

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### SELECCIÓN ASISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES Y SU APLICACIÓN EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TRIGO

Olmos, Sofía

Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE.

#### INTRODUCCIÓN

El proceso tradicional de mejoramiento requerido para la liberación de variedades en los trigos insume aproximadamente de 10 a 15 años (Poehlman, 1979). A través de los años, los fitomejoradores han seleccionado las mejores plantas basados en su **fenotipo**. Este es un proceso lento, y por lo tanto costoso, al no disponer de variedades que respondan a las demandas dinámicas de calidad y de resistencia a enfermedades.

Dentro de este contexto, desde hace un tiempo que resulta posible seleccionar al **genotipo** directamente en lugar del fenotipo, mediante la denominada **Selección Asistida por Marcadores** (SAM). La selección asistida por marcadores consiste en identificar una secuencia de **ADN** que está próxima (ó en el mejor de los casos, codifica) al gen (o locus) de interés agronómico y utilizar esta secuencia como herramienta en el proceso de selección, independizándose de la expresión del gen y de su interacción con el ambiente. La proximidad entre el **marcador molecular** y el gen, medida en unidades de mapeo (cM) es una consecuencia del **ligamiento genético** que exista entre los mismos en una **población de mapeo** determinada (esto es, una población de individuos que se encuentra segregando para un gen), y es la base sobre la que se fundamenta el uso de estas herramientas. Así, dependiendo de la proximidad que exista entre el marcador y el gen ambos tenderán a permanecer próximos en mayor o menor medida durante las sucesivas generaciones en el proceso de selección. De esta forma, cuando los fitomejoradores utilicen un germoplasma para el cual dispongan de un marcador ligado al locus de interés, la presencia del marcador en determinados individuos en la población indicaría que el gen responsable del fenotipo en cuestión también está presente en los mismos.

Muchos caracteres de interés agronómicos (como ser, rendimiento, contenido de nitrógeno en granos, resistencia a enfermedades, etc.), son regulados por un sistema complejo de genes localizados en distintos loci de un mismo cromosoma o en diferentes cromosomas del **genoma**, y por lo tanto pueden ser altamente influenciados por factores ambientales. La

identificación de las regiones cromosómicas asociadas a la variación fenotípica de este tipo de caracteres, y la magnitud en que cada una de dichas regiones afecta al fenotipo, puede establecerse utilizando poblaciones de mapeo para las cuales se disponga de **mapas genéticos** o de ligamiento, en el cual se localicen en cada cromosoma los marcadores moleculares que se encuentren formando parte del genoma. Estas poblaciones de mapeo son luego ensayadas agronómicamente en condiciones usualmente de campo a fin de cuantificar la magnitud de la variación fenotípica de un gen. Las regiones cromosómicas que explican parte de la variación observada en un carácter son llamadas QTLs (Quantitative Trait Loci) **Loci de Herencia Cuantitativa**.

A partir de los conceptos presentados hasta aquí es evidente la gran utilidad que la SAM ofrece a los programas de mejoramiento de trigo (selección temprana en el ciclo de cultivo, selección independiente de las interacciones génicas o con el medio ambiente, entre otras). Sin embargo, la aplicación de SAM en forma extensiva dentro de este campo ha estado limitada técnicamente y sólo ha comenzado a considerarse con más atención en los últimos años, luego de haberse construido las estructuras básicas sobre las cuales se sustenta esta actividad. Es decir, desarrollo de mapas genéticos con mayor cobertura del genoma, desarrollo de poblaciones de mapeo y búsqueda de polimorfismos para los marcadores entre los padres de la población, confirmación de asociación entre el carácter de interés y el locus marcado, y la validación del marcador en otras poblaciones (Staub *et al.*, 1996). Una de las principales dificultades para el estudio del genoma del trigo es su gran tamaño y la baja variabilidad genética debida a su sistema de reproducción (autogamia). Esto requiere analizar miles de individuos en una población de mapeo y cientos de marcadores moleculares a fin de obtener mapas genéticos precisos.

#### Estudios genómicos en cereales

Los cereales varían en cuanto a su contenido de ADN, desde aproximadamente 400 Mb en los genomas de arroz y Panicoides, hasta 17.000

Mb en el trigo pan (*Triticum aestivum* L. em Tell). Esta enorme diferencia en contenido de ADN no se debe a la presencia de mayor cantidad de genes en el trigo sino a la abundancia de secuencias de ADN repetitivas, muchas de las cuales son específicas de cada especie. Por este motivo el estudio del genoma del arroz ha sido considerado como un modelo para estudiar a otras especies de cereales. Los estudios pioneros de Kurata *et al.*, 1994; Van Deynze *et al.*, 1995; Gale y Devos, (1998) y los más recientes (Sorrells *et al.*, 2003) mostraron que extensas regiones del genoma de arroz contiene grupos de marcadores moleculares cuya composición y orden se encuentran altamente conservados en muchos cereales por lo que el genoma de estos pueden describirse básicamente como conjuntos de "bloques de ligamiento de genes de arroz". A este proceso, visto también en otros grupos de plantas, se denomina también **colinearidad** o **sintenia**.

La sintenia y su método de estudio mediante el **Mapeo Comparativo**, ha permitido establecer relaciones genómicas entre el arroz cultivado (*Oryza sativa*), arroz silvestre (*Zizania palustris*), *Setaria italica*, *Pennisetum glaucum*, caña de azúcar, sorgo, maíz, trigos, cebada, avena y raygrass (Gale y Devos, 1998). La información disponible sobre el genoma de arroz se aceleró vertiginosamente a partir del secuenciamiento completo del genoma de arroz por el IRGSP, (International Rice Genome Sequencing Project), iniciativa conjunta de una serie de institutos internacionales. Esta información, junto a la que ya se encuentra disponible para el genoma de *Arabidopsis*, está acelerando el estudio y la identificación de genes en los cereales con genomas complejos como el del trigo. Proyectos similares están siendo llevados a cabo en otras especies de plantas para producir el mapeo genético de las mismas (como ser *Avena sativa*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Lyopersicon esculentum*, *Sorghum sp.*, *Triticum aestivum* y *Zea mays*) y mas aún el secuenciamiento completo de sus genomas (en los casos de *Lycopersicon esculentum* y *Medicago truncatula*), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html>)

Por otro lado, se están llevando a cabo numerosos proyectos en distintas especies para producir bibliotecas de secuencias complementarias al ARNm de diferentes tejidos vegetales (cADN), denominados **ESTs** (Expressed Sequence Tags), que permitirán incrementar la producción de marcadores moleculares y facilitar los estudios de identificación de la estructura y función de genes. Se cuentan con bases de datos de ESTs

para las siguientes especies: *Avena sativa*, *Beta vulgaris subsp. Vulgaris*, *G. max*, *Gossypium arboreum*, *G. hirsutum*, *H. vulgare*, *Lotus japonicus*, *L. esculentum*, *L. hirsutum*, *L. pennellii*, *Marchantia polymorpha*, *Medicago sativa*, *M. truncatula*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Pinus taeda*, *Populus tremula x Populus tremuloides*, *Secale cereale*, *Solanum tuberosum*, *S. bicolor*, *S. propinquum*, *T. aestivum*, y *Z. mays*.

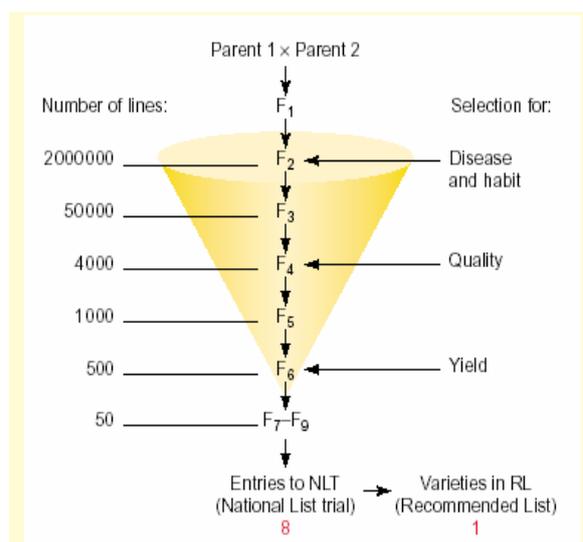
El trigo pan (*Triticum aestivum* L.) es hexaploide ( $2n=6x=42$ ), y tiene tres genomas homeólogos denominados A, B y D, que aportan 7 pares de cromosomas cada uno (AABBDD). Los genes redundantes son una norma, con 'sets' homoealélicos triplicados en la mayoría de ellos. El Proyecto Genómico de Trigo de USA (<http://wheat.pw.usda.gov/NSF/htmlversion.html>) está llevando a cabo el desarrollo y mapeo genético de ESTs de trigo (generados previamente por este proyecto) para descifrar la localización cromosómica de los mismos, y la evolución de los componentes que se expresan en los genomas de los trigos.

#### **Mejoramiento genético en trigo mediante selección asistida por marcadores**

El procedimiento más empleado para el mejoramiento de las plantas autógamas anuales como el trigo es el Método de Selección por Pedigree (también llamada Selección Genealógica), desarrollado a principios del siglo 20. El principio del método consiste en cruzar dos progenitores que fueron previamente seleccionados por sus características agronómicas y que en general se complementan. El procedimiento continua mediante la selección de plantas individuales en la generación segregante  $F_2$  y posteriormente se realiza la selección sobre las líneas derivadas por autofecundación de los individuos  $F_2$  (líneas endocriadas) hasta lograr un cierto nivel de homocigosis y estabilidad dentro de las mismas. En la primera etapa solo es posible seleccionar para caracteres de tipo cualitativos como ser, enanismo, ciertas resistencias a enfermedades, y días a floración, la segunda etapa, es adecuada para seleccionar líneas por caracteres de herencia cuantitativa, esto es, QTLs como es el caso de mayoría de los caracteres de productividad y calidad donde es necesario disponer de suficiente cantidad de réplicas para cuantificar la magnitud de la variación fenotípica.

En un programa de mejoramiento importante con el método de selección por pedigree (Fig. 1), se realizan unos 1000 cruzamientos cada año, para generar un pool de unos 2.000.000 de individuos genéticamente diferentes. De generación en

generación el nivel de fijación de los genes se incrementa en forma asintótica, por lo que en la generación F<sub>6</sub>, cuando usualmente se realizan las evaluaciones de rendimiento, los genotipos presentan un 97% de homocigosis. La aplicación de SAM dentro de un programa de selección por pedregree es adecuada para disminuir la cantidad de plantas seleccionadas en la generación F<sub>2</sub>. Cada generación del trigo representa un año de cultivo. La cantidad de líneas que se seleccionan en cada generación se indican a la izquierda. Los caracteres sometidos a selección se indican a la derecha (F<sub>2</sub>, respuesta a enfermedades y condiciones de crecimiento; F<sub>4</sub>, calidad; F<sub>6</sub>, rendimiento). Las mejores variedades seleccionadas en la F<sub>7</sub>-F<sub>9</sub> son multiplicadas para los ensayos comparativos nacionales.



**Figura 1.** Ejemplo de un programa de selección por pedregree en trigo (Koebner y Summers, 2003).

Asimismo, la aplicación de SAM es conveniente en los programas de mejoramiento por retrocruzas (Koebner y Summers, 2003). La aplicación de SAM en el programa de mejoramiento mediante retrocruzas es especialmente adecuado cuando el gen de interés se hereda en forma recesiva. El retrocruzamiento consiste en cruzar una línea progenitora (donante) conteniendo al gen o genes a seleccionar, con la variedad comercial élite a mejorar (progenitor recurrente). El proceso se lleva a cabo cruzando a los híbridos obtenidos de esta forma con el padre recurrente y seleccionando en cada generación a los heterocigotas para dicho gen en la población segregante (F<sub>2</sub>).

En forma adicional y con el objetivo de mejorar el perfil de resistencia a enfermedades y su durabilidad, también es posible transferir varios genes a la vez para mejorar en forma simultánea el fenotipo deseado. Este proceso es denominado **piramidalización**.

Luego de completar las retrocruzas, los cultivares comerciales que han sido mejorados mediante estos procedimientos, son probados en experimentos de campo y si estos resultados son satisfactorios son seguidamente evaluados por su calidad en pruebas de laboratorio antes de su liberación al mercado.

A pesar de la dificultad para seleccionar caracteres cuantitativos, se han identificado varios QTLs de importancia agronómica que están siendo utilizados en programas de mejoramiento de trigo como por ejemplo el de USA.

Durante el periodo 1996/1998, USA y Canadá fueron los principales exportadores de trigo, cubriendo ambos el 45% de producción y de ventas en el mercado internacional (fuente: Economic Research Service, PS&D View; Foreign Agriculture Service website: <http://www.fas.usda.gov/grain/circular/1999/99-12/graintoc.htm>). Debido al avance de la participación de Canadá en el mercado internacional de trigo pan y fideo, como resultado entre otras cosas de una aplicación intensa de tecnológica, USA ha implementado desde hace un par de años un proyecto nacional de SAM para aumentar la competitividad en la calidad y productividad de sus trigos. Este proyecto está financiado por el organismo Initiative for Future Agriculture and Food Systems (USDA-IFAFS) y el grupo de trabajo está constituido por doce laboratorios de distintas universidades de USA bajo la dirección del Dr. Jorge Dubcovsky, Universidad de California, Davis (<http://maswheat.ucdavis.edu>).

El objetivo de este proyecto es transferir los nuevos desarrollos de la biotecnología y de la genómica de trigo para mejorar la calidad y resistencia a enfermedades de los trigos pan y candeal. Como estos genes son transferidos por métodos normales de recombinación y retrocruzas y evaluados mediante la selección asistida por marcadores, las líneas resultantes no son consideradas transgénicas. Se pretende que esta metodología favorezca la aceptación y conocimiento del público acerca de los beneficios de la biotecnología en el incremento de productividad de los alimentos. Algunas líneas de trabajo que actualmente se están implementado son las que comprenden a genes de resistencia a enfermedades y genes que

afectan a la calidad del grano que se mencionan a continuación.

Para **resistencia a royas** se cuentan con marcadores para los genes de resistencia específica a roya anaranjada (*Puccinia triticina* Erikss.): *Lr21*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr47*, y *Lr50*; roya del tallo (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Eriks. y E. Henn.): *Yr17*, y *Sr38*; y a roya amarilla (*Puccinia striiformis* West. f. sp. *tritici*): *Yr5*, y *Yr15*.

El mejoramiento genético para resistencia a patógenos obligados, como es el caso de las royas, se ha basado en la utilización de genes para resistencia específica. Estos genes generalmente son efectivos a partir del estadio de plántula y confieren reacciones de resistencia en condiciones de planta adulta y solamente a determinadas razas o patotipos. La compleja interacción del patógeno con el hospedante, así como la cantidad de genes de resistencia que acumule la planta resultará en una menor o mayor probabilidad de quiebre de dicha resistencia cuando los cultivares comerciales son sometidos a condiciones de gran cultivo (Antonelli, 2003).

Muchos de estos genes, provienen de los ancestros silvestres del trigo. Por ejemplo, la especie *Aegilops tauschii*, el ancestro que aportó el genoma D al trigo pan, ha sido una fuente importante de resistencia a la roya anaranjada al aportar el gen *Lr21*.

Para el caso de los genes *Lr37-Yr17-Sr38*, un fragmento cromosómico grande (25-38 cM) conteniendo tres genes de resistencia a royas fue translocado entre el brazo corto del cromosoma 2 de *T. ventricosum* y entre el brazo corto del cromosoma 2 del trigo pan (*T. aestivum*) (Bariana y McIntosh, 1993). Este segmento contiene los genes *Lr37-Yr17-Sr38* que confieren resistencia a roya anaranjada, amarilla y roya del tallo, respectivamente. Esta translocación no se recombina con el cromosoma homólogo de trigo por lo cual los tres genes son trasferidos ligados por lo que existen marcadores basados en PCR para esta translocación que permiten asegurar la presencia de los tres genes en forma simultánea (Helguera *et al.*, 2003).

El gen *Lr39* fue transferido desde la accesión TA 1675 de *Ae. tauschii* al cultivar de trigo Wichita y liberado con el nombre de variedad KS86WGRC02 (Gill *et al.*, 1988). El marcador ligado más próximo al *Lr39* en la población de mapeo Wichita x TA 4186 (pedigree = TA 1675/Wichita\*3) es el marcador *Xgwm210*, localizado a 10.7cM proximal al *Lr39*. La efectividad del *Lr39* ha sido alta para razas de roya anaranjada MCDL (razas virulentas sobre los genes *Lr 1,3,10,17,y 26*) pero baja para las

PNMQ (razas virulentas sobre los genes *Lr 1,2c,3,3ka,9,10,18,24, y 30*) (Raupp *et al.*, 2001; Huang y Gill, 2001). El gen *Lr39* también ha sido introducido a partir de una accesión de *Ae. cylindrica*.

Para la transferencia del gen *Lr47* en las variedades comerciales se crearon fuentes de germoplasma con translocaciones intersticiales del cromosoma 7S de *T. speltoides*, especie donante de dicha resistencia (Lukaszewski *et al.*, 2000). El segmento translocado es de 20 a 30 cM, y está localizado en el cromosoma 7A, a una distancia de 2 a 10 cM del centrómero.

El gen *Lr50* proviene de los trigos silvestres *Triticum timopheevii* ssp. *armeniicum* (llamado *T. armeniicum*) (Brown-Guedira *et al.*, 2003). Este gen está ligado al marcador microsatélite *Xgwm382* (6,7 cM) y al *Xgdm87* (9,4 cM) localizados en el brazo largo del cromosoma 2 de trigo. Estos dos microsatélites pueden ser usados para verificar la transferencia del gen *Lr50* en las nuevas variedades comerciales.

El gen *Yr5* fue primeramente encontrado en la especie *T. spelta album*, y está localizado en el brazo largo del cromosoma 2, a una distancia de 21 cM del centrómero (Law, 1976). Yan *et al.*, (2003) encontraron marcadores RGAP (Resistance Gene Analog Polymorphism) completamente ligados al *Yr5*. Estos tipos de marcadores son obtenidos por amplificación de PCR de secuencias homólogas a los dominios conservados de genes codificantes de resistencias a enfermedades (Yu *et al.*, 1996). Debido a que estas clases de marcadores son difíciles de leer y asignar su genotipo correspondiente y que algunas veces no son polimórficos para el progenitor recurrente, Chen *et al.*, (en prensa) convirtió el marcador RGAP en un marcador de PCR de secuencia específica.

El gen *Yr15* fue localizado en el brazo corto del cromosoma 1 de trigo (McIntosh *et al.*, 1996) y fue introducido en los trigos tetraploides y hexaploides. Existen numerosos marcadores basados en RFLP y microsatélites que permiten detectar la presencia del gen *Yr15*, de forma tal que es posible combinarlos a fin de encontrar aquellos que sean polimórficos para los progenitores recurrentes (Peng *et al.*, 2000). El programa del IFAFS en California (USA), emplea a los marcadores RFLP *Xtri* y *Xcdo 1173* para introducir el gen *Yr15* en las variedades comerciales.

La **fusariosis de la espiga** es una enfermedad causada principalmente por *Fusarium graminearum* y ocasionalmente por *F. culmorum* y *F. avenaceum* (Miedaner *et al.*, 2001; Ruckebauer, 2001).

La resistencia a *Fusarium* es heredada en forma cuantitativa y como consecuencia, se observa una variación continua en la resistencia a este hongo (Ruckenbauer *et al.*, 2001). Existen cinco categorías de resistencia a esta enfermedad: (I) Resistencia a la infección inicial, (II) Resistencia al esparcimiento de la infección, (III) Resistencia a la infección del grano, (IV) Tolerancia, y (V) Resistencia a la acumulación de toxinas en el grano. La mayoría de los programas buscan resistencia de la clase II, porque resulta sencillo detectarla en condiciones de invernáculo. Se han identificado varios QTLs de resistencia a esta enfermedad y actualmente se disponen de marcadores microsatélites ligados a la resistencia (Anderson *et al.*, 2001).

Con respecto a los **genes de resistencia a virus**, se cuenta con marcadores moleculares para el gen *Wsm1* que brinda resistencia al Wheat Streak Mosaic Virus (WSMV) (Friebe *et al.*, 1991), el gen *Bdv2* al enanismo amarillo de los cereales (Barley Yellow Dwarf Virus, BYDV) (Banks *et al.*, 1995; Francki *et al.*, 2001), y el gen de resistencia al Wheat Spindle Streak Mosaic Bymovirus, (WSSMV) (Khan *et al.*, 2000).

Para los **genes que afectan la calidad** del trigo, se cuentan con marcadores moleculares para el gen de alta proteína *GPC-6B1*, para los genes *waxy* o glutinosos, y para la textura del grano.

El gen de alta proteína *GPC-6B1* fue introducido desde la variedad silvestre *T. turgidum* ssp. *dicoccoides* al trigo candeal, siendo una fuente valuable para el incremento de proteína del grano (Joppa y Cantrell, 1990; Deckard *et al.*, 1996). Resultados preliminares sugieren que este gen no tiene efectos significativos sobre el rendimiento, la calidad de proteínas, altura de plantas o fecha de espigazón, siendo este probado sobre diferentes fondos genéticos (Deckard *et al.*, 1996, Kovacs *et al.*, 1998). El gen GPC fue también introducido en los trigos hexaploides. Una de las líneas hexaploides obtenidas fue Glupro, que es el progenitor donante en varios programas de retrocruza dentro del proyecto IFAFS. Varios experimentos de mapeo indican que la localización del QTL para el gen GPC transferido tanto en los trigos pan como duro, está en el brazo corto del cromosoma 6BS, entre el locus *Nor-B2* y el centrómero, y flanqueado además por los microsatélites *Xgwm508* y *Xgwm193* (Joppa *et al.*, 1997, Mesfin *et al.*, 1999, Khan *et al.*, 2000). Se disponen de marcadores RFLP, microstélites y marcadores de PCR de secuencia específica estrechamente ligados al gen GPC (Khan *et al.*, 2000; Olmos *et al.*, 2003). En la actualidad, muchos laboratorios del programa IFAFS están usando el marcador de PCR para el locus *Nor-B2* para seleccionar el

alelo *dicoccoides* del gen GPC en los trigos duros (Khan *et al.*, 2000). Sin embargo, las distancias genéticas estimadas en Olmos *et al.*, (2003) para el gen GPC sugieren que la selección empleando solo el marcador *Nor-B2* podría resultar en la pérdida del alelo GPC en el 2,4% de la progenie de cada generación de retrocruzas. Esta estimación sugiere que el locus *Nor-B2* fue localizado a 2,4 cM del locus GPC, por lo tanto la probabilidad de que ocurra un entrecruzamiento entre ambos (y la consiguiente pérdida del locus GPC en cada generación) es del 2,4%.

En este sentido, cuando se lleva a cabo un programa de retrocruzas completo de seis generaciones seguido por selección de las líneas BC<sub>6</sub>F<sub>2</sub> homocigotas, la probabilidad de perder el alelo de alta proteína por recombinación con el marcador *Nor-B2* se incrementa a aproximadamente 14%.

Para eliminar este riesgo algunos laboratorios del IFAFS están empleando los marcadores microsatélites *Xgwm508* y *Xgwm193* (Khan *et al.*, 2000). En este caso, la probabilidad de pérdida del alelo *dicoccoides* para el gen GPC es menor debido a la baja probabilidad que ocurra una recombinación doble en el intervalo de 12-cM que existe entre estos microsatélites. Sin embargo, el empleo de esta estrategia resultaría en la introgresión de un segmento *dicoccoides* relativamente grande en las variedades comerciales. En este sentido, para el programa de mejoramiento existen dos categorías de marcadores, aquellos para el gen GPC mismo y aquellos que permiten reducir el segmento de *dicoccoides* que es transferido por retrocruza. Esto último, permite reducir el riesgo de introducción de genes de esta variedad silvestre que afecten el valor agronómico de las nuevas variedades que se desarrollen.

Los nuevos marcadores identificados en Olmos *et al.*, (2003) pueden ser usados para minimizar la pérdida de cromatina *dicoccoides* durante el programa de retrocruzamientos. Los loci flanqueantes al gen GPC, *Xucw67* y *Xcdo365* (o bien el marcador ligado *Xucw64*) pueden ser usados para seleccionar positivamente la transferencia del segmento *dicoccoides* de 2,7-cM, mientras que el marcador de PCR más externo, *Nor-B2*, y el marcador *Xucw66* pueden ser empleados para seleccionar en contra del alelo *dicoccoide* (es decir por el alelo de la variedad recurrente). La selección de eventos de recombinación entre los marcadores flanqueantes *Xucw67-Xcdo365* y los marcadores más externos pueden ser usados para minimizar la introducción de segmentos de *dicoccoides* no deseables durante el programa de SAM. Una

estrategia alternativa más simplificada sería el uso de marcadores de PCR específicos para el alelo *dicoccoide* en el locus *Nor-B2* seguido de selección en cada generación por el marcador *Xucw67*.

Por otro lado, la glutinosidad del grano en trigo está relacionada directamente por la biosíntesis de amilosa por la enzima GBSS (granule-bound starch synthase) o también llamada proteína waxy. En trigo hay tres genes que codifican para GBSS: *Wx-A1*, *Wx-D1* y *Wx-B1*, con localización cromosómica: 7AS, 7DS y 4AL, respectivamente. Algunos mutantes de trigo pierden uno o más de las proteínas GBSS, entonces son llamados mutantes waxy parciales. En las líneas de trigo con mutaciones en los tres genes codificantes del GBSS, el almidón está compuesto totalmente de amilopectina. El efecto más grande sobre el contenido de amilosa es observado en los mutantes *Wx-B1*, seguido de los mutantes *Wx-D1* y *Wx-A1* (Yamamori y Quynh, 2000).

En oriente, los consumidores de Udon, una clase de noodles producidos con trigo, prefieren los noodles con una superficie firme y suaves por dentro. Estas características están asociadas con altos volúmenes de hinchazón y altos picos de viscosidad de pasta, que son observados en los trigos con contenido reducido de amilosa y la presencia de alelos nulos para GBSS (Graybosch, 1998).

La textura del endosperma, otro factor de calidad, está primeramente controlada por el locus *Ha* (*Hardness*) localizado en el brazo corto del cromosoma 5D. Este es un carácter heredado en forma simple y aunque este locus se refiere a la dureza, la textura suave es de por sí el carácter dominante.

Los granos duros, al ser quebrados durante la molienda, absorben más agua y por esto son más adecuados para procesos fermentativos por levaduras en la producción de pan. En cambio, las harinas de granos suaves son adecuados para fabricar tortas y galletitas.

Las proteínas puroindolinas a (PINA) y b (PINB) que se unen a lípidos, han sido identificadas como responsables en determinar diferencias entre texturas duras y suaves en los trigos (Gautier *et al.*, 1994). Estas proteínas codifican para los genes *Pina-D1* y *Pinb-D1*, estrechamente ligados al locus *Ha* sobre el cromosoma 5DS (Morris, 2002; Turnbull y Arman, 2002). Estos dos genes actúan en forma conjunta en la determinación de la textura del grano. La presencia de los alelos de la puroindolina nativos (*Pina-D1a* y *Pinb-D1a*) determina la suavidad, sea una delección que produce la completa pérdida de la proteína

PINA, o bien mutaciones puntuales que resultan en la modificación de la secuencia de los aminoácidos o la expresión nula de la proteína PINB, fueron relacionados con la presencia de una textura de grano dura en ensayos tanto de trigos europeos como americanos (Giroux y Morris, 1997; Giroux y Morris, 1998; Lillemo y Morris, 2000; Morris *et al.*, 2001). Se ha observado que los genotipos con la delección *Pina-D1* fueron más duros que aquellos con una sola mutación puntual en el *Pinb-D1*, y que los genotipos con delecciones tanto en *Pina-D1* como *Pinb-D1* fueron aún todavía más duros (Giroux *et al.*, 2000, Tranquilli *et al.*, 2002). Por otro lado, la incorporación adicional de copias de *Pina-A<sup>m1</sup>* y *Pinb-A<sup>m1</sup>* de *T. monococcum* en los trigos hexaploides produjo en forma significativa granos más suaves que los del control (Tranquilli *et al.*, 2002). Los test de complementación usando la sobre-expresión del gen *pinB* en plantas transgénicas de trigo con el alelo *pinB-D1b* responsable de la textura suave, demostraron que los genes de puroindolinas son efectivamente responsables de este fenotipo (Beecher *et al.*, 2002). Pequeñas modulaciones de este carácter también pueden lograrse mediante la manipulación de pequeños QTLs sobre el cromosoma 3AS, como los informados por Campbell *et al.*, (1999).

#### **Selección asistida por marcadores en Argentina**

En lo que respecta a Argentina, es el único de los grandes exportadores que vende trigo pan y fideo “mezcla”, es decir, sin una diferenciación por clases que atiendan a distintos usos industriales. Esta mezcla es considerada buena, pero es imposible de sostener ni garantizar debido a oscilaciones regionales y anuales. De esta forma, para Argentina resulta casi imposible agregarle valor a un ‘commodity’ al que vende en el mercado internacional con la peor relación calidad por precio. Desde 1998, el sector oficial ha comenzado a estudiar el tema de calidad de trigo y ha creado un Programa de muestreo varietal de trigo que permita categorizar en 3 grupos de calidad a las variedades de Argentina que actualmente cuenta nuestro país. Esto constituye un paso inicial que posibilitaría responder en el futuro a las demandas de calidad como de producción del mercado nacional e internacional (Informe de la Campaña 2001/2002, Programa de muestreo varietal de trigo, SAGyP).

Dentro de este contexto, desde hace algunos años un par de laboratorios del INTA y el programa de selección asistida del USDA-IFAFS vienen realizando trabajos en conjunto en la SAM en

trigo a fin de desarrollar nuevas tecnologías que permitan mejorar la calidad de las proteínas de variedades adaptadas a condiciones de cultivo en Argentina, tarea que el Instituto de Recursos Biológicos del INTA Castelar realiza sobre numerosas variedades y líneas. Recientemente, tres de los criaderos más importantes de nuestro país -Buck Semillas S.A., Asociación de Cooperativas Argentinas Coop. Ltda. (ACA) y Criadero Klein S.A.- comenzaron a trabajar junto al INTA Castelar en la caracterización de las proteínas de sus líneas élite y en la realización de un programa de selección asistida mediante marcadores moleculares. Otro ejemplo es un reciente convenio de vinculación tecnológica entre el Programa Nacional de Mejoramiento de Trigo del INTA y la empresa Bioceres S.A. para la creación de variedades de trigo pan donde se incluye un módulo de marcadores moleculares para caracterización de germoplasma e introgresión de genes de resistencia a patógenos, tareas llevadas a cabo por EEA Marcos Juárez INTA.

Esta actividades contribuirán al mejoramiento de la calidad de los trigos argentinos, aspecto de fundamental importancia para mejorar su competitividad en los mercados internacionales.

#### Bibliografía

- Anderson, JA, Stack RW, Liu S, Waldron BL, Fjeld AD, Coyne C, Moreno-Sevilla B, Fetch JM, Song QJ, Cregan PB, Frohberg RC. 2001. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs its two wheat populations. In: Theor Appl Genet, 102(8):1164-1168.
- Antonelli EF. 2003. La roya anaranjada (*Puccinia triticina* Erikss.). En: Grafos SRL, Necochea, Argentina (eds), 22 pp.
- Antonelli EF. 2003. La roya negra o del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). En: Grafos SRL, Necochea, Argentina (eds), 42 pp.
- Banks PM, Larkin PJ, Bariana HS, Lagudah ES, Appels R, Waterhouse PM, Brettell RIS, Chen X, Xu HJ, Xin ZY, Qian YT, Zhou XM, Cheng ZM, Zhou GH. 1995. The use of cell culture for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. Genome, 38(2): 395-405.
- Bariana HS, McIntosh RA. 1993. Cytogenetic studies in wheat XIV. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A. Genome, 36: 476-482.
- Beecher B, Bettge A, Smidansky E, Giroux, MJ. 2002. Expression of wild-type pinB sequence in transgenic wheat complements a hard phenotype. Theor Appl Genet, 105: 870-877.
- Brown-Guedira GL, Singh S, Fritz AK. 2003. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* ssp. *armeniicum*. Phytopathology, 93 (7): 784-789.
- Campbell KG, Bergman CJ, Gualberto DG, Anderson JA, Giroux MJ, Hareland G, Fulcher RG, Sorrells ME, Finney PL. 1999. Quantitative Trait Loci Associated with Kernel Traits in a Soft x Hard Wheat Cross. Crop Sci, 39:1184-1195.
- Deckard EL, Joppa LR, Hammond JJ, Hareland GA. 1996. Grain protein determinants of the Langdon durum-dicoccoides chromosome substitution lines. Crop Sci., 36(6):1513-1516.
- Distelfeld A, Uauy C, Olmos S, Schlatter AR, Dubcovsky J, Fahima, T. 2004. Microcolinearity between a 2-cM region encompassing the grain protein content locus *Gpc-6B1* on wheat chromosome 6 and a 350-kb region on rice chromosome 2. Funct Integr Genomics 4:59-66 DOI 10.1007/s10142-003-0097-3
- Francki MG, Ohm HW, Anderson JM. 2001. Novel germplasm providing resistance to barley yellow dwarf virus in wheat. Aust. J. Agric. Res, 52 (11-12):1375-1382
- Friebe B, Mukai Y, Dhaliwal HS, Martin TJ, Gill BS. 1991. Identification of alien chromatin specifying resistance to wheat streak mosaic and greenbug in wheat germ plasm by C-banding and in situ hybridization. Theor Appl Genet, 1991. 81(3):381-389.
- Gale MD, Devos KM. 1998. Plant comparative genetics after 10 years. Science 282, 656-659.
- Gautier MF, Aleman ME, Guirao A, Marion D, Joudrier P. 1994. *Triticum aestivum* puroindolines, two cystine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. Plant Mol Biol, 25: 43-57.
- Gill BS, Raupp WJ, Browder LE, Cox TS. 1988. Registration of KS86WGRC02 Leaf Rust Resistant Hard Red Winter Wheat Germplasm. Crop Sci, 28(1):207.
- Giroux MJ, Morris CF. 1997. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. Theor Appl Genet, 95: 857:864.
- Giroux MJ, Morris CF. 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 6262-6266.
- Giroux MJ, Talbert L, Habernicht DK, Lanning S, Hemphill A, Martin JM. 2000. Association of puroindoline sequence type and grain hardness in hard red spring wheat. Crop Sci, 40: 370-374.
- Graybosch RA. 1998. Waxy wheats: Origin, properties, and prospects. Trends Food Sci Technol, 9(4):135-142

- Helguera M, Khan IA, Kolmer J, Lijavetzky D, Zhong-qi L, Dubcovsky J. 2003. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci*, 43:1839-1847.
- Huang L, Gill BS. 2001. An RGA-like marker detects all known *Lr21* leaf rust resistance gene family members in *Aegilops tauschii* and wheat. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(6-7):1007-1013.
- Informe de la Campaña 2001/2002, Programa de muestreo varietal de trigo, SAGyP: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/>.
- Joppa LR, Cantrell RG. 1990. Chromosomal location of genes for grain protein content of wild tetraploid wheat. *Crop Sci*, 30(5):1059-1064.
- Joppa LR, Du C, Hart GE, Hareland GA. 1997. Mapping gene(s) for grain protein in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) using a population of recombinant inbred chromosome lines. *Crop Sci*, 37(5):1586-1589.
- Khan AA, Bergstrom GC, Nelson JC, Sorrells ME. 2000. Identification of RFLP markers for resistance to wheat spindle streak mosaic bymovirus (WSSMV) disease. *Genome*, 43(3):477-482.
- Khan IA, Procnier JD, Humphreys DG, Tranquilli G, Schlatter AR, Marcucci-Poltri S, Frohberg R, Dubcovsky J. 2000. Development of PCR-based markers for a high grain protein content gene from *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* transferred to bread wheat. *Crop Sci*, 40(2):518-524.
- Koebner R, Summers R. 2003. 21st century wheat breeding: Plot selection or plate detection? *Trends Biotechnol* Vol.21 No.2: 59-63.
- Kovacs MIP, Howes NK, Clarke JM, Leisle D. 1998. Quality characteristics of durum wheat lines deriving high protein from a *Triticum dicoccoides* (6b) substitution. *J Cereal Sci*, 27(1):47-51.
- Kurata N, Nagumara Y, Yamamoto K, Harushima Y, Sue N, Wu J, Antonio BA, Shomura A, Shimizu T, Lin S-Y, Inoue T, Fukuda A, Shimano T, Kuboki Y, Toyama T, Miyamoto Y, Kirihaara T, Hayasaka K, Miyao A, Monna L, Zhong HS, Tamura Y, Wang Z-X, Momma T, Umehara Y, Yano M, Sasaki T, Minobe Y. 1994a. A 300-kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nat Genet* 8 : 365-372.
- Law CN. Genetic control of yellow rust resistance in *T. spelta album*. 1976. Plant Breeding Institute, Cambridge, Annual Report, 108-109.
- Lillemo M, Morris CF. 2000. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theor Appl Genet*, 100:1100-1107.
- Lukaszewski AJ, Porter DR, Antonelli EF, Dubcovsky J. 2000. Registration of two germplasms of common wheat with interstitial translocations of *Triticum speltoides* carrying leaf rust and greenbug resistance genes. *Crop Sci* 40:590.
- McIntosh RA, Silk J, The TT. 1996. Cytogenetic studies in wheat XVII. Monosomic analysis and linkage relationships of gene *Yr15* for resistance to stripe rust. *Euphytica*, 89(3):395-399.
- Mesfin A, Frohberg RC, Anderson JA. 1999. RFLP markers associated with high grain protein from *Triticum turgidum* L. var. *dicoccoides* introgressed into hard red spring wheat. *Crop Sci*, 1999. 39(2):508-513.
- Miedaner T, Schilling AG, Geiger HH. 2001. Molecular genetic diversity and variation for aggressiveness in populations of *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum* sampled from wheat fields in different countries. *J Phytopathol*, 149(11-12):641-648.
- Morris CF. 2002. Puroindolines: the molecular basis of wheat grain hardness. *Plant Mol Biol*, 48: 633-647.
- Morris CF, Lillemo M, Simeone MC, Giroux MJ, Babb SL, Kidwell KK. 2001. Prevalence of puroindolines grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Sci*, 41: 218-228.
- Olmos S, Distelfeld A, Chicaiza O, Schlatter AR, Fahima T, Echenique V, Dubcovsky J. 2003. Precise mapping of a locus affecting grain protein content in durum wheat. *Theor Appl Genet*. 107(7):1243-51.
- Peng JH, Fahima T, Roeder MS, Huang QY, Dahan A, Li YC, Grama A, Nevo E. 2000. High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance genes *YrH52* and *Yr15* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*. *Genetica*, 109(3): 199-210.
- Poehlman JM. 1979. Mejoramiento genético de las cosechas. Ed. Limusa, México: 75-85.
- Raupp WJ, Sukhwinder-Singh Brown-Guedira GL, Gill BS. 2001. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theor Appl Genet*, 102(2-3):347-352.
- Staub JE, Serquen F, Gupta M. 1996. Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortSci* 31: 729 - 741.
- Ruckenbauer P, Buerstmayr H, Lemmens M. 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica*, 119(1-2):121-127.
- Sorrell ME, La Rota M, Bermudez-Kandianis CE, Greene RA, Kantety R, Munkvold JD, Miftahudin X, Mahmoud A, Ma X, Gustafson PJ, Qi LL, Echalié B, Gill BS, Matthews DE, Lazo GR, Chao S, Anderson OD, Edwards H,

- Linkiewicz AM, Dubcovsky J, Akhunov ED, Dvorak J, Zhang D, Nguyen T, Peng J, Lapitan N, Gonzalez-Hernandez JL, Anderson J, Hossain K, Kalavacharla V, Kianian S, Choi D-W, Close TJ, Dilbirligi M, Gill K, Steber C, Walker-Simmons M, McGuire P, Qualset CO, 2003. Comparative DNA Sequence Analysis of Wheat and Rice Genomes. *Genome Res* 13:1818–1827.
- Tranquilli G, Heaton J, Chicaiza O, Dubcovsky J. 2002. Substitutions and deletions of genes related to grain hardness in wheat and their effect on grain texture. *Crop Sci*, 42: 1812-1817.
- Turnbull KM, Rahman S. 2002. Endosperm texture in wheat. *Journal of Cereal Sci*, 36: 327-337.
- Van Deynze AE, Nelson JC, Yglesias ES, Harrington SE, Braga DP, McCouch SR, Sorrells ME. 1995c. Comparative mapping in grasses. Wheat relationships. *Mol Gen Genet* 248: 744–754.
- Yamamori M, Quynh NT. 2000. Differential effects of Wx-A1,-B1 and-D1 protein deficiencies on apparent amylose content and starch pasting properties in common wheat. *Theor Appl Genet*, 2000, 100:32-38.
- Yan GP, Chen XM, Line RF, Wellings CR. 2003. Resistance gene analog polymorphism markers co-segregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust have homology with plant disease resistance genes. *Theor Appl Genet*, 2003, 106:636-643.
- Yu YG, Buss GR, Maroof MA. 1996. Isolation of a superfamily of candidate disease resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93:11751-11756.