

# INVESTIGACIONES

## SECUENCIAS DE MICROSATÉLITES ASOCIADAS A GENES DE PROTEÍNAS DE RESERVA EN VARIEDADES CHILENAS DE TRIGO HARINERO: DESCRIPCIÓN Y POSIBLE USO COMO MARCADORES DE CALIDAD PANADERA<sup>1</sup>

**Microsatellites associated to gluten protein genes of Chilean wheat varieties: Description and potential use as bread quality markers**

**Mireya Zerené Z.<sup>2</sup>, Denise Granger S.<sup>2</sup>, Doris Prehn R.<sup>3</sup> y Patricio Hinrichsen R.<sup>2</sup>**

### ABSTRACT

Thirty-nine Chilean wheat genotypes were characterized by analyzing the microsatellite alleles linked to a low molecular weight glutenin (LMWG) gene and a  $\gamma$ -gliadin pseudogene. Eight alleles for LMWG and nine for  $\gamma$ -gliadin *loci* were detected, including one null allele. Considering both allele groups, a considerable proportion of the analyzed varieties (44%) showed unique allelic combinations, suggesting this as an attractive fingerprinting method for genetic identification purposes.

A portion of the genotypes characterized by SSR's was analyzed using standard bread quality tests. These results were correlated with the alleles of determined SSR patterns, using a methodology designed to compare qualitative and quantitative variables. Statistically significant associations were found between LMWG and sedimentation (0.51\*\*), gluten-index (0.42\*\*) and dry gluten (0.35\*\*) tests. In the case of  $\gamma$ -gliadin alleles, statistically significant correlations were detected with all the bread quality tests conducted (0.54\*\* for protein percentage, 0.47\*\* for sedimentation, 0.52\*\* for gluten-index and 0.49\*\* for dry gluten).

As well, a statistically significant association (0.48\*\*) was found between LMWG and the english index for bread quality, which is based on high molecular weight glutenin (HMWG) patterns. On the other hand, there was no association among LMWG and the french index, nor between  $\gamma$ -gliadin and the French and English indexes.

**Key words:** *Triticum aestivum* L., DNA, fingerprinting, bread-making quality, gliadin, glutenin.

### INTRODUCCIÓN

<sup>1</sup>Recepción de originales: 29 de diciembre de 1999.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

E-mail: phinrich@platina.inia.cl

<sup>3</sup>P. Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago, Chile.

En la producción de variedades de trigo se consideran tanto aspectos de interés agronómico (rendimiento, resistencia a estrés biótico o abiótico, etc.) como el comportamiento que tendrá una variedad desde un punto de vista industrial, para lograr la aceptación del agricultor y del consumidor.

Algunas de las pruebas tradicionales que se realizan para evaluar la calidad panadera del trigo de pan son: contenido de proteína total del grano, la calidad y cantidad de las proteínas que conforman el gluten (sedimentación), farinograma (fuerza de la masa) y elaboración de pan (volumen, color y textura). El gluten, que constituye las proteínas de reserva del grano y se ubica fundamentalmente en el endospermo, está compuesto por dos grupos principales de proteínas: las gliadinas (prolaminas) y las gluteninas (de la familia de las glutelinas) (Hoseney, 1991).

Las gliadinas son un grupo amplio de proteínas, con propiedades similares pero muy heterogéneas en tamaño y punto isoeléctrico. Su peso molecular medio es de unos 40 kDa, son de cadena simple y extremadamente adhesivas cuando están hidratadas. Tienen poca o nula resistencia a la extensión y parecen ser las responsables de la cohesividad de la masa (Hoseney, 1991). El análisis de las gliadinas separadas en un gel de electroforesis de dos dimensiones sugiere que cada variedad contiene aproximadamente 45 polipéptidos diferentes. Algunos de éstos parecen ser compartidos por muchas variedades, mientras otros parecen ser únicos para determinadas variedades (Payne, 1987; Hinrichsen *et al.*, 1997).

Las gluteninas son moléculas grandes que forman polímeros heterogéneos constituidos por varias subunidades, las que están unidas por puentes disulfuro. Las gluteninas se separan en dos grupos distintos; las subunidades de bajo peso molecular (LMWG, low molecular weight glutenins) y las de alto peso molecular (HMWG). El peso molecular de estas últimas oscila entre 100 kDa y varios millones, con un promedio de 3 millones de Da. Físicamente, la proteína es elástica pero no cohesiva, lo que confiere a la masa su propiedad de extensibilidad (Payne, 1987; Hoseney, 1991).

Existen tres *loci*, situados en los brazos largos de los cromosomas 1A, 1B y 1D, que son respon-

sables de la síntesis de las HMWG; estos *loci* se denominan *Glu-A1*, *Glu-B1* y *Glu-D1*, respectivamente. En los mismos cromosomas, pero en los brazos cortos, se encuentran los *loci* *Gli-A1*, *Gli-B1* y *Gli-D1* que codifican para  $\omega$ -gliadinas,  $\gamma$ -gliadinas y para las subunidades de LMWG. Los *loci* *Gli-A2*, *Gli-B2* y *Gli-D2*, localizados en los brazos cortos de los cromosomas 6A, 6B y 6D, respectivamente, codifican para  $\alpha$ -gliadinas y  $\beta$ -gliadinas (Flavell *et al.*, 1988). Otros autores señalan que algunas de las subunidades mayores de LMWG serían codificadas por los *loci* *Glu-A3*, *Glu-B3* y *Glu-D3*, los que estarían estrechamente ligados a los *loci* *Gli-1* que codifican para los genes de gliadinas (Singh y Shepherd, 1988).

A través de hibridaciones tipo Southern se ha podido estimar que los genes para LMWG están presentes en 10 a 15 copias por genoma haploide ( $n = 3X = 21 \text{ ABD}$ ), lo que significa 3 a 5 genes por *locus* *Gli-1*. Un resultado similar se observó para los genes de  $\gamma$ -gliadinas (Payne, 1987).

Se ha demostrado que existe una asociación entre los tipos de alelos de HMWG y la calidad panadera (Payne, 1987). También se ha postulado que las LMWG y las gliadinas tendrían un rol en este sentido. El análisis de estos marcadores proteicos se ve dificultado porque no existen métodos eficientes para su extracción desde el gluten de la semilla, en cambio las HMWG son fácilmente identificables mediante SDS-PAGE; con el uso de marcadores moleculares se podría estudiar directamente los genes que codifican para cada una de estas proteínas (Gupta y Shepherd, 1990; Khelifi y Branlard, 1992).

Se define como marcador molecular a toda variabilidad de naturaleza genómica que puede o no estar asociada con la variabilidad de algún parámetro fenotípico (Campos, 1995). Esta variabilidad se traduce en diferencias o polimorfismos a nivel de la secuencia de ADN (un *locus*), que es la herramienta que permite comparar dos o más genotipos.

Para su aplicación en mejoramiento genético, un marcador molecular debe reunir dos cualidades básicas: permitir la inequívoca diferenciación de los progenitores y ser transmitido en forma estable a la progenie (Paterson *et al.*, 1991). Además, debe generar abundante información, dentro de un lapso de tiempo prudente y a un nivel de costos razonable.

Se han desarrollado numerosos marcadores moleculares genotípicos, aunque algunos de ellos, como las isozimas y las proteínas de reserva son, en estricto rigor, de naturaleza fenotípica (Gepts, 1994; Staub *et al.*, 1996). Uno de los más interesantes corresponde a las secuencias hipervariables. La base molecular de estos marcadores se encuentra en la variación del número de veces que se repite una unidad básica (secuencia repetida), y en menor grado a la variabilidad intrasecuencial de esta unidad (Weising *et al.*, 1991). Los más conocidos son los microsatélites (SSRs o STMS), los cuales constan de 10 a 60 arreglos de 1 a 6 bases de extensión, repetidas en forma alterna o desordenada (Lagercrantz *et al.*, 1993). Los distintos alelos que presenta un SSR se pueden detectar mediante una reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction), usando como partidores de la amplificación a secuencias conservadas que flanquean la región variable (Morgante y Olivieri, 1993).

El trigo hexaploide (*Triticum aestivum* L.) se caracteriza por los bajos niveles de polimorfismo intraespecífico detectados por marcadores moleculares como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Devos y Gale, 1992). Los marcadores basados en RFLP generalmente presentan un limitado número de alelos. Los marcadores de RAPD, aunque entregan más información, generalmente son de carácter dominante, no permitiendo detectar genotipos heterocigotos. Los marcadores basados en secuencias de microsatélites, además de ser codominantes pueden mostrar un gran número de variaciones alélicas, siendo por esto más informativos (He *et al.*, 1992; Dweikat *et al.*, 1993;

Lee *et al.*, 1995). Su principal inconveniente estriba en la dificultad técnica derivada de su identificación y caracterización, ya que implica la preparación de genotecas y la secuenciación de los clones seleccionados, proceso poco eficiente.

Röder *et al.* (1995) estimaron la abundancia y variabilidad de microsatélites dinucleótidos en cultivares hexaploides de trigo. El genoma de trigo contendría en promedio un bloque de (GT)<sub>n</sub> cada 704 kb (kilobares) y un bloque (GA)<sub>n</sub> cada 440 kb. El promedio de distancia entre cualquiera de los dos bloques de dinucleótidos es aproximadamente de 271 kb. El trigo, con  $16 \times 10^6$  kb por genoma haploide, tendría entonces un número aproximado de *loci* (GA)<sub>n</sub> de  $3,6 \times 10^4$  y de  $2,3 \times 10^4$  para (GT)<sub>n</sub> (Röder *et al.*, 1995). Estudios realizados por Plaschke *et al.* (1995) sugieren que es posible estimar diversidad genética e identificar cultivares elite de trigo hexaploide utilizando sólo una pequeña fracción de estos numerosos microsatélites.

Devos *et al.* (1995), en lugar de aislar fragmentos de ADN conteniendo secuencias de microsatélites y caracterizar por secuenciación sus regiones adyacentes, realizaron la búsqueda de microsatélites en bases de datos que acopian todos los genes conocidos. De esta manera identificaron dos microsatélites que formaban parte de las secuencias de genes de proteínas de la semilla del trigo: uno asociado a un pseudogen de  $\gamma$ -gliadina y otro a un gen de LMWG. Los partidores utilizados por ellos fueron genoma específico para ambos genes, 1A para el gen de LMWG y 1B para el gen de  $\gamma$ -gliadina.

El objetivo general de este trabajo fue caracterizar 39 genotipos chilenos de trigo harinero con estos dos marcadores de microsatélites, para posteriormente analizar si existe correlación entre los alelos de microsatélites detectados y los índices de calidad panadera, obtenidos mediante pruebas farinológicas tradicionales, como porcentaje de proteína del grano, prueba de sedimentación, gluten index y gluten seco,

así como también con los índices inglés y francés de calidad panadera basados en los perfiles de HMWG (Hewstone e Hinrichsen, 1994).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material experimental

Se seleccionaron 39 genotipos, incluyendo 25 variedades y 14 líneas avanzadas de trigo harinero, desarrolladas en el Proyecto Trigo del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) (Cuadro 1). La selección de este material se basó en dos criterios:

- 1) Genotipos de buena, regular y mala calidad panadera, según los resultados de algunas pruebas tradicionales (contenido de proteínas, sedimentación, farinograma y características del pan), realizadas en el Laboratorio de Farinología del INIA, Centro Regional de Investigación La Platina.
- 2) Genotipos de buena, regular y mala calidad panadera, según los patrones de alelos de HMWG (Hewstone e Hinrichsen, 1994). En ese trabajo se analizaron 67 variedades chilenas de trigo harinero, y se calculó la calidad panadera que tendría cada variedad de acuerdo a los índices descritos por Payne *et al.* (1987) y Branlard *et al.* (1990), denominados índices de calidad inglés y francés, respectivamente. Estos índices asignan un determinado valor de calidad a cada subunidad de glutenina.

Las variedades y líneas seleccionadas fueron sembradas en maceteros, bajo condiciones de invernadero. Se sembró el juego completo de semillas aproximadamente cada 21 días, de manera de disponer continuamente de tejido joven, en activa regeneración, apropiado para la extracción de ADN.

### Purificación de ADN

En trabajos preliminares se evaluaron distintos métodos para purificar ADN. El protocolo des-

crito por Saghai-Marroof *et al.* (1984) permitió obtener un ADN de calidad apropiada. Brevemente, éste consistió en moler 1,5 g de hojas en N<sub>2</sub> y disolver el polvo obtenido en 15 mL de buffer de extracción (Tris 50mM (pH 8,0), NaCl 0,7 M, EDTA 10 mM, CTAB 1% y β-mercaptoetanol 0,1%). Luego se incubó a 60°C entre 30 y 60 min, se extrajo con 1 volumen de cloroformo:octanol (24:1), se centrifugó a 6.000 rpm por 10 min y la fase acuosa se precipitó con 2/3 vol isopropanol. El pellet colectado se secó y resuspendió en 300 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) conteniendo 1 µL de ARNasa (10 mg/mL).

El estado de integridad de ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X (Tris base 89 mM, borato 89 mM, EDTA 2,5 mM pH 7,3), mientras que su concentración y pureza se determinaron usando un espectrofotómetro Shimadzu UV160 A (λ 260/λ 280). El ADN obtenido se conservó a -20°C. Para las reacciones de amplificación, se preparó una dilución de 20 ng/µL, conservada a 4°C.

### Partidores

Los partidores de microsatélites usados fueron descritos por Devos *et al.* (1995), y son los siguientes:

#### locus de γ-gliadina:

F1: 5'- GCA GAC CTG TGT CAT TGG TC -3'  
(20-mer)

R1: 5'- GAT ATA GTG GCA GCA GGA TAC  
G -3' (22-mer)

#### locus de glutenina de bajo peso molecular (LMWG):

P1: 5'- TCC CGC CAT GAG TCA ATC -3'  
(21-mer)

P2: 5'- TTG GGA GAC ACA TTG GCC -3'  
(21-mer)

### Amplificación por PCR

La reacción de PCR fue llevada a cabo en un termociclador Perkin-Elmer, con 20 ng de ADN

templado en 50 µL de reacción. La concentración final de los otros reactivos fue la siguiente: Tris HCl 10 mM (pH 9,0), Triton X-100 0,1%, KCl 50 mM, dNTPs 0,2 mM, 200 nM de cada partidor, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM y 1 U de Taq ADN polimerasa.

Después de una denaturación inicial a 94°C por 5 min, las muestras fueron amplificadas de acuerdo al siguiente perfil térmico: 30 ciclos de un minuto a 94°C (denaturación), un minuto de unión de partidores a 55°C (partidores F1/R1) o 60°C (partidores P1/P2), y 2 min de extensión a 72°C.

### Separación electroforética de los productos de PCR

Los productos de amplificación de cada reacción se separaron mediante electroforesis vertical en un gel de poliacrilamida (PAA) al 5% (acrilamida:bisacrilamida 29:1) de 40 cm de largo por 0,4 mm de espesor. Cada pocillo se cargó con 20 µL de producto de PCR más 5 µL de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25% y 30% de glicerol). La electroforesis fue corrida a 250 volts por 10 horas. Se utilizó como estándar de peso molecular "100-bp DNA ladder", de Gibco-BRL.

La tinción de las bandas de ADN se realizó con plata, siguiendo el protocolo de Bowers *et al.* (1996). Posteriormente, el gel se secó extendido entre dos trozos de papel celofán, lo que permitió su conservación por tiempo prolongado.

### Pruebas tradicionales de calidad panadera

Las pruebas de calidad panadera se realizaron en 27 de los 39 genotipos estudiados, analizándose solamente el material que fue sembrado durante 1996 en el Centro Regional de Investigación La Platina, para evitar variabilidad debida a efectos ambientales (nutricionales, climatológicos, presencia de patógenos, etc.). Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

1. Determinación del porcentaje de proteína del grano: mediante el método de Bremner (1965), se calculó el porcentaje de nitrógeno del grano. Este valor multiplicado por 5,7 permitió conocer el porcentaje de proteína en el grano.
2. Prueba de sedimentación: SDS en 0,5 g de harina (Zeleny, 1947; Granger *et al.*, 1989).
3. Gluten index y gluten seco: estas pruebas se basan en la metodología señalada por la American Association of Cereal Chemists (AACC, 1988). El gluten separado de la harina de trigo se centrifugó sobre un tamiz especialmente construido. Dicho tamiz permite recuperar tanto el gluten que atraviesa como el que permanece en el tamiz. El peso total del gluten se define como cantidad de gluten húmedo. El porcentaje de gluten húmedo que permanece sin atravesar el tamiz después del centrifugado se define como gluten-index. Si el gluten es muy flojo, todo el gluten puede atravesar el tamiz, teniendo entonces el gluten index el valor 0. Cuando nada de gluten atraviesa el tamiz, el index es 100.

El gluten seco corresponde al gluten total, el cual es secado en un equipo Gluctork 2020 a 150° C durante 4 min. Se obtiene generalmente mejor correlación gluten seco-proteína que gluten húmedo-proteína (D. Granger, comunicación personal).

### Análisis estadístico

Para analizar las asociaciones existentes entre los alelos encontrados para gluteninas de bajo peso molecular y  $\gamma$ -gliadinas (variables cualitativas), con los parámetros de calidad panadera tradicional y los índices de calidad francés e inglés (variables cuantitativas), se utilizó la siguiente fórmula de correlación ( $E^2$ ):

$$E^2 = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y})^2}$$

Se hizo un ordenamiento de los datos de acuerdo a los alelos obtenidos para cada tipo de proteína analizada, los que se denominan arreglos y donde  $\bar{Y}_i$  es el promedio del  $i^{\text{ésimo}}$  grupo consistente en  $n_i$  observaciones (número de observaciones de cada arreglo) e  $\bar{Y}$  es el promedio de todas las observaciones. La tasa de correlación  $E^2$  se compone de un numerador formado por la sumatoria de las diferencias entre el promedio de la variable cuantitativa para una determinada variable cualitativa (alelo) y el promedio general de la variable cuantitativa, multiplicada por el número de individuos que tienen ese determinado alelo. El denominador se obtiene sumando las diferencias entre cada valor individual y el promedio general de la variable cuantitativa que se está analizando. Esta fórmula permite correlacionar variables cualitativas con variables cuantitativas (Ostle, 1963).

Para determinar la significación estadística de las correlaciones obtenidas, se utilizaron las tablas de Woo (1929), recomendada por Ostle (1963). Estos cálculos se realizaron considerando un  $n = 51$ , que es el menor valor que aparece en dichas tablas. Se comparó el valor  $\lambda$  calculado con el valor  $\lambda$  dado de tabla.

$\gamma \text{ calculado} = \frac{E^2 - \bar{n}^2}{\sigma \bar{n}^2}$
---

( $\bar{n}^2$  y  $\sigma \bar{n}^2$ : valores dados por la tabla de Woo (1929)).

El valor crítico de  $\lambda$  con una probabilidad de un 0,009 fue de 2,92.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de alelos de los *loci* de LMWG y de $\gamma$ -gliadina

Está ampliamente documentado el alto nivel de reproducibilidad de los resultados obtenidos con marcadores de tipo microsatélites (SSR). En este trabajo se han usado dos de estos marcadores, descritos originalmente por Devos *et al.* (1995), los cuales están asociados a dos genes de proteínas de la semilla de trigo: un gen de glutenina de bajo peso molecular (LMWG) y un pseudo-gen de  $\gamma$ -gliadina. Los resultados obtenidos mostraron una alta consistencia y reproducibilidad, ya que cada genotipo analizado ( $n = 39$ ; ver Cuadro 1) en tres a cinco repeticiones, con ADN preparado desde varias plantas individuales, entregó el mismo patrón de bandas de ADN amplificadas. Esto es interesante, ya que en trabajos anteriores se había encontrado que algunas muestras de semillas, de una misma variedad usualmente de las más antiguas y obtenidas de distintas fuentes (programa de fitomejoramiento genético, programa de producción de semillas) contenían grados variables de mezclas de genotipos (Hinrichsen *et al.*, 1997). Estas "mezclas" de semillas con diferentes patrones fueron descritas en base a los perfiles electroforéticos de proteínas del gluten, identificándose entre 15 y 25 bandas de gliadinas, las que representan un número similar de *loci* genéticos. En el caso de los SSR, en cambio, sólo se analiza un *locus* por reacción, por lo que sería más difícil detectar estas mezclas que podrían pasar inadvertidas. En otras palabras, para poder hacer un estudio comparativo deberían analizarse al menos unos 15 a 20 diferentes tipos de SSR, lo que técnicamente es posible dado que actualmente existen disponibles en la literatura sobre 200 de estos marcadores específicos de trigo, de los cuales 72 están ubicados en los mismos cromosomas que los genes de interés para calidad panadera (Plaschke *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Korzun *et al.*, 1997; Röder *et al.*, 1998).

**Cuadro 1. Genotipos de trigo harinero primaveral analizados con microsatélites asociados a un gen de LMWG y a un pseudogen de  $\gamma$ -gliadina, sus alelos respectivos encontrados e índices de calidad panadera determinada en este trabajo o previamente**

**Table 1. Wheat genotypes analyzed by microsatellites linked to an LMWG gene and a  $\gamma$ -gliadin pseudo-gene, their respective alleles and bread-making quality index, as determined in this or previous reports**

Variedad o Línea		Alelo de LMWG	Alelo de $\gamma$ -gliadina	Calidad panadera <sup>1</sup>
Nº	Nombre y genealogía			
1	MAD"S"/PSN"S"/PVN/VEE5/3/PJB81 CM-99670-3P-1P-3P-0P(Pla5592)	4	7*	B-1
2	MRL"S"/BUC"S" CM-61949-3M-4Y-1M-1Y-3M-0Y	4	6*	B-1
3	HUAÑIL INIA	4	5*	B-1
4	K-134(60)/4/TOB/BMAN//BB/CAL/5/VEE"S" CM-94978-3P-5P-2P	2	7*	B-1
5	CNO79*2/HE1 CM-90313-A-4B-4Y-2B-0Y	1	7*	B-1
6	V-79438//BUC"S"/PVN"S" CM-99344-1P-2P-2P-0P (Pla 5292)	5	7*	B-1
7	BOW"S"/BUC"S" CM-74005-8M-1Y-03M-5Y-2B-0Y	6	8*	B-1
8	MILLALEU INIA	1	8*	R-1; R-2
9	CATBIRD	1	8*	B-1
10	BOW"S"/BUC"S" CM-74005-8M-1Y-03M-6Y-1B-0Y-1B-0Y	6	8*	ND
11	ALD"S"/BOW"S"/82.P.C.HARI.61 A-23900-5P-2P-3P	2	6*	ND
12	LILEN INIA	1	8*	B-1; B-2
13	BR12*3/3/BR14//LD*6/FB6628 F30069-A-903Y-901D-0Y	4	7*	ND
14	BUC/FLK//MYNA/VUL CM-91575-7Y-0M-0Y-1M-0Y	1	7*	ND
15	MAYA/NAC CM-39424-1M-1M-4Y-1M-2Y-1M-0Y	2	6*	ND
16	OPATA/KILL CM-97029-34Y-0B-0Y	2	5*	ND
17	CAR853/COC//VEE"S"/3/THB"S"/4/MRL"S"/BUC"S" CM-106639-2P-2P-1P	1	8*	ND
18	HUAYUN INIA	1	8*	B-1
19	REIHUE INIA	1	8*	B-1; R-2

## Continuación Cuadro 1.

Variedad o Línea		Alelo de LMWG	Alelo de $\gamma$ -gliadina	Calidad panadera <sup>1</sup>
Nº	Nombre y genealogía			
20	CMH75A.66/2*CNO79//URES CM-101240-1P-1P-1P-0P. (Pla 2393)	1	0	ND
21	LANCERO INIA	4	2*	M-2
22	KONA INIA	6	1*	B-2
23	ANTILHUE INIA	6	4*	B-2
24	DALCAHUE INIA	1	7*	B-2
25	CANDELA INIA	5	2*	B-2
26	CHASQUI INIA	1	3*	B-2
27	TRISA INIA	4	6*	B-2
28	YAFEN INIA	5	3*	B-2
29	OROFEN	1	3*	M-2
30	LINCOYAN	4	4*	M-2
31	CHACAY INIA	3	1*	M-2
32	CANELO INIA	1	3*	M-2
33	LIBUN INIA ESPIGA BLANCA	8	3*	M-2
34	CISNE INIA	3	0	B-2
35	ONDA INIA	4	6*	B-2
36	ANCOA	5	1*	M-2
37	CHIFEN	1	2*	M-2
38	TUKAN	7	3*	M-2
39	NAOFEN	4	6*	M-2

<sup>1</sup>B-1, buena calidad panadera; R-1, regular calidad panadera, de acuerdo a pruebas realizadas por el Laboratorio de Farinología del Centro Regional de Investigación La Platina, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. B-2, buena calidad panadera; R-2, regular calidad panadera; y M-2, mala calidad panadera, de acuerdo a los índices de calidad panadera francés e inglés, determinados por Hewstone e Hinrichsen (1994).

Una ventaja importante de los SSR *versus* las proteínas de reserva de las semillas, es que en estas últimas no es posible descartar posibles interacciones genotipo-ambiente, las que podrían alterar el resultado de la electroforesis de gliadinas.

Se identificó un total de ocho alelos para el SSR asociado al gen de LMWG. Sus tamaños fueron de entre 130 y 160 bp, aproximadamente. Estos

alelos fueron designados con los números 1 al 8 y se representan esquemáticamente en la Figura 1. La mitad de estos alelos (1, 2, 5 y 8) presentaron una banda doble; aunque estos resultados no se esperarían, dado que (i) se trata de materiales con un alto grado de homocigosis, y (ii) las condiciones de la reacción de PCR estaban ajustadas para que se amplificara un único *locus* con cada par de partidores. Resultados similares obtuvo Devos *et al.*, 1995.



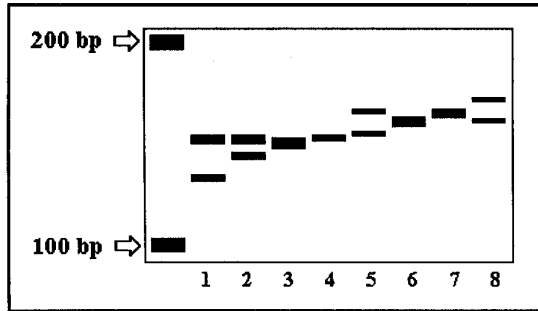


Figura 1. Representación esquemática de la combinación de alelos asociados a un gen de LMWG, encontrados en 39 genotipos de trigos harineros primaverales.

Figure 1. Schematic representation of the allele combinations found for the LMWG gene in the 39 different genotypes of bread wheat.

Por otra parte, se identificaron nueve alelos de microsatélites asociados al pseudo-gen de  $\gamma$ -gliadina, con tamaños aproximados de entre 200 bp y 270 bp y que fueron designados como 1\* al 8\*, más un alelo nulo (ausencia de banda, denominado 0). El alelo nulo se evidenció consistentemente en los genotipos 20 y 34, por lo que es poco probable que se trate de una falla en la amplificación del ADN. Devos *et al.*, (1995) asociaron la falta de amplificación con translocaciones tipo 1BL/1RS. Estas translocaciones donde se utiliza el brazo corto del cromosoma 1R de centeno (*Secale cereale*), fueron utilizadas en las dos décadas pasadas, como fuente de genes de resistencia para plagas y enfermedades y para mejorar el comportamiento agronómico.

En el esquema de la Figura 2 se representan los alelos asociados al pseudo-gen de  $\gamma$ -gliadina, los cuales tuvieron una distribución de tamaños más amplia que para LMWG, lo que significa una mayor variación en el número de repeticiones del microsatélite. Sólo uno de ellos estuvo compuesto por dos bandas (7\*), alelo presente en siete genotipos.

En el Cuadro 1 se detalla la lista de genotipos analizados, incluyendo el pedigrí de las líneas avanzadas, el tipo de alelos determinados para gluteninas de bajo peso molecular y  $\gamma$ -gliadinas

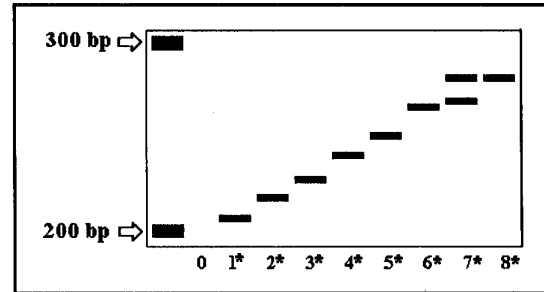


Figura 2. Representación esquemática de los alelos asociados al pseudogen de  $\gamma$ -gliadina encontrados en 39 genotipos de trigos harineros primaverales.

Figure 2. Schematic representation of the allele combinations found for the  $\gamma$ -gliadin pseudo-gene in the 39 different genotypes of bread wheat.

y los índices de calidad panadera determinados en este trabajo o estimados mediante el perfil de gluteninas de alto peso molecular de cada variedad (Hewstone e Hinrichsen, 1994). Las combinaciones alélicas más frecuentes fueron (1,8\*) con seis genotipos, (4,6\*) con cuatro genotipos, y (1,3\*) y (1,7\*) con tres genotipos en cada caso.

Devos *et al.* (1995) analizaron 12 genotipos (nueve variedades) de trigo con los mismos dos marcadores de SSR, encontrando cinco alelos diferentes para LMWG y cinco para  $\gamma$ -gliadinas, incluyendo un alelo nulo. Un resultado similar se obtuvo con 16 líneas y cultivares de Canadá, observándose un total de cuatro y seis alelos, respectivamente (Lee *et al.*, 1995); este último, sin embargo, era un material de estrecho fondo genético (Devos y Gale, 1992). En este trabajo se detectó un mayor número de alelos, 8 y 9, respectivamente. Ello permite suponer que al aumentar el número de genotipos analizados se podrían encontrar nuevos alelos para estos dos *loci*, en directa relación a la diversidad del fondo genético de los materiales estudiados.

Entre los nuevos alelos identificados para  $\gamma$ -gliadinas, se encontró uno con un patrón de doble banda, lo que marca una diferencia con el trabajo de Devos *et al.* (1995). En cambio, para el caso de las LMWG la presencia de alelos con doble banda

había sido informada por dichos autores, con una frecuencia similar al presente trabajo (40% de los genotipos). Trabajos realizados con 110 variedades argentinas de trigo (M. Manifesto, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Argentina; comunicación personal) confirman este resultado, encontrándose una gran cantidad de genotipos que presentaron alelos de LMWG de banda doble. Devos *et al.* (1995) sugirieron que el origen de esta doble banda sería la amplificación de distintos genes, de los ocho o diez que se han descrito localizados en el mismo *locus* del cromosoma 1A (Sabelli y Shewry, 1991). Alternativamente, ésta podría explicarse por la amplificación de dos *loci* completamente diferentes (unión “inespecífica” de los partidores), lo que se resolvería al conocer la secuencia de nucleótidos de los fragmentos amplificados. Sin embargo, la posibilidad de que se trate de una unión inespecífica es baja, por las condiciones restrictivas empleadas en la reacción de PCR.

En cuanto a los alelos “simples” (de banda única) de LMWG, tres de cuatro presentaron una banda ancha (alelos 3, 6 y 7), por lo que es posible que ellos también estén constituidos por dos bandas de tamaño similar que no pueden ser resueltas con el sistema electroforético usado. En este sentido, desde un punto de vista metodológico se podrían optimizar algunos procesos. Por ejemplo, el uso de urea en los geles de poliacrilamida como agente denaturante permitiría definir mejor las bandas de microsatélites, haciendo más fácil su identificación. Sin embargo, los resultados no variaron al preparar geles con urea (resultados no mostrados), lo que sugiere que se trataría de bandas simples y que su mayor grosor se debería a una mayor eficiencia en la reacción de PCR, determinada por la unión más estrecha de los partidores; las limitaciones técnicas de los sistemas de electroforesis usados no permiten dar una respuesta definitiva a este asunto.

Existe otra área donde los microsatélites pueden tener utilidad, que es la identificación de cultivos o “fingerprinting”. En los trigos chilenos

se ha trabajado en esta área basándose en perfiles electroforéticos de gliadinas, separadas en medio ácido (Hinrichsen *et al.*, 1997). Desafortunadamente, esa es una herramienta limitada, ya que la cantidad y variedad de estas proteínas es poca, a la vez que numerosas variedades presentan el mismo patrón electroforético. Por lo tanto, se analizó la capacidad de discriminación de los dos sistemas de partidores de PCR descritos. Se identificaron 24 combinaciones alélicas diferentes, 17 de las cuales fueron únicas para igual número de variedades (44%). La utilidad de un marcador para usarlo en “fingerprinting” está relacionada al índice de polimorfismo (valor PIC) o capacidad discriminativa, sobre una determinada población. En este caso, el PIC del SSR de LMWG fue de 0,782, mientras que para el *locus* de  $\gamma$ -gliadina fue de 0,859. Este resultado es auspicioso respecto a usar este tipo de marcador para determinar la identidad genética de un individuo cualquiera, así como para poder definir la identidad de sus progenitores.

#### **Correlación estadística con pruebas tradicionales de calidad panadera**

Los resultados de las pruebas tradicionales para calidad panadera fueron analizados estadísticamente en busca de correlaciones con alguno(s) de los alelos identificados para ambos genes (Cuadros 2 y 3, respectivamente). Se calculó el promedio de los valores de calidad panadera, cuando más de dos muestras presentaron el mismo alelo. Cabe destacar que para evitar posibles efectos dados por las condiciones ambientales de crecimiento de las plantas sobre la calidad panadera, sólo se analizaron los genotipos sembrados un mismo año (1996) y en la misma localidad. Esto no descarta los posibles efectos de la interacción genotipo ambiente, pero debiera reducir la interferencia ambiental y simplificar la interpretación de cualquier posible correlación detectada.

Las correlaciones entre ambos grupos de alelo y las pruebas de calidad panadera se presentan en el Cuadro 4. Se encontraron correlaciones

**Cuadro 2. Alelos para gluteninas de bajo peso molecular y valores para pruebas tradicionales de calidad panadera, obtenidos en trigos harineros<sup>1</sup>**

**Table 2. LMWG alleles and values for standard breadmaking quality tests on wheat cultivars**

Variedad Nº	Alelo LMWG	Porcentaje de proteína	Sedimentación	Gluten index	Gluten seco
5	1	12,4	10,8	66,1	13,4
8	1	12,2	7,3	71,3	11,4
9	1	11,6	6,0	76,6	12,7
12	1	10,8	7,7	90,5	10,8
14	1	12,6	8,8	82,5	13,3
17	1	12,6	9,8	81,3	12,8
18	1	12,7	7,2	61,5	12,4
19	1	12,0	8,0	73,6	16,0
20	1	12,9	9,2	84,6	12,9
24	1	11,6	8,0	72,2	12,8
<b>Promedio</b>		<b>12,14</b>	<b>8,28</b>	<b>76,02</b>	<b>12,85</b>
4	2	11,0	9,5	68,9	11,5
11	2	13,2	13,6	100,0	13,1
15	2	13,2	11,0	58,9	15,2
16	2	12,1	9,0	81,2	12,4
<b>Promedio</b>		<b>12,38</b>	<b>10,78</b>	<b>77,25</b>	<b>13,05</b>
1	4	10,4	9,8	97,5	10,1
2	4	12,9	10,3	48,8	14,0
3	4	10,3	7,8	85,0	10,3
13	4	12,1	9,0	59,6	13,3
21	4	11,6	10,0	83,4	12,7
39	4	13,2	8,6	49,3	18,1
<b>Promedio</b>		<b>11,75</b>	<b>9,25</b>	<b>70,6</b>	<b>13,08</b>
6	5	11,3	7,6	77,8	10,6
25	5	10,1	4,6	72,2	7,5
<b>Promedio</b>		<b>10,7</b>	<b>6,1</b>	<b>75,0</b>	<b>9,05</b>
7	6	12,0	8,2	85,9	10,0
10	6	12,3	8,0	95,1	11,5
22	6	12,2	8,3	87,8	11,7
23	6	12,1	7,0	61,6	14,5
<b>Promedio</b>		<b>12,15</b>	<b>7,88</b>	<b>82,6</b>	<b>11,93</b>
38	7	12,8	6,4	21,8	16,4

<sup>1</sup>No están todas las variedades analizadas en este trabajo.

**Cuadro 3. Alelos para  $\gamma$ -gliadinas y valores obtenidos para pruebas tradicionales de calidad panadera obtenidos en trigos harineros <sup>1</sup>****Table 3. Alleles of  $\gamma$ -gliadin and values on standard bread-making quality tests on wheat cultivars**

Variedad N <sup>o</sup>	Alelo de $\gamma$ -gliadina	Porcentaje de proteína	Sedimentación	Gluten index	Gluten seco
20	0*	12,9	9,2	84,6	12,9
22	1*	12,2	8,3	87,8	11,7
21	2*	11,6	10,0	83,4	12,7
25	2*	10,1	4,6	72,2	7,5
<b>Promedio</b>		<b>10,85</b>	<b>7,3</b>	<b>77,8</b>	<b>10,1</b>
38	3*	12,8	6,4	21,8	16,4
23	4*	12,1	7,0	61,6	14,5
3	5*	10,3	7,8	85,0	10,3
16	5*	12,1	9,0	81,2	12,4
<b>Promedio</b>		<b>11,2</b>	<b>8,4</b>	<b>83,1</b>	<b>11,35</b>
2	6*	12,9	10,3	48,8	14,0
11	6*	13,2	13,6	100	13,1
15	6*	13,2	11,0	58,9	15,2
39	6*	13,2	8,6	49,3	18,1
<b>Promedio</b>		<b>13,13</b>	<b>10,88</b>	<b>64,25</b>	<b>15,1</b>
1	7*	10,4	9,8	97,5	10,1
4	7*	11,0	9,5	68,9	11,5
5	7*	12,4	10,8	66,1	13,4
6	7*	11,3	7,6	77,8	10,6
13	7*	12,1	9,0	59,6	13,3
14	7*	12,6	8,8	82,5	13,3
24	7*	11,6	8,0	72,2	12,8
<b>Promedio</b>		<b>11,63</b>	<b>9,07</b>	<b>74,94</b>	<b>12,14</b>
7	8*	12,0	8,2	85,9	10,0
8	8*	12,2	7,3	71,3	11,4
9	8*	11,6	6,0	76,6	12,7
10	8*	12,3	8,0	95,1	11,5
12	8*	10,8	7,7	90,5	10,8
17	8*	12,6	9,8	81,3	12,8
18	8*	12,7	7,2	61,5	12,4
19	8*	12,0	8,0	73,6	16,0
<b>Promedio</b>		<b>12,03</b>	<b>7,78</b>	<b>79,48</b>	<b>12,2</b>

<sup>1</sup>No están todas las variedades analizadas en este trabajo.

estadísticamente significativas entre los alelos de LMWG y las pruebas de sedimentación, gluten-index y gluten seco. Para los alelos de  $\gamma$ -gliadinas se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con todas las pruebas de calidad realizadas (porcentaje de proteína, sedimentación, gluten-index y gluten seco).

De acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo, los alelos 1, 2 y 4 del gen de glutenina de bajo peso molecular y los alelos 5\*, 6\* y 8\* del pseudo-gen de  $\gamma$ -gliadina, estuvieron más estrechamente asociados a mejores índices de calidad panadera. Paralelamente, se identificaron 14 genotipos que presentaron una combinación en la cual ambos alelos estuvieron asociados a buena calidad panadera. Entre estos genotipos se encuentran algunas variedades que se han destacado por distintos caracteres de interés, incluida la calidad panadera, como por ejemplo Millaleu-INIA, Catbird, Lilén-INIA, Huayún-INIA y Reihue-INIA, todas con una combinación (1, 8\*); Trisa-INIA, Onda-INIA y Naofén (combinación 4, 6\*); y Huañil-INIA (4, 5\*). Los restantes genotipos corresponden a líneas avanzadas del programa de fitomejoramiento.

#### Correlación estadística con índice francés e índice inglés de calidad panadera

Parte de los genotipos analizados en este trabajo (n=22) coincidieron con el material analizado

por Hewstone e Hinrichsen (1994), quienes determinaron los índices de calidad panadera francés e inglés en base a los patrones de gluteninas de alto peso molecular (HMWG). Para ambos índices, valores más altos suponen mejor calidad panadera. En el Cuadro 5 se señalan los valores obtenidos para los genotipos incluidos en ambos estudios.

Al comparar los alelos para ambos genes (LMWG y  $\gamma$ -gliadina) con los índices francés e inglés, se encontró sólo una correlación estadísticamente significativa al 1% entre LMWG y el índice inglés. Los valores de correlación ( $E^2$ ) entre los alelos de LMWG y los índices francés e inglés fueron de 0,21 y 0,48, respectivamente, mientras que los valores de correlación entre los alelos de  $\gamma$ -gliadinas e índices francés e inglés, fueron de 0,25 y 0,19, respectivamente.

Estos resultados no fueron coincidentes con la correlación observada entre los alelos de los genes de LMWG y  $\gamma$ -gliadina y las pruebas de calidad panadera tradicionales, descrita anteriormente. En parte, esto puede deberse a que sólo nueve genotipos, de los 26 caracterizados por pruebas tradicionales y 22 caracterizados para HMWG, fueron coincidentes entre ambos análisis. De esta manera, la caracterización de un mayor número de genotipos mediante pruebas tradicionales será necesaria antes de obtener conclusiones más sólidas respecto a la correla-

**Cuadro 4. Correlación ( $E^2$ ) entre los alelos obtenidos para LMWG y  $\gamma$ -gliadinas con las pruebas de calidad panadera: porcentaje de proteína, sedimentación, gluten-index y gluten-seco**

**Table 4. Correlation ( $E^2$ ) among alleles for LMWG and  $\gamma$ -gliadins with bread-making quality tests (protein %, sedimentation, gluten-index and dry gluten)**

	Porcentaje de proteína	Sedimentación	Gluten index	Gluten seco
LMW glutenina	0,2542 NS <sup>1</sup> (n=27)	0,5084** (n=27)	0,4169** (n=27)	0,3484** (n=27)
$\gamma$ -gliadina	0,5370** (n=26)	0,4704** (n=26)	0,5180** (n=26)	0,4904** (n=26)

<sup>1</sup>NS = No significativo; \*\* = Significativo al 1%.

**Cuadro 5. Alelos de LMWG y  $\gamma$ -gliadinas, e índices de calidad panadera francés<sup>1</sup> e inglés<sup>1</sup>****Table 5. Alleles of LMWG and  $\gamma$ -gliadins, and English and French indexes for bread-making quality**

Variedad		Alelo de LMWG	Alelo de $\gamma$ -gliadina	Índice francés	Índice inglés
Nº	Nombre				
8	Millaleu INIA	1	8*	65	9
12	Lilen INIA	1	8*	80	9
19	Reihue INIA	1	8*	65	9
21	Lancero INIA	4	2*	39	6
22	Kona INIA	6	1*	75	10
23	Antilhue INIA	6	4*	65	9
24	Dalcahue INIA	1	7*	85	10
25	Candela INIA	5	2*	75	10
26	Chasqui INIA	1	3*	60	10
27	Trisa INIA	4	6*	85	-
28	Yafen	5	3*	80	9
29	Orofén	1	3*	22	6
30	Lincoyan	4	4*	9	4
31	Chacay INIA	3	1*	40	8
32	Canelo INIA	1	3*	55	8
33	Libun espiga blanca	8	3*	30	6
34	Cisne INIA	3	-	78	10
35	Onda INIA	4	6*	78	10
36	Ancoa INIA	5	1*	22	6
37	Chifén	1	2*	22	6
38	Tukan INIA	7	3*	15	3
39	Naofén	4	6*	25	6

<sup>1</sup>Índice francés e índice inglés calculados por Hewstone y Hinrichsen, 1994.

ción entre los alelos de SSR descritos aquí y la calidad panadera. Por otra parte, es sabido que los diferentes alelos de HMWG sí tienen un rol en las propiedades reológicas y de la calidad de la masa (Payne, 1987); sin embargo, hubo un número importante de genotipos con alelos de HMWG de buena calidad (i.e., valores altos de los índices inglés y francés) que no se asociaron a los alelos de LMWG o  $\gamma$ -gliadina definidos aquí como potencialmente de buena calidad (alelos 1, 2 y 4 y 5\*, 6\* y 8\*, respectivamente), mientras que Naofén, un cultivar con HMWG de baja calidad, presentó alelos de LMWG y  $\gamma$ -gliadina que serían de buena calidad.

#### **Aplicación de los marcadores moleculares estudiados en mejoramiento genético**

La aplicación de estos y otros marcadores moleculares actualmente bajo estudio, requerirán de un trabajo a más largo plazo. Por una parte, sería necesario diseñar esquemas de cruzamientos que permitan aumentar el número de individuos analizados incluyendo, por ejemplo, materiales con hábitos de crecimiento alternativos e invernales, además de los primaverales analizados en este caso. Estos cruzamientos dirigidos deberían conducir a identificar o "aislar" el efecto de cada uno de los posibles factores genéticos (alelos) sobre la calidad panadera. Posteriormente, sería necesario determinar la "universa-

lidad" de cada marcador putativo, es decir, verificar que el marcador está presente en distintas variedades con un apropiado grado de correlación a la característica de interés.

Una vez completados estos estudios, los marcadores moleculares podrían tener algún impacto, ya que serían una efectiva forma de seleccionar genotipos de interés sin tener la interferencia dada por la interacción genotipo/ambiente. De esta forma, sería posible reducir el número de individuos que debieran ser analizados en campo. Por otra parte, existe una serie de caracteres que son de muy difícil evaluación. Un ejemplo es la selección para resistencia a ciertas enfermedades causadas por hongos, las que dependen de la presión de selección natural. Dado que esta condición es irreproducible, la selección del fitomejorador suele ser errática, mientras que si se dispusiera de un marcador genético-molecular estrechamente ligado a genes de resistencia, la selección inicial se vería reducida a verificar la presencia de determinados alelos.

## CONCLUSIONES

El uso de microsatélites asociados a genes de proteínas de almacenaje en trigos harineros demostró ser una técnica de alta reproducibilidad, lográndose caracterizar con precisión los 39 genotipos de trigo harineros estudiados. Esta técnica se proyecta como un método de elección para identificar genéticamente cultivares. Es así como en este caso usando sólo dos SSR se pudo diferenciar 17 de los 39 genotipos de trigo de pan estudiados (44%).

El alto nivel de polimorfismo detectado, ocho alelos para gluteninas LMW y nueve para  $\gamma$ -gliadina, junto con la determinación de correlaciones estadísticamente significativas de estos alelos con las pruebas de calidad panadera tradicionales, permiten proyectar esta técnica como una futura herramienta de selección, de uso masivo en los programas de mejoramiento.

## RESUMEN

Se caracterizaron 39 genotipos chilenos de trigo harinero mediante el análisis de alelos de microsatélites (SSR) asociados a un gen de glutenina de bajo peso molecular (LMWG) y a un pseudogen de  $\gamma$ -gliadina. Se detectaron ocho alelos para el *locus* de LMWG y nueve para el de  $\gamma$ -gliadina, incluido un alelo nulo. Desde un punto de vista de la identificación genética, un 44% de las variedades estudiadas presentaron combinaciones de alelos únicas. Parte de los genotipos caracterizados por SSR fue sometido a pruebas tradicionales de calidad panadera. Estos resultados fueron correlacionados con los alelos de SSR determinados, usando una metodología que permite comparar variables cualitativas con variables cuantitativas. Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre los alelos de LMWG con las pruebas de sedimentación

(0,51\*\*), gluten index (0,42\*\*) y gluten seco (0,35\*\*). Para el caso de los alelos de  $\gamma$ -gliadinas se determinaron correlaciones estadísticamente significativas con todas las pruebas de calidad realizadas (0,54\*\* para porcentaje de proteína, 0,47\*\* para sedimentación, 0,52\*\* para gluten-index y 0,49\*\* para gluten seco). Así también, se encontró una correlación estadísticamente significativa (0,48\*\*) entre LMWG e índice inglés para calidad panadera, que está basado en los patrones de gluteninas de alto peso molecular. Por el contrario, no hubo correlación entre LMWG e índice francés, ni entre  $\gamma$ -gliadina y los índices francés e inglés.

**Palabras claves:** *Triticum aestivum* L., ADN, fingerprinting, calidad panadera, gliadina, glutenina.

## LITERATURA CITADA

- AACC. 1988. Approved Methods. American Association of Cereal Chemists (AACC). Vol. 1. Method AACC 38-12. Saint Paul, Minnesota, U.S.A. p. 1
- BOWERS, J.; DANGL, G. S.; VIGNANI, R. AND MEREDITH, C. P. 1996. Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat *loci* in grape (*Vitis vinifera* L.). *Genome* 39: 628-633.
- BRANLARD, G.; AUTRAN, J. C.; ROUSSET, M.; DARDEVEY, M. ET KOENIG, J. 1990. Catalogue des sous unités de haut poids moléculaire des glutenines des blés. Institute National de la Recherche Agronomique. France. 56 p.
- BREMNER, J. M. 1965. Total nitrogen. Methods of soil analysis. II. Chemical and microbiological properties. *In*: Black, C.A. (Ed). American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin. U.S.A. p. 1149-1178.
- CAMPOS, H. A. 1995. Marcadores moleculares: conceptos. *Agro Sur* 23: 68-75.
- DEVOS, K. M. AND GALE, M. D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567-572.
- DEVOS, K. M.; BRYAN, G. J.; COLLINS, A. J.; STEPHENSON, P. AND GALE, M. D. 1995. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 90: 247-252.
- DWEIKAT, I.; MACKENZIE, S.; LEVY, M. AND OHM, H. 1993. Pedigree assessment using RAPD-DGGE in cereal crop species. *Theor. Appl. Genet.* 85: 497-505.
- FLAVELL, R. B.; PAYNE, P. I.; THOMPSON, R. D. AND LAW, C. N. 1988. Strategies for the improvement of wheat-grain quality using molecular genetics. *In*: Russell, G.E. (Ed). *Biotechnology of higher plants*. Intercept. Wimborne. Dorset, United Kingdom. p. 159-175.
- GEPTS, P. 1994. Análisis molecular del proceso de domesticación en plantas: El ejemplo del frejol (*Phaseolus vulgaris*). XI Congreso Latinoamericano de Genética y XV Congreso de Fitogenética. Monterrey, Nueva León, Méjico, p. 4-28.
- GRANGER, D.; RIVEROS, F. Y CORTES, V. 1989. Influencia del grano blanqueado y variedad, sobre algunos parámetros de calidad de *Triticum durum* Def. *Simiente* 59: 87. (Resumen).
- GUPTA, R. B. AND SHEPHERD, K. W. 1990. Two-step one-dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutelin. *Theor. Appl. Genet.* 80: 65-74.
- HE, S.; OHM, H. AND MACKENZIE, S. 1992. Detection of DNA sequence polymorphisms among wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 84: 573-578.
- HEWSTONE, N. Y HINRICHSEN, P. 1994. Composición de subunidades de gluteninas de alto peso molecular de trigos chilenos de pan (*Triticum aestivum* L.). *Agricultura Técnica (Chile)* 54: 211-218.
- HINRICHSEN, P.; OPITZ, X.; RAMÍREZ, I. Y MUÑOZ, C. 1997. Identificación de cultivares chilenos de trigo de pan (*Triticum aestivum* L.) y trigos candeales (*Triticum durum* Def.) basado en perfiles electroforéticos de gliadinas. *Agricultura Técnica (Chile)* 57: 102-112.



- HOSENEY, R. 1991. Principios de ciencia y tecnología de los cereales. Proteínas de los cereales. Zaragoza, España. Editorial Acribia. 321 p.
- KHELIFI, D. AND BRANLARD, G. 1992. The effect of HMW and LMW subunits of glutenin and gliadins on the technological quality of progeny from four crosses between poor bread making quality and strong wheat cultivars. *J. Cereal Sci.* 16: 195-209.
- KORZUN, V.; BÖRNER, A.; WORLAND, A. J.; LAW, C. N. AND RÖDER, M. S. 1997. Application of microsatellite markers to distinguish inter-varietal chromosome substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 95:149-155.
- LAGERCRANTZ, H.; ELLEGREN, Y. AND ANDERSSON, L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 21: 1111-1115.
- LEE, S. J.; PENNER, G. A. AND DEVOS, K. M. 1995. Characterization of *loci* containing microsatellite sequences among Canadian wheat cultivars. *Genome* 38: 1037-1040.
- MA, Z. Q.; RÖDER, M. AND SORRELLS, M. E. 1996. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome* 39: 123-130.
- MORGANTE, M. AND OLIVIERI, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
- Ostle, B. 1963. Statistics in research. Ames, Iowa, USA. The Iowa State University Press. p. 229-243.
- PATERSON, A.; TANKSLEY, S. AND SORRELLS, M. 1991. DNA markers and plant improvement. *Adv. Agron.* 46: 39-90.
- PAYNE, P. 1987. Genetics of wheat storage proteins and effect of allelic variation on bread-making quality. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 141-53.
- PAYNE, P. I.; NIGHTINGALE, M. A.; KRATTIGER, A. F. AND HOLT, L. M. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the breadmaking quality of British grown wheat varieties. *J. Sci. Food Agric.* 40: 51-65.
- PLASCHKE, J.; GANAL, M.W. AND RÖDER, M. S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet* 91: 1001-1007.
- RÖDER, S. M.; PLASCHE, J.; KÖNIG, S. U.; BÖRNER, A.; SORRELLS, M. E.; TANKSLEY, S. D. AND GANAL, M. W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.
- RÖDER, S. M.; KORZUN, V.; WENDEHAKE, K.; PLASCHKE, J.; TIXIER, M-H.; LEROY, P. AND GANAL, M. W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
- SABELLI, P. A. AND SHEWRY, P. R. 1991. Characterization and organization of gene families at the *Gli-1 loci* of bread and durum wheats by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.* 83: 209-216.
- SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A. AND ALLARD, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-8018.
- SINGH N. K. AND SHEPHERD, K. W. 1988. Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group1 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 75: 628-641.

- STAUB, J. E.; SERQUEN, F. C. AND GUPTA, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience* 31: 729-741.
- WEISING, K.; BEYERMANN, B.; RAMSER, J. AND KAHL, G. 1991. Plant DNA fingerprinting with radioactivity and dioxigenated oligonucleotide probes complementary to simple repetitive DNA sequences. *Electrophoresis* 12: 159-160.
- WOO, T. L. 1929. Tables for ascertaining the significance or nonsignificance of association measured by the correlation ratio. *Biometrika* 21: 1.
- ZELNY, L. 1947. A simple sedimentation test for estimating bread-baking and gluten qualities of wheat flour. *Cereal Chem.* 24: 465-475.