.
- Arroyo, T. L., Morales Rosales, E. J., Estrada Campuzano, G., & Martínez Rueda, C. G. (2014). Determinantes ecofisiológicos del rendimiento en tres cultivares de trigo en función y fraccionamiento del nitrógeno. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(3), 405-419.

- Asseng, S., Jamieson, P., Kimball, B., Pinter, P., Sayre, K., Bowden, J., & Howden, S. (2004). Simulated wheat growth affected by rising temperature, increased water deficit and elevated atmospheric CO₂. *Field Crops Research*, 85(2-3), 85-102.
- Bassu, S., Asseng, S., Motzo, R., & Giunta, F. (2009). Optimising sowing date of durum wheat in a variable Mediterranean environment. *Field Crops Research*, 111(1-2), 109-118.
- Basualdo, J. (2013). Estudio de la variabilidad de la tolerancia a bajas temperaturas en trigo candeal (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) y genes asociados.
- Basualdo, J., Díaz, M. L., Cuppari, S., Cardone, S., Soresi, D., Camargo, G. P., & Carrera, A. (2015). Allelic variation and differential expression of VRN-A1 in durum wheat genotypes varying in the vernalization response. *Plant Breeding*, 134(5), 520-528.
- Beauchamp, E., Tekpli, X., Marteil, G., Lagadic-Gossmann, D., Legrand, P., & Rioux, V. (2009). N-Myristoylation targets dihydroceramide Δ 4-desaturase 1 to mitochondria: Partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid. *Biochimie*, 91(11-12), 1411-1419.
- Beisson, F., Koo, A. J., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J. J., . . . Milcamp, A. (2003). Arabidopsis genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiology*, 132(2), 681-697.
- Bell, M., & Fischer, R. (1994). Guide to plant and crop sampling: measurements and observations for agronomic and physiological research in small grain cereals: CIMMYT.
- Beló, A., Zheng, P., Luck, S., Shen, B., Meyer, D. J., Li, B., . . . Rafalski, A. (2008). Whole genome scan detects an allelic variant of FAD2 associated with increased oleic acid levels in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(1), 1-10.
- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H., Iba, K., & Kusano, T. (1998). Two maize genes encoding ω -3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Molecular Biology*, 36(2), 297-306.
- Bertin, P., Bullens, P., Bouharmont, J., & Kinet, J.-M. (1998). Somaclonal variation and chilling tolerance improvement in rice: changes in fatty acid composition. *Plant Growth Regulation*, 24(1), 31-41.
- Bevilacqua, C. B., Basu, S., Pereira, A., Tseng, T.-M., Zimmer, P. D., & Burgos, N. R. (2015). Analysis of stress-responsive gene expression in cultivated and weedy rice differing in cold stress tolerance. *PLoS One*, 10(7), e0132100.
- Bhunja, R. K., Kaur, R., & Maiti, M. K. (2016). Metabolic engineering of fatty acid biosynthetic pathway in sesame (*Sesamum indicum* L.): assembling tools to develop nutritionally desirable sesame seed oil. *Phytochemistry Reviews*, 15(5), 799-811.
- Blais, A., & Dynlacht, B. D. (2005). Constructing transcriptional regulatory networks. *Genes & Development*, 19(13), 1499-1511.

- Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F., & Rawlings, R. R. (2011). Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 93(5), 950-962.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Borda, M. R. (2015). INFORME AGROMETEOROLÓGICO: AÑO 2014. EEAI Barrow. <http://anterior.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agrometeo/anual/WEBANUAL2015.pdf>.
- Borda, M. R. (2017). INFORME AGROMETEOROLÓGICO: AÑO 2016. EEAI Barrow. <http://anterior.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agrometeo/anual/WEBANUAL2017.pdf>.
- Borda, M. R. (2018). INFORME AGROMETEOROLÓGICO: AÑO 2017. EEAI Barrow. <http://anterior.inta.gov.ar/barrow/info/documentos/agrometeo/anual/WEBANUAL2018.pdf>.
- Bossie, M. A., & Martin, C. E. (1989). Nutritional regulation of yeast delta-9 fatty acid desaturase activity. *Journal of Bacteriology*, 171(12), 6409-6413.
- Bybordi, A., Tabatabaei, S. J., & Ahmadev, A. (2010). Effects of salinity on fatty acid composition of canola (*Brassica napus* L.). *J. Food Agric. and Environ*, 8(1), 113-115.
- Caballero, V. J., & Abbate, P. E. (2013). Análisis del rendimiento en cultivares de trigo pan ante el retraso en las fechas de siembra.
- Calderini, D., Abeledo, L., Savin, R., & Slafer, G. A. (1999). Effect of temperature and carpel size during pre-anthesis on potential grain weight in wheat. *Journal of Agricultural Science*, vol. 132, 453-459.
- Campbell, C., Davidson, H., & Winkleman, G. (1981). Effect of nitrogen, temperature, growth stage and duration of moisture stress on yield components and protein content of Manitou spring wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 61(3), 549-563.
- Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D., & May, G. (2004). The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 4(1), 10.
- 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(5), 911-917.
- Chandrasekar, V., K. Sairam, R., & Srivastava, G. (2000). Physiological and biochemical responses of hexaploid and tetraploid wheat to drought stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 185(4), 219-227.

- Charles, M., Belcram, H., Just, J., Huneau, C., Viollet, A., Couloux, A., . . . Coriton, O. (2008). Dynamics and differential proliferation of transposable elements during the evolution of the B and A genomes of wheat. *Genetics*, 180(2), 1071-1086.
- Cheng, J., Zhu, L.-H., Salentijn, E. M., Huang, B., Gruber, J., Dechesne, A. C., . . . van Loo, E. N. (2013). Functional analysis of the omega-6 fatty acid desaturase (CaFAD2) gene family of the oil seed crop *Crambe abyssinica*. *BMC Plant Biology*, 13(1), 1-12.
- Chi, X., Yang, Q., Lu, Y., Wang, J., Zhang, Q., Pan, L., . . . Yu, S. (2011). Genome-wide analysis of fatty acid desaturases in soybean (*Glycine max*). *Plant Molecular Biology reporter*, 29(4), 769-783.
- Chinnusamy, V., Liming Xiong & Jian- Kang Zhu. (2005). Chapter two: Use of Genetic Engineering and Molecular Biology Approaches for Crop Improvement for Strees Environments. pp. 47- 95. En: Ashraf, M. y P. Harris (eds.). *Abiotic stresses plant resistance through breeding and molecular approaches*. Food Products Press, Binghamton.
- Collados, R., Andreu, V., Picorel, R., & Alfonso, M. (2006). A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of ω 3 fatty-acid desaturases (FAD3, FAD7 and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions. *FEBS letters*, 580(20), 4934-4940.
- Connor, D. J., Theiveyanathan, S., & Rimmington, G. M. (1992). Development, growth, water-use and yield of a spring and a winter wheat in response to time of sowing. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43(3), 493-516.
- Consortium, I. W. G. S. (2014). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 345(6194).
- Coventry, D., Reeves, T., Brooke, H., & Cann, D. (1993). Influence of genotype, sowing date, and seeding rate on wheat development and yield. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 33(6), 751-757.
- Cox, M. C., Qualset, C. O., & Rains, D. W. (1986). Genetic Variation for Nitrogen Assimilation and Translocation in Wheat. III. Nitrogen Translocation in Relation to Grain Yield and Protein 1. *Crop science*, 26(4), 737-740.
- Cuevas, C., Bellinger, B., & Skinner, D. (2015). Membrane stability of winter wheat plants exposed to subzero temperatures for variable lengths of time. *Communications in Plant Sciences*, 5(1/2), 9-14.
- Curtis, B. C. (2002). Wheat in the world. In B. C. Curtis, S. Rajaram, & H. Gomez Macpherson (Eds.), *Bread wheat improvement and production* (p. 544). Rome: Food and Agriculture Organization.
- Dakhma, W. S., Zarrouk, M., & Cherif, A. (1995). Effects of drought-stress on lipids in rape leaves. *Phytochemistry*, 40(5), 1383-1386.

- Dar, A. A., Choudhury, A. R., Kancharla, P. K., & Arumugam, N. (2017). The FAD2 gene in plants: occurrence, regulation, and role. *Front Plant Sci*, 8, 1789.
- De Bigault Du Granrut, A., & Cacas, J.-L. (2016). How very-long-chain fatty acids could signal stressful conditions in plants?. *Front Plant Sci*, 7, 1490.
- De Palma, M., Grillo, S., Massarelli, I., Costa, A., Balogh, G., Vigh, L., & Leone, A. (2008). Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molecular Breeding*, 21(1), 15-26.
- Deol, P., Fahrman, J., Yang, J., Evans, J. R., Rizo, A., Grapov, D., ... & Hammock, B. D. (2017). Omega-6 and omega-3 oxylipins are implicated in soybean oil-induced obesity in mice. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Di Rienzo, J. (2019). InfoStat versión 2019. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dias, A., Barreiro, M., Campos, P., Ramalho, J., & Lidon, F. (2010). Wheat cellular membrane thermotolerance under heat stress. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 196(2), 100-108.
- Díaz, M., Basualdo, J., Cuppari S., Miguel I., Carrera A. El gen DREB-A1 y su relación con la respuesta a bajas temperaturas en líneas de trigo candeal. XLIII Congreso Argentino de Genética, S.C. de Bariloche, Argentina. 19 al 22 de octubre de 2014.
- Díaz, M. L., Cuppari, S., Soresi, D., & Carrera, A. (2018). In silico analysis of fatty acid desaturase genes and proteins in grasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(2), 484-499.
- Díaz, M. L., Soresi, D. S., Basualdo, J., Cuppari, S. J., & Carrera, A. (2019). Transcriptomic response of durum wheat to cold stress at reproductive stage. *Molecular biology reports*, 46(2), 2427-2445.
- DiNicolantonio, J. J., & O'Keefe, J. H. (2018). Importance of maintaining a low omega-6/omega-3 ratio for reducing inflammation. *Open Heart*, 5(2).
- Doğan, R. (2009). The correlation and path coefficient analysis for yield and some yield components of durum wheat (*Triticum turgidum* var. *durum* L.) in west Anatolia conditions. *Pak. J. Bot*, 41(3), 1081-1089.
- Domínguez Brando, J. (2014). Panorama Internacional del Mercado de Trigo Pan y Candeal. World Pasta Day 2014. Buenos Aires, Argentina.
- Domínguez, T., Hernández, L., Pennycooke, J., Jiménez, P., Martínez Riva, J. M., Sanz, C., Stockinger, E., Sánchez-Serrano, J., & Sanmartín, M. (2010). Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant Physiology*, 153(2), 655-665.
- Donaire, G., Bainotti, C., Alberioni, E., Gomez, D., Fraschina, J., Salines, J., Salines, N., Conde, B., Reartes, F. & Larsen, A. (2018). Evaluación de cultivares de trigo candeal en la EEA

- Marcos Juaréz durante la campaña 2017. Informe de actualización técnica N° 10 INTA EEA Marcos Juaréz.
- Du, H., Wu, N., Chang, Y., Li, X., Xiao, J., & Xiong, L. (2013). Carotenoid deficiency impairs ABA and IAA biosynthesis and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *Plant Molecular Biology*, 83(4-5), 475-488.
- Dubcovsky, J., & Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833), 1862-1866.
- Dubey, R. S. (1999). Protein synthesis by plants under stressful conditions. *Handbook of Plant and Crop Stress*, 2, 365-397.
- Dyer, J. M., & Mullen, R. T. (2001). Immunocytological localization of two plant fatty acid desaturases in the endoplasmic reticulum. *FEBS letters*, 494(1-2), 44-47.
- Ebrahimian, E., & Bybordi, A. (2012). Effect of salinity, salicylic acid, silicium and ascorbic acid on lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and fatty acid content of sunflower. *African Journal of Agricultural Research*, 7(25), 3685-3694.
- Ehdaie, B., & Wainies, J. (2001). Sowing date and nitrogen rate effects on dry matter and nitrogen partitioning in bread and durum wheat. *Field Crops Research*, 73(1), 47-61.
- Elhani, S., Martos, V., Rharrabti, Y., Royo, C., & del Moral, L. G. (2007). Contribution of main stem and tillers to durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) grain yield and its components grown in Mediterranean environments. *Field Crops Research*, 103(1), 25-35.
- Evans, L., & Fischer, R. (1999). Yield potential: its definition, measurement, and significance. *Crop Science*, 39(6), 1544-1551.
- Falcone, D. L., Ogas, J. P., & Somerville, C. R. (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biology*, 4(1), 17.
- Feldman, M., & Levy, A. A. (2012). Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics*, 192(3), 763-774.
- Fernández-Moya, V., Martínez-Force, E., & Garcés, R. (2002). Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochemistry*, 59(1), 33-37.
- Ferrise, R., Triossi, A., Stratonovitch, P., Bindi, M., & Martre, P. (2010). Sowing date and nitrogen fertilisation effects on dry matter and nitrogen dynamics for durum wheat: An experimental and simulation study. *Field Crops Research*, 117(2-3), 245-257.
- Ferro, M., Salvi, D., Brugièrè, S., Miras, S., Kowalski, S., Louwagie, M., . . . Rolland, N. (2003). Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(5), 325-345.

- Fischer, R. (2001). Selection traits for improving yield potential. *Application of Physiology in Wheat Breeding*, 13, 148-159.
- Fischer, R., Armstrong, J., & Stapper, M. (1990). Simulation of soil water storage and sowing day probabilities with fallow and no-fallow in southern New South Wales: I. Model and long term mean effects. *Agricultural Systems*, 33(3), 215-240.
- Foulkes, M. J., Slafer, G. A., Davies, W. J., Berry, P. M., Sylvester-Bradley, R., Martre, P., ... & Reynolds, M. P. (2011). Raising yield potential of wheat. III. Optimizing partitioning to grain while maintaining lodging resistance. *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 469-486.
- Fukuchi-Mizutani, M., Savin, K., Cornish, E., Tanaka, Y., Ashikari, T., Kusumi, T., & Murata, N. (1995). Senescence-induced expression of a homologue of $\Delta 9$ desaturase in rose petals. *Plant Molecular Biology*, 29(4), 627-635.
- García, G. A., & Miralles, D. J. (2012). Título: Rendimiento potencial en trigo. identificación de atributos ecofisiológicos favorables en líneas doble haploide.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., & Somerville, C. (1994). Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast [omega]-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 106(4), 1615-1621.
- Golizadeh, F., & Kumleh, H. H. (2019). Physiological Responses and Expression Changes of Fatty Acid Metabolism–Related Genes in Wheat (*Triticum aestivum*) Under Cold Stress. *Plant molecular Biology Reporter*, 37(3), 224-236.
- González, Á. (2008). Técnicas de interés en la mejora de cebadas tolerantes a la sequía y temperaturas elevadas. I. Estabilidad de las membranas celulares. *Agroecología*, 3, 55-60.
- Guo, Z. F., Li, F. Z., Ma, X. G., Lin, F., Ma, H., Chen, L. J., ... & Yi, Y. (2011). Molecular cloning of two novel stearoyl-acyl desaturase genes from winterness wheat. *Genes & Genomics*, 33(5), 583.
- Halverson, J. (1988). Criteria of wheat quality. *Wheat: Chemistry and Technology*, 15-46.
- Hannah, M. A., Heyer, A. G., & Hinch, D. K. (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 1(2), e26.
- Harwood, J. L. (1997). Plant lipid metabolism. *Plant Biochemistry*, 237-271.
- Harwood, J. L. (2005). Fatty acid biosynthesis. *Plant lipids: Biology, utilisation and manipulation*, 27, 66.
- Heidarvand, L., & Amiri, R. M. (2010). What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(3), 419-431.

- Heppard, E. P., Kinney, A. J., Stecca, K. L., & Miao, G.-H. (1996). Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal [ω]-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiology*, 110(1), 311-319.
- Hernández, M. L., Mancha, M., & Martínez-Rivas, J. M. (2005). Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive. *Phytochemistry*, 66(12), 1417-1426.
- Hernández, M. L., Sicardo, M. D., & Martínez-Rivas, J. M. (2016). Differential contribution of endoplasmic reticulum and chloroplast ω -3 fatty acid desaturase genes to the linolenic acid content of olive (*Olea europaea*) fruit. *Plant and Cell Physiology*, 57(1), 138-151.
- Hincha, D. K., Zuther, E., & Heyer, A. G. (2003). The preservation of liposomes by raffinose family oligosaccharides during drying is mediated by effects on fusion and lipid phase transitions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1612(2), 172-177.
- Horiguchi, G., Iwakawa, H., Kodama, H., Kawakami, N., Nishimura, M., & Iba, K. (1996). Expression of a gene for plastid ω -3 fatty acid desaturase and changes in lipid and fatty acid compositions in light- and dark-grown wheat leaves. *Physiologia Plantarum*, 96(2), 275-283.
- Horiguchi, G., Fuse, T., Kawakami, N., Kodama, H., & Iba, K. (2000). Temperature-dependent translational regulation of the ER ω -3 fatty acid desaturase gene in wheat root tips. *The Plant Journal*, 24(6), 805-813.
- Huang, M., & Guo, Z. (2005). Responses of antioxidative system to chilling stress in two rice cultivars differing in sensitivity. *Biologia Plantarum*, 49(1), 81-84.
- Iba, K. (2002). Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 225-245.
- Irvine, G. N. (1971). Durum wheat and paste products. Pomeranz, Y. *Wheat; Chemistry and Technology*.
- Jenner, C. F., Ugalde, T. D., & Aspinall, D. (1991). The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. *Functional Plant Biology*, 18(3), 211-226.
- Jia, J., Zhao, S., Kong, X., Li, Y., Zhao, G., He, W., . . . Zhang, X. (2013). *Aegilops tauschii* draft genome sequence reveals a gene repertoire for wheat adaptation. *Nature*, 496(7443), 91-95.
- Jin, U. H., Lee, J. W., Chung, Y. S., Lee, J. H., Yi, Y. B., Kim, Y. K., ... & Chung, C. H. (2001). Characterization and temporal expression of a ω -6 fatty acid desaturase cDNA from sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. *Plant Science*, 161(5), 935-941.
- Kan, A. (2015). Characterization of the fatty acid and mineral compositions of selected cereal cultivars from Turkey. *Records of Natural Products*, 9(1), 124.

- Kanazawa, A., Liu, B., Kong, F., Arase, S., & Abe, J. (2009). Adaptive evolution involving gene duplication and insertion of a novel Ty1/copia-like retrotransposon in soybean. *Journal of Molecular Evolution*, 69(2), 164-175.
- Karabudak, T., Bor, M. E. L. İ. K. E., Özdemir, F., & Türkan, İ. (2014). Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase7 and lipoxygenase gene expression. *Molecular Biology Reports*, 41(3), 1401-1410.
- Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsaftaris, A., & Farmaki, T. (2008). Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2043-2056.
- Khodakovskaya, M., McAvoy, R., Peters, J., Wu, H., & Li, Y. (2006). Enhanced cold tolerance in transgenic tobacco expressing a chloroplast ω -3 fatty acid desaturase gene under the control of a cold-inducible promoter. *Planta*, 223(5), 1090-1100.
- Kinney, A. J., Cahoon, E., & Hitz, W. (2002). *Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants*: Portland Press Ltd.
- Klinkenberg, J., Faist, H., Saupe, S., Lambertz, S., Krischke, M., Stingl, N., ... & Deeken, R. (2014). Two fatty acid desaturases, stearoyl-acyl carrier protein Δ 9-desaturase 6 and fatty acid desaturase 3, are involved in drought and hypoxia stress signaling in *Arabidopsis* crown galls. *Plant Physiology*, 164(2), 570-583.
- Kobata, T., Koç, M., Barutçular, C., Tanno, K. I., & Inagaki, M. (2018). Harvest index is a critical factor influencing the grain yield of diverse wheat species under rain-fed conditions in the Mediterranean zone of southeastern Turkey and northern Syria. *Plant Production Science*, 21(2), 71-82.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M., & Iba, K. (1994). Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast [omega]-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiology*, 105(2), 601-605.
- Kramer, T. H. (1979). Environmental and genetic variation for protein content in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 28(2), 209-218.
- Krasileva, K. V., Buffalo, V., Bailey, P., Pearce, S., Ayling, S., Tabbita, F., . . . Uauy, C. (2013). Separating homeologs by phasing in the tetraploid wheat transcriptome. *Genome Biology*, 14(6), R66.
- Larsen, A. O. (2017). Identificación de regiones genómicas asociadas a contenido de proteína y fuerza de gluten utilizando mapeo por asociación en trigo candeal.
- Larsen, A., & Jensen, C. (2016). Presentación de trigo Candeal. A todo trigo y cultivos de invierno (Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina).

- Lei, N., Peng, S., Niu, B., Chen, J., Zhou, J., Tang, L., ... & Chen, F. (2010). Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene DiFAD2 from *Davidia involucrata* Baill. *Biologia Plantarum*, 54(1), 41-46.
- Li, L., Wang, X., Gai, J., & Yu, D. (2007). Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean. *Journal of Plant Physiology*, 164(11), 1516-1526.
- Lindqvist, Y., Huang, W., Schneider, G., & Shanklin, J. (1996). Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *The EMBO Journal*, 15(16), 4081-4092.
- Ling, H.-Q., Zhao, S., Liu, D., Wang, J., Sun, H., Zhang, C., . . . Tao, Y. (2013). Draft genome of the wheat A-genome progenitor *Triticum urartu*. *Nature*, 496(7443), 87-90.
- Litvan, G. G. (1972). Mechanism of cryoinjury in biological systems. *Cryobiology*, 9(3), 182-191.
- Liu, W., Li, W., He, Q., Daud, M. K., Chen, J., & Zhu, S. (2015). Characterization of 19 genes encoding membrane-bound fatty acid desaturases and their expression profiles in *Gossypium raimondii* under low temperature. *PLoS One*, 10(4), e0123281.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Los, D. A., & Murata, N. (1998). Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1394(1), 3-15.
- Loss, S. P., & Siddique, K. H. M. (1994). Morphological and physiological traits associated with wheat yield increases in Mediterranean environments. In *Advances in Agronomy* (Vol. 52, pp. 229-276). Academic Press.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall III, W. B., De Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., . . . Richardson, D. C. (2003). Structure validation by Cα geometry: φ, ψ and Cβ deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 50(3), 437-450.
- Lynch, M., & Conery, J. S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science*, 290(5494), 1151-1155.
- Macartney, A. (1994). Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition. *Temperature Adaptation of Biological Membranes*, 129-139.
- Maccaferri, M., Harris, N. S., Twardziok, S. O., Pasam, R. K., Gundlach, H., Spannagl, M., . . . Milner, S. G. (2019). Durum wheat genome highlights past domestication signatures and future improvement targets. *Nature Genetics*, 51(5), 885-895.
- Maeoka, R. E., Sadras, V. O., Ciampitti, I. A., Diaz, D. R., Fritz, A. K., & Lollato, R. P. (2020). Changes in the Phenotype of Winter Wheat Varieties Released Between 1920 and 2016

- in Response to In-Furrow Fertilizer: Biomass Allocation, Yield, and Grain Protein Concentration. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1786.
- Magra, G., Senn, J., & Martín, R. (2005). Evaluación del daño provocado por heladas tardías en trigo.
- Makarenko, S., Dudareva, L., Katyshev, A., Konenkina, T., Nazarova, A., Rudikovskaya, E., . . . Konstantinov, Y. M. (2011). The effect of low temperatures on fatty acid composition of crops with different cold resistance. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 5(1), 64-69.
- Mansour, M. M. F., Salama, K. H., & Allam, H. Y. (2015). Role of the plasma membrane in saline conditions: lipids and proteins. *The Botanical Review*, 81(4), 416-451.
- Martineau, J. R., Specht, J. E., Williams, J. H., & Sullivan, C. Y. (1979). Temperature tolerance in soybeans. I. Evaluation of a technique for assessing cellular membrane thermostability 1. *Crop Science*, 19(1), 75-78.
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Hashimoto, T., & Iba, K. (2005). A temperature-sensitive mechanism that regulates post-translational stability of a plastidial ω -3 fatty acid desaturase (FAD8) in Arabidopsis leaf tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3597-3604.
- Matteucci, M., D'angeli, S., Errico, S., Lamanna, R., Perrotta, G., & Altamura, M. M. (2011). Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europaea* L. genotypes with different cold hardiness. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3403-3420.
- McCartney, A. W., Dyer, J. M., Dhanoa, P. K., Kim, P. K., Andrews, D. W., McNew, J. A., & Mullen, R. T. (2004). Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *The Plant Journal*, 37(2), 156-173.
- Miguel I., Cuppari S., Basualdo J., Díaz M., Carrera A. Las dehidrinas y su relación con la tolerancia a frío en estadio vegetativo y reproductivo en trigo candeal. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Argentina. Período: 13-17 de septiembre de 2015.
- Mikkilineni, V., & Rocheford, T. (2003). Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (FAD2) and fatty acid desaturase-6 (FAD6) cDNAs in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(7), 1326-1332.
- Miquel, M., James, D., & Dooner, H. (1993). Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(13), 6208-6212.
- Miralles, D. J., & Slafer, G. A. (2007). Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced? *Journal of Agricultural Science*, 2007, vol. 145, núm. 2, p. 139-149.

- Miralles, D. J., Aguirrezábal, L. N., Otegui, M. E., Kruk, B. C., & Izquierdo, N. (2010). Avances en ecofisiología de cultivos de granos. Facultad agronomía universidad de Buenos Aires.
- Miralles, D., González, F., Abeledo, L., Serrago, R., Alzueta, I., & García, G. (2014). Manual de trigo y cebada para el Cono Sur: procesos fisiológicos y bases de manejo. 56 p. Orientación Gráfica, Buenos Aires, Argentina.
- Mondal, S., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Kehel, Z., & Autrique, E. (2015). Characterization of Heat-and Drought-Stress Tolerance in High-Yielding Spring Wheat. *Crop Science*, 55(4), 1552-1562.
- Motzo, R., Giunta, F., & Deidda, M. (1996). Relationships between grain-filling parameters, fertility, earliness and grain protein of durum wheat in a Mediterranean environment. *Field Crops Research*, 47(2-3), 129-142.
- Murata, N., & Wada, H. (1995). Acyl-lipid desaturases and their importance in the tolerance and acclimatization to cold of cyanobacteria. *Biochemical Journal*, 308(1), 1-8.
- Murata, N., Wada, H., & Gombos, Z. (1992). Modes of fatty-acid desaturation in cyanobacteria. *Plant and Cell Physiology*, 33(7), 933-941.
- Nazari, M., Amiri, R. M., Mehraban, F., & Khaneghah, H. Z. (2012). Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), 183-189.
- Nejadsadeghi L, Amiri RM, Zeinali H, Ramezanpour S, Sadeghzde B. 2015. Membrane fatty acid compositions and cold-induced responses in tetraploid and hexaploid wheats. *Mol Biol Rep* 42:363–372.
- Nejadsadeghi, L., Maali-Amiri, R., Zeinali, H., Ramezanpour, S., & Sadeghzade, B. (2014). Comparative analysis of physio-biochemical responses to cold stress in tetraploid and hexaploid wheat. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 399-408.
- Novaro, P., D'Egidio, M. G., Mariani, B. M., & Bacci, L. (1997). Genotype and environment. Their effect on some durum wheat quality characteristic [*Triticum durum*]. *Journal of Genetics & Breeding (Italy)*.
- Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., & Lark, E. Browse, J. (1994). Arabidopsis FAD2, 147-158.
- Orozco-Arias, S., Isaza, G., & Guyot, R. (2019). Retrotransposons in plant genomes: structure, identification, and classification through bioinformatics and machine learning. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3837.
- Pagny, S., Lerouge, P., Faye, L., & Gomord, V. (1999). Signals and mechanisms for protein retention in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 50(331), 157-164.

- Panpoom, S., Los, D. A., & Murata, N. (1998). Biochemical characterization of a $\Delta 12$ acyl-lipid desaturase after overexpression of the enzyme in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1390(3), 323-332.
- Pask, A., Pietragalla, J., Mullan, D. M., Chávez, P., & Reynolds, M. P. (2013). *Fitomejoramiento fisiológico II: una guía de campo para la caracterización fenotípica de trigo*.
- Pastor Andreu, P. (2015). Efecto de mutaciones genéticas puntuales en la actividad enzimática de FAD3, una enzima implicada en la producción de ácidos grasos $\omega 3$.
- Peña Bautista, R. J., Perez Herrera, P., Villaseñor Mir, E., Gomez Valdez, M. M., Lozano, M., & Monterde Gabilondo, R. (2007). Calidad de la cosecha de trigo en Mexico: Ciclo otoño-invierno 2005-2006. CIMMYT.
- Petersen, G., Seberg, O., Yde, M., & Berthelsen, K. (2006). Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(1), 70-82.
- Pirtle, I. L., Kongcharoensuntorn, W., Nampaisansuk, M., Knesek, J. E., Chapman, K. D., & Pirtle, R. M. (2001). Molecular cloning and functional expression of the gene for a cotton Δ -12 fatty acid desaturase (FAD2). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1522(2), 122-129.
- Prado, S. A., Gallardo, J. M., Serrago, R. A., Kruk, B. C., & Miralles, D. J. (2013). Comparative behavior of wheat and barley associated with field release and grain weight determination. *Field Crops Research*, 144, 28-33.
- Prášil, I., & Zámečník, J. (1998). The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury: I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany*, 40(1), 1-10.
- Quaglia, G.B. 1988. Other Durum Wheat Products. In: *Durum Wheat: Chemistry and Technology*. G. Fabriani and C. Lintas (Eds). American Association of Cereal Chemists St. Paul, Minnesota, 263 - 282.
- Rajwade, A. V., Kadoo, N. Y., Borikar, S. P., Harsulkar, A. M., Ghorpade, P. B., & Gupta, V. S. (2014). Differential transcriptional activity of SAD, FAD2 and FAD3 desaturase genes in developing seeds of linseed contributes to varietal variation in α -linolenic acid content. *Phytochemistry*, 98, 41-53.
- Reynolds, M. P., Balota, M., Delgado, M. I. B., Amani, I., & Fischer, R. A. (1994). Physiological and morphological traits associated with spring wheat yield under hot, irrigated conditions. *Functional Plant Biology*, 21(6), 717-730.

- Reynolds, M. P., Rajaram, S., & Sayre, K. D. (1999). Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post-green revolution period and approaches for meeting projected global demand. *Crop Science*, 39(6), 1611-1621.
- Rharrabti, Y. (2001). Adaptación del trigo duro al ambiente mediterráneo: rendimiento, calidad y parámetros morfofisiológicos de selección para resistencia a la sequía. Tesis doctoral. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Vegetal.
- Richards, R. A. (1996). Increasing the yield potential of wheat: manipulating sources and sinks. *Increasing yield potential in wheat: breaking the barriers'*. (Eds MP Reynolds, S Rajaram, A McNab) pp, 134-149.
- Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Watt, M., Condon, A.G., Spielmeier, W., Dolferus, R. (2010). Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment. *Funct. Plant Biol.* 37, 85-97.
- Román A., Andreu V., Hernández M.L., Lagunas B., Picorel R., Martínez-Rivas JM and Miguel Alfonso. (2012). Contribution of the different omega-3 fatty acid desaturase genes to the cold response in soybean. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 63, No. 13, pp. 4973–4982. DOI:10.1093/jxb/ers174.
- Rousselin, P., Hahne, G., Prieto-Dapena, P., & Jordano, J. (2002). Modification of sunflower oil quality by seed-specific expression of a heterologous $\Delta 9$ -stearoyl (acyl carrier protein) desaturase gene. *Plant Breeding*, 121, 108–116.
- Royo C., Álvaro F., Martos V., Ramdani A., Isidoro J., Villegas D., García del Moral L.F. (2007). Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica* 155:259–270. Doi 10.1007/s10681-006-9327-9.
- Ruelland, E. & Zachowski A. (2010). How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.* 69. 225-232.
- Saghai-Marouf, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., & Allard, R. W. L. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(24), 8014-8018.
- Satorre, E. H., Benech Arnold, R. L., Slafer, G. A., De la Fuente, E. B., Miralles, D. J., Otegui, M. E., & Savin, R. (2004). Producción de granos. Bases funcionales para su manejo (No. F01 AGR 17624). Editorial Facultad Agronomía.
- Săulescu, N. N & Braun, H. J. (2002). Cold Tolerance. Reynolds M.P., Ortiz-Monasterio J.I. y McNab A. (eds.). *Application of Physiology in Wheat Breeding*. CIMMYT. Mexico, D.F. pp: 111-123.

- Sayanova, O., Smith, M. A., Lapinskas, P., Stobart, A. K., Dobson, G., Christie, W. W., . . . Napier, J. A. (1997). Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of $\Delta 6$ -desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 4211-4216.
- Schnable, J. C. (2015). Genome evolution in maize: from genomes back to genes. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 329-343.
- Schulthess, A., & Schwember, A. R. (2013). Improving durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) grain yellow pigment content through plant breeding. *International Journal of Agriculture and Natural Resources*, 40(3), 475-490.
- Seghezzo, M. L. (2015). Calidad en trigo candeal: Chacra Experimental Integrada Barrow.
- Shahryar, N., & Maali-Amiri, R. (2016). Metabolic acclimation of tetraploid and hexaploid wheats by cold stress-induced carbohydrate accumulation. *Journal of plant physiology*, 204, 44-53.
- Shanklin, J., & Cahoon, E. B. (1998). Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 611-641.
- Sharma, A., & Chauhan, R. S. (2012). In silico identification and comparative genomics of candidate genes involved in biosynthesis and accumulation of seed oil in plants. *Comparative and Functional Genomics*, 2012.
- Shi, J., Cao, Y., Fan, X., Li, M., Wang, Y., & Ming, F. (2012). A rice microsomal delta-12 fatty acid desaturase can enhance resistance to cold stress in yeast and *Oryza sativa*. *Molecular Breeding*, 29(3), 743-757.
- Sieber, A. N., Würschum, T., & Longin, C. F. H. (2014). Evaluation of a semi-controlled test as a selection tool for frost tolerance in durum wheat (*Triticum durum*). *Plant Breeding*, 133(4), 465-469.
- Shorter, R., Lawn, R.J., Hammer, G.L. (1991). Improving Genotypic Adaptation in Crops? a Role for Breeders, Physiologists and Modellers. *Exp. Agric.* 27, 155-175.
- Sieber, A. N., Würschum, T., & Longin, C. F. H. (2014). Evaluation of a semi-controlled test as a selection tool for frost tolerance in durum wheat (*Triticum durum*). *Plant Breeding*, 133(4), 465-469.
- Simon, E. W. (1974). Phospholipids and plant membrane permeability. *New Phytologist*, 73(3), 377-420.
- Sissons, M. (2008). Role of durum wheat composition on the quality of pasta and bread. *Food*, 2(2), 75-90.
- Slafer, G. A., & Andrade, F. H. (1989). Genetic improvement in bread wheat (*Triticum aestivum*) yield in Argentina. *Field Crops Res.* 21, 289–296. doi: 10.1016/0378-4290(89)90010-5.

- Slafer, G.A., & Andrade, F.H. (1993). Physiological attributes related to the generation of grain yield in bread wheat cultivars released at different eras. *Field Crops Res.* 31, 351-367.
- Slafer, G.A., Satorre, E.H., Andrade, & F.H. (1994). Increases in grain yield in bread wheat from breeding and associated physiological changes. En: Slafer, G.A. (Ed.), *Genetic improvement of field crops*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA, pp. 1-68.
- Slafer, G. A., & Whitechurch, E. M. (2001). Manipulating wheat development to improve adaptation. *Application of physiology in wheat breeding*, 160-170.
- Slafer, G.A; Mirrales, D.J; Savin, R; Whitechurch, E.M. & González, F.G. (2003). Ciclo ontogénico, Dinámica del desarrollo y Generación del rendimiento y La calidad en trigo. En Pascale, A (EDS). *Producción de granos bases funcionales para su manejo*. pp. 99 – 132.
- Sofield, I., Wardlaw, I. F., Evans, L. T., & Zee, S. Y. (1977). Nitrogen, phosphorus and water contents during grain development and maturation in wheat. *Functional Plant Biology*, 4(5), 799-810.
- Sokoto, M. B., & Singh, A. (2013). Yield and yield components of bread wheat as influenced by water stress, sowing date and cultivar in Sokoto, Sudan Savannah, Nigeria. *American Journal of Plant Sciences*, 4(12), 122.
- Somerville, C. (1991). Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science*, 252(5002), 80-87.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T., & Heinz, E. (2003). The evolution of desaturases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 68(2), 73-95.
- Sperling, P., Zähringer, U., & Heinz, E. (1998). A Sphingolipid Desaturase from Higher Plants identification of a new cytochrome b5 fusion protein. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28590-28596.
- Spink, J. H., Semere, T., Sparkes, D. L., Whaley, J. M., Foulkes, M. J., Clare, R. W., & Scott, R. K. (2000). Effect of sowing date on the optimum plant density of winter wheat. *Annals of Applied Biology*, 137(2), 179-188.
- Stapper, M., & Fischer, R. A. (1990). Genotype, sowing date and plant spacing influence on high-yielding irrigated wheat in southern New South Wales. II. Growth, yield and nitrogen use. *Australian Journal of Agricultural Research*, 41(6), 1021-1041.
- Stapper, M., & Harris, H.C. (1989). Assessing the productivity of wheat genotypes in a Mediterranean climate, using a crop simulation model. *Field Crops Research*. 20,129–152.
- Stoddart F.L., & Marshall D.R. (1990). Variability in grain protein in Australian hexaploid wheats. *The Australian Journal of Agricultural Research*, 41: 277-288.

- Stone P.J., & Savin R. (1999). Grain quality and its physiological determinants. En: Miralles et al. 2010 (ed.). *Avances en ecofisiología de cultivos de granos*. Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. pp. 203-210
- Strand, Å., Hurry, V., Henkes, S., Huner, N., Gustafsson, P., Gardeström, P., & Stitt, M. (1999). Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in the Calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiology*, 119(4), 1387-1398.
- Suprayogi, Y., Clarke, J. M., Bueckert, R., Clarke, F. R., & Pozniak, C. J. (2011). Nitrogen remobilization and post-anthesis nitrogen uptake in relation to elevated grain protein concentration in durum wheat. *Canadian Journal of Plant Science* 91: 273 - 282.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., & Kumar, S. (2001). Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Bio Evol*, 30, 2275-2729.
- Tao, F., Zhu, S.-W., Fan, J., & Cheng, B.-j. (2006). Cloning and sequence analysis of maize FAD2 gene. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 32(6), 649-656.
- Tang, G.Q., Novitzky, W.P., Griffin, H.C., Huber, S.C. and Dewey, R.E. (2005) Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *Plant J.* 44, 433–446.
- Tasseva G, De Virville JD, Cantrel C, Moreau F, & Zachowski A. (2004). Changes in the endoplasmic reticulum lipid properties in response to low temperature in *Brassica napus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42, 811–822.
- Tavakkoli, A.R., & Oweis, T.Y. (2004). The role of supplemental irrigation and nitrogen in producing bread wheat in the highlands of Iran. *Agric. Water Manage.* 65, 225–236.
- Thomashow M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Mol. Biol.* 50, 571–599.
- Todorova, R. (2008). Expression and localization of FAD2 desaturase from spinach in tobacco cells. *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(4), 513.
- Torres-Franklin, M. L., Repellin, A., Huynh, V. B., d’Arcy-Lameta, A., Zuily-Fodil, Y., & Pham-Thi, A. T. (2009). Omega-3 fatty acid desaturase (FAD3, FAD7, FAD8) gene expression and linolenic acid content in cowpea leaves submitted to drought and after rehydration. *Environmental and Experimental Botany*, 65(2-3), 162-169.
- Turner, N.C. (2004). Agronomic options for improving rainfall-use efficiency of crops in dryland farming systems. *Journal of Experimental Botany* 55, 2413–2425.
- Upchurch, R.G. (2008). Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnol Letters* 30:967–977. DOI 10.1007/s10529-008-9639-z.
- Vega, S. E., Alfonso, H., Bamberg, J. B., & Palta, J. P. (2004). Evidence for the up-regulation of stearyl-ACP ($\Delta 9$) desaturase gene expression during cold acclimation. *American journal of potato research*, 81(2), 125-135.

- Venegas-Calación, M., Beaudoin, F., Garcés, R., Napier, J. A., & Martínez-Force, E. (2010). The sunflower plastidial ω 3-fatty acid desaturase (HaFAD7) contains the signalling determinants required for targeting to, and retention in, the endoplasmic reticulum membrane in yeast but requires co-expressed ferredoxin for activity. *Phytochemistry*, 71(10), 1050-1058.
- Wallis, J. G., Watts, J. L., & Browse, J. (2002). Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends in Biochemical Sciences*, 27(9), 467-473.
- Wang, R., Zhao, P., Kong, N., Lu, R., Pei, Y., Huang, C., ... & Chen, Q. (2018). Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes*, 9(1), 54.
- Wang, X., Yu, C., Liu, Y., Yang, L., Li, Y., Yao, W., . . . Cai, Y. (2019). GmFAD3A, a ω -3 fatty acid desaturase gene, enhances cold tolerance and seed germination rate under low temperature in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3796.
- Wardlaw, I. F., & Wrigley, C. W. (1994). Heat tolerance in temperate cereals: an overview. *Functional Plant Biology*, 21(6), 695-703.
- Wicker, T., Mayer, K. F., Gundlach, H., Martis, M., Steuernagel, B., Scholz, U., . . . Taudien, S. (2011). Frequent gene movement and pseudogene evolution is common to the large and complex genomes of wheat, barley, and their relatives. *The Plant Cell*, 23(5), 1706-1718.
- Xia, N., Zhang, G., Liu, X. Y., Deng, L., Cai, G. L., Zhang, Y., ... & Kang, Z. S. (2010). Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Molecular biology reports*, 37(8), 3703-3712.
- Xiao, G., Zhang, Z. Q., Wu X. M., Tan, T. L., & Guan, C. Y. (2010). Cloning and characterization of Six FAD2 pseudogenes of *Brassica napus*. *Acta Agronomica Sinica*, 36(3), 435-441.
- Xiao, G., Zhang, Z. Q., Yin, C. F., Liu, R. Y., Wu, X. M., Tan, T. L., et al. (2014). Characterization of the promoter and 5'-UTR intron of oleic acid desaturase (FAD2) gene in *Brassica napus*. *Gene* 545, 45–55. doi: 10.1016/j.gene.2014.05.008
- Yadav, N. S., Wierzbicki, A., Aegerter, M., Caster, C. S., Perez-Grau, L., Kinney, A. J., ... & Allen, S. M. (1993). Cloning of higher plant [omega]-3 fatty acid desaturases. *Plant Physiology*, 103(2), 467-476.
- Yeilaghi, H., Arzani, A., Ghaderian, M., Fotovat, R., Feizi, M., & Pourdard, S. S. (2012). Effect of salinity on seed oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes. *Food Chemistry*, 130(3), 618-625.
- Yu, C.-W., Murphy, T. M., & Lin, C.-H. (2003). Hydrogen peroxide-induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation. *Functional Plant Biology*, 30(9), 955-963.

- Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. (1974). A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Res.* 14: 414-421
- Zhang, F., Huang, L., Wang, W., Zhao, X., Zhu, L., Fu, B., & Li, Z. (2012). Genome-wide gene expression profiling of introgressed indica rice alleles associated with seedling cold tolerance improvement in a japonica rice background. *BMC Genomics*, 13(1), 461.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *Trends in ecology & evolution*, 18(6), 292-298.
- Zhang, J. T., Zhu, J. Q., Zhu, Q., Liu, H., Gao, X. S., & Zhang, H. X. (2009). Fatty acid desaturase-6 (FAD6) is required for salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 469-474.
- Zhang, J., Zuo, T., & Peterson, T. (2013). Generation of tandem direct duplications by reversed-ends transposition of maize Ac elements. *PLoS Genetics*, 9(8), e1003691.
- Zhang, Z., Wei, X., Liu, W., Min, X., Jin, X., Ndayambaza, B., & Wang, Y. (2018). Genome-wide identification and expression analysis of the fatty acid desaturase genes in *Medicago truncatula*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(2), 361-367.
- Zheng, B., Chapman, S. C., Christopher, J. T., Frederiks, T. M., & Chenu, K. (2015). Frost trends and their estimated impact on yield in the Australian wheatbelt. *Journal of Experimental Botany*, 66(12), 3611-3623.
- Zhong, D., Du, H., Wang, Z., & Huang, B. (2011). Genotypic variation in fatty acid composition and unsaturation levels in bermudagrass associated with leaf dehydration tolerance. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(1), 35-40.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA GENERADA DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

Díaz M., Soresi D., Basualdo J., **Cuppari S.**, Carrera A. 2019. Transcriptomic response of durum wheat to cold stress at reproductive stage. *Molecular Biology Reports*. ISSN: 0301-4851. DOI 10.1007/s11033-019-04704-y.

Díaz M., **Cuppari S.**, Soresi D., Carrera A. 2017. In Silico Analysis of Fatty Acid Desaturase Genes and Proteins in Grasses. *Appl Biochem Biotechnol*. ISSN 0273-2289. DOI 10.1007/s12010-017-2556-7.

Presotto A, Hernández F, Díaz M, Fernández-Moroni I, Pandolfo C, Basualdo J, **Cuppari S**, Cantamutto M, Poverene M. 2017. Crop-wild sunflower hybridization can mediate weediness throughout growth-stress tolerance trade-offs. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 249 Pp 12–21. ISSN 0167-8809.

Basualdo J., Díaz M.L., **Cuppari S.**, Cardone S., Soresi D., Pérez Camargo G., Carrera A. 2015. Allelic variation and differential expression of VRN-A1 in durum wheat genotypes varying in vernalization response. *Plant Breeding Online*. ISSN: 1439-0523. ID: PLBR-14-OA-365.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS EN ELABORACIÓN

Cuppari S., Díaz M., Garayalde A., Soresi D., Delucchi F., Carelli A., Carrera A. Characterization of ω -6 desaturase gen and analysis of fatty acids desaturase profiles in response to cold stress of durum wheat.

Cuppari S., Garayalde A., Díaz M., Larsen A., Martínez L., Carrera A. Interaction between genotypes, years and sowing date in *Triticum turgidum* ssp. *durum*.

Cuppari S., Garayalde A., Díaz M., Larsen A., Martínez L., Carrera A. Evaluación del rendimiento en genotipos de trigo candeal con diferentes ciclos de crecimiento en tres fechas de siembra. Boletín técnico EEAI-INTA-Barrow.

TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES CIENTÍFICAS NACIONALES

Cuppari SY. IV Jornada de Intercambio de Producción Científico Tecnológica. Estudio de genes de desaturasas y de perfiles de ácidos grasos en trigo candeal. Centro de Recursos Renovables de la Zona Semiárida CERZOS-CCT (CONICET Bahía Blanca). Exposición oral. 24/08/2018.

Cuppari SY, Soresi DS, Carelli AA, Delucchi F, Carrera AD, Díaz ML. Estudio de genes de desaturasas y de perfiles de ácidos grasos en trigo candeal. III Jornadas Regionales de Genética del Litoral. INTA Rafaela. Santa Fe. 06/2018. Seleccionado para ponencia oral.

Cuppari SY, Díaz ML, Soresi DS, Carrera AD. Uso integrado de herramientas bioinformáticas para el estudio de una familia de proteínas: las desaturasas de gramíneas. XI Simposio Nacional de Biotecnología. Bahía Blanca, Buenos Aires. 09/2017.

Díaz ML, **Cuppari SY**, Soresi DS, Carrera AD. Perfil transcriptómico de la respuesta a frío de *Triticum turgidum* ssp. *durum* en etapa reproductiva. Simposio de genómica funcional de plantas. Rosario, Santa Fé. 05/2017.

Soresi DS, Díaz ML, Zappacosta D, **Cuppari SY**, Carrera AD. Análisis funcional de genes de respuesta a la inoculación con fusarium en espiga de trigo candeal. Simposio de genómica funcional de plantas. Rosario, Santa Fé. 05/2017.

Cuppari SY, Soresi DS, Díaz ML, Basualdo J, Garayalde AF, Carrera AD. Análisis del transcriptoma de trigo candeal para la identificación de genes de respuesta al estrés por frío e infección por Fusarium. VIII Congreso Nacional De Trigo - VI Simposio De Cereales De Siembra Otoño Invernal - II Reunión Del Mercosur. Pergamino, Argentina. 14-16/09/2016.

Cuppari S., Basualdo J., Revale S., Soresi D., Carrera A., Díaz M. Análisis del transcriptoma de trigo candeal para la identificación de genes de respuesta a bajas temperaturas. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Argentina. Período: 13-17/09/2015.

Miguel I., **Cuppari S.**, Basualdo J., Díaz M., Carrera A. Las dehidrasas y su relación con la tolerancia a frío en estadio vegetativo y reproductivo en trigo candeal. XLIV Congreso Argentino de Genética. Mar del Plata, Argentina. 13-17/09/2015.

Díaz M., Basualdo J., **Cuppari S.**, Miguel I. y Carrera A. El gen Dreb-a1 y su relación con la respuesta a bajas temperaturas en líneas de trigo candeal. XLIII Congreso Argentino de Genética. Ciudad de Bariloche, Argentina. 19- 22/10/2014.

TRABAJOS PRESENTADOS EN REUNIONES CIENTÍFICAS INTERNACIONALES

Presotto A., Hernández F., Fernández-Moroni I., Basualdo J., Díaz M., **Cuppari S.**, Cantamutto M. Efecto de la introgresión del girasol cultivado en una población de *H. annuus* silvestre. XVI Congreso Latinoamericano de Genética. Montevideo, Uruguay. 9-12/10/2016.