



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
Facultad de Ciencias Agrarias
Escuela de Agronomía

Avance genético en parámetros de calidad panadera en trigo (*Triticum aestivum* L.) combinando mejoramiento convencional y selección asistida por marcadores moleculares en poblaciones segregantes

Tesis presentada como parte
de los requisitos para optar
al grado de Licenciado en
Agronomía

Matías Eduardo Avendaño Ceballos

Valdivia Chile 2002

PROFESOR PATROCINANTE

Sr. Ricardo Riegel S.
Ing. Agr. Ph. D.

PROFESOR COPATROCINANTE

Sr. Claudio Jobet F.
Ing. Agr. Ph. D.

PROFESOR INFORMANTE

Sr. Javier Zuñiga R.
Bioquímico

INDICE DE MATERIAS

Capitulo		Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Antecedentes generales del trigo	3
2.1.1	Evolución	3
2.1.2	Importancia mundial y nacional	5
2.1.3	Calidad del grano	7
2.2	Mejoramiento genético en trigo	8
2.2.1	Mejoramiento convencional	8
2.2.2	Aplicaciones de la biotecnología vegetal al mejoramiento	10
2.2.3	Complementación del mejoramiento convencional y la biotecnología	11
2.3	Marcadores moleculares	12
2.3.1	Marcadores fenotípicos o bioquímicos	13
2.3.2	Marcadores genotípicos	13
2.3.3	Aplicaciones de los marcadores moleculares al mejoramiento genético de plantas	16
2.4	Métodos de selección y creación de variedades	17
2.4.1	Selección fenotípica	18
2.4.2	Selección con herramientas biotecnológicas	19
2.4.2.1	Selección Asistida por Marcadores (MAS)	20
2.4.2.2	Selección Directa al Alelo (DAS)	22
2.5	Base genética de los principales parámetros de calidad del grano	22
2.5.1	Proteína del grano	22

Capítulo		Página
2.5.2	Dureza del grano	26
2.5.3	Sedimentación	29
2.5.4	Translocación trigo-centeno 1BL/1RS	30
3	MATERIAL Y MÉTODO	32
3.1	Material vegetal	32
3.2	Método	34
3.2.1	Población experimental	34
3.2.2	Selección fenotípica (Etapa 1)	35
3.2.3	Caracterización fenotípica	35
3.2.3.1	Caracterización agronómica	35
3.2.3.2	Parámetros tecnológicos (Etapa 2)	35
3.2.4	Caracterización genotípica (Etapa 3)	36
3.2.4.1	Toma de muestras	37
3.2.4.2	Extracción de ADN	37
3.2.4.3	Detección del alelo Glu-Dx5, subunidad 5+10	38
3.2.4.4	Detección del alelo mutado de puroindolina Pinb-D1b	39
3.2.4.5	Detección del alelo de puroindolina Pinb-D1a	40
3.2.4.6	Detección del alelo de puroindolina Pina-D1a	41
3.2.4.7	Detección de segmentos translocados trigo-centeno	42
3.2.5	Análisis de resultados	43
4	PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	44
4.1	Antecedentes de la calidad panadera de las variedades utilizadas como progenitores	44
4.2	Caracterización fenotípica y molecular	45
4.2.1	Población base	45
4.2.2	Población DAS	46
4.3	Evaluación de la Población base	47

Capítulo		Página
4.3.1	Caracterización de los parámetros de selección y caracterización fenotípica en función de los marcadores moleculares	47
4.3.2	Frecuencias esperadas y observadas de los marcadores moleculares	49
4.3.3	Distribución de las variables cuantitativas	52
4.3.3.1	Porcentaje de proteína del grano	52
4.3.3.2	Dureza del grano	53
4.3.3.3	Volumen de sedimentación	56
4.4	Distribución de las variables cuantitativas (sedimentación y dureza de grano) en función de diferentes alelos	58
4.4.1	Porcentaje de proteína	59
4.4.2	Dureza del grano	59
4.4.3	Volumen de sedimentación	64
4.5	Avance genético obtenido entre la Población base y Población DAS	69
4.5.1	Porcentaje de proteína	69
4.5.2	Dureza de grano	70
4.5.3	Volumen de sedimentación	74
4.5.4	Evaluación del avance genético	78
5	CONCLUSIONES	81
6	RESUMEN	83
	SUMMARY	85
7	BIBLIOGRAFIA	87
	ANEXOS	97

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Caracterización de trigos silvestres y cultivados	5
2	Clasificación de la harina de trigo y su uso final	8
3	Clasificación alélica de las principales subunidades de glutenina de alto peso molecular y su valor de índice inglés	25
4	Tipos de puroindolinas, cambio molecular y fenotípico	28
5	Origen y altura de planta de las variedades de trigo utilizadas como progenitores, (Temporada 2000/2001)	33
6	Características genéticas de las variedades de trigo utilizadas como progenitores	33
7	Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo <i>GLU-Dx5</i>	38
8	Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo mutado de puroindolina <i>Pinb-D1b</i>	39
9	Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo de puroindolina <i>Pinb-D1a</i>	40
10	Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo de puroindolina <i>Pina-D1a</i>	41
11	Características de los partidores y componentes de mix PCR, del segmento traslocado del centeno alelo RIS -1	42
12	Porcentaje de proteína, índice de dureza y sedimentación de los padres de las cruzas evaluadas. (Año 2001)	44
13	Valores promedio por crusa, para el peso de 1000 granos en función de los diferentes alelos evaluados	48
14	Valores promedio por crusa, para la altura de planta en función de los diferentes alelos evaluados	48

Cuadro		Página
15	Número de plantas seleccionadas y valores de χ^2 cuadrado para las frecuencias genéticas en las cruzas evaluadas	49
16	Coefficientes de correlación r para los alelo de puroindolina mutados, <i>Glu-5+10</i> y presencia de translocación en función de los parámetros de calidad (sedimentación, índice de dureza)	58
17	Numero de plantas seleccionadas y porcentaje de proteína promedio de la Población base y Población DAS, por cruza	69
18	Comparación de los promedios de los índices de dureza de la Población base y Población DAS	70
19	Comparación de los promedios de sedimentación NIR de la Población base y Población DAS	74

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Evolución del trigo	4
2	Esquema del Mejoramiento tradicional complementado con herramientas biotecnológicas	12
3	Reacción de la polimerasa en cadena PCR	15
4	Etapas de la creación de una variedad	18
5	Esquema de la distribución y ubicación de las diferentes cruzas analizadas en terreno	34
6	Presencia del alelo mutado de puroindolina Pinb-D1b (arriba) y ausencia de este alelo (abajo) en individuos de la craza Avital x Kona	46
7	Frecuencias observadas vs esperadas craza Baroudeur x Renaico	50
8	Frecuencias observadas vs esperadas craza Avital x Renaico	51
9	Distribución del porcentaje de proteína del grano en la craza Genial x Pukem	52
10	Distribución del porcentaje de proteína del grano en la craza Baroudeur x Renaico	53
11	Distribución del índice de dureza en la craza Renan x Dalcahue	54
12	Distribución del índice de dureza en la craza Avital x Kona	55
13	Distribución del volumen de sedimentación (mL) craza Avital x Kona	56
14	Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la craza Genial x Pukem	60

Figura		Pagina
15	Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la cruce Avital x Kona	60
16	Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la cruce Baroudeur x Dalcahue	61
17	Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la cruce Baroudeur x Renaico	62
18	Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la cruce Renan x Dalcahue	63
19	Distribución del volumen de sedimentación (SDS) en función de los alelos de puroindolina en la cruce Avital x Kona	65
20	Distribución del índice de sedimentación (NIR) para individuos translocados vs no translocados	67
21	Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Avital x Kona	71
22	Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Genial x Pukem	71
23	Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Baroudeur x Dalcahue	72
24	Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Baroudeur x Renaico	72
25	Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Renan x Dalcahue	73
26	Distribución del volumen de sedimentación SDS en poblaciones segregantes F ₃ en la cruce Avital x Kona	75
27	Distribución del índice de sedimentación NIR en poblaciones segregantes F ₃ en la cruce Avital x Kona	76
28	Distribución del índice de sedimentación NIR en poblaciones segregantes F ₃ en la cruce Genial x Pukem.	77

Figura		Pagina
29	Distribución del índice de sedimentación SDS en poblaciones segregantes F_3 en la cruza Baroudeur x Dalcahue	77
30	Distribución del índice de sedimentación NIR en poblaciones segregantes F_3 en la cruza Avital x Renaico	78

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Tabla con los datos de caracterización fenotípica, molecular y calidad, Población base, cruza Genial x Pukem	98
2	Presencia de alelos de glutenina subunidad 5+10 en individuos de la cruza Avital x Kona	111
3	Presencia de la translocación trigo/centeno (S.R.C. Ris-1) en individuos de la cruza Avital x Renaico	111
4	Presencia de alelo de puroindolina Pina-D1a en la cruza Baroudeur x Dalcahue	111
5	Tabla con los datos de caracterización fenotípica, molecular y calidad, Población DAS	112
6	Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Genial x Pukem (dureza)	117
7	Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Avital x Kona (dureza)	117
8	Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Baroudeur x Dalcahue (dureza)	118
9	Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Genial x Pukem (sedimentación)	118
10	Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Baroudeur x Dalcahue (sedimentación)	119
11	Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Avital x Kona (sedimentación SDS)	119
12	Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Avital x Renaico (sedimentación)	120

1 INTRODUCCION

El trigo (*Triticum aestivum L.*), es la especie cultivada más importante a nivel mundial, no sólo por su capacidad adaptativa a diferentes ecosistemas, sino también por el aporte nutritivo que representa para la alimentación humana.

Este es el cultivo más tradicional de la agricultura chilena, y su consumo per capita y rendimiento se encuentra entre los más altos a nivel mundial.

Sin embargo, la calidad y cantidad de proteína así como otros parámetros de calidad expresados por algunos cultivares de alto rendimiento desarrollados en Chile distan aún de los parámetros de calidad exigidos a nivel mundial, siendo necesaria la búsqueda de equilibrio entre alto rendimiento y calidad, para así poder competir en un mercado globalizado.

Paralelo a esto se han alcanzado grandes avances en el área del mejoramiento a través del uso de herramientas biotecnológicas, como la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) aplicados en programas de mejoramiento convencional. Aun así, ha sido difícil materializar estos avances en forma masiva, por el costo que involucra el desarrollo de estas tecnologías y por la limitada información que se dispone.

En el caso del mejoramiento en trigo apoyado por herramientas biotecnológicas, se han desarrollado estudios paralelos en varios centros de investigación del mundo, siendo los objetivos más importantes mejorar la calidad panadera, resistencia a enfermedades y rendimiento.

Para el primero de ellos, se han desarrollado marcadores moleculares para calidad de proteína y textura de grano, además es posible evaluar la presencia de la translocación trigo/centeno, la cual tiene gran influencia en la calidad panadera, sobre todo calidad de proteínas. Aun así es necesario validar estos conocimientos bajo las condiciones de Chile para poder determinar la relación de estos marcadores moleculares con la calidad panadera presente en los cultivares desarrollados en Chile.

En una primera etapa, se evaluó la forma en que estos marcadores moleculares pueden ser incorporados a un sistema de mejoramiento convencional bajo un sistema de selección asistida por marcadores, de tal forma de lograr avances sustanciales en generaciones tempranas y así apoyar el sistema de mejoramiento convencional, aumentando la eficiencia de selección en cada generación.

Por esta razón, el principal objetivo de este trabajo es determinar la posibilidad de incrementar el avance genético para calidad industrial, combinando esquemas de mejoramiento basados en una caracterización molecular complementaria al programa de mejoramiento convencional de trigo.

Como objetivos específicos se plantean: la utilización de marcadores moleculares con el fin de seleccionar genotipos para algunos factores de calidad industrial; determinar la presencia de individuos transgresivos dentro de diferentes poblaciones segregantes y poder establecer el progreso genético de los caracteres evaluados en una generación segregante intermedia, bajo una estrategia de selección directa al alelo (DAS).

Las hipótesis planteadas en la presente investigación son:

- La selección asistida por marcadores permite aumentar el avance genético.
- El avance genético es mayor al aumentar la correlación entre el marcador molecular y el parámetro de calidad evaluado.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Antecedentes generales del trigo.

El trigo es una gramínea anual perteneciente al género *Triticum* que comprende especies silvestres y cultivadas, cuyos principales géneros relacionados son: *Triticum*, *Secale*, *Aegilops*, *Agropyron*, *Haynaldia* y *Hordeum*. (LELLEY, 1976).

La especie más cultivada de trigo (*Triticum aestivum* L.) alcanza una altura de planta entre 60 y 120 cm, su tallo es un rizoma corto que presenta de 5 a 7 nudos según la especie, aún cuando generalmente se desarrollan sólo 3 a 4 hojas, denominándose la superior hoja bandera la cual posee una alta capacidad fotosintética (KENT, 1987).

El trigo se origino en Asia Menor, específicamente entre los ríos Tigris y Eufrates desde donde fue llevado a Europa y África antes de la era cristiana (LELLEY, 1976). El trigo fue introducido a América en 1529 cuando los españoles llegaron a Nuevo México y de ahí por las costas a través de toda América (FELDMAN, 1976).

El trigo tiene una amplia área de adaptación, se cultiva desde los límites del Ártico hasta cerca del Ecuador, sin embargo las cosechas más productivas se encuentran entre los 30⁰ y 60⁰ de latitud Norte y entre los 27⁰ y 40⁰ de latitud Sur. En relación a la altitud a la que se cultiva, estas varían desde el nivel del mar, hasta los 4.572 m, demostrando que es un cultivo adaptable a condiciones muy diversas (KENT, 1987).

2.1.1 Evolución. Las especies de trigo silvestres y cultivadas forman una serie poliploide basada en un número básico de 7 cromosomas, siendo diploides ($2n=2x=14$), tetraploides ($2n=4x=28$) y hexaploides ($2n=6x=42$) (RAHMAN, 1987).

Según POEHLMAN (1965), los ancestros silvestres del trigo con características diploides pertenecientes a los géneros antes mencionados, han originado a las especies tetraploides por cruzas interespecíficas. Por su parte las especies hexaploides se habrían originado por la adición de un tercer genoma a una especie tetraploide (Figura 1).

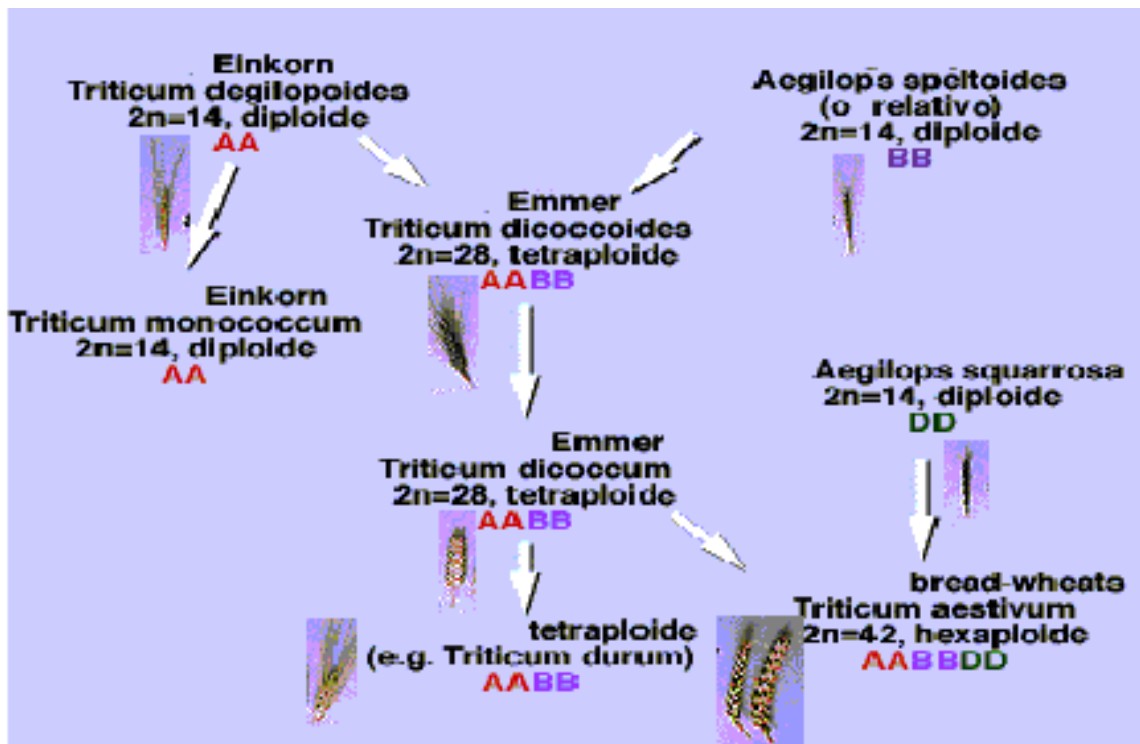


FIGURA 1. Evolución del trigo.

FUENTE: Modificado de POEHLMAN (1965) y FELDMAN (1976).

Para FELDMAN (1976), las especies poliploides son ejemplo de evolución a través de anfiploidia y forman el típico genoma alopoliploide, lo que significa que sus pares de cromosomas están en forma diploide y el modo de herencia es disómico.

Las múltiples especies y variedades pertenecientes al género *Triticum*, se pueden agrupar en tres razas diferentes, en base a diferente número de cromosomas y antecesores como se detalla en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Caracterización de trigos silvestres y cultivados.

Raza	Tipo Silvestre	2n	Nombre de la especie cultivada	Nombre vulgar
Espelta pequeño	<i>T. aegelopoides</i>	14	<i>T. monococcum</i>	Eikorn
Emmer	<i>T. dicoccoides</i>	28	<i>T. dicoccum</i>	Emmer
			<i>T. durum</i>	Macaroni wheat
			<i>T. polonicum</i>	Polish
			<i>T. turgidum</i>	Rivet, Cone
Espelta grande		42	<i>T. aestivum</i>	Bread Wheat
Dinkel	<i>T. monococcum</i>		<i>T. spelta</i>	Dinkel, Spelt
			<i>T. speltoides</i>	Club
			<i>T. squarrosa</i>	Indian Dwarf

FUENTE: Adaptado de KENT (1987).

Las variedades modernas de trigo son del tipo hexaploides (*T. aestivum* var. *aestivum*), seleccionadas por su alto contenido de gluten en el endospermo, y en especial por su grano duro (FELDMAN, 1976).

Los genomas del trigo cultivado no se recombinan entre sí debido a la presencia del gen Phd en el grupo 5B de cromosomas homólogos, por lo que no se observa recombinación homeóloga entre los distintos genomas. Por esta razón, el trigo principalmente se comporta como un organismo diploide a pesar de su complejidad genómica (LELLEY, 1976).

2.1.2 Importancia mundial y nacional. El trigo es la especie más cultivada a nivel mundial, su grano en diferentes formas, es consumido por más de 1500 millones de personas siendo su aporte calórico y proteico, mayor a la de cualquier otro alimento (JOBET, 1989).

A nivel mundial el trigo es la base alimentaria para el 35% de la población, la superficie sembrada cubre alrededor de 220 millones de hectáreas, manteniéndose estable desde 1965. Sin embargo la producción se duplicó en un lapso de 20 años, de 265.800 millones de toneladas en 1965 a 535.842 millones de ton. en 1985, manteniéndose desde esa fecha a niveles similares (HEWSTONE, 1998).

El trigo en Chile es el cultivo más importante en volumen y superficie concentrándose el 70% de la producción en las Regiones VIII, IX, X. El consumo de este cereal es de alrededor de 150 kilos/hab./año encontrándose entre los más elevados a nivel mundial (JOBET, 1989).

En la temporada 2001 se sembraron 438.320 ha con un rendimiento promedio de 43 qm/ha lograndose una producción total de 1.780.157 toneladas. Las mayores superficies cultivadas se concentraron en la VIII y IX Regiones con una superficie de 111.600 ha y 166.970 ha respectivamente. Sin embargo los mayores rendimientos se obtuvieron en la X Región y Región metropolitana con un rendimiento promedio 59.6 y 48 qm/ha respectivamente (OFICINA DE ESTUDIOS PUBLICOS Y POLÍTICAS AGRARIAS, (ODEPA), 2001).

Esto se debe a que el área triguera de Chile presenta una gran diversidad de condiciones agroecológicas, que inciden sobre las especies de trigo que se cultivan, sus hábitos de crecimiento, las técnicas de manejo y la productividad (MELLADO y MADARIAGA, 1996).

En relación al comercio internacional, MONTESINOS (2001), establece que Chile importó un 40% del trigo que se consumió en el país en el año 2001. Estas importaciones están regidas por bandas, las cuales regulan los precios de importación del producto a nivel nacional, adicionando un impuesto a las importaciones si el precio del producto importado está por debajo de la banda de precios. De acuerdo al MERCOSUR (Mercado Común del Sur) el año 2014, debería lograrse el 100% de desgravamen.

2.1.3 Calidad del grano. El trigo tiene diversos usos en la industria alimentaria constituyendo el principal ingrediente en la elaboración de pan, galletas y pastas entre otros. La calidad del trigo requerida va a ser diferente de acuerdo al uso final que este tenga, por lo que son requeridas distintas calidades de grano para cada producto (PEÑA et al., 1998).

Un factor de importancia en la clasificación de la calidad del grano según PEÑA et al. (1998), es el contenido de proteínas, esto se debe a que el 80-85% de la proteína forma un complejo conocido como gluten que es el factor determinante de la calidad de la harina para la elaboración de productos de panificación.

La textura de grano, es una herramienta complementaria para clasificar comercialmente a los trigos, ya que es una de las características más importantes en términos de calidad final y utilización (MORRIS et al., 2001).

Para la comercialización del trigo harinero, la dureza de grano se clasifica en duros, semiduros y suaves. Los trigos duros y semiduros se utilizan principalmente en la panificación, en tanto que los suaves o blandos son usados en repostería para la elaboración de galletas (PEÑA et al., 1998).

En el Cuadro 2, se presenta la clasificación del trigo basándose en la fuerza de su gluten, dividiéndose en 5 grupos, que se asocian al uso industrial y a la textura de grano deseada (PEÑA et al., 1998).

CUADRO 2. Clasificación de la harina de trigo y su uso final.

Grupo de calidad	Fuerza de gluten	Uso Industrial	Observaciones
Grupo 1	Fuerte/Extensible	Panificación mecanizada mejorador de trigos de menor fuerza de gluten	Endosperma duro o semi-duro
Grupo 2	Medio/Extensible	Panificación manual y semi-mecanizada	Endosperma duro o semi-duro
Grupo 3	Débil/Extensible	Galletería y repostería panificación artesanal	Endosperma suave (blando)
Grupo 4	Medio/Tenaz (poco extensible)	Algunos productos de repostería	Endosperma duro o semi-duro (no panificable)
Grupo 5	Fuerte/Tenaz	Elaboración de pastas alimenticias	Endosperma muy duro y cristalino (no panificable)

FUENTE: (PEÑA *et al.*, 1998).

2.2 Mejoramiento genético en trigo.

De acuerdo con SIMMONDS (1979), la primera tarea para el mejorador, es determinar el objetivo del mejoramiento que en la mayoría de los casos se ha enfocado a la búsqueda de mayores rendimientos y calidad. Para lograr este objetivo, el mejorador debe seleccionar las herramientas adecuadas para así obtener las características deseadas en la progenie.

2.2.1 Mejoramiento convencional. El mejoramiento por métodos convencionales tiene por objetivo la búsqueda de genotipos superiores o grupos de genotipos relacionados para un nicho agroecológico en particular (MAC KEY y QUALSET, 1986).

El mejoramiento convencional en sus primeras etapas se ha desarrollado en base a la variabilidad existente, la cual se vio favorecida por el desarrollo de nuevos métodos de recombinación aumentando así la variabilidad existente (ALLARD, 1960).

La creación de nuevas variedades en especies de autofecundación se basa en el incremento de la variabilidad existente. Los métodos utilizados para incrementar esta variabilidad son principalmente; la introducción, la selección y la hibridación (ALLARD, 1960).

La introducción de especies relacionadas es uno de los métodos más ampliamente usados y se basa en la selección de individuos introducidos con mejor adaptabilidad a un nuevo nicho agroecológico. La selección es un proceso natural o artificial, mediante el cual se separan plantas individuales o grupos de las mismas, dentro de poblaciones que presentan variación genética, siendo esto la base de todo sistema de mejoramiento (POEHLMAN, 1965).

La selección puede ser: a) Masal que corresponde a la selección de un grupo de plantas similares que se cosechan mezclando su semilla, y b) Selección de líneas puras: corresponde a la progenie descendiente por autofecundación de una planta individual homocigota (LELLEY, 1976).

La hibridación en especies de autofecundación corresponde a la hibridación o cruce artificial entre dos variedades y posterior selección de individuos que posean un comportamiento agronómico deseado. Se seleccionan características cualitativas y cuantitativas que sean superiores a las expresadas por sus progenitores (SIMMONDS, 1979).

La hibridación intervarietal es el método de recombinación más frecuentemente aplicado en mejoramiento convencional. Esta se basa en una cuidadosa evaluación de los padres, en donde el material materno es el que posee las características conocidas (adaptabilidad, rendimiento, calidad, entre otras), el cual se quiere mejorar con un nuevo tipo (MAC KEY y QUALSET, 1986).

Otra herramienta utilizada es la hibridación interespecífica, usada sólo para propósitos especiales, como por ejemplo, las cruces *Triticum x Aegilops* con el objetivo de introducir genes de una especie a otra. Un caso especial son las hibridaciones intergenéricas, siendo el *Triticale* el resultado de una cruce entre trigo con centeno (LELLEY, 1976).

2.2.1 Aplicaciones de la biotecnología vegetal al mejoramiento. Según CAMPOS (1992), la biotecnología es la aplicación integrada de la bioquímica, la genética, la microbiología y el cultivo de tejidos vegetales, con el fin de identificar y manipular la información genética. Del mismo modo es posible incrementar la variabilidad de una especie y aumentar la cantidad de características deseables para el mejorador.

Una de las técnicas de mayor influencia en la obtención de variabilidad en el mejoramiento, es la micropropagación, ya que además de permitir el intercambio y la conservación de germoplasma se han desarrollado otras herramientas basadas en la micropropagación (KNOTT, 1986). Un ejemplo de esto son la inducción de mutaciones y poliploidia *in vitro*, ya que son más eficientes y se obtienen un menor porcentaje de individuos indeseados. Además, con cultivo *in vitro* se ha podido romper barreras interespecíficas de cruzamientos que normalmente no son viables (MUÑOZ y HEWSTONE, 1995).

Estos mismos autores señalan que, para la evaluación y comercialización de nuevas variedades es necesario que posean un alto nivel de homogeneidad. Una herramienta biotecnológica que favorece la rápida fijación de caracteres es la producción de dobles haploides. Esto se debe a que estas plantas inicialmente poseen la mitad de la dotación cromosomal, la cual, luego de la duplicación con colchicina se restablece obteniendo así el doble haploide.

Al comparar los sistemas de obtención de homocigosis, CAMPOS (2000), señala que es posible la fijación de los caracteres genéticos en solo dos temporadas con el uso de doble haploide, lo cual permite aumentar la eficiencia de mejoramiento. Con el sistema convencional de autofecundación, la homocigosis se lograba en alrededor de 6-7 temporadas y nunca llega a ser 100% como en el caso de doble haploide.

Las formas para producir dobles haploides en plantas son: el cultivo de anteras, cruza interespecíficas o la ginogénesis, en el cual ovarios no polinizados u óvulos de trigo son inducidos a formar callo en un medio de cultivo. Estos métodos presentan distintos niveles de eficiencia (KNOTT, 1986).

Una de las ventajas más importantes en la obtención de dobles haploides según CAMPOS (2000), es permitir una selección temprana de individuos genéticamente estables. Esta selección precoz puede realizarse de forma convencional o apoyada por marcadores moleculares.

2.2.3 Complementación del mejoramiento convencional y la biotecnología. De acuerdo con CAMPOS (1992), el mejoramiento convencional se ha complementado con la biotecnología, ya que ambos tienen como objetivos la búsqueda de variabilidad genética y fijación de la misma, seleccionando materiales adecuados y liberándolos posteriormente como variedades (Figura 2).

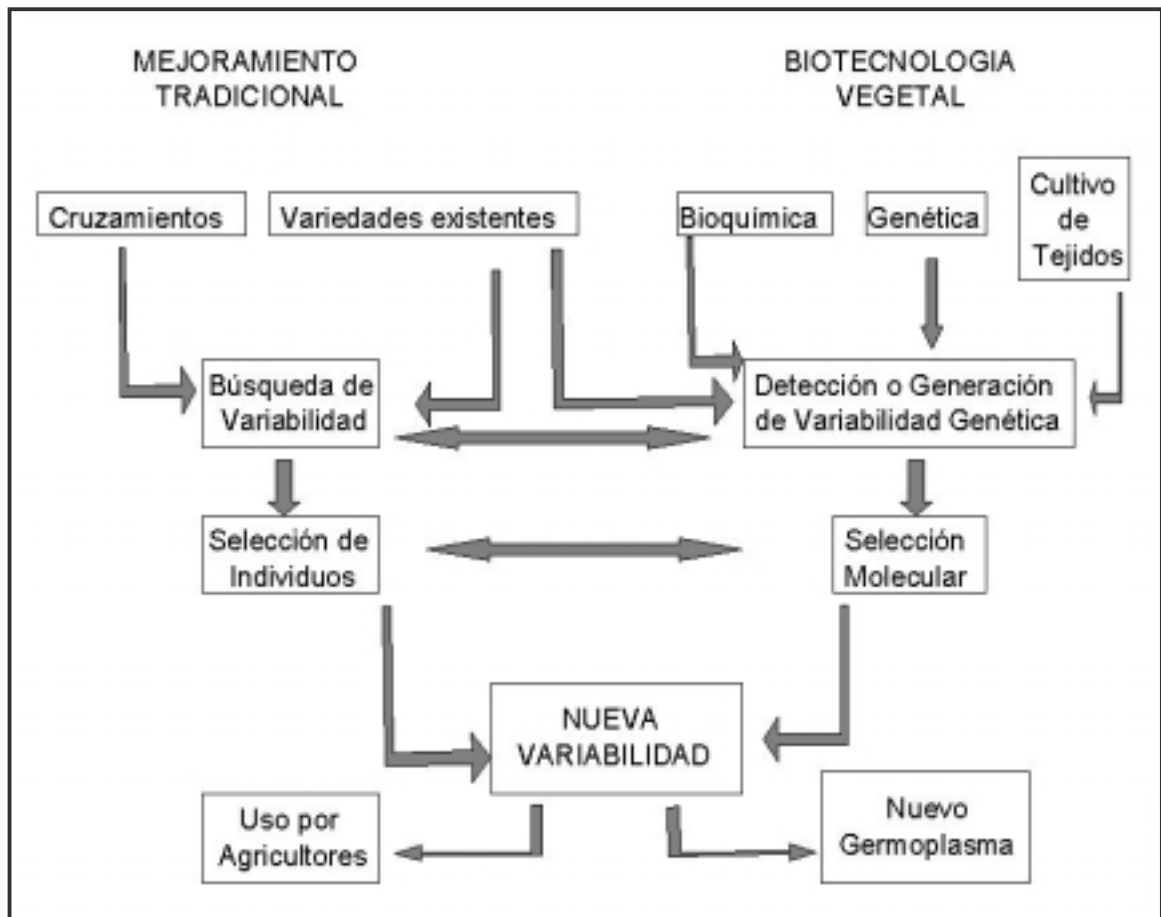


FIGURA 2. Esquema del mejoramiento tradicional complementado con herramientas biotecnológicas.

FUENTE: Adaptado de (CAMPOS, 1992).

2.3 Marcadores moleculares.

“Se define como marcador molecular a toda variabilidad de naturaleza bioquímica/molecular susceptible de ser asociada a algún parámetro morfológico agronómico” (CAMPOS, 1995).

Para este mismo autor, los marcadores moleculares se caracterizan por permitir la inequívoca diferenciación de los progenitores y ser transmitido en forma estable en la progenie.

2.3.1 Marcadores fenotípicos o bioquímicos. Los marcadores fenotípicos o bioquímicos más comunes son, las isozimas y las proteínas de reserva (CAMPOS y SALVO, 1995).

Las isozimas corresponden a las múltiples formas moleculares que comparten un sustrato y actividad enzimática idéntica o similar pero presentan un comportamiento electroforético distinto lo cual permite identificarlas. Por su naturaleza fenotípica el nivel de polimorfismo detectado no es elevado y poseen una herencia mendeliana codominante. (GRATTAPAGLIA y FERREIRA, 1996).

Las proteínas de reserva se caracterizan por ser abundantes en las semillas, tiene la ventaja de que el grado de polimorfismo detectado es elevado, pero presenta la desventaja que el número de locus detectado es reducido resultando en una discriminación genotípica no muy elevada (CAMPOS, 1995).

2.3.2 Marcadores genotípicos. De acuerdo con JOBET *et al.* (2001), un marcador genotípico se puede definir como un segmento de ADN de un individuo fácil de detectar y a menudo anónimo, que al estar en estrecha asociación genética con alguna característica agronómica importante y puede ser utilizado para identificar individuos portadores de ese carácter.

Algunas técnicas de marcadores genotípicos se basan en la variabilidad de las secuencias genéticas (ADN), entre estas técnicas destacan los, RFLPs, RAPDs, AFLP y marcadores hipervariables (SSR) (CAMPOS, 1995).

En los RFLPs (fragmentos de restricción polimorficos), el polimorfismo está dado por el tamaño del fragmento de ADN que se genera al ser digerido por una enzima de restricción. Este ADN posteriormente se separa por electroforesis, luego es hibridado con sondas marcadas con isótopos radiactivos o no radiactivos, revelándose en una fuente de rayos X (GRATTAPAGLIA y FERREIRA, 1996).

De acuerdo con CAMPOS y SALVO (1995), esta técnica permite un excelente cubrimiento del genoma exhibiendo una herencia mendeliana codominante.

La técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) permite amplificar una secuencia específica de bases del ADN a través de ciclos térmicos secuenciales que permiten denaturar y posteriormente sintetizar ADN (CAMPOS, 1995).

El proceso se basa en la enzima ADN polimerasa la cual es termoresistente y proviene de las especies *Thermus aquaticus*, *T. flavis* y *T. thermophilus*. (KRAWETZ, 1989). El punto de partida de la amplificación está dado por partidores (primers), los cuales hibridizan al ADN en secuencia complementaria a ellos (CAMPOS, 1995).

El ciclo PCR envuelve 3 etapas: desnaturación de la hebra de ADN por la elevación de la temperatura a 90-96° C, seguido de una etapa de acoplamiento en donde la temperatura es reducida a 35-60°C y finalmente la temperatura se eleva a 72°C para que la enzima *Taq* polimerasa realice la extensión a partir de los partidores. Este ciclo puede repetirse entre 20-35 veces, generando una gran cantidad de secuencias específicas de DNA las cuales pueden visualizarse en geles de agarosa al ser teñidos con bromuro de etidio (GRATTAPAGLIA y FERREIRA, 1996). (Figura 3).

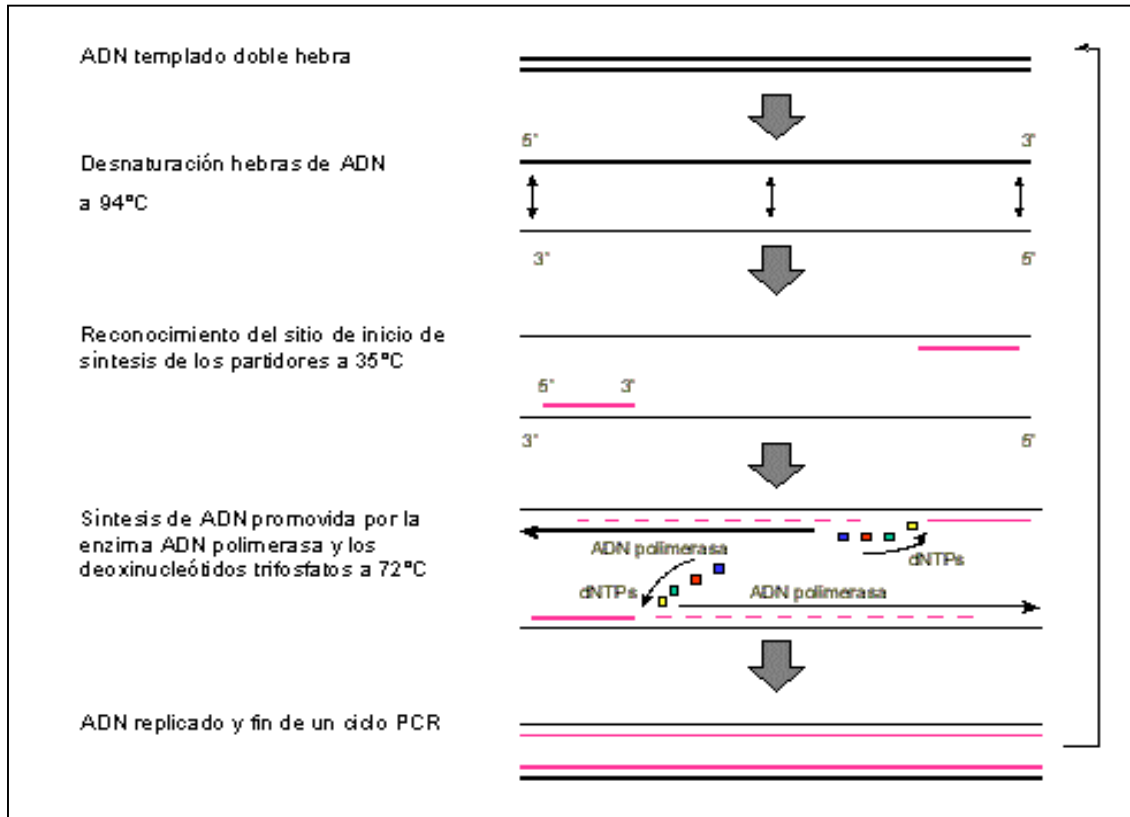


FIGURA 3. Reacción de la polimerasa en cadena PCR.

FUENTE: GRATTAPAGLIA y FERREIRA, (1996).

Basados en la técnica PCR se han desarrollado otras técnicas para detectar marcadores moleculares como, RAPD, AFLP y microsatelites, entre otros.

La técnica RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimorfo), se basa en el uso de un partidor arbitrario y aleatorio que reconoce áreas situadas a una distancia menor a 4000 pares de bases en donde se induce la síntesis de una nueva hebra de ADN (GRATTAPAGLIA y FERREIRA. 1996). De acuerdo con CAMPOS (1995), la etapa fundamental en RAPD es la identificación de los partidores que permitan detectar un elevado polimorfismo. Una ventaja de los RAPD es el no requerir información previa de la especie para realizarse, por otro lado su desventaja es lo poco reproducible entre distintos laboratorios.

El AFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados) es una técnica que conjuga RAPD con una digestión con enzimas de restricción y se caracteriza por detectar un alto grado de polimorfismo (CAMPOS, 1995). Los AFLP generan un gran número de bandas por gel, facilitando el mapeo genético, además poseen un gran poder de detección de variabilidad genética y con más especificidad que otros marcadores como RAPD. La desventaja es que posee muchas etapas, por lo que se necesita más equipamiento y además requiere una gran calidad de ADN, lo cual aumenta los costos (GRATTAPAGLIA y FERREIRA, 1996)

2.3.3 Aplicaciones de los marcadores moleculares al mejoramiento genético de plantas. La identificación de parentales, identificación de variedades patentadas, certificación de pureza genética, monitoreo de cruzas, estudio de diversidad, distancia genética, construcción de mapas genéticos, mapeo de locis de características cuantitativas (QTL) y selección asistida por marcadores (MAS), son una de las tantas aplicaciones de los marcadores moleculares (GRATTAPAGLIA y FERREIRA, 1996).

El mapeo de QTL tiene grandes aplicaciones en el mejoramiento, esto se debe a que los parámetros más importantes como el rendimiento y la calidad son de naturaleza cuantitativa. Esta naturaleza cuantitativa observada se debe a la acción coordinada de numerosos genes, tales asociaciones de genes y poligenes se definen como QTL, correspondiendo a toda la región del genoma de una especie, en la cual el polimorfismo de un marcador molecular se asocia estrechamente con la expresión de un carácter de naturaleza cuantitativa (CAMPOS y SALVO, 1995).

Por otro lado, la selección asistida por marcadores (MAS), basada en la información generada por marcadores moleculares, presenta grandes ventajas sobre un programa de mejoramiento tradicional principalmente por alcanzar progresos genéticos superiores reduciendo los ciclos de mejoramiento, optimizando así los recursos (CAMPOS y SALVO, 1995).

2.4 Métodos de selección y creación de variedades.

En una población producida por cruzamientos, los recombinantes o mutantes deseados deben ser detectados y seleccionados de las otras plantas. Esto puede realizarse en etapas tempranas, siendo las características a seleccionar las que condicionaran esa selección. Tradicionalmente los mejoradores han seleccionado por rendimiento de grano y tipo agronómico en etapas tempranas y para calidad en etapas finales. (WRIGLEY y MORRIS, 1996).

“Una variedad corresponde a un grupo de plantas similares entre sí, las cuales por sus características morfofisiológicas se pueden diferenciar de otras variedades de la misma especie” (MELLADO y MADARIAGA, 1996; JOBET, 1987).

La obtención de variedades puede tener varias formas: ya sea a través de selección de materiales nativos o introducidos; introducción de variedades de otras zonas del país y del extranjero; selecciones de poblaciones híbridas (producto de cruzamiento entre 2 o más variedades.); a través de inducción de mutaciones y/o utilizando herramientas biotecnológicas de apoyo. Los métodos más comúnmente utilizados para la obtención de nuevas variedades son la introducción (variedades), lo que conjuntamente con cruzamientos dirigidos de estas variedades, dan como resultado un interesante aporte de material genético. Esto se ve favorecido por el uso de herramientas biotecnológicas lo que da un importante impulso a los proyectos de fitomejoramiento (JOBET, 1987).

La obtención de una variedad por métodos convencionales de mejoramiento a través de selección en poblaciones segregantes producto de la hibridación toma alrededor de 12 años (Figura 4). Este tiempo podría ser reducido al incorporar herramientas biotecnológicas al mejoramiento (JOBET, 1987).

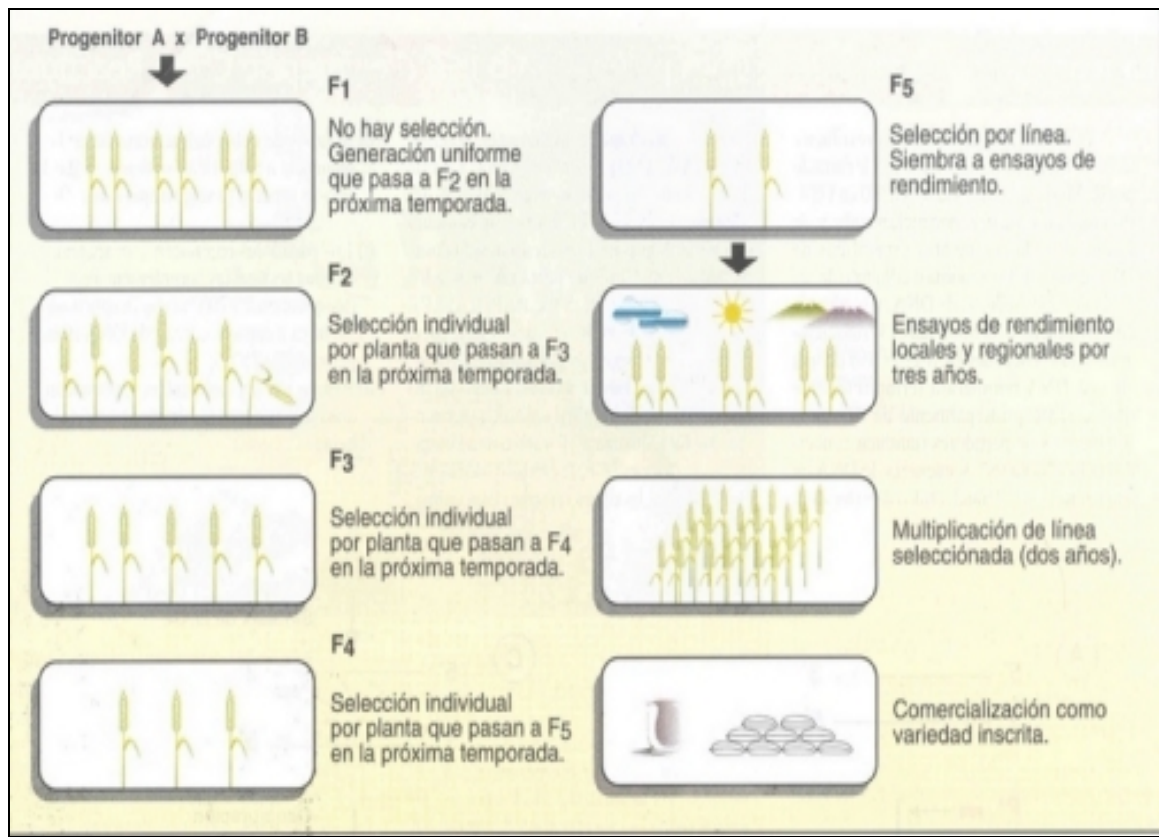


FIGURA 4. Etapas de la creación de una variedad.

FUENTE: CAMPOS (2000).

2.4.1 Selección fenotípica. LELLEY (1976), establece que la selección por características morfológicas es simple, pero la selección por caracteres cuantitativos ej. rendimiento y calidad de la harina, requieren métodos que reduzcan la posibilidad de perder buenas combinaciones en las etapas tempranas de selección.

Según este mismo autor, la selección debe comprender una evaluación sistemática, separando los genotipos deseados en etapas tempranas. Por ejemplo para propiedades de herencia simple, la selección puede realizarse en etapas F2, especialmente si estos son recesivos. Pero en el caso de propiedades determinadas poligenicamente (herencia de características cuantitativas), la selección se recomienda cuando la segregación es moderada.

De acuerdo con MAC KEY y QUALSET, (1986), la herencia de características cuantitativas está determinada por genes múltiples y por la interacción de ellos. En los individuos en que se dan combinaciones superiores de estos genes en relación a sus progenitores se les conoce como segregantes transgresivos.

En la práctica, la heredabilidad de los caracteres es la base para determinar si se debe seleccionar en etapas tempranas. Si la heredabilidad de los caracteres es menor al 50%, la selección debe hacerse en generaciones posteriores. Por el contrario si es sobre un 50% esta puede realizarse en etapas tempranas (LELLEY, 1976).

La habilidad para capitalizar ventajas sustanciales de selección en generaciones tempranas, depende de lo predictivo de los métodos para determinar calidad, los factores genéticos, la influencia del ambiente y sus interacciones (WRIGLEY y MORRIS, 1996).

Los métodos de selección más usados en mejoramiento son: selección masal, selección por pedigrí y retrocruzas. Gracias a estos métodos, los mejoradores han podido obtener variedades de mejores características y de amplia adaptabilidad a diferentes zonas agroecológicas (MAC KEY y QUALSET, 1986).

2.4.2 Selección con herramientas biotecnológicas.

La utilidad práctica de generar variabilidad según CAMPOS (1992), no tiene sentido alguno sin el desarrollo de técnicas que permitan identificar a los individuos deseados entre la población a mejorar, por esta razón se han desarrollado varios métodos de selección.

A) La selección de materiales *in vitro* permite la selección de grupos de células sobre otras ante una presión de selección determinada en el medio. La ventaja de seleccionar *in vitro* es que permite hacer más eficiente la selección, pudiendo trabajar con un número mayor de individuos y en menor espacio (MUÑOZ y CAMPOS, 1998).

B) La selección precoz consiste en buscar e identificar genes de interés agronómico que estén ligados a marcadores. Estos marcadores pueden ser bioquímicos o moleculares, permitiendo seleccionar individuos sin necesidad de hacer evaluaciones de campo o seleccionar individuos con genes asociados a características deseadas en las primeras etapas de selección (MUÑOZ y HEWSTONE, 1995).

2.4.2.1 Selección Asistida por Marcadores (MAS). Según SORRELS y WILSON (1997), los progresos realizados en un programa de mejoramiento convencional dentro de un pool genético son lentos y de menor nivel, ya que solo podrá evaluar un set limitado de alelos. Por esta razón que, la integración de nuevas técnicas y metodologías dentro de programas convencionales son necesarias para facilitar la identificación, manipulación y caracterización de la variación genética y así continuar y acelerar el progreso de mejoramiento.

La integración de mapas moleculares y la información de las secuencias de ADN son la base del mejoramiento molecular asistido ya que facilitan la identificación de genes candidatos o secuencias responsables de características cuantitativas y cualitativas. Cuando uno de estos genes a sido identificado debe ser evaluado para asegurar la directa relación con la característica de importancia y determinar su "Valor alelico" para la característica en cuestión. Esto se realiza a través de correlaciones entre el gen candidato y el efecto fenotípico a evaluar (SORRELS y WILSON, 1997).

Los marcadores moleculares pueden ser aplicados al mejoramiento, en la identificación y combinación de genes deseados, en la selección sobre genes indeseados o la introgresion de genes deseados de diferentes especies y para asegurar la diversidad genética de un determinado germoplasma, entre otras aplicaciones (SORRELS, 1998).

Para CAMPOS y SALVO (1995), el uso de MAS, es la aplicación más inmediata de los marcadores moleculares al sistema de mejoramiento genético. Pero el uso de marcadores se ha visto restringido principalmente al uso de QTL por los costos y el trabajo que implica su desarrollo.

Según SORRELS (1998), el uso de marcadores moleculares tiene el potencial de aumentar la eficiencia de selección, pero posee algunas limitaciones ya que las características más importantes son controladas poligénicamente, no siempre se conocen las características moleculares de los individuos a mejorar y los factores a analizar están influenciados por el medio ambiente lo cual dificulta el análisis.

Sin embargo, a pesar de estas desventajas, la selección asistida por marcadores tiene ciertas ventajas: requiere poca cantidad de ADN y de cualquier tejido de la planta, el análisis se puede realizar en cualquier etapa del desarrollo de la planta y no está influenciado por el medio ambiente (JOBET *et al.*, 2001).

De acuerdo con SORRELS (1998), el costo relativo de la selección asistida por marcadores, va depender del número de individuos a evaluar y de los locis que se quiere detectar. Para características condicionadas por pocos genes, la selección sería favorable en etapas tempranas ya que la gran mayoría de la población posee los alelos deseados, esto resultaría en una población altamente enriquecida de los alelos deseados, solo así los marcadores moleculares tendrían un costo/beneficio razonable.

Los métodos convencionales de mejoramiento han sido efectivos para mejorar características cuantitativas por muchas décadas y sólo cuando la selección asistida por marcadores llegue a ser rutinaria y a un costo razonable puede haber una justificación para su implementación (SORRELS, 1998). Para CAMPOS y SALVO (1995), la tendencia actual se encamina al uso masivo de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético, para lo cual hay que reducir los costos y hacer más eficiente y rápido el proceso.

Los mayores costos asociados a la selección asistida por marcadores moleculares se relacionan al tiempo que se requiere para evaluar el material, por lo que la posibilidad de reducir los costos en sistemas de mejoramiento asistido por marcadores se basa en la capacidad de evaluación de muestras en menor tiempo, con técnicas más simples y mecanización de los procesos.¹

2.4.2.2 Selección directa al alelo (DAS). Este tipo de selección se basa en la caracterización de la variación de un gen y la determinación de su "Valor alelico" relativo. Aún así la caracterización de los alelos está limitada al número de genes clonados o identificados y nuestro conocimiento de la relación entre la secuencia de ADN y la expresión de estos genes. Gracias al desarrollo de partidores extremadamente específicos basados en PCR, se ha permitido una rápida identificación de alelos (CAMPOS y SALVO, 1995).

La mayoría de los programas que realizan selección asistida por marcadores en trigo se enfocan en la selección para gluteninas de alto peso molecular (GAPM). Son menores los esfuerzos en la identificación de marcadores moleculares asociados con dureza de grano y contenido de proteína (KOHLI, 1998).

2.5 Base genética de los principales parámetros de calidad del grano.

Los factores de calidad que se encuentran bajo control génico hacen posible en mayor o menor grado la manipulación por el fitomejorador. Para lograr este objetivo hay que desarrollar tecnologías que permitan determinar características de interés en la calidad del grano para su selección por parte del fitomejorador (PEÑA et al., 1998).

2.5.1 Proteína del grano. El contenido de proteína del grano según GRANGER et al. (1999), puede variar entre 9% y 17%. En Chile las variedades tienen un promedio entre 9.5-12.5%, dependiendo en gran medida de los factores de manejo del cultivo, como

¹ ZUÑIGA, J. (2001). Bioquímico, INIA Carillanca. Comunicación personal.

la fertilización nitrogenada, los factores ambientales (alta humedad y temperaturas frescas a la madurez del cultivo) y del ataque de enfermedades durante la formación del grano, más que los factores genéticos.

Los principales componentes de las proteínas de reserva del trigo han sido clasificadas por KENT (1987), en base a su solubilidad: albúminas (6-12%) solubles en agua; globulinas (5-11%) solubles en sal; y prolaminas (78-85%). Las prolaminas están a su vez formadas por gliadinas, solubles en alcohol, y gluteninas, solubles en ácidos diluidos y álcalis (SHEWRY y TATHAM, 1990).

Otra forma de caracterizar a las prolaminas, es en base a su peso molecular, siendo las gliadinas moléculas de bajo peso molecular distinguiéndose 4 grupos (α , β , γ y ω gliadinas), agrupándose en un total aproximado de 45 componentes. En cambio las gluteninas son moléculas largas y heterogéneas con 19 diferentes subunidades que se dividen en dos grupos, de bajo peso molecular (BPM); y alto peso molecular (APM) (PAYNE, 1987).

Las gluteninas y gliadinas son los componentes principales del gluten en la harina que se forma cuando estas proteínas insolubles hacen contacto con el agua, lo cual le confiere visco-elasticidad a la masa de panificación (PEÑA et al., 1998).

De acuerdo con Weegels (1996), citado por PEÑA et al. (1998), la calidad de la proteína del gluten depende en parte de las gliadinas que confieren viscosidad a la masa. En tanto, las gluteninas dan elasticidad y extensibilidad a la masa lo cual depende de la presencia de unidades específicas de gluteninas conocidas como *GLU-1*, las cuales contribuyen de forma positiva o negativa a la obtención de gluten fuerte y extensible.

Según PAYNE (1987), el peso molecular de las gluteninas está directamente relacionado con la elasticidad, y se hipotetiza que esta variable es controlada por combinaciones específicas de subunidades de glutenina.

Los genes que controlan a las subunidades de gluteninas de APM se ubican en el brazo largo de los cromosomas 1A, 1B, 1D y los genes que controlan a las subunidades de glutenina de BPM, ω y γ gliadinas se ubican en el brazo corto de los mismos cromosoma (1A, 1B, 1D) (PAYNE, 1987).

Por su parte JOHNSON et al. (1985), establecen que la variación genética en el contenido de proteína del grano en poblaciones de trigo es de solo el 5% de la variación total, lo cual hace difícil su manejo genético por los mejoradores.

En el caso de la calidad de la proteína PAYNE et al. (1981), establecen que algunas subunidades de las gluteninas de APM son más efectivas que otras para conferir buena calidad panadera. Además, estas subunidades presentan un efecto aditivo en la calidad proteica, lo cual posibilita el mejoramiento por la búsqueda de las óptimas combinaciones.

Dado que la mayoría de las proteínas que contribuyen a la formación del gluten están bajo control génico, pueden ser manipuladas por los mejoradores para producir variedades con distintos tipos de calidad proteica según su uso final.²

En estudios desarrollados por PAYNE, et al. (1987), se estableció una clasificación de las gluteninas de alto peso molecular según su asociación con el test de sedimentación. Estos resultados establecieron que el alelo 5+10 del loci *GLU-D1* otorga una mejor calidad panadera que el alelo 2+12. Con esta herramienta se desarrolló el índice inglés que clasifica a los alelos de glutenina de alto peso molecular por su aporte en la calidad proteica y en el cual el alelo 5+10 se le otorga un valor relativo de 4 y al alelo 2+12 un valor de 2, siendo el máximo total para el loci *GLU-D1* de 4 (Cuadro 3) y para los tres loci un máximo total de 10 para la mejor combinación de alelos de glutenina de alto peso molecular.

² PEÑA, J. (2001). Bioquímico, Ph. D. CYMMIT. Comunicación personal.

CUADRO 3. Clasificación alélica de las principales subunidades de glutenina de alto peso molecular y su valor de índice inglés.

Puntaje	<i>GLU- A1</i>		<i>GLU- B1</i>		<i>GLU- D1</i>	
	<i>Alelo</i>	<i>Subunidad</i>	<i>Alelo</i>	<i>Subunidad</i>	<i>Alelo</i>	<i>Subunidad</i>
4					d	5+10
3	a	1	i	17+18		
3	b	2*	b	7+8		
3			f	13+16		
2					a	2+12
2					b	3+12
1	c	0	a	7	c	4+12
1			d	6+8		
1			e	20		

2* es la designación de una subunidad

FUENTE: PAYNE et al. (1987).

El alelo 5+10 según el índice inglés, posee el valor relativo más alto entre todos los alelos, siendo el 40% del valor máximo (10), por lo cual es el alelo de mayor relevancia dentro de los alelos de gluteninas de alto peso molecular. Otro factor a considerar es la presencia de translocación trigo/centeno ya que en las variedades que posean el segmento translocado del centeno 1RS, el valor debe ser ajustado ya que la translocación posee un efecto negativo sobre la calidad de la proteína (PAYNE et al., 1987).

Según FLAVELL et al. (1989), la composición alélica del loci *GLU-D1* es el factor de mayor incidencia sobre la calidad panadera del trigo y el alelo 5+10 se encuentra positivamente correlacionado con la fuerza, tenacidad del gluten y un elevado volumen de sedimentación SDS.

Esto concuerda con LAFIANDRA et al. (1993), los cuales establecen que una progenie que posea el alelo 5+10 tiene una mayor cantidad de proteínas de buena calidad que la progenie del alelo 2+12, sugiriendo que este alelo ofrece un buen efecto en la tenacidad de la masa.

A pesar de que ciertas subunidades de alto peso molecular dan un buen índice inglés en relación a la calidad panadera, hay algunos casos en que el índice obtenido no se relaciona con la buena calidad industrial, apareciendo con valores bajos pero excelente sedimentación. Esto se debería a la influencia de las gluteninas de bajo peso molecular y las gliadinas por los efectos aditivos que estos grupos de proteínas tienen (HEWSTONE y HINRICHSEN, 1994; ARCOS, 2001).

2.5.2 Dureza del grano. La dureza del grano influye en las propiedades de molienda del trigo afectando el tiempo y el consumo de energía durante la misma, así como los niveles de almidón dañado (grano de almidón fracturado durante la molienda) en la harina. Esto se debe a que la proteína y el almidón están más íntimamente unidos entre sí (LILLEMO, 2001a).

El almidón, (65 a 75% base seca del grano), tiene poco efecto en la calidad de la harina, pero el almidón dañado mecánicamente durante la molienda afecta la absorción de agua, los requerimientos de fermentación de la masa, la suavidad, textura de la miga de pan y el tiempo de envejecimiento (pérdida de suavidad), esto se debe a que el almidón que es dañado durante la molienda incrementa considerablemente la absorción de agua por los componentes del grano de almidón como la utilización de los mismos durante la fermentación (PEÑA et al., 1998).

De acuerdo con JOLLI et al. (1996), en los trigos suaves, el principal plano de ruptura ocurre en la interfase de la matriz de proteína-almidón, resultando en la separación de los granos de almidón de la matriz con pequeño daño durante la molienda. Es por esta razón que, los granos de almidón de los trigos suaves absorben menos agua cuando forma la masa.

Una proteína de los granos llamada friabilina esta presente en la superficie del almidón de trigos suaves en alta cantidad, en trigos duros en pequeñas cantidades y completamente ausente en los trigos candeales (*Triticum durum*). Es por esta razón que

la friabilina es un marcador bioquímico para determinar la dureza genotípica del grano ya que ésta se correlaciona directamente y sin excepciones con la textura del grano (BETTGE y MORRIS, 2000).

Para LILLEMO (2001a), un posible rol de la friabilina sería a través de la estabilización de la membrana lipídica durante la desecación del grano. La friabilina prevendría que el amiloplasto colapse totalmente y haría que el grano de almidón se separe de matriz de proteína con una pequeña capa de membrana remanente determinando la textura del endosperma. En trigos de textura dura, las puroindolinas mutadas que forman la friabilina no estabilizan la membrana durante la desecación, causando un contacto más fuerte entre la matriz de proteína y los granos de almidón.

El análisis de esta proteína indica una mezcla de dos o más polipéptidos discretos llamados puroindolinas (puroindolina a y puroindolina b respectivamente) y GSP1 (proteínas del grano suave). Las puroindolinas son proteínas especiales por ser ricas en triptofano y poseer un dominio hidrofóbico, lo cual le otorga afinidad para unir lípidos (GIROUX y MORRIS, 1998).

La textura de grano es controlada por un factor genético mayor denominado locus hardness (Ha), ubicado en el brazo corto del cromosoma 5D. Este locus está formado por el gen *Pin-a* *Pin-b* y GSP1, los cuales están estrechamente ligados (GIROUX et al., 2000). Según estos mismos autores, las mutaciones en *Pin-a* o *Pin-b* muestran una estrecha relación con el nivel de dureza del grano lo cual sugiere que las variaciones en los alelos de puroindolinas afectan directamente la textura del grano y que el locus Ha está compuesto por los genes *Pin-a* y *Pin-b* y GSP1.

De acuerdo a lo anterior, MARTÍN et al. (2001), establecieron que la textura suave es expresada por los alelos silvestres de puroindolinas, la puroindolina-a está codificada por el alelo (*Pina-D1a*) y la puroindolina-b por el alelo (*Pinb-D1a*), las mutaciones en estos alelos que codifican para la puroindolina a y b están asociados con

la textura dura de grano. La mayoría de los trigos duros tiene la mutación b de la *Pin-b* (alelo *Pinb-D1d*), o la mutación en la *Pin-a* (alelo *Pina-D1b*). La mutación en la *Pin-a* tiende a presentar un fenotipo más duro que en *Pin-b*.

Otras mutaciones han sido descritas sobre la *Pin-b* según LILLEMO y MORRIS (2001), dos mutaciones adicionales fueron encontradas en la *Pin-b* (*Pin-b* D1c y *Pin-b* D1d). Otros estudios realizados por MORRIS *et al.* (2001), han descrito 3 nuevas mutaciones en la *Pin-b*, incluyendo todas ellas codones de término en su secuencia (Cuadro 4).

CUADRO 4. Tipos de puroindolinas, cambio molecular y fenotípico.

Alelos <i>Pin a</i>	Alelos <i>Pin b</i>	Cambio molecular	Fenotipo	Referencia
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1a</i>	----	Suave, tipo silvestre	GIROUX y MORRIS (1997).
<i>Pina-D1b</i>	<i>Pinb-D1a</i>	Desconocido	Duro <i>Pina</i> nulo	GIROUX y MORRIS (1998).
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1b</i>	Gly-46 por Ser-46	Duro	GIROUX y MORRIS (1997).
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1c</i>	Leu-60 por Pro-60	Duro	LILLEMO y MORRIS (2000).
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1d</i>	Trp-44 por Arg-44	Duro	LILLEMO y MORRIS (2000).
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1e</i>	Trp-39 por codon de termino	Duro <i>Pinb</i> nulo	MORRIS <i>et al.</i> (2001).
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1f</i>	Trp-44 por codon de termino	Duro <i>Pinb</i> nulo	MORRIS <i>et al.</i> (2001).
<i>Pina-D1a</i>	<i>Pinb-D1g</i>	Cys-56 por codon de termino	Duro <i>Pinb</i> nulo	MORRIS <i>et al.</i> (2001).

FUENTE: LILLEMO (2001a).

Las mutaciones en la puroindolina a y b explican más del 60% de la variación observada en la textura de grano. Sin embargo, ésta no puede explicar todo el efecto en la dureza del grano por lo cual se necesitan más estudios para determinar si hay más genes ligados a los genes de puroindolina ya descritos (GIROUX *et al.*, 2000).

2.5.3 Sedimentación. La sedimentación de la harina está directamente relacionada con la fuerza del gluten, la cual depende de la interacción de las gluteninas y las gliadinas. La forma de determinar la fuerza del gluten es a través del análisis de sedimentación, siendo el más común el SDS-test que mide la capacidad de hidratación y expansión de la proteína del gluten en un medio ligeramente ácido, donde valores altos de sedimentación corresponden a harinas de trigo de mayor fuerza (PEÑA *et al.*, 1998).

La sedimentación esta altamente correlacionada con las gluteninas de alto peso molecular (MONEEN *et al.*, 1982). CARTER *et al.* (1999), agregan que, el volumen de sedimentación ha sido asociado con la fuerza del gluten y buena calidad panadera. Por lo tanto cultivares con diferentes calidades de gluten pueden ser diferenciados por el volumen de sedimentación.

Para PETERSON *et al.* (1992), el volumen de sedimentación es un buen indicador de la calidad de proteína pero está fuertemente influenciado por el contenido total de proteína. Baik *et al.*, 1994, citado por estos mismos autores señala que, el efecto del contenido de proteína sobre la sedimentación puede ser corregido al multiplicar el volumen de sedimentación por el contenido de proteína y luego dividir por diez.

No solo el contenido de proteína influye en el volumen de sedimentación, según CARTER *et al.* (1999), también puede ser altamente influenciado por el medio ambiente, año de cultivo y interacción del cultivar. Aun así, para PETERSON *et al.* (1992), el volumen de la sedimentación es un parámetro altamente heredable y puede ser usado en selecciones tempranas en la progenie.

Según los índices de sedimentación (SDS-test), los trigos pueden clasificarse en trigos de calidad fuerte, trigos intermedio y trigos suaves. Valores menores a 27 mL (trigo suave), entre 27-32,9 mL (trigo intermedio) y mayores a 33 mL (trigo fuerte) (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION, 2000).

2.5.4 Translocación trigo-centeno 1BL/1RS. El trigo posee genomas de tres especies ancestrales diferentes. Además, cromosomas de otras especies derivadas de la tribu Triticeae pueden sustituir parcial o completamente, los cromosomas del trigo. Aunque los cromosomas hibridizan con éxito, éstos no se pueden aparear ni recombinar con los cromosomas del trigo. La translocación del brazo corto del cromosoma (1RS) del centeno al trigo es la forma más común de translocación presente en el trigo (FRIEBE *et al.*, 1996).

Típicamente, la translocación trigo-centeno se desarrolla por quiebres en el cromosoma al nivel de los centromeros, seguido por un cambio y fusión de los respectivos brazos de los cromosomas (BERZONZKY y FRANCKI, 1999).

La translocación 1R del centeno se han transferido al trigo en forma de 1AL/1RS, 1BL/1RS, 1DL/1RS, de las cuales las primeras, han tenido un gran impacto en el mejoramiento del trigo (GRAYBOSH, 2001).

Según RABINOVICH (1998), la translocación 1BL/1RS tiene tres orígenes independientes, 2 provenientes de Alemania y uno de Japón, siendo ampliamente utilizados en programas de mejoramiento alrededor de todo el mundo.

Los efectos de la translocación sobre las variedades de trigo son conferir resistencia a pestes y enfermedades, sin embargo, esta translocación resulta en grandes alteraciones en la calidad de la proteína y por ende panadera (GRAYBOSH, 2001).

Esto se debe, a que genes deseables del centeno traen asociado proteínas que alteran la composición del grano en los cultivares de trigo. Estas proteínas de reserva del centeno, llamadas Secalinas, codificadas en el complejo loci Sec-1 (GRAYBOSH *et al.*, 1999 y WIESER *et al.*, 2000).

1RS contiene el locus Sec-1, un complejo locus que codifica dos tipos de proteína de almacenaje del centeno: las γ -Secalinas y las ω -Secalinas. Cuando la 1RS esta presente el loci que codifica a las subunidades de BPM del trigo se pierde, en particular las del brazo corto (1AS, 1BS o 1DS) del cromosoma envuelto. En la translocación, la presencia de Secalinas del centeno asociadas con la perdida de gluteninas BPM y gliadinas del trigo, causan gran deterioro en la calidad de la proteína del trigo. (BERZONZKY y FRANCKI, 1999).

Para McKENDRY et al. (1996), el efecto sobre la calidad del trigo con la presencia del cromosoma 1RS varia con la carga genética se han detectado diferencias significativas entre los cultivares que poseen la translocación 1RS, por lo cual una buena selección de padres en cruza con trigos translocados disminuiría el efecto negativo.

Por ejemplo, la variedad “Kavkaz” que presenta la translocación 1BL/1RS, además de poseer genes de resistencia a pestes y enfermedades, ha demostrado un incremento en el contenido de proteína y rendimiento de grano. Hay varias líneas que los mejoradores consideran buenos padres para programas de cruzamientos por que desarrollan buenas progenies (GRAYBOSH et al., 1993).

La identificación de la translocaciones en trigo se ha realizado de diferentes formas, por ejemplo, la identificación de alelos específicos de resistencia a enfermedades (FRIEBE et al., 1996); identificación de las proteínas de almacenamiento del centeno (γ -Secalinas y las ω -Secalinas), por medio de (sodium docedyl sulfato) SDS-PAGE (GRAYBOSH et al., 1993); A través de fase reversa HPLC (WIESER et al. 2000), y por reflectancia en el infrarrojo cercano (NIR) (DELWICHE et al., 1999).

3 MATERIAL Y METODO

La tesis se desarrolló en los Laboratorios de Biotecnología y Semillas así como en la Estación Experimental del CRI-Carillanca, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en el Km 10 camino Vilcún, Temuco, Novena Región. Este estudio desarrollado durante los años 2001/2002, fue financiado por el proyecto FONDEF D98I1074 adjudicado por INIA-CRI Carillanca en 1998.

3.1 Material vegetal

El material experimental analizado correspondió a material segregante F_3 - F_4 derivado de siete diferentes cruza pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Trigo del INIA-CRI Carillanca. De cada cruza se tomó un mínimo de dos muestras por hilera, detallando el número de hileras por cada cruza en la Figura 5. Se estimó una presión de selección del 10% mejor de la población experimental.

Las características de los padres y las cruza se detallan en el Cuadro 5.

CUADRO 5. Origen y altura de planta de las variedades de trigo utilizadas como progenitores, (Temporada 2000/2001).

Genotipo	Origen	Altura planta (cm)
Genial	Francia	110
Pukem	Chile	100
Baroudeur	Francia	100
Renaico	Chile	105
Avital	Francia	100
Kona	Chile	110
Renan	Francia	105
Dalcahue	Chile	110

FUENTE: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA CARILLANCA, 2000. (Proyecto FONDEF D98I1074).

CUADRO 6. Características genéticas de las variedades de trigo utilizadas como progenitores.

Cultivar (Cruza)	Traslocación	Tipo de puroindolina [‡]	GLU ₅₊₁₀	Alelos gluteninas [†]
Genial (macho)	-	<i>Pinb</i> -D1b	+	0/7/5+10
Pukém (hembra)	-	<i>Pinb</i> -D1a	-	2/17+18/2+12
Baroudeur (macho)	-	<i>Pinb</i> -D1a	-	0/7+9/2+12
Renaico (hembra)	+	<i>Pinb</i> -D1b	-	1/17+18/2+12
Avital (macho)	-	<i>Pinb</i> -D1b	-	0/7/2+12
Renaico (hembra)	+	<i>Pinb</i> -D1b	-	1/17+18/2+12
Baroudeur (macho)	-	<i>Pinb</i> -D1a	-	0/7+9/2+12
Kona (hembra)	-	<i>Pinb</i> -D1a	+	2*/7+8/5+10
Avital (macho)	-	<i>Pinb</i> -D1b	-	0/7/2+12
Kona (hembra)	-	<i>Pinb</i> -D1a	+	2*/7+8/5+10
Rénan (Macho)	-	<i>Pinb</i> -D1b	+	2*/7+8/5+10
Dalcahue (hembra)	-	<i>Pina</i> -D1b	+	1/13+16/5+10
Baroudeur (macho)	-	<i>Pinb</i> -D1a	-	0/7+9/2+12
Dalcahue (hembra)	-	<i>Pina</i> -D1b	-	1/13+16/5+10

+ y - Presencia y ausencia del gen/alelo respectivamente. [‡]Diferentes mutaciones en genes de dureza.

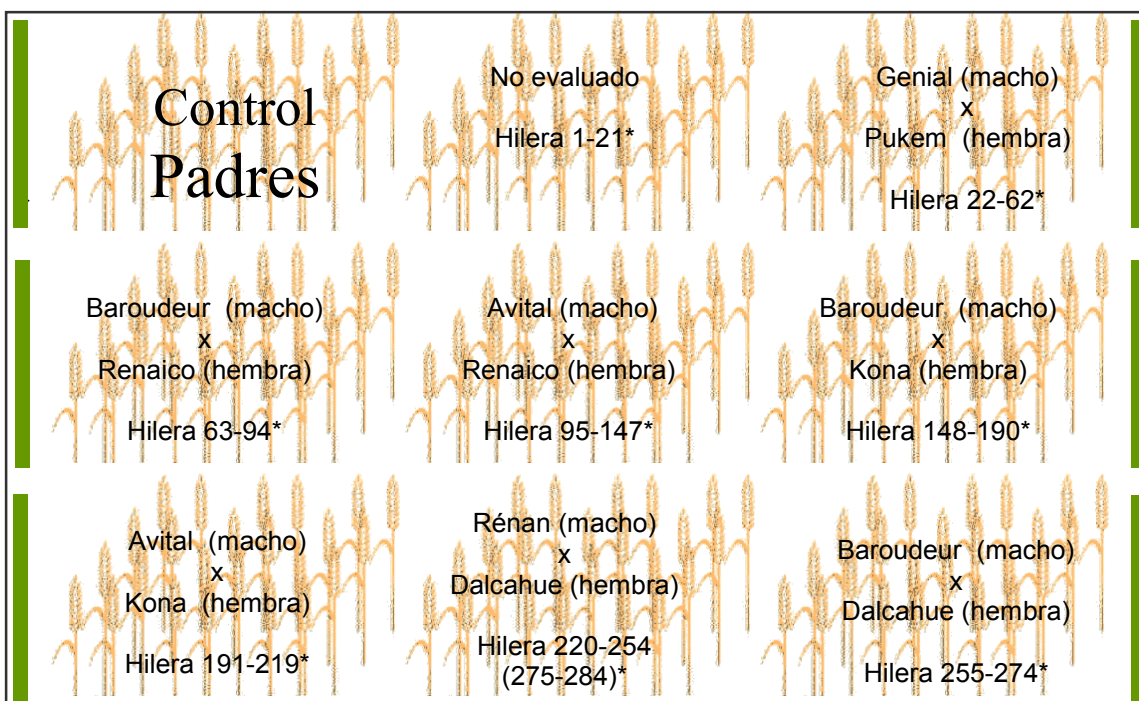
[†] Diferentes alelos de gluteninas (APM), ubicados en los genomas A/B/D respectivamente.

FUENTE: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA CARILLANCA, 2000. (Proyecto FONDEF D98I1074).

3.2 Método.

Las poblaciones segregantes, producto de las 7 cruzas, especificadas en el Cuadro 5, fueron seleccionadas hasta nivel F₃, según el esquema de selección convencional seguido por el Programa de Mejoramiento de Trigo del CRI-Carrilanca desarrollado durante los años 1998-2000.

3.2.1 Población experimental. Las cruzas fueron conformadas en distintas hileras dándoles un orden correlativo. Cada hilera deriva de la selección de una espiga a nivel F₂. Las hileras tuvieron un largo de 5 metros con aproximadamente 20 plantas por hilera. La distancia entre hileras fue de 30 cm. El orden de las cruzas se detalla en la Figura 5.



* Se seleccionó un promedio de 3 plantas sobre la hilera, no seleccionando plantas en todas las hileras.

FIGURA 5. Esquema de la distribución y ubicación de las diferentes cruzas analizadas en terreno.

3.2.2 Selección fenotípica (Etapa 1). Se realizó una selección fenotípica en terreno, según los parámetros establecidos por el Programa de Mejoramiento de Trigo del CRI-Carillanca, en los cuales se incluyó:

- Selección fitosanitaria: se seleccionaron plantas dentro las progenies que presenten buenos niveles de tolerancia a las principales enfermedades como *Puccinia striiformis*, *P. recondita* y *Septoria tritici*.
- Selección por tipo agronómico. se realizó una selección por altura de plantas menores a 110 cm midiendo la planta desde la base del tallo hasta el ápice de la espiga sin considerar la arista.

3.2.3 Caracterización fenotípica. Dentro de esta caracterización se evaluaron parámetros agronómicos y tecnológicos.

3.2.3.1 Caracterización agronómica. Cada planta seleccionada se caracterizó por la presencia o ausencia de aristas (barbada/mutica).

Para el peso de los 1000 granos, se seleccionaron 100 granos por muestra con dos repeticiones por planta, luego las muestras fueron dejadas a 70° C por 48 h y posteriormente pesadas.

3.2.3.2 Parámetros tecnológicos (Etapa 2). Los parámetros de calidad evaluados fueron, la dureza de grano, el porcentaje de proteína y el índice de sedimentación.

Toma de muestra: cada planta seleccionada fue cosechada individualmente asignándosele el número de la hilera en la cual estaba ubicada y un orden dentro de la hilera. Luego se tomó una muestra de 20 g de granos los cuales se molieron obteniéndose 12 g de harina integral aproximadamente. La muestra fue inmediatamente guardada en un sobre con su identificación para su posterior análisis.

Sedimentación, porcentaje de proteína e índice de dureza: estos parámetros se midieron indirectamente por NIR (reflectancia en el infrarrojo cercano), que permite la selección rápida de cientos de muestras de líneas segregantes (PAYNE *et al.*, 1987).

Por medio de NIR se determinó el contenido de proteína e índice de dureza, herramienta ya utilizada con éxito por DELWICHE, (1998); DUBREIL *et al.* (1998), respectivamente. Además, se realizó análisis NIR de la sedimentación en forma referencial para todas las cruces y en forma comparativa un análisis de sedimentación (SDS test) para la cruce Avital x Kona.

Los valores obtenidos a partir del análisis NIR se basan en una calibración realizada con un grupo de 47 muestras estándares a las cuales previamente se les determinaron sus características de calidad industrial según la Norma Chilena del Instituto Nacional de Normalización referente al trigo harinero (INN, 2000)

La dureza de grano se determinó según Norma Chilena NCh513 por medio del índice de perlado, que se expresa como el porcentaje de material extraído de una muestra de 20 gramos de trigo por medio de un esmeril, lo que produce un desgastamiento el cual se tamiza, se pesa y se expresa en porcentaje, relacionándose los valores más bajos a textura de grano más dura (TAYLOR *et al.*, 1939).

El porcentaje de proteína se determinó de acuerdo a la Norma Chilena NCh513, la cual utiliza el método de Kjendahl para la determinación de este parámetro. La sedimentación se midió mediante el SDS-test, según la Norma Chilena, NCh1237-2000 (INN, 2000).

3.2.4 Caracterización genotípica (Etapa 3). Se evaluó la presencia de 5 alelos, translocación (S.R.C. *RIS-1*), glutenina (*GLU-5+10*), y puroindolina (*Pina-D1a*, *Pinb-D1a* y *Pinb-D1b*), dependiendo si los padres presentan individuos segregantes para estos alelos (detalle en Cuadro 5).

3.2.4.1 Toma de muestras. De las plantas seleccionadas en la Etapa 1 (selección fenotípica), se tomaron muestras de hojas, en estado de antesis (Zadok 65/69) las cuales fueron congeladas en N liquido (-196 °C) y almacenadas en el ultracongelador a -76°C hasta su posterior procesamiento.

3.2.4.2 Extracción de ADN. Se utilizó el protocolo descrito por DOYLE y DOYLE (1987), en donde se sumerge el tejido en N liquido para su trituración con ayuda de un pistón estéril y un motor. Luego se colocaron 500 µL de buffer de extracción precalentado a 65° C en cada tubo y se homogeneizo la solución. Posteriormente se agregaron 50 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), para luego agitar la mezcla 3 minutos en un Vortex. Se incubaron las muestras por 30 min. a 65° C en baño maría mezclando cada 10 min. posteriormente se agregó 1 volumen (500 µL) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló 5 minutos por inversión. Se centrifugo a 14.000 r.p.m. y 4 °C por 5 minutos, recuperando la fase superior (400 µL) y transfiriéndola posteriormente a un tubo nuevo. Se agregaron 2.5 volúmenes (1000 µL) de etanol 96% mezclando con suavidad por inversión, hasta la formación de un pellet de ADN. Luego se centrifugo a 14.000 r.p.m. por 5 minutos para posteriormente eliminar el sobrenadante. Se lavo con 500 µL de etanol 75% y acetato de sodio 0.2 M y agito por 5 minutos. Nuevamente se centrifugo a 14.000 r.p.m. y elimino el sobrenadante. El pellet se seco al vacío (10 minutos) y se agregaron 400 µL de TE para disolver el pellet. Se dejo disolver el pellet a 4° C, durante 12 h. La calidad del ADN se determino por electroforesis en un gel de agarosa. No es necesario cuantificar la preparación por espectrofotometría cuando el resultado en gel es satisfactorio (RIBAUT et al., 1997).

3.2.4.3 Detección del alelo *GLU-Dx5*, subunidad 5+10. La presencia del alelo de glutenina de alto peso molecular (APM) 5+10, fue detectado mediante PCR, utilizando protocolos basados en (D' OVIDIO y ANDERSON, 1994). En caso de la presencia del alelo el largo del producto esperado es de alrededor de 450 bp.

CUADRO 7. Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo *GLU-Dx5*.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Nº Bases
<i>GLU-R</i>	gcc tag caa cct tca caa tc	20
<i>GLU-F</i>	gaa acc tgc tgc gga caa g	19

Componente	Deseado	Stock	Reacción (µl)
DNA	25 ng/25 µl	25 ng/µl	1
Buffer	1 1x	10 10x	2.5
MgCl ₂	3 mM	50 mM	1.5
dNTP	300 µM	2000 µM	3.75
Primer 1	0.4 µM	10 µM	1
Primer 2	0.4 µM	10 µM	1
Formamida	3 %	50 %	1.5
Cresol-Sacarosa	1 x	7.5 x	2
Taq Pol	0.625 U/25 µl	5 U/µl	0.125
Agua (d.d.e)*			10.625
Volumen total	25 µL/tubo		

*Agua destilada desionizada y esteril.

FUENTE: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA CARILLANCA, 2000.

Las condiciones PCR fueron: 30 ciclos de 30s a 94 °C; 30s a 60 °C y 20s a 72 °C para finalizar con una extensión de 7 minutos a 72°C, luego la temperatura es bajada a 4 °C. Los productos PCR fueron separados mediante electroforesis de geles de agarosa (1,5%), corridos a 100V durante 1 hora. Posteriormente, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (0.1 ppm), visualizados en un transiluminador UV y documentado con un sistema digital Kodak 1D.

3.2.4.4 Detección del alelo mutado de puroindolina *Pinb-D1b*. La presencia de la mutación tipo D1b en el gen que codifica para la puroindolina b, fue detectado mediante PCR, utilizando protocolos basados en (GIROUX y MORRIS, 1997). En caso de existir la mutación el largo del producto esperado es de alrededor de 250 bp.

CUADRO 8. Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo mutado de puroindolina *Pinb-D1b* .

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Nº Bases
HRD1	atg aag acc tta ttc ctc cta	21
HRD3	ctc atg ctc aca gcc gct	18

Componente	Deseado	Stock	Reacción (µl)
DNA	100 ng/25 µl	100 Ng/µl	1
Buffer	1 1x	10 10x	2.5
MgCl ₂	2 mM	50 mM	1
dNTP	20 µM	2000 µM	0.25
HRD 1	0.2 µM	4 µM	1.25
HRD 3	0.2 µM	4 µM	1.25
Cresol-Sacarosa	1 x	12.5 x	2.0
Taq Pol	0.625 U/25 µl	5 U/µl	0.125
Agua (d.d.e)*			15.625
Volumen total	25 µL/tubo		

*Agua destilada desionizada y esteril.

FUENTE: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA CARILLANCA, 2000.

Las condiciones PCR fueron: 35 ciclos de 30s a 94 °C; 30s a 60 °C y 45s a 72 °C para finalizar con una extensión de 7 minutos a 72 °C, luego la temperatura es bajada a 4 °C. La separación de los productos PCR, tinción y fotografiado fueron similares a lo indicado en el punto 3.2.4.3.

3.2.4.5 Detección del alelo de puroindolina *Pinb-D1a*. La presencia de la mutación tipo D1b en el gen que codifica para la puroindolina a, fue detectado mediante PCR, utilizando protocolos basados en (GIROUX y MORRIS, 1997). En caso de presencia del alelo el largo del producto esperado es de alrededor de 250 bp.

CUADRO 9. Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo de puroindolina *Pinb-D1a* .

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	Nº Bases
HRD1	atg aag acc tta ttc ctc cta	21
HRD2	ctc atg ctc aca gcc gcc	18

Componente	Deseado	Stock	Reacción (µl)
DNA	100 ng/25 µl	100 Ng/µl	1
Buffer	1 1x	10 10x	2.5
MgCl ₂	2 mM	50 mM	1
dNTP	20 µM	2000 µM	0.25
HRD 1	0.2 µM	4 µM	1.25
HRD 2	0.2 µM	4 µM	1.25
Cresol-Sacarosa	1 x	12.5 x	2.0
Taq Pol	0.625 U/25 µl	5 U/µl	0.125
Agua (d.d.e)*			15.625
Volumen total	25 µL/tubo		

*Agua destilada desionizada y esteril.

FUENTE: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA CARILLANCA, 2000.

Las condiciones PCR fueron: 35 ciclos de 30s a 94 °C; 30s a 60 °C y 45s a 72 °C para finalizar con una extensión de 7 minutos a 72 °C, luego la temperatura es bajada a 4 °C. La separación de los productos PCR, tinción y fotografiado fueron similares a lo indicado en el punto 3.2.4.3.

3.2.4.6 Detección del alelo de puroindolina *Pina-D1a*. La ausencia de la mutación en el gen que codifica para la puroindolina a, fue detectado mediante PCR, utilizando protocolos basados en ZUÑIGA *et al.* (2001a). En caso de presencia del alelo el largo del producto esperado fue de alrededor de 450 bp.

CUADRO 10. Características de los partidores y componentes de mix PCR, del alelo de puroindolina *Pina-D1a*.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	N° Bases	
<i>Pina-L</i>	atg aag gcc ctc ttc ctc a	19	
<i>Pina-R</i>	tca cca gta ata gcc aat agt g	22	
Componente	Deseado	Stock	Reacción (µl)
DNA	50 ng/25 µl	25 ng/µl	2
Buffer	1 1x	10 10x	2.5
MgCl ₂	3 mM	50 mM	1.5
dNTP	250 µM	2000 µM	3.125
Primer 1	0.4 µM	10 µM	1
Primer 2	0.4 µM	10 µM	1
Glicerol	10 %	100 %	2.5
Taq Pol	0.125 U/25 µl	5 U/µl	0.025
Agua (d.d.e)*			11.35
Volumen total	25 µL/tubo		

*Agua destilada desionizada y esteril.

FUENTE: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA CARILLANCA, 2000.

Las condiciones PCR fueron: 35 ciclos de 30s a 94 °C; 45s a 60 °C y 60s a 72°C para finalizar con una extensión de 7 minutos a 72°C, luego la temperatura es bajada a 4 °C. La separación de los productos PCR, tinción y fotografiado fueron similares a lo indicado en el punto 3.2.4.3.

3.2.4.7 Detección de segmentos translocados trigo-centeno. La presencia del segmento heterólogo del centeno IRS se detectó mediante PCR, utilizando protocolos basados en KOEBNER, (1995). En caso de existir translocación el largo del producto esperado es de alrededor de 100 bp.

CUADRO 11. Características de los partidores y componentes de mix PCR, del segmento traslocado del centeno alelo RIS -1.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')	N° Bases		
RYE8	taa ttt ctg ctt gct cca tgc	21		
RYE9	act ggg gtg cac tgg att ag	20		
Componente	Deseado	Stock		Reacción (µl)
DNA	100 ng/25 µl	100	ng/µl	1.00
Buffer	1 1x	10	10x	2.50
MgCl ₂	2 mM	50	mM	1.00
DNTP	80 µM	2000	µM	1.00
Primer 1	0.04 µM	1	µM	1.00
Primer 2	0.04 µM	1	µM	1.00
Cresol-Sacarosa	1 x	7.5	x	3.33
Taq Pol	0.4 U/25 µl	5	U/µl	0.08
Agua (d.d.e)*				14.09
Volumen total	25 µL/tubo			

*Agua destilada desionizada y esteril.

FUENTE: LABORATORIO BIOTECNOLOGIA CARILLANCA, 2000.

Las condiciones PCR fueron: 35 ciclos de 15s a 94 °C; 45s a 65 °C y 45s a 72 °C para finalizar con una extensión de 5 minutos a 72°C, luego la temperatura es bajada a 4 °C en un termociclador (Perkin Elmer). La separación de los productos PCR, tinción y fotografiado fueron similares a lo indicado en el punto 3.2.4.3.

3.2.6 Análisis de resultados. Para cada cruce se evaluaron las frecuencias esperadas y observadas de los marcadores moleculares por medio de un análisis de χ^2 cuadrado.

Adicionalmente para cada cruce se evaluaron las frecuencias de las variables cuantitativas (dureza del grano, porcentaje de proteína y sedimentación).

Se determinaron correlaciones (coeficiente de correlación Puntual-Biserial) entre las características cuantitativas (porcentaje de proteína, índice de dureza, índice de sedimentación) y los marcadores moleculares evaluados.

Se determinó el grado de diferencias entre los tratamientos correspondientes a la “Población base” versus la “Población DAS”. Basados en un análisis de comparación de promedios t student.

En base a estos resultados se determinó el avance genético entre ambas poblaciones según el diferencial de selección que equivale a la diferencia de los promedios entre Población base y DAS (SIMMONDS, 1979), asumiendo que:

$$G = D \times H \quad (3.1)$$

Donde G = ganancia genética, D = diferencial de selección y H = heredabilidad

La caracterización de las poblaciones se realizó en base a los datos fenotípicos y moleculares obtenidos y está en relación a la hipótesis de la investigación.

- **Población base:** corresponde a todas las plantas analizadas por cruce, Anexo 1.
- **Población DAS:** corresponde a una población seleccionada de la Población base basándose en parámetros fenotípicos y moleculares, esta se detalla en Anexo 2.
- **Población Elite:** mejores individuos de la Población base, seleccionados en base a un análisis de parámetros de calidad a través de NIR.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Antecedentes de la calidad panadera de las variedades utilizadas como progenitores.

Ocho cultivares con distinto origen y cualidades fueron utilizados en cruzamientos con el fin de generar poblaciones segregantes con diferentes genes asociados a calidad industrial. Los cultivares utilizados en la presente investigación difieren significativamente en sus bondades genéticas para calidad, estableciéndose una clasificación sobre la base de sus aptitudes molineras y panaderas. Desde este punto de vista, cultivares como Renan, Renaico y Dalcahue han sido clasificadas como trigos fuertes de aptitud directa para elaboración de harinas de pan. Avital, Kona, Genial y Baroudeur, como trigos intermedios, y Pukem como trigo de tipo suave, apto para galleterías³. El porcentaje de proteína medido a través de NIR, índice de dureza (NIR) y sedimentación (NIR y SDS test) de los trigos utilizados como progenitores se detalla en el Cuadro 12.

CUADRO 12. Porcentaje de proteína, índice de dureza y sedimentación de los padres de las cruas evaluadas (año 2001).

Padres	% Proteína (NIR)	Ind. Dureza (NIR)	Sedimentación (NIR)	Sedimentación (SDS test)
<i>Renaico</i>	11	23.1	27.4	43.9
<i>Pukem</i>	9.3	25.6	25.6	34.6
<i>Renan</i>	10.8	22.3	22.3	53.3
<i>Dalcahue</i>	10.7	21.6	21.6	41.7
<i>Genial</i>	10.7	19.7	19.7	45
<i>Baroudeur</i>	10.5	24.4	24.4	53.3
<i>Avital</i>	9.9	18.9	21.3	36.5
<i>Kona</i>	11.6	23.6	27.0	44.0

Estos valores se relacionan con los obtenidos en anteriores análisis de estas variedades, en general se mantiene en todos los casos la relación que existe entre cultivares de buena calidad y de mala calidad.³

³GRANGER, D. 2001. Ing. Agrónomo. GRANOTEC. Comunicación personal

4.2 Caracterización fenotípica y molecular.

Se realizó una caracterización fenotípica y molecular de la población a evaluar. Para este análisis la población total en estudio fue caracterizada como Población base, de la cual se desprende una sub-población llamada Población DAS.

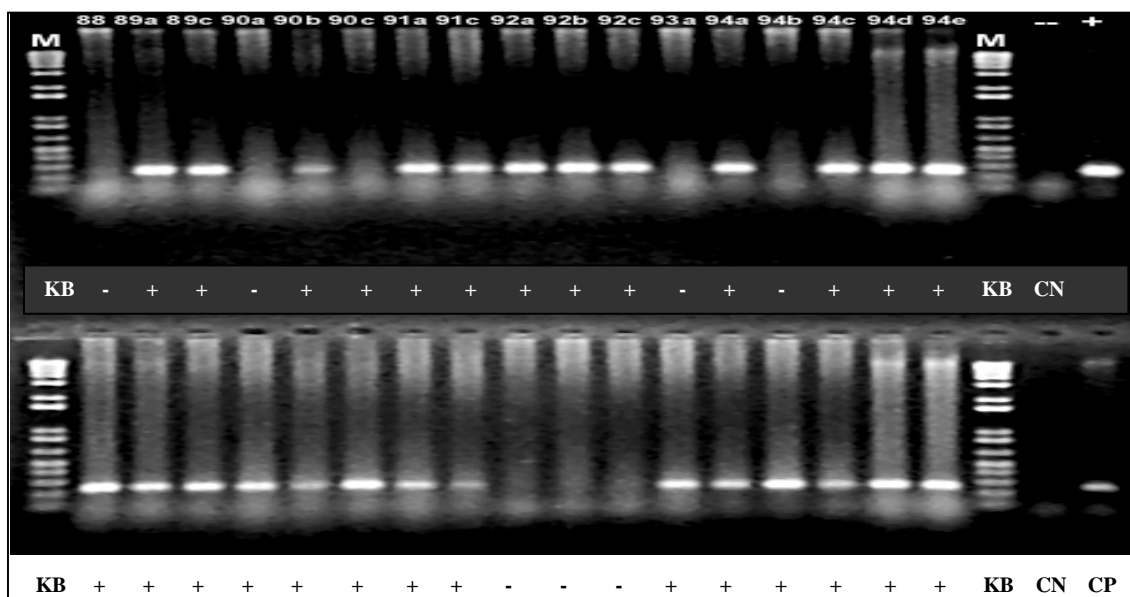
4.2.1 Población base. De la generación F₃ se seleccionaron 429 plantas en forma individual, provenientes de siete diferentes cruces; a este grupo de plantas se denomina “Población base”. Estas plantas fueron caracterizadas según su altura (cm), presencia/ausencia de barba y peso de 1000 granos, los resultados se detallan en el Anexo 1.

Cinco diferentes alelos fueron caracterizados molecularmente por medio de PCR, se caracterizó molecularmente la presencia de alelo de glutenina de APM Glu 5+10, lo cual se ejemplifica en el Anexo 2. Esta metodología molecular ya había sido aplicada en trigo con éxito en programas “MAS” por AHMAD, (2001).

También se determinó la presencia del segmento translocado del centeno con el partidor Ris-1, basados en KOEBNER, (1995), quien identificó secuencias específicas del centeno a través de marcadores moleculares basados en PCR. En esa misma línea, ZÚÑIGA *et al.* (2001b) sin publicar, han detectado individuos translocados a través de PCR, específicamente dominios repetidos en el DNA del genoma del centeno, un ejemplo de los fragmentos producidos en la reacción PCR se detalla en el Anexo 3.

Se caracterizó a la población para tres diferentes alelos de puroindolinas (*Pina* D1a, Anexo 4), *Pinb* D1b y ausencia de *Pinb* D1b, que fue señalado como *Pinb* D1a. En la parte superior de la Figura 6 se observan los individuos que presentan el alelo mutado tipo *Pinb*-D1b y en la parte inferior los individuos que presentan el alelo no mutado determinado como *Pinb*-D1a. Cuando el individuo presenta estos dos alelos se caracterizo como un individuo heterocigoto.

Se establece que por el ligamiento entre las puroindolinas *Pina* y *Pinb* y la ausencia de recombinantes para las mutaciones antes descritas, la falta del gen (*Pina*-D1a), tiene un tipo silvestre en el gen *Pinb* (*Pinb*-D1a) y cuando posee mutado el gen *Pinb* (*Pinb*-1Db), posee un tipo silvestre en el gen *Pina* (*Pina*-D1a) (GIROUX y MORRIS, 1998).



+ Presencia del alelo, - ausencia del alelo, **KB** marcador de peso, **CN** control negativo, **CP** control positivo.

FIGURA 6. Presencia del alelo de mutado de puroindolina *Pinb*-D1b (arriba) y ausencia de este alelo (abajo) en individuos de la craza Avital x Kona.

4.2.2 Población DAS. Sobre la base de los datos moleculares y la selección y caracterización fenotípica se realizó una selección asistida basada en marcadores moleculares, la cual dio origen a una sub-población de la Población base, llamada Población DAS la cual se detalla en el Anexo 5.

Los parámetros de selección fueron la complementación de la caracterización fenotípica y de la selección molecular. Para la formación de la Población DAS se seleccionaron plantas de la Población base que presentaban las mejores características agronómicas (menor altura, mayor peso de grano), y que al mismo tiempo presentaran alelos de glutenina de APM subunidad 5+10, algún alelo mutado de

puroindolina y la ausencia de translocación. La presencia de individuos translocados o con la subunidad 2+12 en la Población DAS se debe a su excelente tipo agronómico.

Para evaluar la eficiencia de selección se determino como valores comparativos el promedio de índice de dureza y sedimentación de la Población base y Población DAS con los cuales se realizo el análisis estadístico comparativo.

4.3 Evaluación de la Población base.

En una primera etapa se evaluó la distribución de los parámetros cuantitativos (sedimentación, índice de dureza y porcentaje de proteína), para posteriormente asociar estos parámetros de calidad a los diferentes alelos detectados, estableciendo correlaciones entre los alelos y los parámetros de calidad.

4.3.1 Caracterización de los parámetros de selección y caracterización fenotípica en función de los marcadores moleculares. Los parámetros de selección fenotípica (altura de planta y peso de 1000 granos), fueron evaluados en función de la presencia/ausencia de los marcadores moleculares analizados, translocación (RIS-1), índ. dureza (*Pin* a y b) y glutenina (Glu 5+10).

Las distribuciones de altura de planta y peso de 1000 granos (datos no mostrados), en función de los marcadores evaluados para cada crusa no mostraron diferencias para todos los alelos evaluados, ello se desprende de la inexistencia de correlación entre los marcadores moleculares analizados y los parámetros fenotípicos evaluados.

En el Cuadro 13 se aprecian los pesos promedio de 1000 granos en relación a los marcadores moleculares evaluados para cada crusa. Al comparar los promedios entre los alelos seleccionados solo se observan diferencias significativas (datos no mostrados) entre los alelos de glutenina de APM 5+10/2+12 en dos de las cuatro cruzas que segregaban para este alelo. En todas las otras cruzas y alelos no hubo diferencias significativas, encontrándose en todos los casos un promedio sobre los 44 g.

CUADRO 13. Valores promedio por cruza, para el peso de 1000 granos en función de los diferentes alelos evaluados.

Cultivar (Cruza)	Población Muestral Nº De Plantas Seleccionadas (F3)	Peso de 1000 granos (g)							
		Glutenina 5+10	Glutenina 2+12	<i>Pina, Pinb</i> Mutados	<i>Pina o Pin b</i> Heterocigoto	<i>Pina o Pinb</i> No mutados	Presencia Translocación	Ausencia Translocación	Promedio por cruza
Genial x Pukém	66	49.3 (39)	48.2 (27)	48.4 (20)	47.3 (14)	49.8 (32)			48.6
Baroudeur x Renaico	63			49.3 (22)	49.8 (14)	48.8 (27)	48.6 (37)	49.5 (26)	49.2
Avital x Renaico	74						48.1 (32)	46.0 (42)	47.0
Baroudeur x Kona	54	45.8 (29)	44.7 (25)						45.2
Avital x Kona	44	44.6 (28) *	49.7 (16) *	45.1 (23)	48.3 (9)	47.6 (12)			47.0
Rénan x Dalcahue	76			47.3 (32)	45.6 (18)	46.0 ^Y (26)			46.2
Baroudeur x Dalcahue	52	42.5 (37) *	46.3 (15) *	43.2 (27)		43.9 (25)			44.0
Promedio por alelo	429	45.5	47.2	46.7	47.7	47.2	48.3	47.8	

* Diferencias significativas entre alelos. (n) Numero de Individuos, ^Y Presenta mutación en *Pina*.

Similares resultados se observaron al evaluar los promedios de altura de planta (Cuadro 14). Se detectaron diferencias significativas de altura al comparar los alelos 5+10 y 2+12 en la cruza Baroudeur x Dalcahue y entre los alelos de puroindolina solo en la cruza Avital x Kona.

CUADRO 14. Valores promedio por cruza, para la altura de planta en función de los diferentes alelos evaluados.

Cultivar (Cruza)	Población Muestral Nº De Plantas Seleccionadas (F3)	Altura de planta (cm)							
		Glutenina 5+10	Glutenina 2+12	<i>Pina, Pinb</i> Mutados	<i>Pina o Pin b</i> Heterocigoto	<i>Pina o Pinb</i> No mutados	Presencia Translocación	Ausencia Translocación	Promedio por cruza
Genial x Pukém	66	101.1(39)	100.9 (27)	97.5 (20)	97.1(14)	97.8 (32)			98.9
Baroudeur x Renaico	63			97.5 (22)	96.2 (14)	98.0 (27)	96.6 (37)	98.1 (26)	97.3
Avital x Renaico	74						94.5 (32)	95.2 (42)	94.9
Baroudeur x Kona	54	89.8 (29)	91.6 (25)						90.7
Avital x Kona	44	92.0 (28)	90.0 (16)	89.6 (23) *	90.6 (9)	95.0 (12) *			91.4
Rénan x Dalcahue	76			85.0 (32)	87.9 (18)	86.4 ^Y (26)			86.4
Baroudeur x Dalcahue	52	90.0 (37) *	97.0 (15) *	92.0 (25)		92.2 (27)			92.8
Promedio por alelo	429	93.2	94.9	92.3	92.9	93.9	95.6	96.7	94.2

* Diferencias significativas entre alelos. (n) Numero de Individuos, ^Y Presenta mutación en *Pina*.

Las alturas promedio fueron en general menores a 95 cm, a pesar de que todos los padres que conforman estas cruzas tienen alturas sobre los 100 cm (Cuadro 5). Esto se debe a la fuerte selección fenotípica realizada en terreno con el fin de seleccionar tipos agrónomicamente adaptables a las condiciones prevalentes en el sur de Chile.

La inexistencia de relación entre los marcadores moleculares evaluados y los factores fenotípicos de selección se debe a la independencia que estos factores tienen genéticamente, con ello existe la posibilidad de seleccionar mejores fenotipos en etapas segregantes tempranas, que posean además una buena combinación alelica asociada a factores de calidad, permitiendo una mejor complementación de una selección asistida por marcadores moleculares (MAS).

4.3.2 Frecuencias esperadas y observadas de los marcadores moleculares. La evaluación de las frecuencias observadas versus las esperadas se realizó en base a *ji* cuadrado, cuyo análisis por cruza y número de genotipos evaluados se observan en el Cuadro 15.

CUADRO 15. Número de plantas seleccionadas y valores de *ji* cuadrado para las frecuencias genéticas esperadas en las cruzas evaluadas.

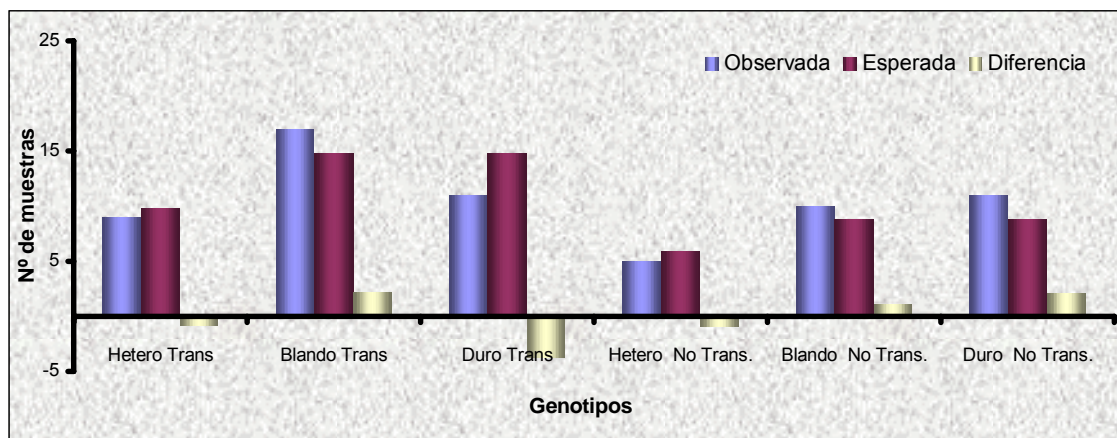
Cultivar (Cruza)	Población Muestral		Caracterización frecuencias genotípicas	
	Nº De Plantas Seleccionadas (F3)	Nº de Genotipos ƒ Determinados (F4)	Valores de <i>ji</i> -cuadrado	
Genial x Pukém	66	6	8.68	
Baroudeur x Renaico	63	6	2.2	
Avital x Renaico	74	2	11.7*	
Baroudeur x Kona	54	2	6.1*	
Avital x Kona	44	6	10.0	
Rénan x Dalcahue	76	3	13.0*	
Baroudeur x Dalcahue	52	4	16.9*	
Total	429			

* Diferencias significativas de las frecuencias esperados vs observados valores de $P < 0.01$.

ƒ Corresponde el Nº de combinaciones alelicas posibles según los alelos que segregan en cada cruza.

Diferencias significativas fueron observadas en 4 de las 7 cruzas evaluadas. Aun así los valores presentan variaciones, siendo este mayor en la cruza Baroudeur x Renaico (Figura 7) con un ($P = 0.82$) en donde se cumplió la distribución mendeliana.

Estos mismos resultados fueron observados en las cruzas Genial x Pukem ($P = 0.12$) y Avital x Kona ($P = 0.07$), pero en menor magnitud.



Hetero: Planta heterocigota para alelo evaluado; **Blando**: planta con ausencia de mutación conocida (Pina-D1b); **Duro**: planta con algún alelo de puroindolina mutado; **Trans/noTrans**: presencia y ausencia de translocación respectivamente.

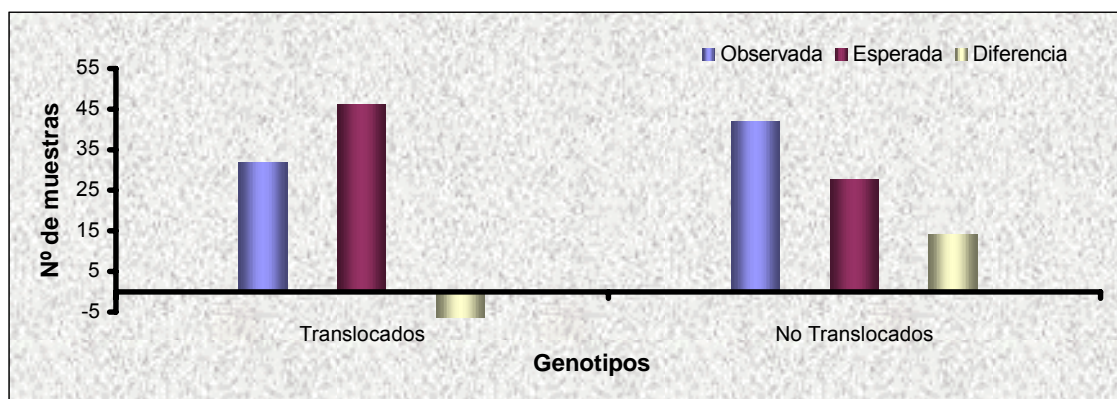
FIGURA 7. Frecuencias observadas vs esperadas en la cruce Baroudeur x Renaico.

El número de genotipos presentes, por ende grados de libertad, tiene un efecto sobre los valores de P . Se observa que las cruces que no presentaron diferencias significativas con las frecuencias mendelianas esperadas, tienen seis genotipos y las cruces que si presentaron diferencias significativas tienen menos de cuatro genotipos.

Esto es explicado por STEEL y TORRIE, (1980), quienes establecen que para cada grado de libertad existe una distribución de valores de χ^2 cuadrado diferente, y que entre mayores sean los grados de libertad más simétrica es la curva que describe estos valores.

En base a lo anteriormente descrito se observa un efecto de dilución de los valores de χ^2 cuadrado al aumentar el numero de genotipos y por lo tanto grados de libertad. Resultados similares fueron obtenidos por ERCOLI, (2002), al evaluar la segregación dihibrida entre alelos de glutenina 5+10 y alelos de dureza con un numero de genotipos igual a seis y en donde no se observaron diferencias entre las frecuencias observadas y las esperadas.

A diferencia de lo observado en la cruce Baroudeur x Renaico, en la cruce Avital x Renaico (Figura 8), la cual solo segrega para un carácter, se obtuvieron las mayores diferencias entre las frecuencias observadas y esperadas ($P = 0.0006$), al igual que para las cruces Baroudeur x Kona ($P = 0.013$), Renan x Dalcahue ($P = 0.0003$) y Baroudeur x Dalcahue ($P = 0.00075$).



Translocado/noTranslocado: presencia y ausencia de translocación respectivamente.

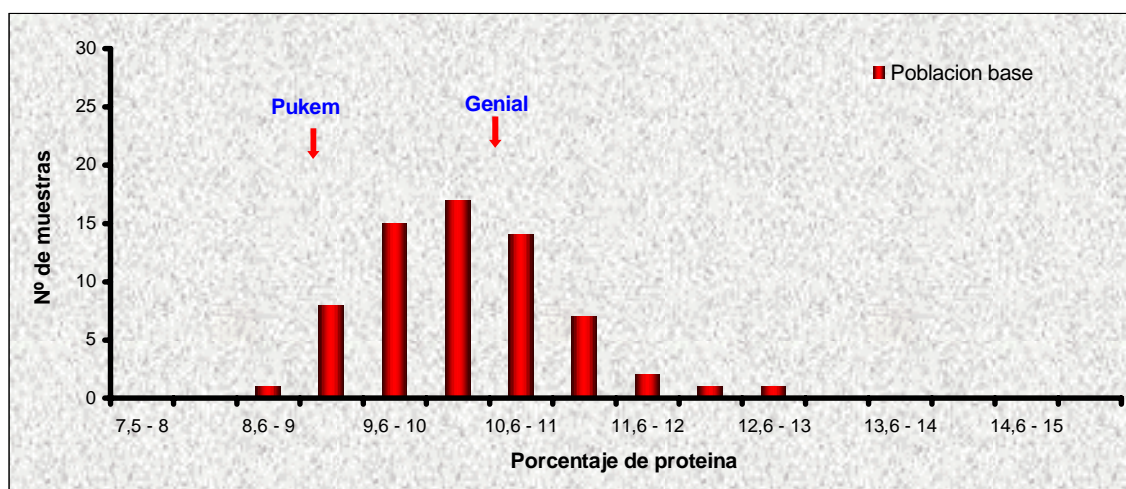
FIGURA 8. Frecuencias observadas vs esperadas cruce Avital x Renaico.

Estos resultados se relacionan a los obtenidos por MARTÍN *et al.* (2001), específicamente para alelos de puroindolina (*Pina-D1b* vs *Pinb-D1b*), quienes evaluaron la segregación de dos alelos en una población de 139 individuos a nivel F_2 en trigo y encontraron diferencias significativas entre la frecuencia observada y la frecuencia esperada (1:1).

Además concuerda con los datos publicados anteriormente por GIROUX y MORRIS, 1997; GIROUX *et al.* 2000, que evaluaron la segregación de alelos de puroindolina obteniendo diferencias significativas con las frecuencias mendelianas al evaluar la segregación de dos alelos en las tres cruces.

4.3.3 Distribución de las variables cuantitativas. Se caracterizó la distribución de los diferentes parámetros de calidad como son el porcentaje de proteína, índice de sedimentación e índice de dureza.

4.3.3.1 Porcentaje de proteína del grano. Se observaron distribuciones normales en todas las cruzas evaluadas, pero con comportamientos diferentes según las cruzas. En las cruzas Genial x Pukem, Baroudeur x Kona, Avital x Kona, Renan x Dalcahue y Baroudeur x Dalcahue, los promedios de las poblaciones generadas se ubicaron entre los valores de ambos padres (Figura 9). En estas poblaciones destacaron un mayor número de transgresivos, los cuales corresponden a los individuos que superan el porcentaje de proteína del mejor de los padres.

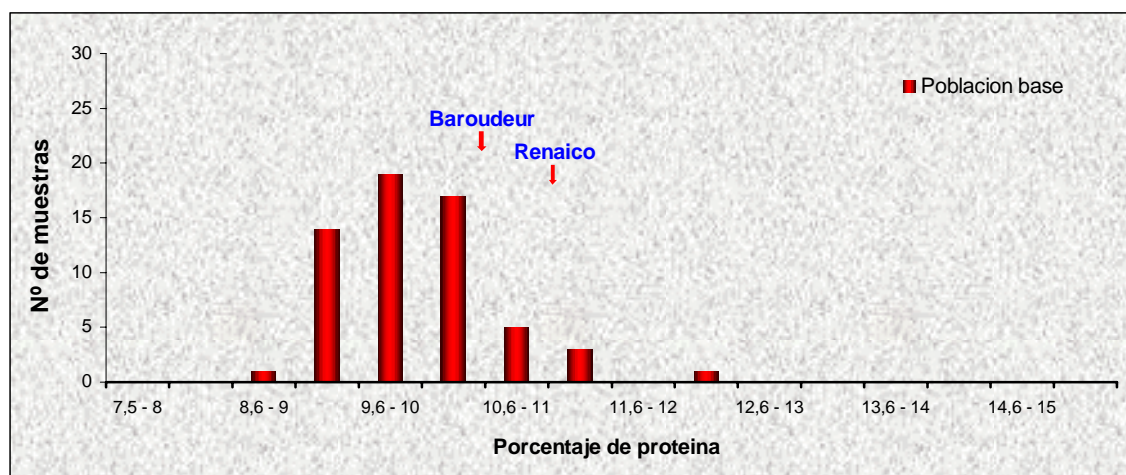


↓ Valor promedio de los progenitores.

FIGURA 9. Distribución del porcentaje de proteína del grano en la cruce Genial x Pukem.

A diferencia de este tipo de distribución, en las cruzas Baroudeur x Renaico (Figura 10) y Avital x Renaico, el promedio de la población generada fue menor que el promedio del menor de los padres, lográndose una menor cantidad de individuos transgresivos.

Similares resultados que los observados en las cruzas Baroudeur x Renaico y Avital x Renaico obtuvo ZHANG *et al.* (1998), quienes evaluaron una población segregante, en la cual uno de los padres poseía excelente calidad panadera y el otro buenas características agronómicas, resultando el promedio de la población F₂ menor que el promedio de sus padres.



↓ Valor promedio de los progenitores.

FIGURA 10. Distribución del porcentaje de proteína del grano en la cruce Baroudeur x Renaico.

Solo en las cruzas donde participó Renaico como parental, la población generada alcanza niveles de proteína en promedio menores que el de los padres. Si lo comparamos con la distribución de las cruzas Avital x Kona y Baroudeur x Kona (datos no mostrados), se ve claramente el efecto negativo de Renaico sobre su progenie. Explicando así la baja frecuencia de individuos transgresivos para estas poblaciones.

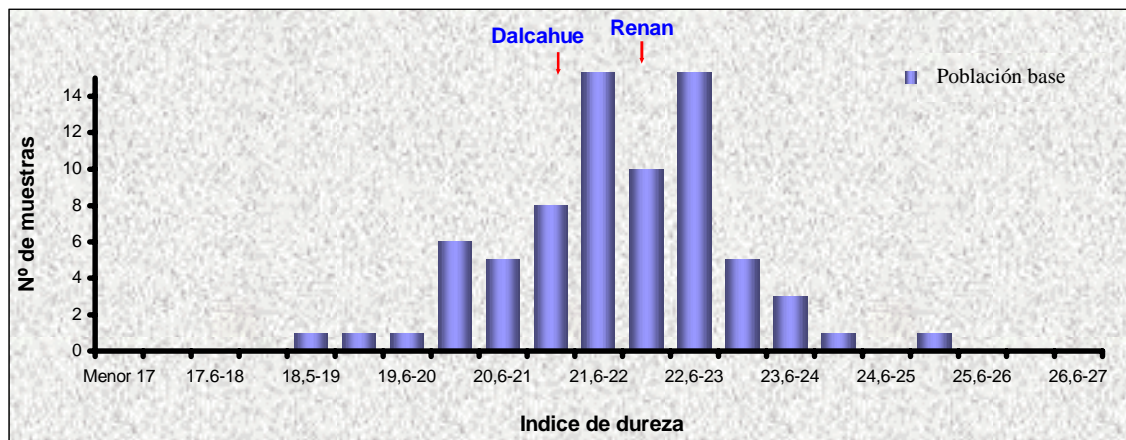
Una característica importante de destacar es la poca diferencia observada entre los promedios del contenido de proteína entre las cruzas, esto se podría deber a la alta fertilización nitrogenada a la cual son sometidos estos ensayos enmascarando cualquier tipo de diferencia entre ellos.

4.3.3.2 Dureza del grano. El índice de dureza observado en las progenies de diferentes cruzas está en directa relación a los valores promedio de los progenitores.

En base a los índices de dureza de los progenitores se pueden caracterizar como duros (Avital, Genial, Dalcahue, Renan y Renaico), intermedios (Kona y Baroudeur) y blandos (Pukem), (Cuadro 12), por lo cual las frecuencias oscilaron dentro de estos rangos.

Al evaluar las cruzas en función de las características de dureza de los padres, se pudo observar que existen dos tipos de cruzas; una en que los padres poseen valores similares de textura de grano (Baroudeur x Kona, Baroudeur x Renaico y Renan x Dalcahue), y otra en que los padres difieren en mayor medida en los índices de dureza (Avital x Renaico, Genial x Pukem, Avital x Kona, Baroudeur x Dalcahue).

Cuando los padres poseen valores similares, la población se distribuye en torno a ellos mostrando una distribución normal y con un promedio entre los valores de los padres (Figura 11). Esta distribución también fue observada por (GIROUX *et al.* 2000), quienes evaluaron las poblaciones segregantes generadas por cinco diferentes cruzas, a las cuales se les midió la dureza de grano en forma indirecta a través de NIT (transmitancia en el infrarrojo cercano).

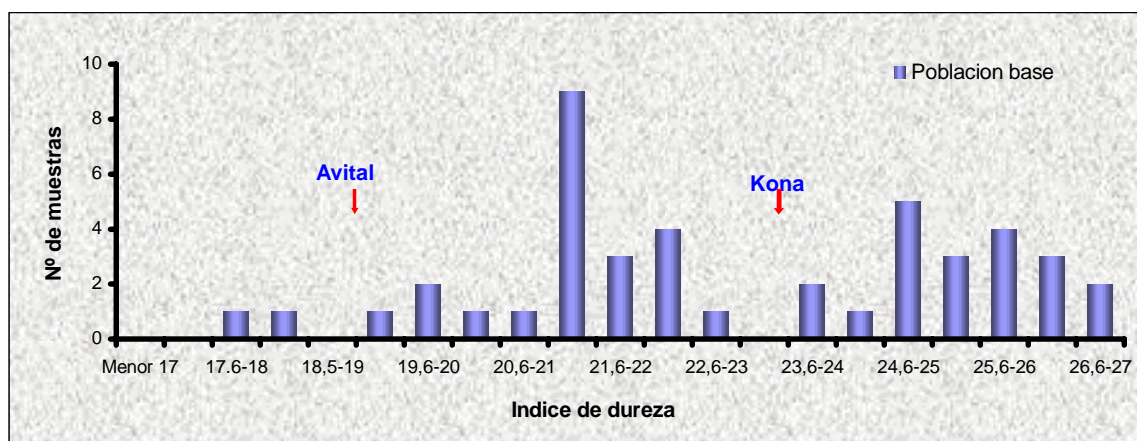


↓ Valor promedio de los progenitores.

FIGURA 11. Distribución del índice de dureza en la cruz Renan x Dalcahue.

De igual modo, cuando los padres poseen valores de textura de grano más dispares, la población tiende a distribuirse en forma binomial (Figura 12), lo cual refleja

lo poco variable de esta característica cuantitativa y coincide con lo establecido por GIROUX y MORRIS, (1997), quienes evaluaron la distribución del índice de dureza medido a través de NIR de 83 líneas recombinantes, concluyendo que esta distribución es binomial y que correspondería solo a la segregación de un gen mayor. Por su parte, LILLEMO y RINGLUND (en preparación), determinaron distribuciones binomiales para las 9 cruzas que evaluaron, estableciendo que a mayor diferencia en el índice de dureza de los padres, mayor será el efecto sobre la distribución de la población.⁴



↓ Valor promedio de los progenitores.

FIGURA 12. Distribución del índice de dureza en la craza Avital x Kona.

Las distribuciones de los valores de índice de dureza tienen dos comportamientos claramente determinados, cuando una característica cuantitativa presenta una distribución normal, se debe a que hay muchos genes que determinan esta característica. Al mismo tiempo, cuando las distribuciones presentan diferentes modas, se establece que existen genes mayores que tendrían una influencia mas fuerte sobre la característica cuantitativa en cuestión.

Esto concuerda con lo expresado por MARTÍN *et al.* 2001; GIROUX y MORRIS, 1997; GIROUX *et al.* 2000. Estos autores coinciden que la dureza de grano esta gobernada por dos genes mayores y que estos determinan la distribución de los valores de textura de grano en poblaciones segregantes.

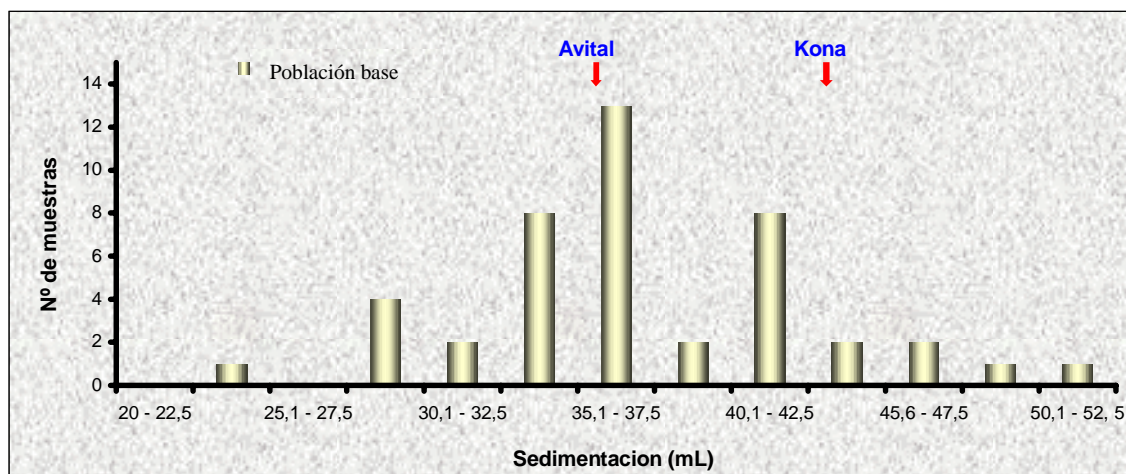
⁴ LILLEMO, M. (2001). Ing. Agrónomo, Ph. D. Universidad de Noruega. Comunicación personal.

4.3.3.3 Volumen de sedimentación. El índice de sedimentación fue evaluado para todas las cruza a través de NIR y en forma comparativa en la cruza Avital x Kona con el método SDS.

Como ejemplo se analizara el comportamiento de la progenie de la cruza Avital x Kona la cual se pueden caracterizar en forma arbitraria en dos grupos principales; un grupo entre los valores 25-40 mL (trigos de calidad suave, corriente y fuerte), y un segundo grupo de menor magnitud entre los valores 40-52 mL (trigos de calidad extra), clasificación de acuerdo con INN (2000), (Figura 13).

Esta distribución difiere con los resultados obtenidos por (PAYNE *et al.* 1981), quienes evaluaron seis cruza $F_3.F_5$ y encontrando distribuciones normales en todas las cruza para sedimentación SDS.

La distribución en la sedimentación SDS observada para la cruza Avital x Kona se podría deber al efecto que tienen algunos genes sobre el volumen de sedimentación lo cual afectaría su distribución. Esto se discutirá posteriormente en forma mas detallada al correlacionarlo con los marcadores moleculares evaluados.



↓ Valor promedio de los progenitores.

FIGURA 13. Distribución del volumen de sedimentación (mL) cruza Avital x Kona.

Por otra parte, al evaluar esta distribución en función de los valores de los padres se observó una menor cantidad de individuos transgresivos, en comparación a aquellos que alcanzaron volúmenes de sedimentación menores al promedio de los padres. Estos resultados son similares a los obtenidos por LUO *et al.* (2001), quienes evaluaron cuatro poblaciones segregantes a nivel F₄.

A diferencia de esto ZHANG *et al.* (1998), evaluaron el promedio de la población segregante F₂ generada a partir de un padre con altos niveles de sedimentación y otro padre con bajos niveles de sedimentación pero de buenas características agronómicas, cuyo promedio de sedimentación de la población segregante fue mayor al promedio de los padres.

La menor cantidad de individuos transgresivos observada en la cruce Avital x Kona puede deberse a la excelente calidad del padre Kona el cual posee uno de los índices de sedimentación NIR mas altos entre los padres evaluados (Cuadro 12), lo cual hace menos probable la obtención de gran cantidad de individuos superiores a Kona.

4.4 Distribución de las variables cuantitativas (sedimentación y dureza de grano) en función de diferentes alelos.

Se evaluó la distribución de las variables cuantitativas (sedimentación y dureza de grano), en función de los marcadores moleculares asociados a estas características (alelos de glutenina APM *Glu-5+10*, alelos de puroindolina, *Pina-D1a*, *Pina-D1b*, *Pinb-D1a* y *Pinb-D1b* y presencia de translocación), para las cruzas que segregaban para estos alelos.

Uno de los principales factores que determina la relación entre los alelos evaluados y los parámetros de calidad medidos, es el coeficiente de correlación r .

En el Cuadro 16 se resumen los índices de correlación para todas las cruzas evaluadas, se observa en casi todas las cruzas el efecto positivo de la presencia de mutaciones en los alelos de puroindolina, el cual es significativo, esto de igual manera se da para la presencia de la translocación, el cual afecta negativamente la sedimentación, no se observan correlaciones significativas entre la presencia del alelo de glutenina de APM Subunidad *Glu 5+10* y los índices de dureza y sedimentación.

CUADRO 16. Coeficientes de correlación r para los alelos de puroindolina mutados, *Glu-5+10* y presencia de translocación en función de los parámetros de calidad (sedimentación, índice de dureza).

Progenie F ₄	Índice de correlación r					
	Presencia mutación alelo Puroindolina		Alelo glutenina APM Subunidad 5+10		Presencia Translocación	
	Valor de sedimentación	Índice de dureza	Valor de sedimentación	Índice de dureza	Valor de sedimentación	Índice de dureza
Genial x Pukém	0.66**	0.64**	0.01	0.02	↔	↔
Baroudeur x Renaico	0.09	0.05	↔	↔	-0.38**	0.16
Avital x Renaico	↔	↔	↔	↔	-0.44**	0.36**
Baroudeur x Kona	↔	↔	0.13	0.05	↔	↔
Avital x Kona	0.50**	0.82**	0.02	0.05	↔	↔
Rénan x Dalcahue	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Baroudeur x Dalcahue	0.51**	0.68**	0.04	0.03	↔	↔

** Altamente significativo $P < 0.01$; ↔ La cruz no segrega para este alelo; Mutación alelos (*Pinb-D1b* y *Pina-D1b*). Valores determinados a través de NIR.

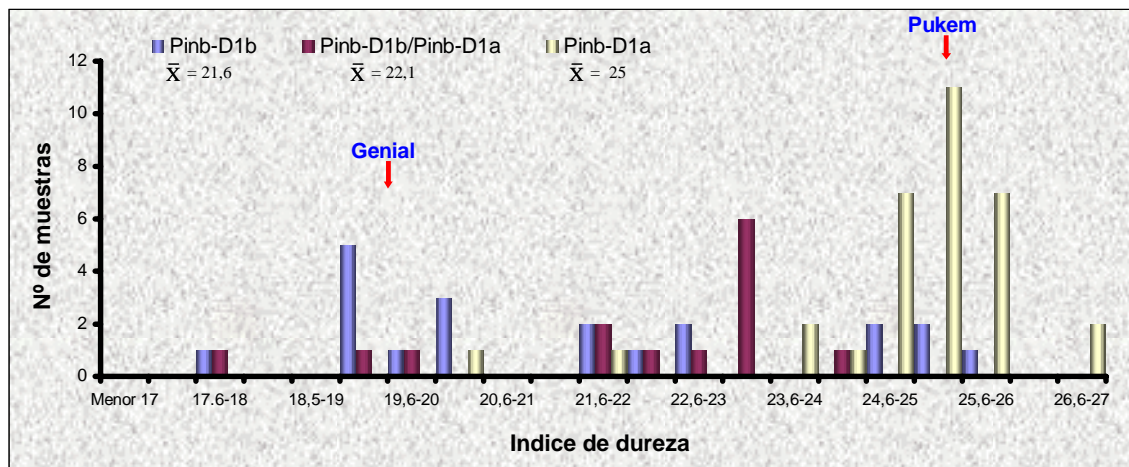
Como se estableció anteriormente, existen diferencias en los coeficientes de correlación según el alelo y las características cuantitativas, entre las diferentes cruzas. Un análisis más detallado de estas correlaciones y su efecto en la distribución de los parámetros de calidad se detalla a continuación.

4.4.1 Porcentaje de proteína. Con los marcadores evaluados en la presente investigación no se esperaba obtener ninguna correlación para el porcentaje de proteína por lo cual este parámetro no fue evaluado.

4.4.2 Dureza del grano. Para la dureza de grano fueron evaluados tres marcadores moleculares (*Pina D1a*, *Pinb-D1a* y *Pinb-D1b*), los cuales permiten identificar dos de las siete mutaciones descritas hasta este momento (LILLEMO, 2001a). Es por esta razón que en los padres donde no se encontraban los alelos antes mencionados, se asume que poseen un tipo silvestre (no mutado), o algún tipo de mutación no detectada.

Solo cuatro cruzas segregaban para estos alelos (Genial x Pukem, Baroudeur x Renaico, Avital x Kona y Baroudeur x Dalcahue), encontrándose, en tres de estas, una fuerte correlación entre la presencia/ausencia de la mutación y la textura de grano (Cuadro 16).

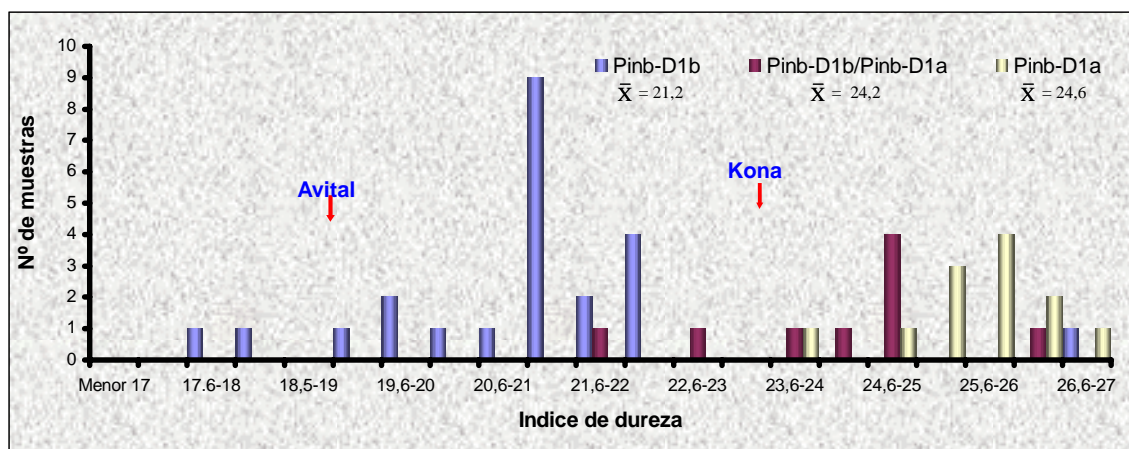
Estos valores fueron más evidentes cuando los padres poseían índices de dureza más disímiles, por ejemplo en las cruzas Genial x Pukem ($R^2=0.41$), Avital x Kona ($R^2=0.67$), similar situación fue observada en la craza Baroudeur x Dalcahue ($R^2=0.46$). A pesar que en esta última población no se detectaron los individuos heterocigotos que fueron caracterizados como no mutados, disminuyendo así la correlación real del marcador molecular (Figuras 14, 15 y 16).



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{x} Promedio alelo.

FIGURA 14. Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la craza Genial x Pukem.

Resultados similares fueron publicados por LILLEMO (2001b), y LILLEMO y RINGLUND, (en preparación)⁴, quienes al evaluar nueve diferentes cruza que segregaban para diferentes alelos de puroindolina encontraron una fuerte correlación entre la presencia de alelos mutados de puroindolina (*Pinb-D1b*, *Pinb-D1c*, *Pinb-D1d*) y texturas de grano mas duras, estableciendo que más de tres cuartos de la variación en dureza están asociados a las mutaciones de puroindolina.

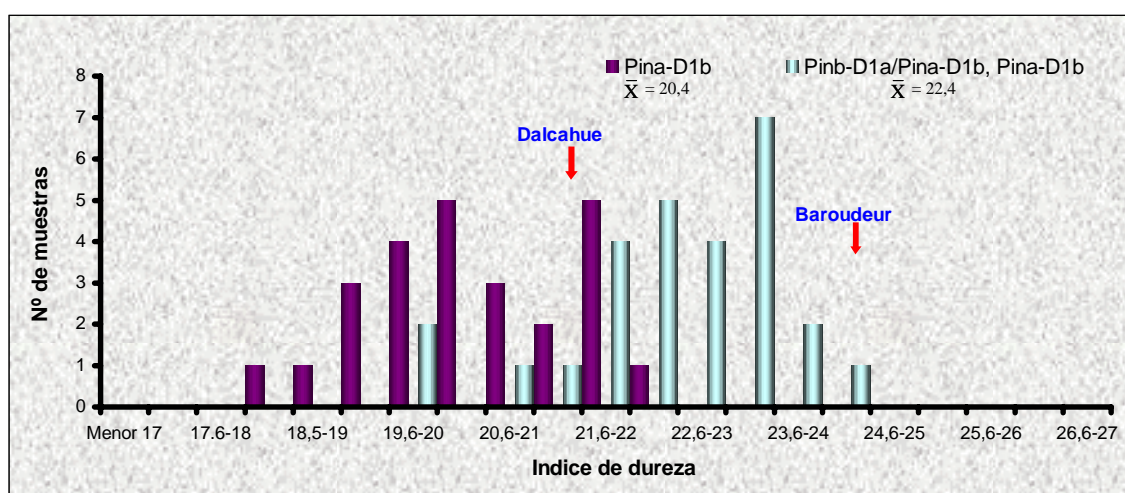


↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{x} Promedio alelo.

FIGURA 15. Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la craza Avital x Kona.

⁴ LILLEMO, M. 2001. Ing. Agrónomo, Ph. D. Universidad de Noruega. Comunicación personal.

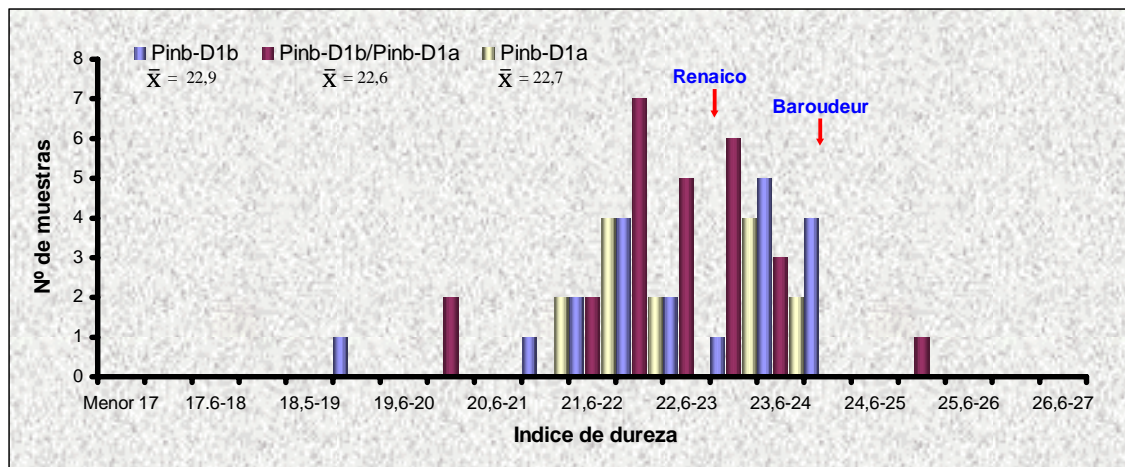
Resultados similares a los observados en la cruce Avital x Kona se encontraron al evaluar poblaciones que segregaban para el alelo de puroindolina mutado *Pina-D1b* (Figura 16), se observo que la mutación en este alelo de puroindolina genera una población con una textura de grano mas dura, que las poblaciones con otras mutaciones. LILLEMO (2001a); MARTÍN *et al.* (2001) y GIROUX *et al.* (2000), establecieron que el alelo de puroindolina *Pina-D1b* otorga una textura de grano aun más dura que las otras mutaciones, lo cual refuerza lo observado para la población derivada de la cruce Baroudeur x Dalcahue.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{x} Promedio alelo.

FIGURA 16. Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la cruce Baroudeur x Dalcahue.

Un caso especial resulta ser la cruce Baroudeur x Renaico (Figura 17), ya que este ultimo posee la mutación *Pinb-D1b* y Baroudeur es de tipo intermedio sin mutación detectada. Se observa que los padres de esta cruce presentan valores muy similares de textura de grano y que la presencia y/o ausencia de algún marcador no se relaciona con la textura de la población generada por esta cruce.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{x} Promedio alelo.

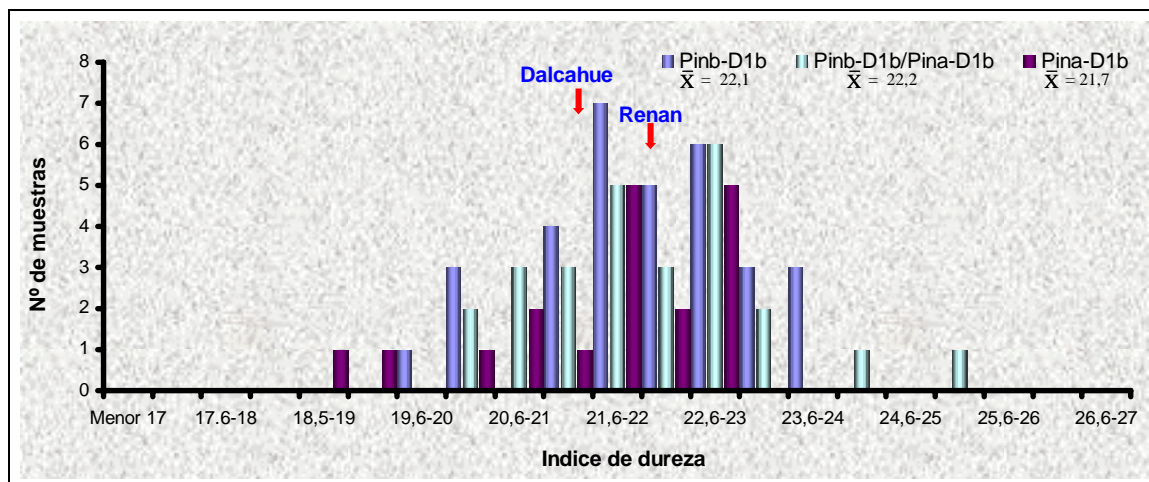
FIGURA 17. Distribución de índices de dureza en función del alelo de puroindolina en la cruce Baroudeur x Renaico.

En forma comparativa y para respaldar los resultados obtenidos en la cruce Baroudeur x Renaico, se toma como ejemplo la distribución de la cruce Renan x Dalcahue (Figura 18), en donde las distribuciones en función de los alelos de puroindolinas están completamente traslapadas ya que los dos poseen mutaciones en los alelos de puroindolina.

GIROUX *et al.* (2000), observaron que las distribuciones de los índices de dureza y los promedios de las poblaciones segregantes con mutación *Pinb-D1b* y *Pina-D1b* están completamente traslapadas, lo cual corresponde al caso de la cruce Renan x Dalcahue, presentando cada uno de los padres una de estas mutaciones.

Por lo tanto en la cruce Renan x Dalcahue el tipo de distribución de la población y su promedio esta determinado principalmente por la presencia de alelos mutados de puroindolina en los dos padres.

Esta distribución que presentó la cruce Baroudeur x Renaico en la cual solo se detecto la presencia de la mutación *Pinb-D1a* en el padre Renaico y solo se estableció la ausencia de la mutación *Pinb-D1b* y *Pina-D1b* para el padre Baroudeur, no implica la ausencia de las otras 5 mutaciones previamente descritas en el padre Baroudeur.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio alelo.

FIGURA 18. Distribución del índice de dureza en función de los alelos de puroindolina en la cruce Renan x Dalcahue.

Finalmente los resultados obtenidos en la cruce Baroudeur x Renaico no son inesperados y se enmarcan dentro del rango de posibilidades existentes al combinar dos padres de similar textura. Se debe tomar en cuenta que las mutaciones están asociadas fuertemente a textura de grano pero que no responden totalmente a esta, hay efectos ambientales y genes menores que afectan las distribución de los valores obtenidos.

Los marcadores moleculares permiten discriminar en una población segregante los individuos que poseen alguna mutación en los alelos de puroindolina. La mutación a estos alelos esta asociada fuertemente a la textura de grano, pero si los valores promedio de los padres involucrados en la cruce no difieren en gran medida aun cuando uno de estos posea mutación en alelos, no se puede esperar que este marcador responda por las diferencias de textura de grano en la población segregante generada.

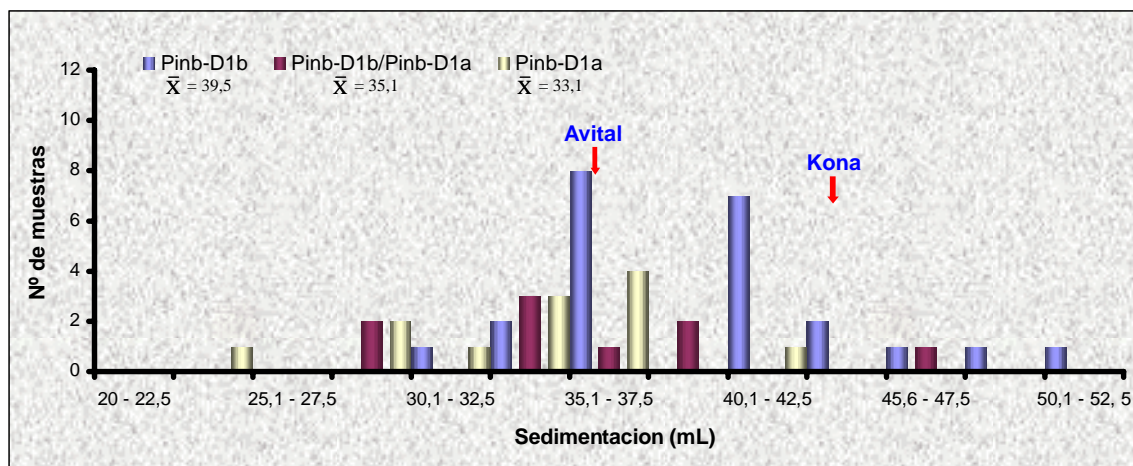
Como se observa al comparar el Cuadro 6 y 12, todos los progenitores que presentan alelos mutados de puroindolina, presentan valores de textura de grano inferiores a los progenitores que no poseen mutaciones. Aun así, destacan la variedad Kona y Baroudeur, por no poseer las mutaciones analizadas, y poseer texturas de grano intermedias muy cercanas a la variedad Renaico, portadora de la mutación. LILLEMO, (2001b), observo estos efectos al comparar mas de 100 variedades de trigo, concluyendo

Australianos las gluteninas de BPM, otorgan una mejor predicción de la calidad panadera que las gluteninas de APM. Además establecieron que las gluteninas de APM son insuficientes por si solas para determinar diferencias en calidad, por lo cual las líneas de mejoramiento no pueden ser seleccionadas ni descartadas basándose solo en la composición de estas.

Por su parte ARCOS (2001), al evaluar diferentes variedades de trigo desarrolladas en Chile determinó que hay variedades que a pesar de poseer el alelo de glutenina de APM subunidad 2+12, poseen igual y mejor calidad que variedades con la subunidad 5+10.

En el caso particular de las cruzas evaluadas y para algunas variedades desarrolladas en Chile, el alelo 5+10 por si solo no explicaría la variabilidad en sedimentación, por lo tanto al seleccionar exclusivamente por la presencia de este alelo no se obtendrían buenas correlaciones con los mejores niveles de sedimentación.

Aun cuando no se observaron correlaciones entre la presencia de alelos de glutenina de APM *Glu* 5+10, hubo una significativa correlación entre el alelo mutado de puroindolina (*Pinb*-D1b), y los mayores niveles de sedimentación en la población, con una correlación de ($R^2=0.25$), (Figura 19).



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio alelo.

FIGURA 19. Distribución del volumen de sedimentación (SDS) en función de los alelos de puroindolina en la craza Avital x Kona.

que la textura de los padres siempre responde a mutaciones en alelos de puroindolina y las variedades que no lo hacen pueden presentar otro tipo de mutación a estos alelos que no ha sido detectada.

Un efecto de menor importancia puede deberse a la calibración de los valores NIR, que dificultan la discriminación de estas diferencias debido a la poca amplitud de su rango.

Al evaluar la presencia de alelos de glutenina de APM *Glu* 5+10, en relación con el índice de dureza no se observa ninguna correlación en las cuatro cruzas que segregaban para este alelo, lo cual habla de la independencia de este alelo sobre la textura de grano. En el caso de la presencia translocación trigo/centeno, se observaron correlaciones en una de las dos cruzas que segregaban para este alelo.

4.4.3 Volumen de sedimentación. Se evaluó la cruzada Avital x Kona, no observándose correlación entre la presencia del alelo de glutenina APM *Glu* 5+10 y los niveles de sedimentación SDS de la población segregante. Estos resultados difieren de lo planteado por LUO *et al.* (2001), quienes encontraron una buena relación entre los valores de sedimentación de la población segregante F_4 y la subunidad 5+10.

Los resultados obtenidos por LUO *et al.* (2001), respaldan los obtenidos por PAYNE *et al.* (1981), al evaluar tres diferentes poblaciones que segregaban para los alelos de glutenina subunidad 2+12 y 5+10, encontrando correlaciones significativas entre la presencia de la subunidad 5+10 y los promedios de sedimentación.

Específicamente PAYNE *et al.* (1987), al evaluar 84 variedades, determinaron que más de un 50% de la variación en la calidad panadera se debe a cambios en las subunidades de glutenina de APM y que entre un 6-23 % de la variación en la calidad panadera se debe específicamente a los alelos de glutenina *Glu*-D1.

Aun así LUO *et al.* (2001), establecieron que en los cultivares

Esto se relaciona a lo obtenido por MARTIN *et al.* (2001), quienes concluyen que alteraciones en los alelos de puroindolinas tienen gran influencia en las características de calidad panadera.

DUBREIL *et al.* (1998), al evaluar 32 cultivares agrupados en tres diferentes categorías de calidad panadera, establecieron que un 75% de los cultivares de textura dura y muy dura están en el grupo de buena calidad panadera. Además, agregan que esto concuerda con la idea que las principales variedades usadas para panificación presentan textura de grano dura, y los trigos suaves son principalmente usados para galletas.

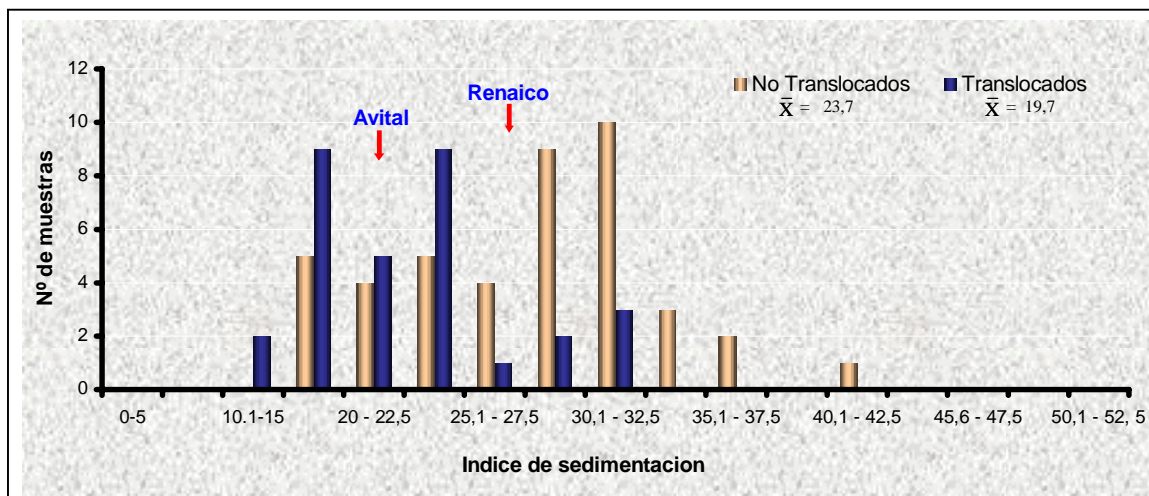
Un posible efecto de esta buena asociación entre los alelos mutados de puroindolina y el volumen de sedimentación puede deberse a que, en los trigos duros los granos de almidón sufren más daño durante la molienda y tienden a absorber más agua durante la formación de la masa en comparación con los trigos suaves (SLAUGHTER *et al.*, 1992).

Aun así DUBREIL *et al.* (1998), establecen que, los cultivares asociados a mutaciones en puroindolina pueden presentar mala y buena calidad panadera por lo cual se concluiría que estas mutaciones juegan un rol importante pero no esencial, ya que el efecto asociado a la presencia de puroindolinas en la harina (trigos de textura suave), incrementa la tenacidad de la masa dependiendo del balance entre alelos de glutenina.

Es por esta razón que la baja correlación entre la sedimentación y el alelo de glutenina de APM subunidad 5+10, no solo se debe al efecto de los otros alelos de glutenina y gliadina sino también al efecto de las mutaciones en los alelos de puroindolina.

La presencia del segmento translocado del centeno tuvo un efecto negativo significativo sobre la distribución de la sedimentación, esto se presentó en las dos cruzas que compartían al padre Renaico, poseedor de la translocación.

En la Figura 20, se presenta la distribución de los valores de sedimentación NIR de la cruce Avital x Renaico, los rangos de valores de sedimentación NIR difieren en alguna medida con los obtenidos de sedimentación SDS, esto se debe a que NIR es una metodología indirecta para medir volumen de sedimentación. Se observa un efecto negativo asociado a la presencia de la translocación sobre los valores de sedimentación (NIR).



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{x} Promedio alelo.

FIGURA 20. Distribución del índice de sedimentación (NIR) para individuos translocados vs no translocados.

Un efecto negativo asociado a la presencia del segmento translocado del centeno sobre la calidad obtuvieron ZÚÑIGA *et al.* (2001b), al evaluar mas de 50 diferentes variedades y líneas avanzadas de trigo, quienes determinaron el efecto negativo de la presencia del segmento translocado del centeno sobre los niveles de sedimentación.

Esto se debe a que las translocaciones trigo/centeno presentan efectos indeseables como un incremento de la viscosidad de la masa, una reducción del volumen de sedimentación y la reducción en la tenacidad de la masa (GRAYBOSCH *et al.*, 1990).

Al tomar en cuenta las tres ideas antes planteadas, es decir, el bajo efecto de la presencia de alelos de glutenina de alto peso molecular específicamente la subunidad 5+10, el fuerte efecto de las mutaciones en los alelos de puroindolina y la presencia del segmento traslocado del centeno, destaca la ausencia de correlación asociada a la presencia del alelo de glutenina de APM Glu 5+10 y los índices de sedimentación.

Quizás al evaluar poblaciones dentro de grupos de calidad en lo referente a textura de grano, por ejemplo dentro de trigos duros (destinados a panificación), se obtendrían mejores asociaciones entre los volúmenes de sedimentación y los alelos de glutenina de APM subunidad 5+10, ya que la textura de grano tendría una menor influencia en la variación de los niveles de sedimentación.

También es importante destacar que un mejor avance en parámetros de calidad panadera debe involucrar a la mayor cantidad de alelos de glutenina y gliadina los cuales están relacionados con la calidad proteica, para así obtener combinaciones alelicas deseadas y por ende avances sustanciales en calidad panadera.

4.5 Avance genético obtenido entre la Población base y Población DAS.

Se evaluó el avance genético obtenido para cada uno de los parámetros cuantitativos evaluados en función de la población resultante de la selección asistida por marcadores moleculares.

4.5.1 Porcentaje de proteína. Ninguno de los marcadores moleculares evaluados estaba asociado al porcentaje de proteína de grano por lo cual no se esperaban avances en este parámetro. Una de las razones es que más del 70% de la variación del contenido de proteína esta determinada por la disponibilidad de nitrógeno, en donde la variación genética tiene un pequeño efecto, lo cual hace difícil su mejoramiento (DUBCOVSKY *et al.*, 1998).

Aun así, bajo un sistema de selección fenotípica (peso de 1000 granos y altura de planta), se podría afectar la distribución y promedio de la Población DAS en relación al contenido de proteína. A pesar de esto no se encontraron diferencias significativas entre los promedios de la Población base y la Población DAS, como se detalla en el Cuadro 17.

CUADRO 17. Numero de plantas seleccionadas y porcentaje de proteína promedio de la Población base y Población DAS, por cruza.

Cultivar (cruza)	Población base		Población DAS	
	Nº De Plantas Seleccionadas (F3)	% de Proteína Promedio por cruza	Nº De Plantas DAS Seleccionadas (F3)	% de Proteína Promedio por cruza
Genial x Pukém	66	10.3	14	10.2
Baroudeur x Renaico	63	10.0	14	10.0
Avital x Renaico	74	9.4	25	9.5
Baroudeur x Kona	54	11.2	22	11.1
Avital x Kona	44	10.8	14	10.6
Rénan x Dalcahue	76	10.5	45	10.5
Baroudeur x Dalcahue	52	10.8	20	10.9
Promedio / Total	429	10.4	154	10.4

4.5.2 Dureza del grano. Otro parámetro a comparar fue la ganancia genética en función del índice de dureza para las mismas cruzas. Solo se realizó selección asistida por marcadores moleculares en las cruzas que segregaban para los alelos de puroindolina (Cuadro 6). Un resumen de los índices de dureza de la Población base en comparación con los obtenidos en la Población DAS y base elite para cada craza se observa en el Cuadro 18.

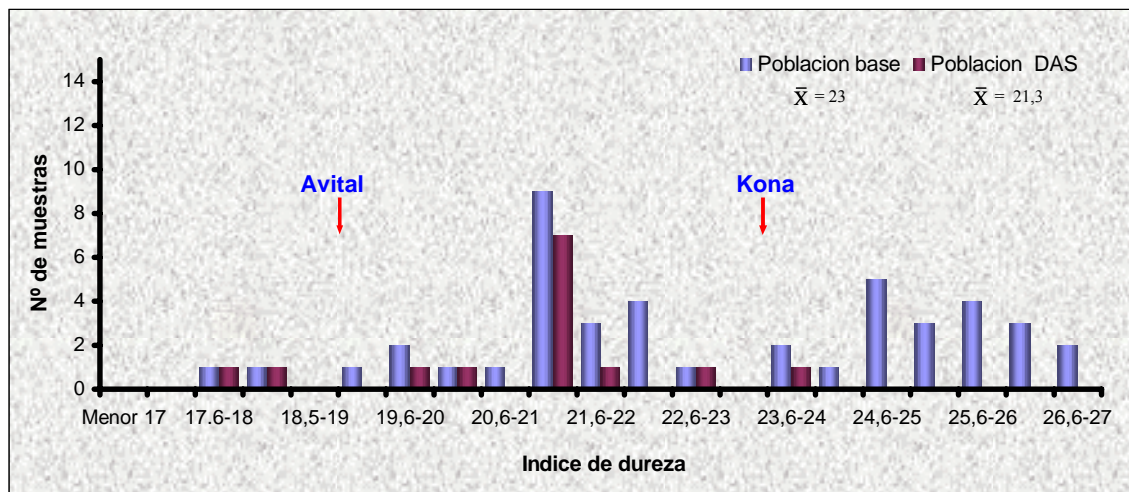
CUADRO 18. Comparación de los promedios de los índices de dureza de la Población base y Población DAS.

Cultivar (cruza)	Población base		Población DAS		Población Elite	
	Nº De Plantas Seleccionadas	Ind. De Dureza Promedio por craza	Nº De Plantas Seleccionadas	Ind. De Dureza Promedio por craza	Nº De Plantas Seleccionadas	Ind. De Dureza Promedio Mejores base Nº DAS
Genial x Pukém)	66	23.4*	14	21.2*	14	19.9
Baroudeur x Renaico	63	22.8	14	22.7	14	22.4
Avital x Renaico ^l	74	20.4	25	20.2	25	18.6
Baroudeur x Kona [§]	54	24.6	22	24.7	22	22.9
Avital x Kona	44	23.0*	14	21.3*	14	20.3
Rénan x Dalcahue ^l	76	22.0	45	21.7	45	21.3
Baroudeur x Dalcahue	52	21.5*	20	20.4*	20	20.0
Promedio / Total	429	22.5	154	21.8	154	20.8

*Diferencias significativas entre Población base y DAS, [§] Cruzas que no segregan para alelos de puroindolina mutados, ^l Los dos padres poseen alelos mutados de puroindolina.

Se observaron diferencias significativas entre la Población base y la Población DAS, para 3 de las 4 cruzas que segregaban para estos alelos: Genial x Pukem, Avital x Kona y Baroudeur x Dalcahue. Los análisis estadísticos se desarrollan en (Anexo 6, 7 y 8), respectivamente.

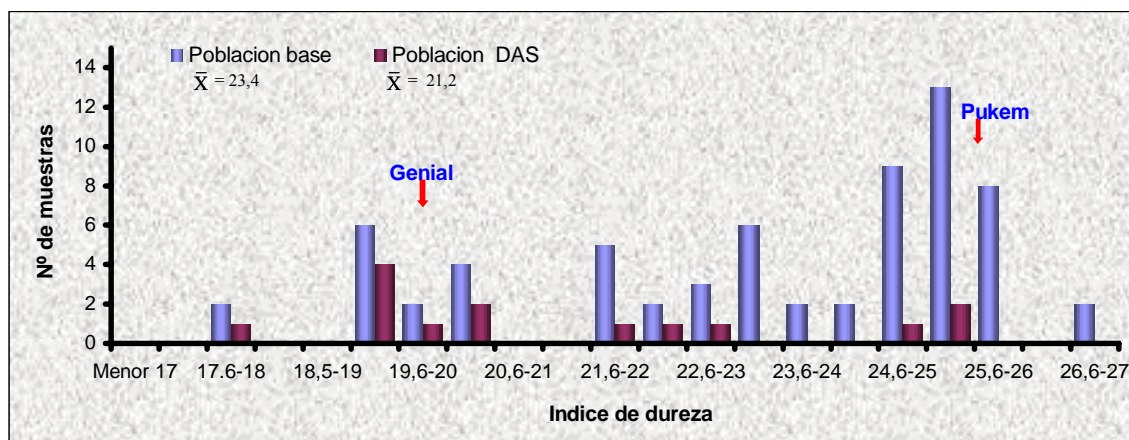
Para la craza Avital x Kona (Figura 21), el índice de dureza de la Población base fue de 23,0 y el promedio de la población bajo un sistema de selección asistida por marcadores fue de 21,3 (Población DAS), según lo anteriormente descrito, se obtiene un avance genético significativo, de aproximadamente de 2 puntos.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio población.

FIGURA 21. Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Avital x Kona.

Estas mismas tendencias fueron observados en las cruza Genial x Pukem (Figura 22) y Baroudeur x Dalcahue (Figura 23), con avances significativos, de 2.2 y 1.1 unidades respectivamente.

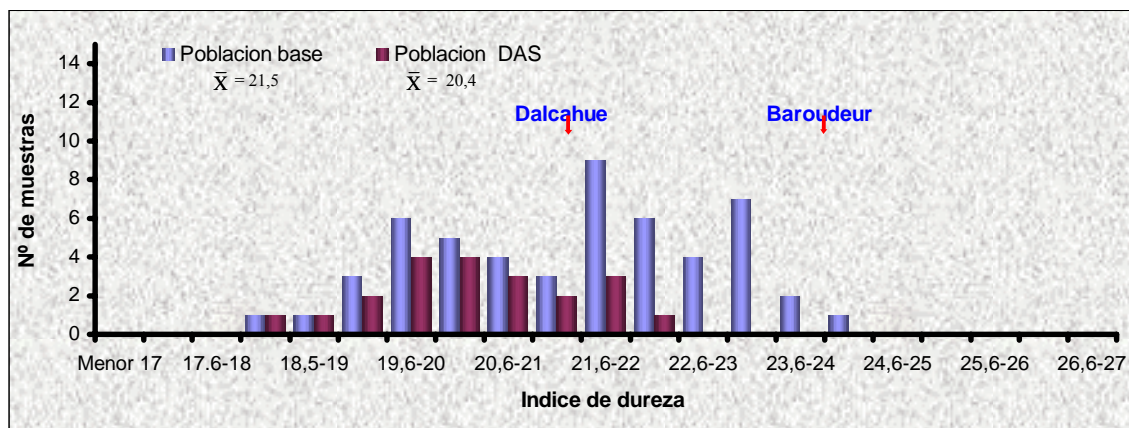


↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio población.

FIGURA 22. Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Genial x Pukem.

En el caso de la cruce Baroudeur x Dalcahue se observó una población con un gran número de individuos transgresivos lo cual depende de las características alelicas de los padres y a la posibilidad que tiene la población segregante de desarrollar

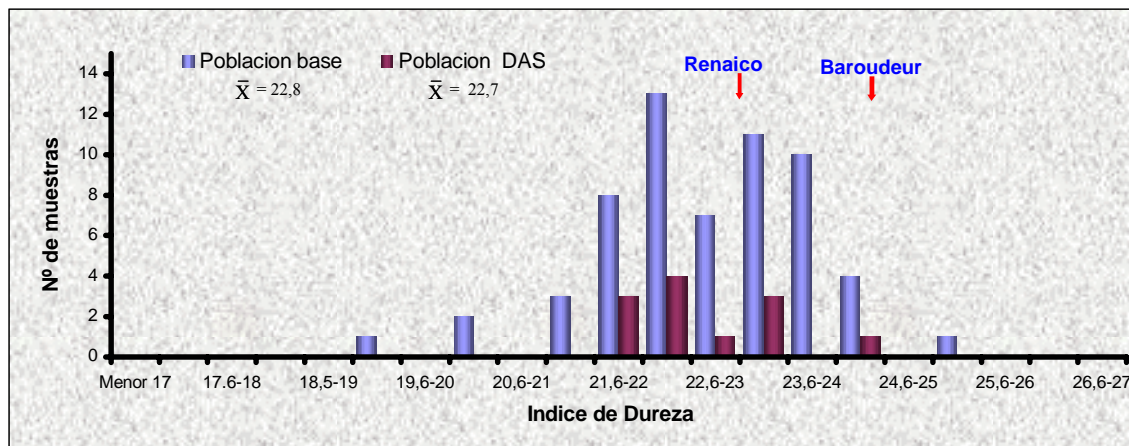
mejores combinaciones alelicas, lo cual en esta cruce se da particularmente para alelos que regulan la textura de grano.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{x} Promedio población.

FIGURA 23. Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Baroudeur x Dalcahue.

Por otra parte en la cruce Baroudeur x Renaico (Figura 24) se observan resultados contradictorios ya que no hubo correlaciones entre el marcador molecular (alelos de puroindolina) y el índice de dureza, razón por la cual se obtuvo un muy bajo avance en este parámetro no siendo significativo.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{x} Promedio población.

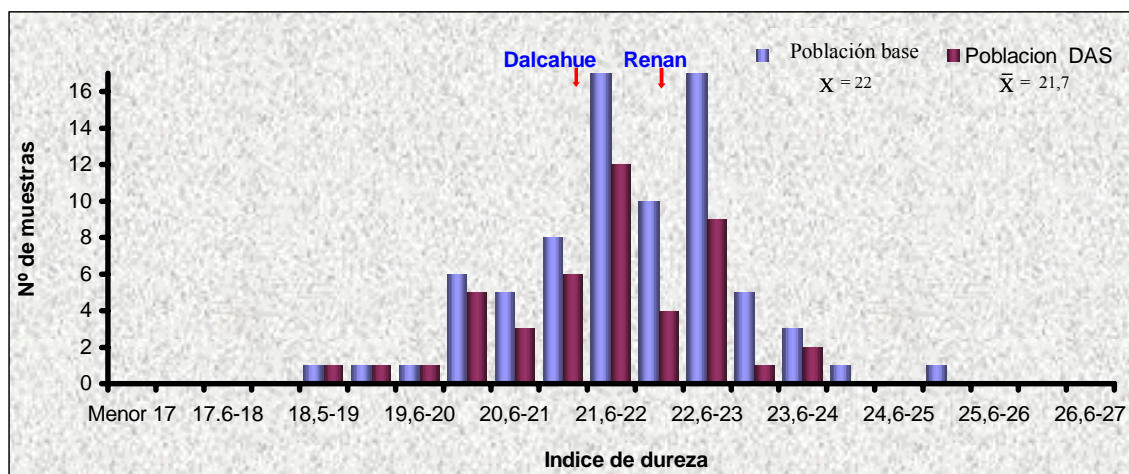
FIGURA 24. Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Baroudeur x Renaico.

Los padres de esta cruce, se caracterizan por tener valores muy similares de índice de dureza por lo cual la diferencia en alelos de puroindolina detectados no explica su actual fenotipo.

La población muestra una distribución normal con una menor varianza, característico de poblaciones que poseen alelos de puroindolina mutados como por ejemplo la cruce Renan x Dalcahue, (Figura 25), la cual no presenta diferencia en la distribución de los valores de textura de grano entre alelos de puroindolina debido a que los dos padres presentan alelos mutados.

En poblaciones como Baroudeur x Renaico de baja variabilidad, no se observan diferencias en textura de grano para los alelos de puroindolina evaluados, por lo que resulta más difícil obtener avances sustanciales.

Esto queda demostrado al evaluar el promedio de los mejores individuos de la cruce (Población base elite) y compararlos con los seleccionados molecularmente (Población DAS), no existiendo diferencias significativas, (datos no mostrados), en los promedios (Cuadro 18), por lo cual, es muy difícil tener avances para el índice de dureza en esta cruce en particular.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio población.

FIGURA 25. Distribución de "Población base" v/s "Población DAS" para índice de dureza en la cruce Renan x Dalcahue.

4.5.3 Volumen de sedimentación. Para la formación de la Población DAS, los alelos positivamente seleccionados fueron principalmente alelos mutados de puroindolina (*Pina* D1b y *Pinb* D1b), presencia del alelo de glutenina APM Glu 5+10 y ausencia de translocación.

Solo cinco de las siete cruzas evaluadas segregaban para este alelo, aun así, al evaluar el avance genético, no se observó correlación con la presencia y/o ausencia del alelo Glu 5+10. A diferencia de esto, cuatro de las siete cruzas evaluadas segregaban para alelos de puroindolina y en tres de estas se encontraron fuertes correlaciones con la presencia/ausencia del alelo de puroindolina mutado *Pinb*-D1b (Cuadro 16).

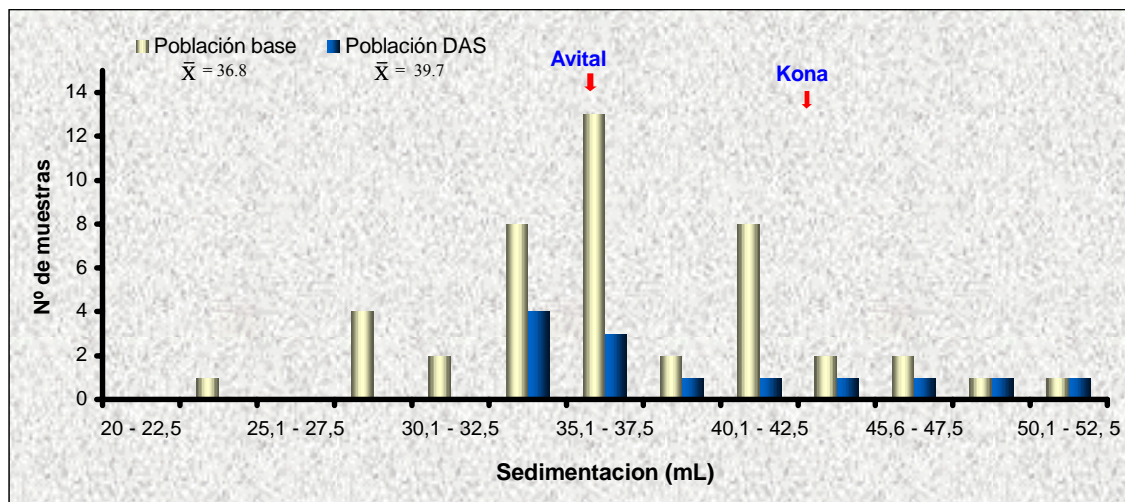
A continuación se muestran en forma referencial otras comparaciones de la distribución de la Población base vs la Población DAS para los índices de sedimentación NIR, los cuales están resumidos en el Cuadro 19.

CUADRO 19. Comparación de los promedios de sedimentación NIR de la Población base y Población DAS.

Cultivar (Cruza)	Población base		Población DAS		Población Elite	
	Nº De Plantas Seleccionadas	Valor de Sedimentación Promedio por cruza	Nº De Plantas Seleccionadas	Valor de Sedimentación Promedio por cruza	Nº De Plantas Seleccionadas	Sedimentación Promedio Mejores base Nº DAS
Genial x Pukém	66	13.7*	14	21.3*	14	29.2
Baroudeur x Renaico	63	22.8	14	22.8	14	28.6
Avital x Renaico	74	25.2*	25	28*	25	31.7
Baroudeur x Kona	54	15.9	22	16.4	22	24.8
Avital x Kona	44	36.8 [‡]	14	39.7 [‡]	14	43.7
Rénan x Dalcahue	76	24.8	45	25.9	45	29.5
Baroudeur x Dalcahue	52	23.4*	20	29.5*	20	32
Promedio / Total	429	24.6	154	26.3	154	31.4

[‡] Sedimentación SDS, * Diferencias significativas entre el promedio de la Población base y DAS.

En la cruza Avital x Kona, la Población DAS presento un buen avance, aunque no significativo al compararlo con la Población base para el nivel de sedimentación SDS, (Anexo 11). Esto se debió a la buena correlación con el alelo de puroindolina mutado (*Pinb*-D1b), como se observa en el Cuadro 16.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio población.

FIGURA 26. Distribución del volumen de sedimentación SDS en poblaciones segregantes F_3 en la cruce Avital x Kona.

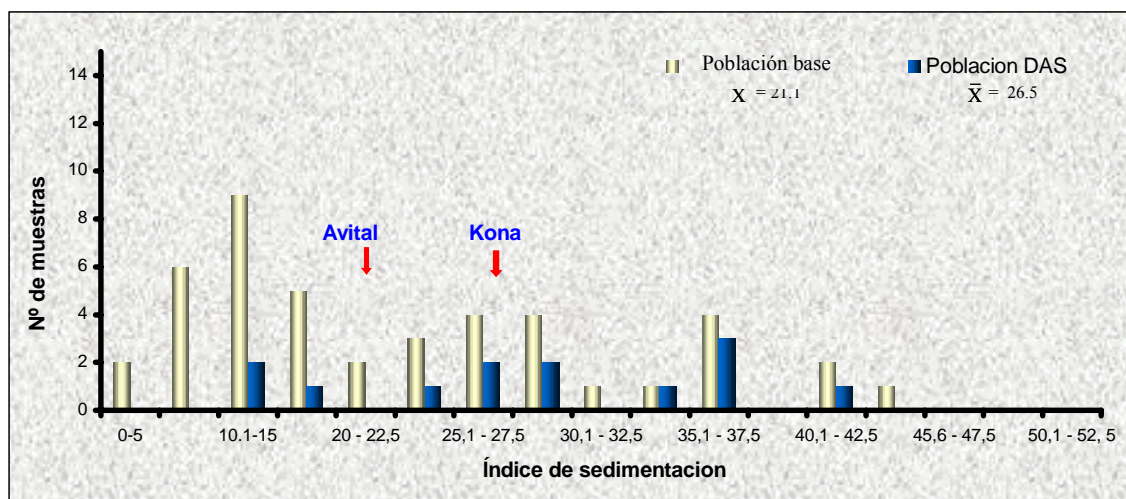
La Población DAS presentó un promedio de 40 mL en relación con los 37 mL de la Población base, siendo el avance genético alcanzado para este parámetro de 3 mL, con este avance se puede pasar de un trigo intermedio a un trigo fuerte según la clasificación realizada por el CHILE (INN), (2000), para los trigos Chilenos. Este avance se determinó considerando que la $H=1$, ya que la selección fue realizada molecularmente (se seleccionó un gen) y se asume que la heredabilidad de un gen es completa.

En forma comparativa en la Figura 27 se muestra la distribución de la Población base vs la Población DAS para sedimentación medidos en forma referencial a través de NIR, se observan diferencias en la distribución de las poblaciones al comparar con los mismos datos medidos a través de SDS (Figura 26), esto puede deberse a la diferencia entre los rangos de medición como a factores de la metodología.

Aun así a pesar que NIR es un método indirecto para medir sedimentación, se observan las mismas tendencias al comparar las poblaciones, ya que la Población DAS presenta similar ubicación al compararla con la Población base respectiva, debido a

la significativa correlación que existe entre los valores SDS y NIR (mayor 60%), este valor se obtuvo al correlacionar los datos SDS vs NIR para la cruce Avital x Kona.

Estos mismos efectos en la distribución obtuvieron MARTIN *et al.* (2001), al comparar la metodología de medición indirecta NIR vs SKCS (sistema de caracterización de un grano), para valores de textura de grano.

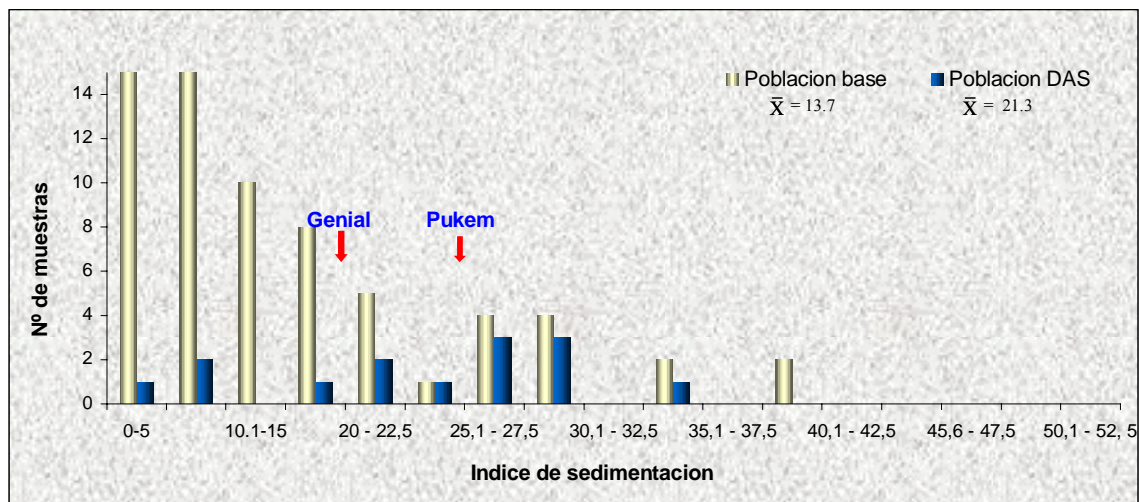


↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio población.

FIGURA 27. Distribución del índice de sedimentación NIR en poblaciones segregantes F₃ en la cruce Avital x Kona.

Para la cruce Genial x Pukem (Figura 28), se obtuvo un gran avance en lo que se refiere a sedimentación NIR, ya que la Población base presentó un promedio de 14 unidades (NIR), y la Población DAS presentó un promedio de 21,3 unidades (NIR), siendo significativamente diferentes (Anexo 9).

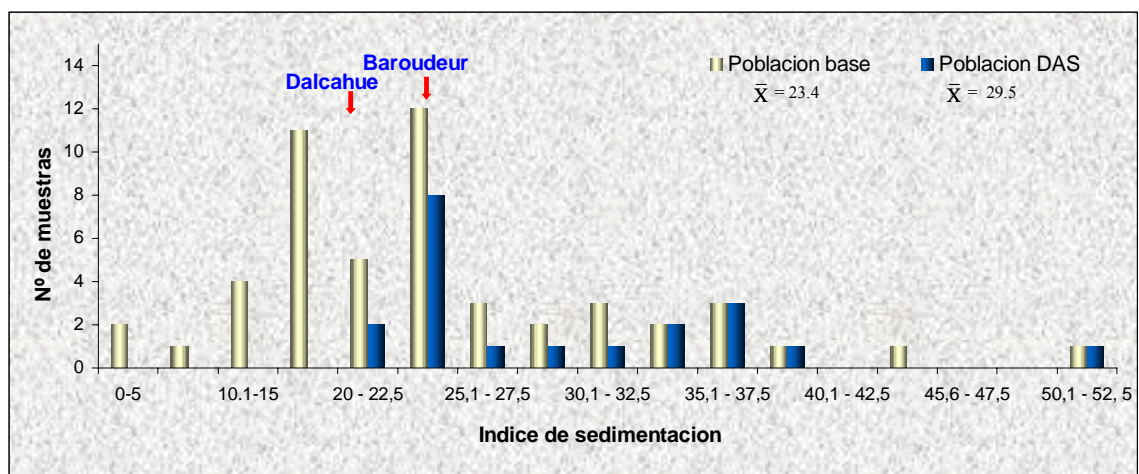
Estos resultados otorgan un avance genético de 7,3 unidades (NIR), para sedimentación, lo cual, permite establecer lo importante que puede ser combinar selección molecular para calidad en ciertos grupos de germoplasma.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio población.

FIGURA 28. Distribución del índice de sedimentación NIR en poblaciones segregantes F_3 en la cruce Genial x Pukem.

En la cruce Baroudeur x Dalcahue (Figura 29), también se observaron avances significativos, (Anexo 10) para el índice sedimentación, obteniendo la Población base un promedio de 23,4 y la Población DAS un promedio de 29,5 unidades NIR, lo cual da un avance genético de 6 unidades NIR.



↓ Valores promedio de los progenitores; \bar{X} Promedio población.

FIGURA 29. Distribución del índice de sedimentación SDS en poblaciones segregantes F_3 en la cruce Baroudeur x Dalcahue.

Otra población en que se observaron avances significativos para los valores de sedimentación fue en la cruce Avital x Renaico, la cual segregaba para translocación.

Esta cruce segregaba solo para la presencia de la translocación trigo/centeno, por lo cual la selección fue principalmente de individuos sin translocación y de buenas características agronómicas. La selección dio como resultado un avance significativo, de 3 puntos NIR, el análisis estadístico se detalla en el Anexo 12.

Como se observa en la Figura 30, y derivado de la buena correlación entre el marcador molecular evaluado y los niveles de sedimentación detallado anteriormente, se obtuvo una población seleccionada con mejor promedio que la Población base.

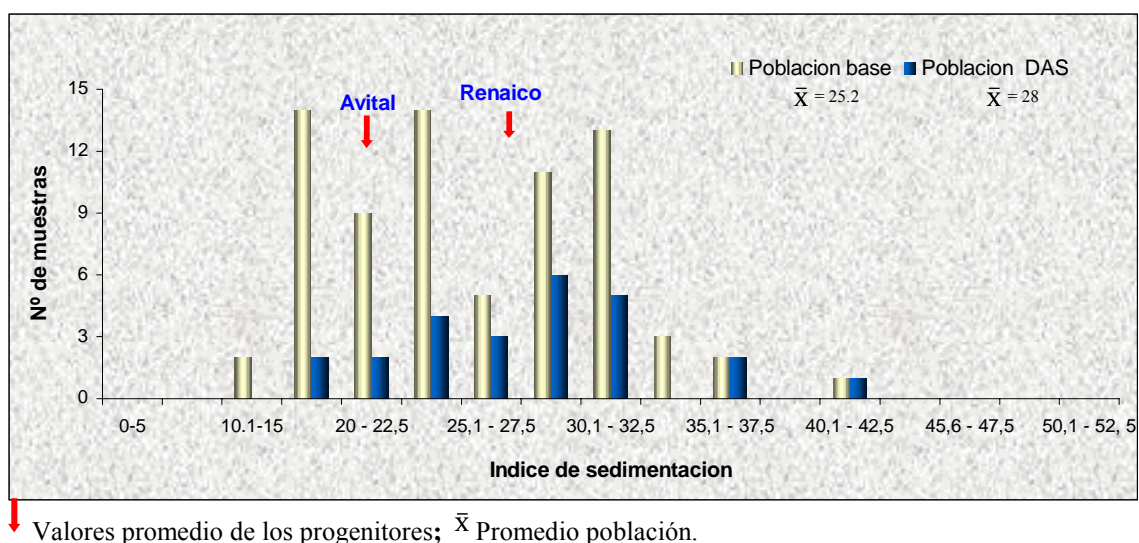


FIGURA 30. Distribución del índice de sedimentación NIR en poblaciones segregantes F₃ en la cruce Avital x Renaico.

4.5.4 Evaluación del avance genético. Analizando los parámetros bajo selección, se obtuvieron avances significativos para índice de dureza e importantes avances en sedimentación en la mayoría de las cruces que segregan para estos alelos, esto se debe principalmente a la buena correlación de los marcadores moleculares seleccionados con los parámetros de calidad evaluados.

SORRELS, (1998), estableció que, bajo un sistema de Selección Directa al Alelo (DAS), se pueden obtener grandes avances en una generación, pero estos avances dependerán del grado de correlación que tengan los marcadores moleculares seleccionados y la característica cuantitativa en cuestión, ya que a mayor correlación entre el marcador y la característica cuantitativa se esperaría un mayor nivel de avance genético.

Si analizamos el avance genético para sedimentación en las siete cruzas evaluadas, solo cinco de estas segregaban para los alelos de glutenina de APM subunidad 5+10 por lo cual solo en estas se espera algún tipo de avance para este parámetro. Sin embargo, no se observó una correlación de este marcador con sedimentación por lo cual no se obtuvieron avances sustanciales producto de la selección de este alelo para sedimentación.

A diferencia de esto, se encontraron fuertes correlaciones entre las mutaciones a los alelos de puroindolinas y los valores de sedimentación. En las 4 cruzas que segregaban para este alelo, solo 3 presentaron buenas correlaciones, ya que la cruce Baroudeur x Renaico no presentó ningún tipo de correlación entre los marcadores y los parámetros de calidad, por esta razón no se esperan avances.

En las tres restantes cruzas (Genial x Pukem, Avital x Kona, Baroudeur x Dalcahue), se observaron avances al comparar la Población base vs la Población DAS, esto se debe a la buena correlación entre la presencia de alelos mutados de puroindolina (parámetro de selección molecular), y los valores de sedimentación, siendo en dos de estas cruces significativos.

Para MARTIN et al. (2001), los alelos de puroindolina mutados confieren ventajas a la calidad panadera, por lo cual los mejoradores podrían seleccionar estos alelos para mejorar la calidad panadera de las variedades seleccionadas.

Además de esto hubo correlaciones significativas entre la presencia de translocación y los niveles de sedimentación para las 2 cruzas que segregaban para estos alelos, obteniendo avances significativos para este parámetro en la cruzada Avital x Renaico.

Para el índice de dureza se dio la misma situación, de las cuatro cruzas que segregaban para estos alelos, solo en las tres cruzas antes mencionadas hubo avance entre la Población base y la Población DAS, en estas tres cruzas el avance fue significativo. Para la cruzada Baroudeur x Renaico, la ausencia de correlación entre el marcador y el índice de dureza debido principalmente a las características de los padres y la población segregante generada impidió obtener avances significativos, esto se discute extensamente en el capítulo respectivo.

5 CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares evaluados en esta investigación, son una poderosa herramienta para la caracterización de los padres en relación con los factores de calidad, permitiendo dirigir las cruzas en función de objetivos específicos.

La selección de alelos asociados a calidad panadera en etapas segregantes, no afecta la distribución de otros parámetros de selección como peso de 1000 granos o altura de planta, estableciéndose una independencia de estos parámetros.

Las frecuencias esperadas de los diferentes alelos y combinaciones alelicas evaluadas en las poblaciones segregantes, se ven afectadas en diferentes grados dependiendo de la craza y el número de alelos involucrados, por esta razón, la caracterización y selección de las combinaciones alelicas, es una importante herramienta en etapas segregantes tempranas.

La distribución de los valores de sedimentación SDS y porcentaje de proteína se caracterizan por presentar distribuciones normales en torno a una moda, a diferencia de esto, los valores de dureza de grano presentan distribuciones con diferentes modas debido a la acción de genes mayores que determinan esta característica como son los genes *Pina* y *Pinb*.

La presencia de los diferentes alelos de puroindolina evaluados están fuertemente correlacionados a la textura de grano, siendo de textura mas dura cuando existe una mutación en los alelos de puroindolina (*Pina*-D1b y *Pinb*-D1b), y de texturas mas suaves cuando presentan los alelos no mutados (*Pinb*-D1a y *Pinb*-D1a).

En este estudio, los alelos de puroindolina están fuertemente correlacionados con los índices de sedimentación, aunque en menor medida que la asociación a textura de grano. La presencia de la mutación en los alelos de puroindolina esta asociada a mayores niveles de sedimentación.

Se comprueba que la presencia de la translocación trigo-centeno tiene efectos negativos sobre los índices de sedimentación.

No se observaron efectos significativos en la presencia del alelo de glutenina de alto peso molecular subunidad 5+10 con los índices de sedimentación. Esto pudo deberse al fuerte efecto de la mutación en los alelos de puroindolina y otros alelos de glutenina sobre la sedimentación, enmascarando el efecto de la subunidad 5+10.

La selección directa al alelo (DAS), mejora la eficiencia de selección, obteniéndose avances significativos en textura de grano y sedimentación para los casos en que se presentaban correlaciones significativas y cuando los valores de sedimentación y textura de grano de los parentales involucrados responden a la presencia de un determinado alelo.

El avance genético obtenido en una población segregante no depende exclusivamente del grado de correlación del marcador molecular con la característica evaluada. El grado de avance genético también se ve afectado por de la diferencia de promedios de los padres, otros parámetros de selección y el porcentaje de individuos seleccionados que posean el alelo deseado.

6 RESUMEN

Siendo la calidad de la harina un factor importante que determina su uso industrial, se hace necesario conocer los parámetros que la determinan y la forma como poder incrementarla en procesos de selección temprana dentro de programas de mejoramiento genético.

El objetivo de esta investigación fue cuantificar el progreso genético obtenido en una población F_3 para factores de calidad industrial en trigo, cuando se combina el uso de herramientas biotecnológicas, como ser la selección molecular asistida (MAS), con métodos de selección convencional.

Para ello, se evaluaron siete poblaciones segregantes F_3 derivadas de poblaciones F_2 , las poblaciones F_3 fueron seleccionadas por planta individual para caracteres cualitativos (altura, tipo agronómico, sanidad, etc.), denominándose a esta selección fenotípica "Población Base". Posteriormente, a cada planta seleccionada se le realizó una caracterización molecular utilizando la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) para genes que determinan de manera significativa la expresión de calidad de la harina, incluyendo: glutenina alto peso molecular (Alelo 5+10), genes de dureza (Alelos Pinb-D1b, Pina-D1a, Pinb-D1a) y presencia de segmento translocado (Trigo/Centeno 1R), estableciéndose una población seleccionada alélicamente (Población DAS) sobre la base de una selección MAS.

El índice de dureza del grano y sedimentación a través de NIR (Reflectancia del Infrarrojo Cercano) para cada planta fueron medidos con el fin de estimar el progreso genético alcanzado. Se obtuvieron avances significativos entre la Población base y la Población DAS para dureza de grano en tres de las cuatro cruzas que segregaban para alelos de puroindolina, esto debido a la fuerte correlación entre texturas duras de grano y la presencia de alelos mutados de puroindolina, también fueron

observados avances significativos para el índice de sedimentación en tres de las seis cruzas que segregaban para alelos asociados con mayores niveles de sedimentación, los alelos positivamente correlacionados fueron los alelos mutados de puroindolina y ausencia de translocación.

Los resultados demostraron que existe la posibilidad de identificar plantas superiores y obtener avances significativos para parámetros de calidad en etapas tempranas de segregación cuando se combinan mecanismos de selección convencional y molecular.

SUMMARY

Being the quality of flour an important factor for determining its industrial use, it becomes necessary to get to know the parameters which determine this quality and the manner to increase it at early selection processes within genetic improvement programmes.

The purpose of this research was to quantify, in an F_3 population, the genetic progress obtained for factors of industrial quality in wheat when the use of biotechnological tools, such as assisted molecular selection (MAS), is combined with conventional selection methods.

Seven segregated populations F_3 were evaluated which were derived from F_2 populations previously selected per individual plant for qualitative traits (height, agronomic type, diseases resistance, etc.) and designated as “base Population”. Then a molecular characterization for each selected plant was carried out using the chain polimerase reaction (PCR) for genes which determines significantly the quality expression of the flour including high molecular weight glutenine (Allele 5+10), hardness gene (Alleles Pinb-D1b, Pina-D1a, Pinb-D1a) and presence of translocated segment (Wheat/Rye 1R), thus establishing an allelewise selected population (DAS Population) on the basis of an MAS selection. The grain hardness index and sedimentation trough NIR (Near infrared reflectance) for each plant were obtained so as to estimate the genetic progress achieved.

Significant advances were obtained between the “base Population” and “DAS Population” for hardness of grain in three of the four cross that were segregating for puroindoline alleles, this due to the strong correlation between this parameter and the presence of mutation in alleles of puroindoline, significant advances were observed also

for the index of sedimentation in three of the six cross that were segregating for alleles, associated principally to the strong correlation with alleles mutation of puroindoline and absence of translocación.

Results show that, when combining molecular and conventional selections mechanisms, there is a possibility to identify superior plants at early stages of segregation regarding qualitative traits such as grain industrial quality.

7 BIBLIOGRAFIA

- AHMAD, A. 2001. Molecular marker assisted selection of HMW glutenin alleles related to wheat bread quality by PCR-generated DNA markers. *Theor. Appl. Genetic.* 101:892-896.
- ALLARD, R. 1960. Principles of plant breeding. Wiley, Inc. 485 p.
- ARCOS, A. 2001. Análisis genético de los determinantes de la calidad agroindustrial del trigo (*Triticum aestivum* L.) en Chile. Tesis de M. Sc. Valdivia, Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. 120 p.
- BERZONSKY, W. y FRANCKI M. 1999. Biochemical, molecular, and cytogenetic technologies for characterizing IRS in wheat: A review. *Euphytica.* 108: 1-19.
- BETTGE, A. y MORRIS C. 2000. Relationships among grain hardness, pentosan fractions and end-use quality of wheat. *Cereal Chemistry.* 77:241-247.
- CAMPOS DE QUIROZ, H. 1992. Biotecnología Vegetal: Emergente complemento al mejoramiento tradicional de plantas cultivadas. *Investigación y Progreso Agropecuario – Carillanca (Chile).* 11 (2): 3-7.
- CAMPOS DE QUIROZ, H. 1995. Marcadores Moleculares: Conceptos. *Agro Sur (Chile).* 23(1): 68-75.
- CAMPOS DE QUIROZ, H. y SALVO, H. 1995. Marcadores Moleculares: Aplicaciones al mejoramiento genético de plantas. *Agro Sur (Chile).* 23(2): 173-185.

- CAMPOS DE QUIROZ, H. 2000. Biotecnología al grano. Bioplanet. Año 1 (3): 13-19.
http://www.bioplanet.net/magazine/bio_mayjun_2000/bio_2000_mayjun_reportaje.htm. Fecha de entrada 10 ENE 2002.
- CARTER, B.; MORRIS, C.; y ANDERSON, J. 1999. Optimizing the SDS sedimentation test for end-use quality selection in a Soft White and Club wheat breeding program. *Cereal Chemistry*. 76(6): 907-911.
- CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION, 2000. Norma Chilena 1237-2000, Trigo harinero Requisitos. Primera Edición. 16 p.
- DELWICHE, S. 1998. Protein Content of Single Kernels of Wheat by Near-Infrared Reflectance Spectroscopy. *Journal of Cereal Science*. 27 (3): 241-254.
- DELWICHE, S.; GRAYBOSH, R. y PETERSON, C. 1999. Identification of wheat lines possessing the 1AL/1RS or 1BL/1RS wheat-rye translocation by near-infrared reflectance spectroscopy. *Cereal Chemistry*. 76: 255-260.
- DOYLE, J. y DOYLE, J. 1987. Isolation of plants DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- D`OVIDIO, O. y ANDERSON, D. 1994. PCR analysis to distinguish between alleles of a member of a multigene family correlated with wheat bread-making quality. *Theor. Appl. Genetic*. 88: 759-763.
- DUBREIL, L.; MELIANDE, S.; CHIRON, H.; COMPOINT, J.; QUILLIEN, L.; BRANLARD, G. y MARION, D. 1998. Effect of puroindolines on the breadmaking properties of wheat flour. *Cereal Chemistry*. 75(2):222-229.

- ERCOLI, I. 2002. Selección molecular para calidad panadera en trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesis de Ing. En Ejecución Agrícola, INACAP. 59 p.
- FELDMAN, M. 1976. Taxonomic Classification and Names of Wild, Primitive, Cultivated, and Modern Cultivated Wheats. Wheats. In: Simmonds, N.W. (eds.). Evolution of Crop Plants. Longman, London. pp: 120-128.
- FLAVELL, R.B.; GOLDSBROUGH, A.P.; ROBERT, L.S.; SCHNICK, D. y THOMPSON, R.D. 1989. Genetic Variation in Wheat HMW Glutenin Subunits and Molecular Basis of Breadmaking Quality. *Biotechnology* 7. 1281-1285 p.
- FRIEBE, B.; JIANG, J.; RAUPP, W.J.; MCINTOSH, R.A; y GILL, B.S. 1996. Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to diseases and pest; Current status. *Euphytica*. 91: 59-87.
- GIROUX, M. y MORRIS, C. 1997. A serine to glycine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theor. Appl. Genetics*. 95: 857-864.
- GIROUX, M. y MORRIS, C. 1998. Wheat grain hardness results from highly conserved mutation in the friabilin components puroindoline a and b. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 95: 6262-6266.
- GIROUX, M.; TALBERT, L.; LANNING, S.; HEMPHILL, A. y MARTIN, J. 2000. Association of puroindoline sequence type and grain hardness in hard red spring wheat. *Crop Science*. 40: 370-374.
- GRANGER, D.; CORTAZAR, R.; RAMIREZ, I.; HACK, E.; ZERENÉ, M. y CORTES, V. 1999. Contenido de proteína y proteína por hectárea en Trigo. *Tierra Adentro, INIA*. (Chile). 26: 32-33.

- GRATTAPAGLIA, D. y FERREIRA, M. 1996. Introducao ao uso de marcadores moleculares em análise genetica. Embrapa, Brasilia D.F. 2ª ed. 220 p.
- GRAYBOSCH, R.; PETERSON, C.; HANSEN, L.; WORRALL, D.; SHELTON, D. y LUKASZEWSKI A. 1993. Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL / 1RS and 1AL - 1RS wheat-rye translocation lines. *Journal of Cereal Science*. 17: 95-106.
- GRAYBOSCH, R.; PETERSON, C.J. y CHUNG, O.K. 1999. Quality effects of rye (*Secale cereale* L.) chromosome arm 1RL transferred to wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*. 29: 211-216.
- GRAYBOSCH, R. 2001. Mini review. Uneasy unions: Quality effects of rye chromatin transfer to wheat. *Journal of Cereal Science*. 33: 3-16.
- 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 (3): 211- 218.
- HEWSTONE, C. 1998. La necesidad de explorar los altos rendimientos en trigo. En Seminario "Trigo: preparándonos para el 2000". pp. 2-4 .
- JOBET, C. 1987. La variedad de trigo, producto de un largo trabajo. *Investigación y Progreso Agropecuario Carillanca (Chile)*. 6(2): 2-4.
- JOBET, C. 1989. El trigo: pan nuestro de cada día. *Investigación y Progreso Agropecuario Carillanca (Chile)*. 8(39): 18-22.

- JOBET, C.; ZUÑIGA, J.; CAMPOS, H.; RATHGEB, F.; SOTO, B.; ARCOS, A. y MARIN, G. 2001. Mejoramiento de trigo: selección molecular. Tierra Adentro (Chile). (37): 16-17.
- JOHNSON, V.; MATTERN, J.; PETERSON, C. y KUHR, S. 1985. Improvement of wheat protein by traditional breeding and genetics techniques. Cereal Chemistry. 65(5): 350-355.
- JOLLY, C.; GLENN, G. y RAHMAN, S. 1996. GPS-1 genes are linked to the grain hardness locus (Ha) on wheat chromosome 5D. Proc. Natl. Acad. Sci. 93:2408-2413.
- KENT, N.L. 1987. Tecnología de los Cereales. Ed. Acribia. Zaragoza España. 260 p.
- KNOTT, D. 1986. Novel approaches to wheat breeding. Special publications CSSA, Crops Science Society of America. In Genetics improvement in yield of wheat. (13): 25-40.
- KOEBNER, R. 1995. Generation of PCR-based markers for the detection of rye chromatin in A wheat background. Theor. Appl. Genetic. 90:740-745.
- KOHLI, M. 1998. Use of biotechnology in wheat breeding in the Southern cone region. Koohli, M; Francis, M. (eds.). "Application of biotechnologies to wheat breeding". La Estanzuela, Uruguay; CIMMYT-INIA. Pp. 1-14.
- KRAWETZ, S. 1989. The polimerasa chain reaction: opportunities for agriculture. AgBiotech News and Info. 1(6): 897-902.

- LAFIANDRA, D.; D'OVIDIO, R.; PORCEDDU, E.; MARGIOTTA, B. y COLAPRICO, G. 1993. New data supporting high glutenin subunit 5 as the determinant of quality differences among the pair 5+10 vs. 2+12. *Journal Cereal Science*. 18: 197-205.
- LELLEY, J. 1976. *Wheat breeding, theory and practice*. Publishing house of the hungarian academy of Science. Akademiai Kiado, Hungría. 485 p.
- LILLEMO, M. y MORRIS, C. 2001. A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theor. Appl. Genetic*. 100: 1100-1107.
- LILLEMO, M. 2001a. Genetics of endosperm hardness.
<http://arken.nlh.no/~ipfmol/genetics.html>. Fecha de entrada 10 ENE 2002.
- LILLEMO, M. 2001b. Studies of puroindoline a and b genes and their effect on wheat grain hardness. Ph.D thesis, Department of Horticulture and Crop Sciences, Agricultural University of Norway.
<http://arken.nlh.no/~ipfmol/thesis.html>. Fecha de entrada 10 ENE 2002.
- LUO, C.; GRIFFIN, W.; BRANLARD, G. y MCNEIL, D. 2001. Comparison of low- and high molecular-weight wheat glutenin allele effects on flour quality. *Theor. Appl. Genetic*. 102:1088-1098.
- MAC-KEY, J. y QUALSET. O. 1986. Conventional methods of the wheat breeding. Special publications CSSA, Crops Science Society of America. In genetics improvement in yield of wheat. (13): 7-24.
- McKENDRY, A.; TAGUE, D.; FINNEY, P. y MISKIN, K. 1996. Effect of 1BL/1RS on milling and baking quality of soft red winter wheat. *Crop Sci*. 36: 848-851.

- MARTIN, P.; FROHBERG, R.; MORRIS, C.; TALBERT, L. y GIROUX, M. 2001. Milling and bread baking traits associated with puroindoline sequence type in hard red spring wheat. *Crop Sci.* 41: 228-234.
- MELLADO, M. y MADARIAGA, R. 1996. Mejoramiento genético del trigo. Análisis del periodo 1964 – 1994. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Centro Regional de Investigación Quilamapu-INIA (Chile). (70): 67 p.
- MOONEN, J.; SCHEEPSTRA, A. y GRAVELAND, A. 1982. Use de SDS-sedimentation test and SDS-polyacrylamidegel electrophoresis for screening breeder`s samples of wheat for bread-making quality. *Euphytica.* 31: 677-690.
- MONTESINOS, 2001. El trigo en Chile: Alto rendimiento, baja competitividad. Publicaciones Bimestrales Tierra adentro (Chile). (37): 4-6.
- MORRIS, C.; LILLEMOM, M.; SIMEONE, M.; GIROUX, J.; BABB, S. y KIDWELL, K. 2001. Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Sci.* 41: 218-228.
- MUÑOZ, C. y HEWSTONE, N. 1995. Técnicas biotecnológicas aplicadas al mejoramiento genético de plantas. *Simiente, Chile.* 65 (4). 18-25.
- MUÑOZ, C. y CAMPOS DE QUIROZ, H. 1998. Qué es la biotecnología. *Tierra Adentro (Chile).* (23): 24-27.
- OFICINA DE ESTUDIOS PUBLICOS Y POLÍTICAS AGRARIAS, (ODEPA), 2001. <http://www.odepa.cl/base-datos/estadisticas/>. Fecha de entrada 10 ENE 2002.

- PAYNE, P.; CORFIELD, K.; HOLT, L. y BLACKMAN J. 1981. Correlations between the inherence of certain high -molecular weight subunits of glutenin an bread-marking, quality in progenies of six crosses of bread wheat., J. Sci. Food Agric. 32:51-60.
- PAYNE, P.; NIGHTINGALE, M.; KRATTIGER, A. y HOLT, L. 1987. The relationship between HMW glutenin subunit composition and the bread-making quality of british-grow wheat varieties. J. Sci. Food Agric. 40: 51-65.
- PAYNE, P. 1987. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-marking quality. Ann. Rev. plant Physiol. 38:141-153.
- PEÑA, R.; ORTIZ-MONASTERIO, J. y SAYRE, K. 1998. Estrategias para mejorar (o mantener), la calidad panadera en trigo de alto potencial de rendimiento. KOOHLI, M; MARTINO, M. (eds.) .“Explorando altos rendimiento de trigo”. La estanzuela, Uruguay; CIMMYT-INIA. pp. 287-304.
- PETERSON, C.; GRAYBOSCH, A.; BAENZIGER, P. y GROMBACHER, A. 1992. Genotype and environment effects on quality characteristics of hard red winter wheat. Crop Sci. 32:98-103.
- POEHLMAN, J. 1965. Mejoramiento genético de las cosechas. eds. Limusa-Wiley. S.A. México. 453 p.
- RABINOVICH, S. 1998. Importance of the wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of (*Triticum aestivum* L.) National center for plant genetics resource of Ukraine, Ukrania. pp: 401-418.
- RAHMAN, A. 1987. Manual of wheat breeding procedures. University of Agriculture Fauilabad, Pakistan. 134 p.

- RIBAUT, J.; HU, X.; HOISINGTON, D. y GONZALES, D.; 1997. Use de STSs and SSRs a rapid and reliable preselection tools in a markers-assisted selection backcross scheme. *Plant molecular biology reporter*. 15 (2): 156-164.
- SHEWRY P. y TATHAM A. 1990. Review article: The prolamin storage protein of cereal seeds: structure and evolution. *Biochemical journal*. 267: 1-12.
- SIMMONDS, D. 1979. Principles of crop improvement. (Ed.) Longman Inc. New York. 408 p.
- SLAUGHTER, D.; NORRIS, K. y HRUSCHKA, W. 1992. Quality and classifications of hard red winter. *Cereal Chemistry*. 69(4): 428-432.
- SORRELS, 1998. Marker assisted selection: Is it practical?. KOOHLI, M; FRANCIS, M.. (eds.) .“Application of biotechnologies to wheat breeding”. La Estanzuela, Uruguay; CIMMYT-INIA. pp: 103-110.
- SORRELS, E. y WILSON, W. 1997. Direct classification and selection of superior alleles for crop improvement. *Crop Sci*. 37: 691-697.
- STEEL, R. y TORRIE, S. 1980. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. McGraw-Hill. 2^a ed. 633 p.
- TAYLOR, J.; BAYLES, B. y FIFILED, C. 1939. A simple measure of kernel hardness in wheat. *J. Am. Soc. Agron*. 31.775.
- WIESER, H.; KIEFFER, R. y LELLEY, T. 2000. The influence of 1B/1R chromosome translocation on gluten protein composition and technological properties of bread wheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 1640-1647.

- WRIGLEY, C. y MORRIS, C. 1996. Chapter 11. Breeding cereals for quality improvement. In: Cereal Grain Quality (Henry RJ and Kettlewell PS eds). Chapman & Hall, London. pp: 321-365.
- ZHANG, H.; JOHNSON, G.; KRENZER, G. y GRIBBLE, R. 1998. Soil testing for an economically and environmentally sound wheat production in Oklahoma. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29:1707-1717.
- ZUÑIGA, J.; JOBET, C.; CAMPOS, H.; MATHIAS M. y SCHAFER, D. 2001a. Identificación molecular de alelos de puroindolinas en trigos (*Triticum aestivum* L.), invernales Chilenos. In: IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO 2001, Brasil. pp: 16-17
- ZÚÑIGA J.; JOBET, C.; CAMPOS, H.; AVENDAÑO, M. y GRANGER, D. 2001b. Identificación mediante PCR-Elisa de translocaciones derivados del centeno (*Secale cereale* L.) en genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) y su efecto sobre el volumen de sedimentación (SDS). . In: IV Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. REDBIO 2001, Brasil. pp: 25-26

ANEXOS

**ANEXO 1.- Tabla con los datos de caracterización fenotípica, molecular y calidad,
Población base. Cruza Genial x Pukem**

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
22	A	85	50.55	M	-	D	-	37.9	18	9.8
22	B	90	41.65	M	-	S/D	-	3.7	24.1	10.2
22	C	90	45.10	M	-	S/D	+	26.4	19.2	9.2
25	A	100	44.95	M	-	S	-	4.2	25.2	10.1
25	B	110	46.30	M	-	S	-	5	25	9.8
25	C	115	47.35	M	-	S	-	3.4	25.3	9.9
27	A	95	44.95	M	-	S/D	-	26.4	21.9	12.1
27	B	95	36.15	M	-	D	+	7.4	25.2	10.6
27	C	120	42.30	M	-	D	+	10	22	11
29	A	110	55.80	M	-	S	-	6.8	25.5	10.6
29	B	110	51.35	M	-	S	-	11.6	25.7	10.8
29	C	105	54.30	M	-	S	-	7.4	25.8	10.1
35	A	85	43.55	M	-	D	-	21.1	20.5	9.5
35	B	100	49.25	M	-	S/D	-	15.9	23.3	10.6
35	C	100	52.90	M	-	S/D	-	15.6	21.9	9.2
37	A	110	58.70	M	-	S	+	1	25	9.3
37	B	105	48.15	M	-	S	-	1.4	25.6	10
37	C	100	51.35	M	-	S	-	7.7	25.3	10.5
38	A	95	50.30	M	-	D	+	28.5	20.1	10.4
38	B	105	52.05	M	-	D	+	27.9	20.2	9.4
39	A	85	46.40	M	-	D	-	27.9	19.3	9.8
39	B	85	50.05	M	-	D	+	29.2	19.5	10.5
39	C	95	48.25	M	-	D	-	32.7	19.4	10.8
41	A	90	50.05	M	-	S	+	3.2	26	10.5
41	B	90	47.65	M	-	S	+	7.9	24.6	9.6
41	C	85	49.95	M	-	S	+	1	25.2	10.1
44	A	95	54.70	M	-	S	+	17.1	24.8	11.7
44	B	90	50.55	M	-	S	+	12.9	24.5	10.6
44	C	85	47.90	M	-	S	+	9.3	24.8	11
45	A	110	54.10	M	-	D	+	22.5	22.6	10.1
45	B	80	51.50	M	-	D	+	26.5	21.6	11.1
46	A	110	53.40	M	-	D	-	38.7	19.6	10.6
46	B	95	47.55	M	-	D	+	33	19.3	11.1
47	A	100	51.65	M	-	S/D	-	7.2	23.4	9.7
47	B	100	58.10	M	-	S/D	-	17.3	23.5	11.3
47	C	110	54.10	M	-	S	-	12.3	23.6	9.9
49	A	115	60.00	M	-	S/D	+	21.7	23.2	11.6
49	B	110	49.10	M	-	S/D	+	14.5	23.1	11.2

M = Mutica, S/D Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente. (Continúa)

Continuación **Anexo 1** Cruza Genial x Pukem

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
49	C	110	51.65	M	-	D	+	17.7	22.7	10.4
50	A	100	46.40	M	-	S	-	1.3	25.3	10.1
50	B	110	46.05	M	-	S	-	4.4	25.9	10.8
50	C	105	43.90	M	-	S	-	6	25.3	10.2
52	A	100	44.65	M	-	S	-	15.2	20.5	9.7
52	B	100	44.75	M	-	S/D	+	11	22.4	9.7
52	C	95	39.90	M	-	S	+	16.7	22	10.9
53	A	105	48.30	M	-	D	-	10.5	25	10.3
53	B	120	49.50	M	-	D	-	10	25.9	9.4
54	A	95	50.25	M	-	D	+	6.7	24.7	10.7
54	B	105	46.65	M	-	D	+	1	25.5	11
54	C	85	51.40	M	-	D	+	27.3	22.3	10.6
55	A	85	44.55	M	-	D	+	24.4	19.4	9.4
55	B	90	41.30	M	-	S/D	+	21.6	17.6	9
55	C	85	42.00	M	-	S/D	+	21.3	19.9	9.1
56	A	100	56.30	M	-	S	+	3.5	25.4	10.1
56	B	85	48.50	M	-	S	+	1.6	26.8	11.4
56	C	100	63.10	M	-	S	+	10.8	25.8	9.6
59	A	90	43.05	M	-	S	+	1	25.9	9.6
59	B	85	45.25	M	-	S	+	2.7	24.8	10.5
59	C	90	44.30	M	-	S	+	7	24.7	9.8
60	B	90	39.60	M	-	S	-	11.1	22.6	9.6
60	C	95	41.60	M	-	S	-	20	23.5	11.3
61	A	85	49.20	M	-	S	+	11.9	25.2	11.3
61	B	95	55.70	M	-	S	+	13.3	26.7	12.6
62	A	95	54.00	M	-	S	+	5.3	23.7	10.1
62	B	100	48.50	M	-	S	+	6	25.2	10
62	C	85	51.45	M	-	S	+	7.8	25.5	10.5

M = Mutica, S/D Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente. (Continua)

Continuación Anexo 1. Cruza Baroudeur x Renaico.

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
63	A	100	48.70	M	+	D	-	19.5	24.2	10.9
63	B	85	48.45	M	+	D	-	19	23.9	12.3
63	C	100	40.80	M	+	D	-	22	21.3	11.1
66	A	90	47.50	M	-	S	-	15.8	23.7	9.3
66	B	90	51.20	Barbada	+	S	-	15.1	23.3	9.8
67	A	95	47.20	M	-	D	-	28	21.6	10.8
67	B	90	42.20	M	-	S	-	36.4	20.3	10.5
67	C	90	45.95	M	-	S	-	20.7	22.5	9
68	A	95	53.35	Barbada	-	D	-	25.7	21.8	10.2
68	B	90	55.25	Barbada	-	D	-	26.1	22.2	10.5
69	A	90	44.80	M	+	S	-	14.2	23.4	9.3
69	B	105	46.30	M	+	S/D	-	27.7	21.2	9.8
70	A	100	48.30	M	+	D	-	8.4	24.3	9
70	B	90	55.45	M	+	D	-	12.3	23.6	9
72	A	90	43.30	Barbada	+	S	-	19.6	23.2	9.7
72	B	80	46.40	M	+	S	-	22.4	22.8	10
73	A	100	42.50	M	+	S	-	16	22.7	9.6
73	B	120	50.60	M	+	S	-	17.6	22.2	9.5
73	C	110	52.10	M	+	S	-	20.2	22.2	9.1
75	A	105	49.60	M	+	S	-	24.3	23.8	10.4
75	B	110	48.50	M	+	D	-	18.4	23.6	10
76	A	105	47.45	M	-	D	-	16.9	23.9	10.7
76	B	105	50.20	M	+	D	-	0	0	0
78	A	95	46.90	M	-	D	-	32.9	19.1	9.2
78	B	85	44.25	M	-	S	-	20.7	22.9	10
78	C	95	43.70	M	-	D	-	27.4	22.7	10.5
79	A	110	52.10	Barbada	-	D	-	15.9	24.1	10.4
79	B	105	49.80	M	+	D	-	0	0	0
79	C	85	52.95	M	+	D	-	21.3	22.4	10.2
82	A	80	51.35	M	+	S/D	-	20.2	23.2	9.7
82	B	95	53.80	M	+	S/D	-	28.9	21.8	10.3
82	C	100	47.55	M	+	S	-	25.3	21.7	9.6
83	A	90	48.60	M	-	S/D	-	26.1	22	10.1
83	B	85	44.55	M	-	D	-	21.6	22.4	9.7
83	C	95	51.30	M	-	S/D	-	21.3	22.4	10.4
84	A	100	50.65	M	+	S	-	15	23.3	9.9
84	B	100	45.70	M	+	S	-	20.3	23.2	9.3
84	C	95	46.20	M	+	S	-	15.2	23	9.2
85	A	90	44.70	Barbada	+	S	-	20.9	21.8	9.6
85	B	100	53.45	Barbada	+	S	-	24.5	22.9	10.2

(Continua)

Continuación **Anexo 1** Cruza Baroudeur x Renaico.

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
85	C	85	41.65	Barbada	-	S	-	23.4	23.5	10.6
86	A	105	52.55	M	-	D	-	23.4	23.3	9.8
86	C	100	55.55	M	-	D	-	20.6	24.3	10.4
87	A	110	54.80	Barbada	-	S	-	25.9	22.5	10.8
87	B	105	55.70	Barbada	-	S	-	25	20.5	10
87	C	100	48.75	Barbada	-	S	-	29.8	22.2	11.5
88	A	100	49.85	M	-	S	-	22.8	22.2	10
88	B	110	51.85	M	-	S/D	-	26.2	23.3	10.2
88	C	100	51.80	M	-	S	-	25.6	22.2	9.5
89	A	115	49.40	M	-	S/D	-	16.9	23.8	10.3
89	C	115	57.30	M	-	S/D	-	24.5	24	10.5
90	A	100	48.70	M	+	D	-	16.7	22.7	9.6
90	C	95	44.60	M	+	D	-	28.3	22.4	9.8
91	A	85	48.90	M	+	S/D	-	16	23.5	9.3
91	C	80	50.45	M	+	S/D	-	20.7	22	8.7
92	A	110	57.60	M	+	S	-	12	25.3	10.2
92	B	100	54.35	M	+	S	-	0	0	0
92	C	110	53.00	M	+	S	-	10.9	23.9	9.4
94	A	85	37.90	M	+	S/D	-	31.3	21.5	11.1
94	B	95	48.45	Barbada	-	D	-	15.4	23.9	9.9
94	C	100	45.05	M	+	S/D	-	18.9	23.4	9.9
94	D	85	47.65	M	+	S/D	-	23.8	21.8	10.1
94	E	95	45.30	Barbada	+	S/D	-	23.9	22.1	9.5

M = Mutica, S/D Heterocigoto, +/- Ausencia y presencia del alelo respectivamente. (Continúa)

Continuación Anexo 1 Cruza Avital x Renaico.

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
95	A	85	48.50	Barbada	-	D	-	27.6	20.5	8.8
95	B	100	47.20	Barbada	+	D	-	20.2	21.6	9.2
95	C	100	47.70	Barbada	+	D	-	23.2	21.2	9.5
96	A	90	45.00	Barbada	-	D	-	32.3	19.4	9.4
96	B	90	46.45	Barbada	-	D	-	35.1	17.6	8.7
96	C	95	47.30	Barbada	-	D	-	25.4	19.3	8.8
97	A	100	45.65	Barbada	-	D	-	18.2	17.2	8.9
97	B	105	40.50	Barbada	+	D	-	23.8	18.4	9.2
97	C	100	44.45	Barbada	-	D	-	33.1	18.4	9
97	D	100	49.70	Barbada	-	D	-	19.8	20.1	8.3
98	A	85	50.60	Barbada	-	D	-	21.9	22.3	9.7
98	B	95	49.55	Barbada	+	D	-	29.3	19.1	9.2
98	C	95	49.00	Barbada	+	D	-	31.7	18.8	9.8
98	D	110	55.65	Barbada	+	D	-	26.8	19.1	8.4
100	A	100	51.25	Barbada	+	D	-	20.8	20.9	10.1
100	B	110	50.45	Barbada	+	D	-	20.4	21	9.8
109	A	105	42.80	Barbada	-	D	-	27.8	19.8	9.3
109	B	100	56.20	Barbada	+	D	-	24	20.3	9.1
112	A	100	50.35	Barbada	-	D	-	25.6	18.5	8.3
112	B	100	45.95	Barbada	-	D	-	28.4	18.3	8.1
113	A	90	36.25	Barbada	-	D	-	42.3	16.5	10.3
113	B	110	39.10	Barbada	-	D	-	30.2	18.1	9.4
114	A	100	48.30	Barbada	+	D	-	22.9	21.4	9.2
114	B	105	47.05	Barbada	-	D	-	32.8	19.7	9.8
115	A	90	52.30	Barbada	+	D	-	24.1	20.6	9.5
115	B	90	48.40	Barbada	+	D	-	21.4	22.1	9.5
115	C	90	42.30	Barbada	+	D	-	31	19.1	10.1
116	A	115	47.85	Barbada	-	D	-	30.9	17.9	8.1
116	B	110	47.15	Barbada	-	D	-	33.2	19	8.9
117	A	80	47.10	Barbada	-	D	-	29.7	20.4	9.6
117	B	90	49.95	Barbada	-	D	-	26.1	21.3	9.3
117	C	85	41.40	Barbada	-	D	-	35.6	21.9	10.6
118	A	100	53.65	Barbada	-	D	-	23.4	21.2	8.8
118	B	95	37.60	Barbada	-	D	-	30.4	20.6	10.1
119	A	115	46.90	Barbada	-	D	-	22.2	20.8	9.3
119	B	85	41.90	Barbada	-	D	-	29.6	21	10.3
119	C	105	46.70	Barbada	-	D	-	30.2	20.1	9.5
122	A	105	48.75	Barbada	-	D	-	23	21.7	9.4
122	B	95	49.15	Barbada	+	D	-	24.8	22.1	9.5
122	C	90	47.35	Barbada	-	D	-	27.9	21.3	9.8

(Continua)

Continuación Anexo 1. Cruza Avital x Renaico

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
123	A	95	43.65	Barbada	+	D	-	16.1	22.8	9
123	B	95	39.80	Barbada	+	D	-	25	20	10
123	C	100	35.70	Barbada	+	D	-	24	21.2	9.8
125	A	80	37.05	Barbada	-	D	-	31.6	19.7	9.8
125	B	100	49.15	Barbada	-	D	-	20.2	19.1	7.7
126	A	85	43.05	Barbada	-	D	-	31.5	21.1	9.9
126	B	95	49.10	Barbada	-	D	-	24.3	20.8	9
127	A	80	55.30	Barbada	+	D	-	14.2	24.1	9.7
127	B	80	55.35	Barbada	+	D	-	20.7	22.6	9.7
127	C	80	53.90	Barbada	-	D	-	22	21.5	9.4
128	A	100	46.85	Barbada	+	D	-	20	21.2	9
128	B	105	51.00	Barbada	-	D	-	29.2	20.3	8.9
134	A	85	41.75	Barbada	+	D	-	18	21.9	9.1
134	B	95	59.55	Barbada	+	D	-	31.4	22.7	11.9
134	C	90	45.25	Barbada	+	D	-	29.7	19.7	10.7
135	A	100	44.10	Barbada	-	D	-	16	21.7	10.1
135	B	100	50.50	Barbada	-	D	-	32	20	9.5
136	A	105	46.15	Barbada	-	D	-	28.1	20	8.6
136	B	95	40.15	Barbada	-	D	-	24	20.8	9.8
136	C	95	35.60	Barbada	-	D	-	25.6	20	9.6
138	A	85	48.50	Barbada	-	D	-	30	20	9.5
138	B	95	43.60	Barbada	-	D	-	25	21.1	9.4
139	A	100	52.85	Barbada	-	D	-	16	23.2	10
139	B	80	46.95	Barbada	-	D	-	19	20.6	9.4
139	C	85	47.55	Barbada	-	D	-	30.2	18.1	9.9
143	A	90	48.65	Barbada	+	D	-	20	22	9.3
143	B	95	52.95	Barbada	+	D	-	15.7	22.4	9.4
145	A	85	46.15	Barbada	+	D	-	17.5	21.9	9.5
145	B	85	37.65	Barbada	+	D	-	24.9	19.7	9
146	A	100	52.35	Barbada	+	D	-	17.1	22.9	9.7
146	B	105	44.85	Barbada	+	D	-	14	22.6	9.2
147	A	90	49.80	Barbada	+	D	-	18	21.2	9
147	B	80	46.50	Barbada	+	D	-	16.6	22.5	9.7
147	C	80	43.95	Barbada	+	D	-	30.1	10.9	9.7

M = Mutica, S/D Heterocigoto, +/- Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continua)

Continuación Anexo 1. Cruza Baroudeur x Kona

Planta Nº	Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR			
	Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína	
149	A	85	38.60	Barbada	-	S	-	22.60	23.2	13.1
149	B	100	45.95	Barbada	-	S	-	12.90	25.8	12.4
149	C	85	45.70	Barbada	-	S	-	11.80	25.3	11.5
152	A	100	43.75	M	-	S	-	6.80	24.7	11.4
152	B	115	52.10	M	-	S	+	5.80	25.8	10.4
158	A	90	45.20	Barbada	-	S	+	9.90	24.8	11.9
	B	100	48.85	Barbada	-	S	-	1.00	26.6	10.4
	C	95	44.10	Barbada	-	S	-	3.80	26.5	11.7
166	A	95	36.85	M	-	S	+	11.20	26.6	11.8
	B	95	43.40	M	-	S	+	4.00	25.2	10
	C	90	45.65	M	-	S	+	6.40	26.7	10.4
168	A	95	38.75	M	-	S	-	29.40	21.2	12
	B	105	43.25	M	-	S	-	29.40	19.4	11.2
	C	105	36.70	M	-	S	-	31.50	19.5	11
169	A	90	51.15	Barbada	-	S	-	22.00	24	11
	B	85	48.00	Barbada	-	S	+	18.90	25.2	11.6
170	A	90	57.90	M	-	S	-	27.50	23.4	10.6
	B	90	43.40	M	-	S	-	26.20	23.4	10.6
	C	90	47.55	M	-	S	-	29.60	22.5	10.7
171	A	90	47.00	M	-	S	-	9.50	26.7	11.4
	B	80	40.05	M	-	S	-	12.10	26.1	12.2
	C	90	42.25	M	-	S	-	8.20	26.7	11
172	A	85	41.50	Barbada	-	S	-	19.00	25	11
	B	85	35.85	Barbada	-	S	+	16.70	24.1	10.5
	C	90	55.20	M	-	S	+	18.20	25.9	11.6
173	A	100	45.70	M	-	S	+	26.10	22.8	10.9
	B	120	44.40	M	-	S	+	28.60	22	11.1
	C	115	36.75	M	-	S	+	24.30	22.4	11
175	A	90	39.10	M	-	S	+	18.40	24.3	12.1
	B	105	53.00	M	-	S	+	28.40	23.5	10.9
178	A	100	48.50	M	-	S	-	1.00	26.4	10
	B	100	44.60	M	-	S	-	8.60	25	9.9
	C	95	40.00	M	-	S	-	8.20	24	10.7
180	A	90	50.35	Barbada	-	S	+	18.00	21.3	10.6
	B	85	49.25	Barbada	-	S	+	27.50	20.8	11.3
	C	85	43.20	Barbada	-	S	-	15.10	23.7	10.5
	D	80	50.20	Barbada	-	S	+			
182	A	85	52.20	M	-	S	-	3.10	25.3	10.7
	B	85	45.90	M	-	S	-	6.00	24.6	10.4
	C	80	45.25	Barbada	-	S	-	1.80	26.2	10.6

(Continua)

Continuación **Anexo 1.** Cruza Avital x Renaico

Planta Nº	Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR			
	Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína	
185	A	85	44.60	Barbada	-	S	+	25.00	25.3	13.2
	B	85	39.95	Barbada	-	S	-	22.90	26.2	13.2
	C	95	49.35	Barbada	-	S	+	27.80	23	10.5
186	A	85	44.90	M	-	S	+	19.40	25	11.7
	B	90	47.20	M	-	S	+	22.90	23.4	10.4
187	A	80	48.50	M	-	S	+	13.60	25.6	10.5
	B	80	46.95	M	-	S	+	13.70	24.8	10.6
	C	90	50.85	M	-	S	+	12.30	26.1	10.7
	D	90	47.65	M	-	S	+	11.00	25.3	11.3
	E	80	43.90	M	-	S	+	10.20	26.9	11.1
	F	70	42.75	M	-	S	+	12.10	26.3	12.2
	G	70	38.80	M	-	S	+	12.00	25.9	10.5
	H	80	45.38	M	-	S	+	15.00	25.2	11.8
	I	80	46.45	M	-	S	+	16.80	26.1	12.3

M = Mutica, S/D Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continua)

Continuación Anexo 1. Cruza Avital x Kona

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
192	A	100	44.15	Barbada	-	S/D	+	33.24	23	9
	B	90	46.70	Barbada	-	S/D	+	33.24	22	9
	C	90	37.55	Barbada	-	S/D	+	38.78	23.9	11.2
193	A	95	47.90	Barbada	-	S	+	31.40	24	9.8
	C	95	47.90	Barbada	-	S	+	29.55	25	9.9
195	A	75	49.35	Barbada	-	D	-	31.40	22.4	10.2
	B	95	53.50	Barbada	-	S/D	-	38.78	26.1	10.6
	C	85	53.80	Barbada	-	S/D	-	33.24	24.3	10.4
196	A	95	50.70	Barbada	-	D	+	36.94	21.4	9.5
	B	95	46.10	Barbada	-	D	-	40.63	21.1	9.9
197	A	85	48.20	Barbada	-	S	+	40.63	26.2	15.2
	B	100	44.40	Barbada	-	S	+	33.24	25.8	11.4
	C	95	42.85	Barbada	-	S	+	33.24	25.9	11.4
198	A	90	44.20	Barbada	-	S	+	35.09	25.3	11.3
	B	90	41.15	Barbada	-	S	+	36.94	25.3	12.4
200	A	100	56.65	Barbada	-	D	-	36.94	21.8	10.4
	B	85	52.90	Barbada	-	S/D	-	27.70	24.6	10.5
201	A	80	48.60	Barbada	-	D	-	36.94	22.4	11
	B	85	51.90	Barbada	-	D	-	44.32	21	12.3
	C	85	44.75	Barbada	-	D	+	48.02	21.2	12.7
	D	80	44.45	Barbada	-	D	+	46.17	21.4	11.4
	E	90	41.45	Barbada	-	D	+	40.63	21.1	11.7
	F	90	43.00	Barbada	-	D	+	42.48	22.3	11.1
202	A	90	41.00	Barbada	-	D	+	33.24	20	10.7
	B	100	35.50	Barbada	-	D	+	35.09	18	11.9
	C	100	44.65	Barbada	-	D	+	35.09	18.4	10.7
205	A	90	46.75	Barbada	-	D	-	40.63	21.2	11.2
	B	85	44.05	Barbada	-	D	+	51.71	21.4	10.5
	C	80	36.60	Barbada	-	D	+	44.32	21.4	11.4
211	A	95	53.30	Barbada	-	S	-	35.09	26.1	11.1
	B	100	50.60	Barbada	-	D	-	35.09	26.6	10.6
213	A	90	43.95	Barbada	-	D	+	33.24	21.2	9.3
	B	90	32.85	Barbada	-	D	-	40.63	19.4	10.3
	C	90	41.80	Barbada	-	D	+	35.09	20.4	9.5
214	A	95	52.20	Barbada	-	S	+	24.01	25.1	9.6
	B	100	55.10	Barbada	-	S	+	35.09	25.9	11.1
	C	95	48.10	Barbada	-	S	+	33.24	25.6	10.2
218	D	105	45.90	Barbada	-	S	+	29.55	26.9	10.1
	A	95		Barbada	-	D	+	42.48	21.8	10.5
	C	80		Barbada	-	D	+	42.48	19.6	11.7
	B	95	43.85	Barbada	-	S/D	-	46.17	24.6	10.4
219	C	75	48.70	Barbada	-	S/D	-	29.55	24.8	10.1
	D	100	53.45	Barbada	-	S/D	-	35.09	24.6	10.7
	E	95	51.70	Barbada	-	D	-	35.09	22.2	10.3

M = Mutica, S/D Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continua)

Continuación Anexo 1. Cruza Renan x Dalcahue

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
221	A	100	52.05	Barbada	-	D	+	19.00	22.2	10.1
221	B	90	43.95	Barbada	-	D	+	18.90	21.8	10
221	C	100	52.40	Barbada	-	D/D*	+	15.50	22.4	10.2
222	A	80	56.00	Barbada	-	D*	+	32.90	21	11.2
222	B	85	51.00	Barbada	-	D*	+	32.90	21.8	11.1
223	A	70	52.95	Barbada	-	D*	+	22.00	22.9	10.7
223	B	65	47.55	Barbada	-	D*	+	22.00	22	10.8
223	C	90	44.20	Barbada	-	D*	+	23.00	23	10.5
228	A	90	43.55	Barbada	-	D	+	20.00	20	10.5
228	B	75	47.05	Barbada	-	D	+	29.90	21.9	10.5
228	C	75	43.60	Barbada	-	D	+	29.30	22.3	10.5
228	D	75	42.05	Barbada	-	D	+	37.30	20.3	11.4
231	A	100	46.60	Barbada	-	D*	+	14.40	22.8	9.5
231	B	75	46.60	Barbada	-	D*	+	14.10	22.7	9.7
232	A	60	35.00	Barbada	-	D/D*	+	28.50	20.8	12.4
232	B	90	45.05	Barbada	-	D/D*	+	15.70	22.2	10.5
232	C	95	46.50	Barbada	-	D/D*	+	14.20	21.9	10.1
235	A	110	57.15	Barbada	-	D	+	27.00	22.4	10.5
235	B	75	42.90	Barbada	-	D	+	29.50	23	11.1
235	C	90	47.35	Barbada	-	D	+	32.40	21.3	11.1
235	D	75	51.00	Barbada	-	D	+	33.50	21.1	11.3
235	E	90	42.50	Barbada	-	D	+	27.80	21.1	10.3
236	A	70	41.70	Barbada	-	D*	+	30.30	20.4	10.5
236	B	90	43.75	Barbada	-	D*	+	25.10	21.5	10.6
236	C	100	49.05	Barbada	-	D/D*	+	30.00	20.5	10.5
236	D	95	39.90	Barbada	-	D*	+	41.10	19.1	11.8
237	A	75	42.45	Barbada	-	D/D*	+	17.10	23	9.4
237	B	90	44.75	Barbada	-	D/D*	+	18.50	22.3	9.2
237	C	70	35.65	Barbada	-	D/D*	+	18.60	23	9.9
237	D	75	43.65	Barbada	-	D/D*	+	18.30	22.9	9.3
237	E	90	48.60	Barbada	-	D	+	20.40	23.6	9.9
239	A	75	48.30	Barbada	-	D	+	28.30	23.1	10.5
239	B	85	44.10	Barbada	-	D	+	25.90	21.2	10.8
239	C	85	51.90	Barbada	-	D	+	22.60	23	10.3
239	D	90	42.95	Barbada	-	D	+	20.40	21.7	9.8
239	E	85	45.70	Barbada	-	D	+	28.40	20.3	11.6
239	F	65	38.35	Barbada	-	D/D*	+	25.00	22.7	10.5
239	G	70	39.60	Barbada	-	D/D*	+	21.60	22.8	10.4
239	H	85	41.30	Barbada	-	D	+	24.50	22.4	10.4
241	A	80	40.05	Barbada	-	D/D*	+	37.10	20.9	11.1

(Continua)

Continuación **Anexo 1.** Cruza Renan x Dalcahue

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Barbada	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
241	B	80	51.80	Barbada	-	D*	+	27.00	22.4	10.4
241	C	80	54.50	Barbada	-	D*	+	33.00	22	10.9
243	A	80	42.50	Barbada	-	D	+	27.20	21.6	10.8
243	B	75	50.15	Barbada	-	D	+	19.10	24	10.8
245	A	70	44.10	Barbada	-	D*	+	45.10	18.6	11.1
245	B	85	45.85	Barbada	-	D/D*	+	31.50	20.1	10.1
245	C	80	45.55	Barbada	-	D/D*	+	28.00	21	10.5
245	D	85	49.60	Barbada	-	D/D*	+	26.50	21.9	9.9
245	E	75	40.60	Barbada	-	D/D*	+	33.40	21.1	10.9
247	A	90	46.60	Barbada	-	D*	+	30.80	21.7	10.3
247	B	100	49.20	Barbada	-	D	+	28.70	20.5	9.8
247	C	105	54.50	Barbada	-	D*	+	25.60	22.3	10.1
247	D	105	52.45	Barbada	-	D/D*	+	19.20	23.1	10.2
247	E	105	47.50	Barbada	-	D*	+	16.60	22.8	9.4
275	A	90	48.30	Barbada	-	D/D*	+	27.8	21.5	9.8
275	B	75	40.05	Barbada	-	D	+	28.6	22	11
275	C	95	50.20	Barbada	-	D/D*	+	25.8	21.8	10.3
275	D	100	49.85	Barbada	-	D/D*	+	20.4	25.3	12.8
277	A	80	44.30	Barbada	-	D*	+	25	22	9.6
277	B	100	42.30	Barbada	-	D*	+	27.3	21.7	11.1
277	C	90	42.65	Barbada	-	D*	+	24	21	10.5
278	A	95	37.25	Barbada	-	D	+	19	22.9	9.5
278	B	75	41.95	Barbada	-	D	+	22	23.1	9.4
279	A	70	42.10	Barbada	-	D	+	11.5	23.6	9.7
279	B	100	47.80	Barbada	-	D/D*	+	19.6	22.8	10.5
279	C	120	48.90	Barbada	-	D/D*	+	13.1	22	10.1
279	D	90	43.95	Barbada	-	D/D*	+	18.1	23.1	10.2
279	E	115	50.45	Barbada	-	D/D*	+	18.3	22	11.3
279	F	95	49.20	Barbada	-	D	+	27.2	21.8	11.4
280	A	90	42.30	Barbada	-	D	+	14	23.1	9.5
280	B	90	48.15	Barbada	-	D	+	23.9	22.8	10.6
280	C	90	47.30	Barbada	-	D/D*	+	44.8	21.4	11.9
280	D	85	51.25	Barbada	-	D/D*	+	9.8	24.4	9.7
281	A	100	50.90	Barbada	-	D	+	27.10	22.7	11.5
281	B	85	39.55	Barbada	-	D	+	25.00	22.8	10.6
281	C	105	55.20	Barbada	-	D	+	24.40	22.1	10.6

M = Mutica, D/D* Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continua)

Continuación Anexo 1. Cruza Baroudeur x Dalcahue

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Barbada	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
255	A	100	45.60	M	-	S	-	14.40	22.3	9.7
255	B	100	46.90	M	-	S	-	15.80	22.2	10.1
256	A	75	43.00	M	-	S	+	18.10	23.5	11.3
256	B	70	42.25	Barbada	-	S	+	28.50	21.6	10.9
256	C	90	45.50	M	-	S	+	23.20	23.3	11
257	A	70	38.40	M	-	D*	+	37.20	19.6	11.1
257	B	95	47.60	M	-	D*	+	23.00	20.7	10.1
257	C	90	47.10	M	-	D*	+	21.90	21.1	9.9
257	D	85	44.40	M	-	D*	+	0.00	20.2	11.1
257	E	70	38.60	M	-	D*	+	37.00	19	11
258	A	105	43.75	M	-	S	-	15.70	22.8	9.9
258	B	75	45.40	M	-	S	-	24.60	23.1	12
258	C	95	45.95	M	-	S	-	11.60	24.2	9.9
259	A	90	41.65	M	-	S	+	14.20	23.3	10.2
259	B	75	35.10	M	-	D*	+	35.00	20.1	11.5
259	C	100	44.05	M	-	D*	+	23.20	21.6	10.9
259	D	100	45.55	Barbada	-	S	+	25.50	23	10.3
260	A	105	50.55	M	-	D*	-	50.00	19.1	11.8
260	B	100	40.90	M	-	D*	-	40.00	18.4	11.2
261	A	105	50.00	M	-	D	+	32.30	19.1	10.6
261	B	100	48.00	M	-	D	+	20.00	21.6	11.4
262	A	90	44.60	Barbada	-	D*	-	35.80	20.5	11.4
262	B	85	43.45	Barbada	-	D*	+	24.20	21.7	11
262	C	90	43.30	M	-	D*	+	25.00	21	11.1
262	D	90	45.35	M	-	D*	+	29.90	21.1	10.5
263	A	90	37.05	M	-	D*	+	23.60	22.2	11.2
263	B	105	39.70	M	-	D*	+	21.10	22	11.1
263	C	95	38.80	M	-	D*	+	23.80	22	11
264	A	90	43.35	M	-	S	+	26.10	23.2	12.1
264	B	80	39.90	M	-	S	+	24.90	22.5	11.2
264	C	90	40.50	M	-	S	+	18.00	23	11.2
264	D	90	44.00	M	-	S	+	17.00	23.6	11.3
264	E	100	38.80	M	-	S	+	16.60	23.2	11
265	A	100	40.90	M	-	D*	+	25.50	19.9	10.3
265	B	90	43.65	M	-	D*	+	25.00	20	11
265	C	90	45.10	M	-	D*	+	31.40	20.1	11.1
266	A	100	42.30	M	-	S	-	9.80	23.6	11.2
266	B	95	42.15	Barbada	-	S	+	17.90	22.8	11.1
267	A	95	41.00	M	-	S	+	20.70	21.9	10.9
267	B	80	41.65	M	-	S	+	20.20	21.6	10.7

(Continua)

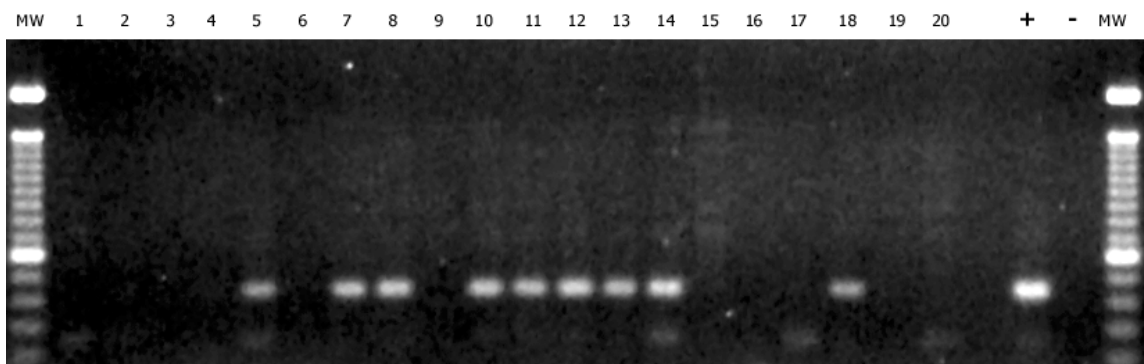
Continuación **Anexo 1.** Cruza Baroudeur x Dalcahue

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
268	A	90	32.65	M	-	S	+	0.00	19.6	10.4
268	B	90	41.30	M	-	S	+	23.00	20.6	9.9
269	A	100	41.90	Barbada	-	D*	+	42.90	20.4	12.5
269	B	95	46.85	M	-	S	+	32.60	20.7	11.2
269	C	90	40.70	M	-	D*	+	30.50	20	11.2
271	A	90	46.95	M	-	D*	-	23.50	19.1	9.6
271	B	95	43.85	M	-	D*	-	24.20	20	9.6
272	A	95	47.80	M	-	S	+	14.40	23.1	10.1
272	B	100	46.95	M	-	S	-	21.60	22.2	10.1
274	A	100	52.60	M	-	S	-	18.80	22.5	11.4
274	B	95	48.10	M	-	S	-	18.00	22	10
274	C	105	49.95	M	-	S	-	17.10	21.2	9.6

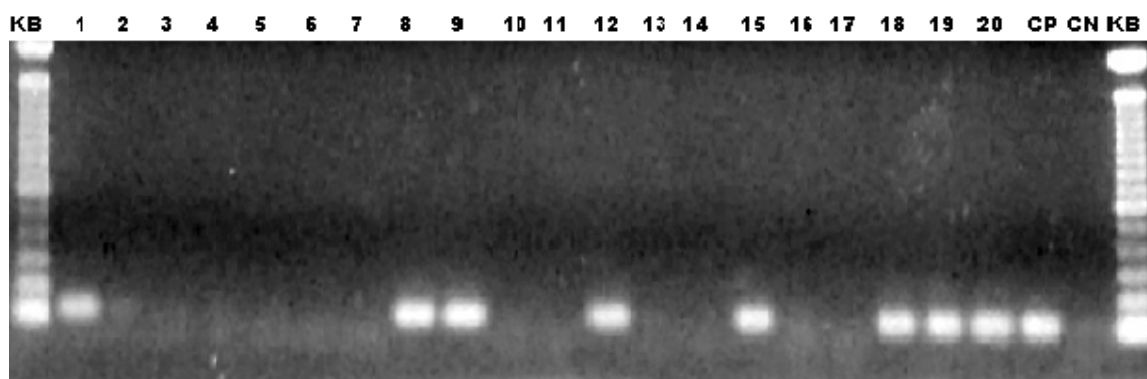
M = Mutica, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continua)

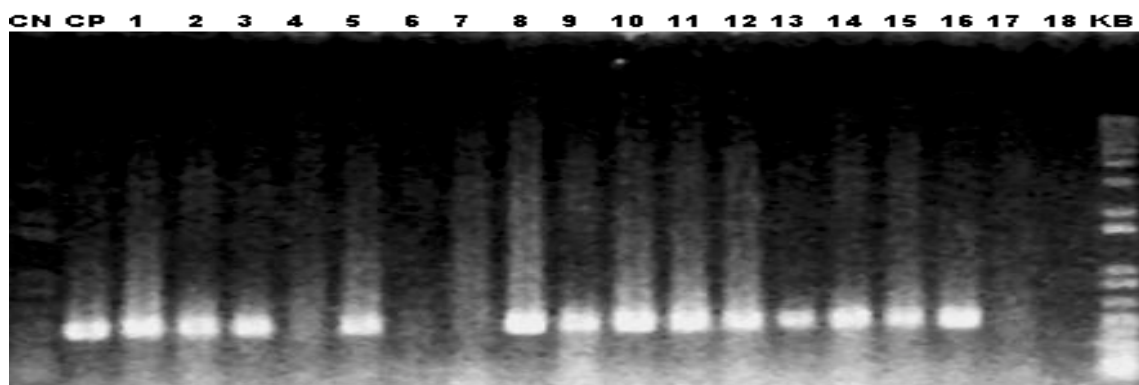
ANEXO 2.- Presencia de alelos de glutenina subunidad 5+10 en individuos de la cruce Avital x Kona.



ANEXO 3. Presencia de la translocación trigo/centeno (S.R.C. Ris-1) en individuos de la cruce Avital x Renaico.



ANEXO 4. Presencia del alelo de puroindolina Pina-D1a, en la cruce Baroudeur x Dalcahue.



ANEXO 5. Tabla con los datos de la caracterización fenotípica, molecular y calidad, de la Población DAS.

Cruza Genial x Pukem

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
22	C	90	45.10	M	-	S/D	+	26.4	19.2	9.2
27	B	95	36.15	M	-	D	+	7.4	25.2	10.6
38	A	95	58.70	M	-	D	+	28.5	20.1	10.4
38	B	105	52.05	M	-	D	+	27.9	20.2	9.4
39	B	85	50.05	M	-	D	+	27.9	19.3	10.5
45	B	80	51.50	M	-	D	+	26.5	21.6	11.1
46	B	95	47.55	M	-	D	+	33	19.3	11.1
49	C	110	51.65	M	-	D	+	17.7	22.7	10.4
54	A	95	50.25	M	-	D	+	6.7	24.7	10.7
54	B	105	46.65	M	-	D	+	1	25.5	11
54	C	85	51.40	M	-	D	+	27.3	22.3	10.6
55	A	85	44.55	M	-	D	+	24.4	19.4	9.4
55	B	90	41.30	M	-	S/D	+	21.6	17.6	9
55	C	85	42.00	M	-	S/D	+	21.3	19.9	9.1

M = Mutica, S/D Heterocigoto, +/- Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

Cruza Baroudeur x Renaico

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
68	A	95	53.35	Barbada	-	D	-	25.7	21.8	10.2
68	B	90	55.25	Barbada	-	D	-	26.1	22.2	10.5
76	B	105	50.20	M	+	D	-			
78	C	95	43.70	M	-	D	-	27.4	22.7	10.5
79	B	105	49.80	M	+	D	-			
79	C	85	53.00	M	+	D	-	21.3	22.4	10.2
82	A	80	51.35	M	+	S/D	-	20.2	23.2	9.7
82	B	95	53.80	M	+	S/D	-	28.9	21.8	10.3
83	B	85	44.55	M	-	D	-	21.6	22.4	9.7
83	C	95	51.40	M	-	S/D	-	21.3	22.4	10.4
86	A	105	52.55	M	-	D	-	23.4	23.3	9.8
86	C	100	55.55	M	-	D	-	20.6	24.3	10.4
91	A	85	48.90	M	+	S/D	-	16	23.5	9.3
91	C	80	50.45	M	+	S/D	-	20.7	22	8.7

M = Mutica, S/D Heterocigoto, +/- Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continúa)

Continuación Anexo 5.

Cruza Avital x Renaico

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
95	A	85	48.50	Barbada	-	D	-	27.6	20.5	8.8
96	A	90	45.00	Barbada	-	D	-	32.3	19.4	9.4
96	B	90	46.45	Barbada	-	D	-	35.1	17.6	8.7
96	C	95	47.30	Barbada	-	D	-	25.4	19.3	8.8
97	A	100	45.65	Barbada	-	D	-	18.2	17.2	8.9
98	A	85	50.60	Barbada	-	D	-	21.9	22.3	9.7
98	B	95	49.55	Barbada	+	D	-	29.3	19.1	9.2
98	C	95	49.00	Barbada	+	D	-	31.7	18.8	9.8
113	A	90	36.30	Barbada	-	D	-	42.3	16.5	10.3
117	A	80	47.10	Barbada	-	D	-	29.7	20.4	9.6
117	B	90	50.00	Barbada	-	D	-	26.1	21.3	9.3
117	C	85	41.40	Barbada	-	D	-	35.6	21.9	10.6
118	A	100	53.70	Barbada	-	D	-	23.4	21.2	8.8
118	B	95	37.60	Barbada	-	D	-	30.4	20.6	10.1
119	B	85	41.90	Barbada	-	D	-	29.6	21	10.3
122	C	90	47.35	Barbada	-	D	-	27.9	21.3	9.8
125	A	80	37.05	Barbada	-	D	-	31.6	19.7	9.8
126	A	85	43.05	Barbada	-	D	-	31.5	21.1	9.9
126	B	95	49.10	Barbada	-	D	-	24.3	20.8	9
127	C	80	53.90	Barbada	-	D	-	22	21.5	9.4
136	B	95	40.15	Barbada	-	D	-	24	20.8	9.8
136	C	95	35.60	Barbada	-	D	-	25.6	20	9.6
138	A	85	48.50	Barbada	-	D	-	30	20	9.5
138	B	95	43.60	Barbada	-	D	-	25	21.1	9.4
139	B	80	46.95	Barbada	-	D	-	19	20.6	9.4

M = Mutica, S/D Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente. (Continúa)

Continuación Anexo 5.

Cruza Baroudeur x Kona

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Barbada	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
158	A	90	45.20	Barbada	-	S	+	9.9	24.8	11.9
166	A	95	36.85	M	-	S	+	11.2	26.6	11.8
166	B	95	43.40	M	-	S	+	4	25.2	10
166	C	90	45.65	M	-	S	+	6.4	26.7	10.4
169	B	85	48.00	Barbada	-	S	+	18.9	25.2	11.6
172	A	85	41.50	Barbada	-	S	-	19	25	11
172	B	85	35.85	Barbada	-	S	+	16.7	24.1	10.5
172	C	90	55.20	M	-	S	+	18.2	25.9	11.6
173	A	100	45.70	M	-	S	+	26.1	22.8	10.9
180	A	90	50.35	Barbada	-	S	+	18	21.3	10.6
180	B	85	49.25	Barbada	-	S	+	27.5	20.8	11.3
180	C	85	43.20	Barbada	-	S	-	15.1	23.7	10.5
185	A	85	44.60	Barbada	-	S	+	25.0	25.3	13.2
185	C	95	49.35	Barbada	-	S	+	27.8	23	10.5
186	A	85	44.90	M	-	S	+	19.4	25	11.7
186	B	90	47.20	M	-	S	+	22.9	23.4	10.4
187	B	80	46.95	M	-	S	+	13.7	24.8	10.6
187	C	90	50.85	M	-	S	+	12.3	26.1	10.7
187	E	80	43.90	M	-	S	+	10.2	26.9	11.1
187	F	70	42.75	M	-	S	+	12.1	26.3	12.2
187	G	70	38.80	M	-	S	+	12.0	25.9	10.5
187	H	80	45.38	M	-	S	+	15	25.2	11.8

M = Mutica, S/D Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

Cruza Avital x Kona

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR			
		Altura	Peso 1000 gran.	Espiga	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación SDS	NIR	Ind. dureza	% proteína
192	A	100	44.15	Barbada	-	S/D	+	33.2		23	9
192	B	90	46.70	Barbada	-	S/D	+	33.2		22	9
192	C	90	37.55	Barbada	-	S/D	+	38.8		23.9	11.2
196	A	95	50.70	Barbada	-	D	+	36.9		21.4	9.5
201	C	85	44.75	Barbada	-	D	+	48.0		21.2	12.7
201	D	80	44.45	Barbada	-	D	+	46.2		21.4	11.4
201	E	90	41.45	Barbada	-	D	+	40.6		21.1	11.7
202	A	90	41.00	Barbada	-	D	+	33.2		20	10.7
202	B	100	35.50	Barbada	-	D	+	35.1		18	11.9
202	C	100	44.65	Barbada	-	D	+	35.09		18.4	10.7
205	B	85	44.05	Barbada	-	D	+	51.7		21.4	10.5
205	C	80	36.60	Barbada	-	D	+	44.3		21.4	11.4
213	A	90	43.95	Barbada	-	D	+	33.2		21.2	9.3
213	C	90	41.80	Barbada	-	D	+	35.1		20.4	9.5

M = Mutica, S/D Heterocigoto, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continua)

Continuación Anexo 5.

Cruza Renan x Dalcahue

Planta N°		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Barbada	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
221	A	100	52.05	Barbada	-	D	+	19	22.2	10.1
221	B	90	43.95	Barbada	-	D	+	18.9	21.8	10
221	C	100	52.40	Barbada	-	D/D*	+	15.5	22.4	10.2
223	A	70	52.95	Barbada	-	D*	+	22	22.9	10.7
223	B	65	47.55	Barbada	-	D*	+	22	22	10.8
223	C	90	44.20	Barbada	-	D*	+	23	23	10.5
228	A	90	43.55	Barbada	-	D	+	20	20	10.5
228	B	75	47.05	Barbada	-	D	+	29.9	21.9	10.5
228	D	75	42.05	Barbada	-	D	+	37.3	20.3	11.4
231	A	100	46.60	Barbada	-	D*	+	14.4	22.8	9.5
232	A	60	35.00	Barbada	-	D/D*	+	28.5	20.8	12.4
232	C	95	46.50	Barbada	-	D/D*	+	14.2	21.9	10.1
235	B	75	42.90	Barbada	-	D	+	29.5	23	11.1
235	C	90	47.35	Barbada	-	D	+	32.4	21.3	11.1
235	D	75	51.00	Barbada	-	D	+	33.5	21.1	11.3
235	E	90	42.50	Barbada	-	D	+	27.8	21.1	10.3
236	A	70	41.70	Barbada	-	D*	+	30.3	20.4	10.5
236	B	90	43.75	Barbada	-	D*	+	25.1	21.5	10.6
236	C	100	49.05	Barbada	-	D/D*	+	30	20.5	10.5
236	D	95	39.90	Barbada	-	D*	+	41.1	19.1	11.8
237	A	75	42.45	Barbada	-	D/D*	+	17.1	23	9.4
237	B	90	44.75	Barbada	-	D/D*	+	18.5	22.3	9.2
237	C	70	35.65	Barbada	-	D/D*	+	18.6	23	9.9
237	D	75	43.65	Barbada	-	D/D*	+	18.3	22.9	9.3
237	E	90	48.60	Barbada	-	D	+	20.4	23.6	9.9
239	A	75	48.30	Barbada	-	D	+	28.3	23.1	10.5
239	B	85	44.10	Barbada	-	D	+	25.9	21.2	10.8
239	D	90	42.95	Barbada	-	D	+	20.4	21.7	9.8
239	E	85	45.70	Barbada	-	D	+	28.4	20.3	11.6
239	F	65	38.35	Barbada	-	D/D*	+	25	22.7	10.5
239	G	70	39.60	Barbada	-	D/D*	+	21.6	22.8	10.4
241	A	80	40.05	Barbada	-	D/D*	+	37.1	20.9	11.1
241	B	80	51.80	Barbada	-	D*	+	27	22.4	10.4
241	C	80	54.50	Barbada	-	D*	+	33	22	10.9
243	A	80	42.50	Barbada	-	D	+	27.2	21.6	10.8
243	B	75	50.15	Barbada	-	D	+	19.1	24	10.8
245	A	70	44.10	Barbada	-	D*	+	45.1	18.6	11.1
245	B	85	45.85	Barbada	-	D/D*	+	31.5	20.1	10.1
245	C	80	45.55	Barbada	-	D/D*	+	28	21	10.5
245	D	85	49.60	Barbada	-	D/D*	+	26.5	21.9	9.9
245	E	75	40.60	Barbada	-	D/D*	+	33.4	21.1	10.9
247	A	90	46.60	Barbada	-	D	+	30.8	21.7	10.3
277	A	80	44.30	Barbada	-	D*	+	25	22	9.6
277	B	100	42.30	Barbada	-	D*	+	27.3	21.7	11.1
279	E	115	50.50	Barbada	-	D/D*	+	18.3	22	11.3

M = Mutica, D/D* Heterocigoto, +/- Ausencia y presencia del alelo respectivamente. (Continúa)

Continuación Anexo 5.

Cruza Baroudeur x Dalcahue

Planta Nº		Caracterización Fenotípica			Caracterización Molecular			Evaluación NIR		
		Altura	Peso 1000 gran.	Barbada	Translocación	Dureza	Glu.5+10	Sedimentación	Ind. dureza	% proteína
257	A	70	38.40	M	-	D*	+	37.2	18.4	11.1
257	B	95	47.60	M	-	D*	+	23	19.6	10.1
257	C	90	47.10	M	-	D*	+	21.9	20.7	9.9
257	E	70	38.50	M	-	D*	+	37	20.2	11
259	B	75	35.10	M	-	D*	+	35	19.0	11.5
260	A	105	50.60	M	-	D*	-	50	20.1	11.8
260	B	100	40.90	M	-	D*	-	40	19.1	11.2
262	A	90	44.60	Barbada	-	D*	-	35.8	20.5	11.4
262	B	85	43.50	Barbada	-	D*	+	24.2	21.7	11
262	C	90	43.30	M	-	D*	+	25	21.0	11.1
262	D	90	45.40	M	-	D*	+	29.9	21.1	10.5
263	A	90	37.10	M	-	D*	+	23.6	22.2	11.2
263	B	105	39.70	M	-	D*	+	21.1	22.0	11.1
263	C	95	38.80	M	-	D*	+	23.8	22.0	11
265	A	100	40.90	M	-	D*	+	25	19.9	10.3
265	B	90	43.70	M	-	D*	+	25.5	20.0	11
265	C	90	45.10	M	-	D*	+	31.4	20.1	11.1
269	A	100	41.90	Barbada	-	D*	+	32.6	20.7	12.5
271	A	90	47.00	M	-	D*	-	23.5	19.1	9.6
271	B	95	43.90	M	-	D*	-	24.2	20.0	9.6

M = Mutica, -/+ Ausencia y presencia del alelo respectivamente.

(Continua)

ANEXO 6. Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Genial x Pukem (dureza).

Resumen datos estadísticos		
	Población base	Población DAS
Cantidad	66	14
Promedio	23.38	21.21
Varianza	5.84	6.28
Desv. estándar	2.42	2.5
Comparación de promedios t Student		
Hipótesis nula	Promedio (P. base = P. DAS)	
Hipótesis alter.	Promedio (P. base \neq P. DAS)	
	Igual varianza	Distinta varianza
Valor t	3.03	2.95
P-value	0.0034	0.008

ANEXO 7. Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Avital x Kona (dureza).

Resumen datos estadísticos		
	Población base	Población DAS
Cantidad	44	14
Promedio	23.02	21.05
Varianza	5.72	2.40
Desv. estándar	2.39	1.55
Comparación de promedios t Student		
Hipótesis nula	Promedio (P. base = P. DAS)	
Hipótesis alter.	Promedio (P. base \neq P. DAS)	
	Igual varianza	Distinta varianza
Valor t	2.87	3.56
P-value	0.0057	0.001

ANEXO 8. Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Baroudeur x Dalcahue (dureza).

Resumen datos estadísticos		
	Población base	Población DAS
Cantidad	52	21
Promedio	21.48	20.40
Varianza	2.17	1.11
Desv. estándar	1.47	1.06
Comparación de promedios t Student		
Hipótesis nula	Promedio (P. base = P. DAS)	
Hipótesis alter.	Promedio (P. base \neq P. DAS)	
	Igual varianza	Distinta varianza
Valor t	3.04	3.498
P-value	0.0032	0.0009

ANEXO 9. Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Genial x Pukem (sedimentación).

Resumen datos estadísticos		
	Población base	Población DAS
Cantidad	66	14
Promedio	13.65	21.26
Varianza	100.7	92.77
Desv. estándar	10.00	9.63
Comparación de promedios t Student		
Hipótesis nula	Promedio (P. base = P. DAS)	
Hipótesis alter.	Promedio (P. base \neq P. DAS)	
	Igual varianza	Distinta varianza
Valor t	-2.5911	-2.662
P-value	0.011	0.015

ANEXO 10. Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Baroudeur x Dalcahue (sedimentación).

Resumen datos estadísticos		
	Población base	Población DAS
Cantidad	52	20
Promedio	23.35	29.48
Varianza	87.99	58.73
Desv. estándar	9.38	7.66
Comparación de promedios t Student		
Hipótesis nula	Promedio (P. base = P. DAS)	
Hipótesis alter.	Promedio (P. base \neq P. DAS)	
	Igual varianza	Distinta varianza
Valor t	-2.605	-2.850
P-value	0.0112	0.0067

ANEXO 11. Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la cruza Avital x Kona (sedimentación SDS).

Resumen datos estadísticos		
	Población base	Población DAS
Cantidad	44	14
Promedio	36.84	40.09
Varianza	32.76	36.02
Desv. estándar	5.72	6.00
Comparación de promedios t Student		
Hipótesis nula	Promedio (P. base = P. DAS)	
Hipótesis alter.	Promedio (P. base \neq P. DAS)	
	Igual varianza	Distinta varianza
Valor t	-1.831	-1.786
P-value	0.0723	0.088

**ANEXO 12. Análisis estadístico entre la Población base y la Población DAS en la
cruza Avital x Renaico (sedimentación).**

Resumen datos estadísticos		
	Población base	Población DAS
Cantidad	74	25
Promedio	25.2	27.98
Varianza	34.74	29.72
Desv. estándar	5.89	5.45
Comparación de promedios t Student		
Hipótesis nula	Promedio (P. base = P. DAS)	
Hipótesis alter.	Promedio (P. base \neq P. DAS)	
	Igual varianza	Distinta varianza
Valor t	-2.076	-2.158
P-value	0.040	0.036