

**LONGITUD DE COLEÓPTILO DE TRIGOS HARINEROS Y RELACIÓN DE
Rht_1 EN DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SIEMBRA**

Eva Arenas Hernández

Tesis

Presentada Como Requisito Parcial

Para Obtener El Grado De:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
FITOMEJORAMIENTO**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio del 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

LONGITUD DE COLEÓPTILO DE TRIGOS HARINEROS Y RELACIÓN DE *Rht_1*
EN DIFERENTES PROFUNDIDADES DE SIEMBRA


TESIS
POR
EVA ARENAS HERNÁNDEZ

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y Aprobada como requisito
parcial para optar el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN FITOMEJORAMIENTO

COMITÉ PARTICULAR

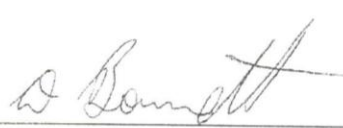
Asesor Principal:



Dr. Víctor Manuel Zamora Villa

Asesor:


Dr. Alejandro Javier Lozano del Río

Asesor :


Dr. David Graham Bonnett


Dr. Fernando Ruiz Zárate
Subdirector de Posgrado

Saltillo, Coahuila, México. Junio 2013

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi comité de asesores el Dr. Víctor Zamora Villa, el Dr. Alejandro. Por su valiosa guía en todo momento, todo el apoyo en todas mis decisiones en el trabajo realizado, de manera muy especial al Dr. David G. Bonnett que desde un inicio confió en mí, todo ese gran apoyo incondicional que recibí de él. Gracias a los tres por todo el tiempo prestado.

Al igual agradezco a la Dra. Susan Dreisigacker, el Dr. Leonardo Patiño Zúñiga por la aportación y asesoría en cuanto a la parte molecular en este trabajo, a todo el equipo de Cruzas Amplias, en la parte estadística al Dr. Gregorio Álvarez Beltrán y el Dr. José Crossa por sus consejos.

A mis maestros durante la Maestría por esos gratos momentos de clases, que siempre hicieron que viéramos las cosas tal cual son, las críticas constructivas, buenas metodologías de enseñanza y todo el conocimiento compartido, el Dr. José Espinoza, Dr. Humberto Reyes, Dr. Humberto de León y Dr. Froylan Rincón a todos y cada uno de ustedes muchas gracias.

También de una forma muy especial a quienes de manera indirecta me estuvieron apoyando para concluir esta tesis como mis amigos de CIMMYT tanto trigueros como maiceros, todo el grupo de cruzas amplias de campo y laboratorio, al Dr. José Luis Torres, Ing. Manuel López, Ing. Mayolo Leyva, Ing. Raymundo López; por otro lado a mis maestros que desde licenciatura me han dado tantas enseñanzas hasta la fecha el M.C. Roberto Bernal Muñoz y M.C. Alfredo Meza.

Ahora a mis grandes amigos Juan de Dios, Inés, Rosendo, Yadhira, Agustín, José Antonio, Pilar, Gabriela, Diana y mi querida Malu inolvidables ustedes, que sólo el acordarme sale una sonrisa, gracias por esas alegrías compartidas.

Al CONACYT por el apoyo económico, ¡24 meses de beca!, con lo cual permite haya más gente preparada en áreas específicas y así contribuir al desarrollo del país.

DEDICATORIA

A mis padres: Guadalupe Arenas Rivas y Tomasa Hernández Gutiérrez.

A ti Papá porque más que un padre aprendiste a ser un amigo, en el que confío plenamente, el carácter que forjaste en tus hijos, la confianza, y ser el gran amigo “cuate” como solemos decir. Por darme el gran ejemplo de valentía ante todas las dificultades que por tu enfermedad has tenido, por esa inteligencia, tu astucia para resolver problemas aun siendo ciego, te amo y te admiro. Mamita por ser la mejor madre, siempre tan cariñosa y consentidora, por esa bondad que llevas siempre contigo, esa paz que siempre transmites, tu integridad, tu nobleza, sobre todas la cosas el gran amor que nos tienes, te amo.

A mis hermanos: Efraín, que desde niña con tu gran paciencia me enseñaste a leer, escribir, sumar y restar, a ti hermanito por todo ese amor incondicional dando todo por nosotros siempre.

Conchita eres un gran ejemplo, te amo y te admiro porque además de ser una gran mujer, eres una gran profesionalista; pero sobre todo por ser la mejor hermana del mundo, estoy tan orgullosa de ti. Mi hermanita consentida dando siempre el 100% de ti para nosotros.

Abraham, por ser el más pequeño aunque siempre el más maduro, por ser un hombrecito fuerte, noble y respetuoso. ¿Qué más puedo pedir? Si los tengo a ustedes, un diamante indestructible, donde quiera que vaya sé que ahí están esperándome siempre con la brillante alegría que dan a mi vida.

COMPENDIO

**Longitud de coleóptilo de trigos harineros y relación de *rht_1* en
diferentes profundidades de siembra**

POR:

EVA ARENAS HERNÁNDEZ

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN FITOMEJORAMIENTO**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COHAUILA. JUNIO DE 2013**

Dr. Víctor Zamora Villa -Asesor-

RESUMEN

Los genes *Rht_1* y *Rht_2* tienen una relación negativa con la longitud de coleóptilo y por tanto de vigor de emergencia en el cultivo de trigo. En el presente trabajo se evaluaron diferentes números de segregantes de cada una de las 9 cruzas de líneas élite de trigos harineros de CIMMYT que contienen *Rht_1* gen del enanismo, por líneas que contienen diferentes tipos de *Rht* (*Rht_4*, *Rht_5* y *Rht_13*) que no se asocian tanto a la longitud del coleóptilo; pero al igual reducen altura de planta. Igual número de segregantes dentro de cada familia en F2 se sembraron en 5 y 15 cm de profundidad, durante dos ciclos de con la intención de saber si la siembra más profunda nos permite obtener coleóptilos más largos y reducir la frecuencia de *Rht_1* en comparación con la siembra a 5 cm. No se encontraron diferencias significativas para longitud de coleóptilos en las diferentes profundidades, pero se reportaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre cruzas al igual que para presencia y ausencia de *Rht_1*, tales resultados sugieren que el largo de coleóptilo es un carácter de difícil selección en siembras profundas, pero si se puede hacer una buena elección de progenitores para modificar la longitud de coleóptilos, los *Rht* alternativos funcionaron en éste experimento, el uso de un buen progenitor es el principal responsable para modificar la longitud del coleóptilo y mantener baja la altura de planta.

Palabras clave: *Triticum Aestivum* L., gen de enanismo, gen silvestre, gen mutante, progenitor.

ABSTRACT

The genes *Rht_1* and *Rht_2* have a negative relationship with the coleoptile's length, and in consequence, with the emergency force in wheat. In this study, different segregating numbers of each of the 9 elite line crosses of bread wheat from CIMMYT that contain *Rht_1* gene for dwarfism, crossed with lines that contain different types of *Rht* (*Rht_4*, *Rht_5* and *Rht_13*) that are not so associated with the coleoptile's length, but also reduce the plant height, were evaluated. The same segregating numbers within families were planted at a depth of 5 and 15 cm during two seasons with the objective of knowing if a deeper planting can give us larger coleoptiles and a reduction of the *Rht_1* frequency in comparison with the planting done at a depth of 5 cm. No significant differences were found for coleoptiles lengths among the different planting depths, however, high significant differences ($P \leq 0.01$) were found among crosses, as well as for the presence and absence of *Rht_1*; these results suggest that the coleoptile's length is a trait difficult to select in deep plantings; although, parental selection can be done to modify the coleoptile's length. The *Rht* alternatives worked in this experiment, and the use of a good parental can be the principal reason to change the coleoptile's length and for maintaining a short plant height.

Key words: *Triticum Aestivum L.*, dwarfism gene, alternative genes, wild gene, mutant gene, progenitor.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis.....	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
Importancia del trigo	6
Limitantes del establecimiento del cultivo de trigo	7
Índice de emergencia (IE).....	8
Longitud de coleóptilo y altura de planta	9
Marcadores moleculares	10
Generalidades de los Rht	12
Genes Rht_4, Rht_5 y Rht_13	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
Localidades	15
Material genético	16
Evaluación agronómica	16
Invierno 2010-2011	16

Primavera 2011	17
Invierno 2011-2012	18
Primavera 2012	18
Determinación de longitud de coleóptilo en condiciones controladas.....	19
Extracción de ADN, PCR y SNP	20
Selección de las mejores segregantes	23
Diseño experimental.....	24
Análisis estadístico	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
Longitud de coleóptilo ciclo Y10-11	27
Análisis de varianza para el ciclo Y11-12	29
Análisis combinado.....	32
V. CONCLUSIONES.....	37
VI. LITERATURA CITADA.....	38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3. 1 Genotipos utilizados en el experimento.....	16
Cuadro 3. 2 Genotipos y número de segregantes en cada cruce, en F ₂ y F ₄	18
Cuadro 4. 1 Análisis de Varianza para longitud de coleóptilo de las segregantes de diferentes cruces, seleccionadas en diferentes profundidades de siembra.	27
Cuadro 4. 2 Comparación de la media P≤0.01 de segregantes de diferentes cruces con testigos para longitud de coleóptilos y sus estimadores.	28
Cuadro 4. 3 Análisis de Varianza de Longitud de Coleóptilo para el ciclo Y11-12	29
Cuadro 4. 4 Comparación de promedios de longitud de coleóptilo de acuerdo a la profundidad de siembra y al tipo de alelo.....	30
Cuadro 4. 5 Correlación de altura de plata con longitud de coleóptilo.	31
Cuadro 4. 6 Agrupación de medias para el ciclo Y11-12 para longitud de coleóptilo.....	32
Cuadro 4. 7 Análisis combinado para los ciclos Y10-11 y Y11-12.....	33
Cuadro 4. 8 Promedios de longitud de coleóptilo en mm en diferentes ciclos de selección en dos profundidades de siembra.	33
Cuadro 4. 9 Promedios a través de dos ciclos de evaluación para longitud de coleóptilo.....	35
Cuadro 4. 10 Porcentaje de alelos presentes en segregantes F ₅ de trigo seleccionados en dos profundidades de siembra.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3. 1 Charolas con sustrato para medir longitud de coleóptilos y plántulas listas para toma de datos.....	20
Figura 3. 2 Equipo BMG LABTECH, genotificador para SNP´s.	22
Figura 3. 3Vista de SNPviewer para la separación de muestras de acuerdo a los alelos presentes.....	23

I. INTRODUCCIÓN

El trigo harinero (*Triticumaestivum L.*), es el cultivo más sembrado del mundo, con una producción global de más de 600 millones de toneladas surgidas de alrededor de 210 millones de hectáreas en numerosos países de Europa, Asia, África del Norte y el Continente Americano (Payne, 2011).

Su importancia deriva de las propiedades del gluten, una red cohesiva de proteínas resistentes del endospermo que se extienden, característica que le da gran valor en la industria panificadora (Poehlman, 2005). El trigo es una planta alohexaploide, debido a su conformación de 42 cromosomas repartidos en 6 juegos desde tres diferentes especies, de 7 cromosomas cada uno. La planta posee tres genomas idénticos, los cuales poseen información genética repetida, lo cual le confiere a la especie en sí gran adaptabilidad a los diferentes ambientes.

Durante los años 40's en México los rendimientos de trigo eran de aproximadamente 900 Kg ha^{-1} , aun cuando la mayor parte del trigo se sembraba en terrenos con riego. En otros países como la India, Pakistán, y más semejaban una situación muy similar; a través de un programa cooperativo de investigación y adiestramiento entre la Secretaría de Agricultura de México y la Fundación Rockefeller, se logra un incremento en la producción del trigo, maíz, papa y frijol.

Los logros en el rendimiento de trigo se debían a la selección en contra de enfermedades y a el uso de fertilizantes, pero aquí surgía un problema muy grande; cuando las variedades mejoradas que eran de tallo largo los rendimientos se incrementaron a $4.5 \text{ ton}\cdot\text{ha}^{-1}$ y el acame inicia a limitar los rendimientos, dando pauta a la colecta de trigos de tallo corto e iniciar la formación de variedades de trigo enanas, rendidoras que soportan altas dosis de fertilizantes logrando así incrementar aún más los rendimientos de trigo hasta 7.5 ton ha^{-1} (Borlaug, 1972).

Desde la Revolución Verde en los años 60's, los genes del enanismo *Rht_1* (*Rht-B1b*) y *Rht2* (*Rht-D1b*) se han hecho prácticamente ubicuos en trigos modernos alrededor del mundo. Esos genes *Rht* se introdujeron en las variedades altas de trigo por el equipo de Norman Borlaug desde cultivares de Norin 10 provenientes de Japón.

Estos genes aumentan rendimiento, incrementando el índice de cosecha debido a la altura de planta reducida. Un efecto secundario negativo de estos genes es que reducen la longitud del coleóptilo y el vigor temprano de la planta. Esto significa que el establecimiento puede verse afectado por condiciones de siembra adversas tal como cuando la semilla se siembra profundamente o tiene que surgir por residuos de cosechas anteriores como ocurre con la agricultura de conservación.

En ausencia de *Rht1* y *Rht2*, se manifiesta variación considerable en longitud de coleóptilos y vigor que puede ser explotado en mejoramiento. Sin embargo, estos genes que proporcionan al enanismo deben ser sustituidos por otros que tienen el mismo efecto en la altura e índice de cosecha, pero sin los efectos

negativos. Varias alternativas están disponibles y siendo introducidos ahora en el programa de pre-mejoramiento de trigo en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Varias líneas han sido identificadas y liberadas por la planta Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO) de Australia dentro del programa de mejoramiento de Trigo, donde se combinan coleóptilos largos y reducen la altura de planta, pero carecen de *Rht1* o de *Rht2*. De este modo, la variación genética requerida está disponible para desarrollar líneas élite, con altura reducida para generar trigos con coleóptilos largos y mejores caracteres de crecimiento temprano. Las cruas apropiadas fueron hechas en Cd. Obregón Sonora, en el invierno 2008-2009 y el presente trabajo consistió en identificar los genotipos que reúnan las características deseadas, porte bajo además de coleóptilo largo.

Objetivo general

Determinar si las diferentes profundidades de siembra es un buen método de selección para cambiar la frecuencia de acción del coleóptilo largo, caracterizar molecularmente y evaluar preliminarmente las plantas mejor emergentes en comparación con las de la siembra menos profunda.

Objetivos específicos

1. Medir la longitud de coleóptilos de las segregantes cosechadas de diferentes profundidades de siembra para saber si realmente la profundidad de siembra es una buena técnica para la selección de coleóptilos largos.
2. Estudiar los porcentajes de los alelos *Rht_1* con marcadores SNP de las diferentes segregantes de trigo provenientes de dos profundidades de siembra para saber si la profundidad es un buen método para seleccionar más genotipos sin *Rht_1*.

Hipótesis

A mayor profundidad de siembra germinarán y emergerán plantas con coleóptilos más largos, lo que permitirá seleccionar de manera más efectiva plantas con mayor longitud de coleóptilo y menor aparición de segregantes con Rht_1.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del trigo

El trigo se siembra en más de 200 millones de hectáreas del mundo en desarrollo, CIMMYT (2012), con una producción mundial de 651,42 millones de toneladas (Agropanorama, 2013). El precio nacional de trigo es 3 mil 800 pesos por tonelada (Inforural, 2013); mientras que el precio internacional oscila entre los 250 y 280 dólares (Infoacercas, 2013). En México, el trigo representa el 21% del consumo de granos básicos, ubicado en el segundo lugar después del maíz, con 52 kg consumo per cápita por año y con un volumen de ventas de la industria que estará creciendo entre 1% y 2%. Cinco estados, Sonora, Guanajuato, Baja California, Michoacán y Chihuahua, concentraron el 65% de la superficie sembrada con trigo en el 2009 que fue de 802 mil ha, destacando Sonora con el 35% del área, sumando un total de 898 mil ha; de las cuales sólo el 73% corresponde a la cultivada con sistemas de riego (Cárdenas *et al.*, 2008).

El uso del trigo harinero depende de su calidad; trigos fuertes sirven para panificación mecanizada, como harina de pan de caja, trigos menos fuertes panificación manual, trigos suaves, para la elaboración de galletas, buñuelos y otros productos artesanales (Peña *et al.*, 2008).

Limitantes del establecimiento del cultivo de trigo

Una profundidad mayor de siembra (10 cm) podría permitir a las plantas aprovechar la humedad del estrato del suelo situado por debajo de la superficie seca; sin embargo, los coleóptilos cortos de los trigos semi-enanos reducen la emergencia de las plántulas cuando la siembra se hace a profundidades mayores de 5 cm (Rebetzke *et al.*, 2004). Los coleóptilos largos permiten un mejor establecimiento del cultivo debido a la mejor emergencia (Botwright *et al.*, 2001). La selección de genotipos con coleóptilos largos y gruesos puede ayudar a la emergencia de las plántulas en suelos duros o en siembras profundas. La longitud de coleóptilo en trigo es una característica cuantitativa que puede ser controlada por dos genes mayores y menores (Rebetzke *et al.*, 2007). El CIMMYT menciona que la mitad de la superficie donde se cultiva trigo en los países en desarrollo se caracteriza por lluvias erráticas, suelos infértiles, enfermedades virulentas y en ocasiones calor o frío extremos.

Para la tolerancia temprana a la sequía se utiliza un método de siembra inusual; principalmente en los Valles Altos de México donde las siembras son profundas para hacer una emergencia lenta y al mismo tiempo la semilla este más en contacto con la humedad y resista así a la llegada de las lluvias tardías; mientras que en el mediterráneo el método de la siembra profunda permite la sobrevivencia del cultivo de trigo hasta que se inician las lluvias abundantes (Lafitte, 2001).

Las tecnologías actuales de siembra como la de conservación; a través del programa MAS AGRO pretenden impactar un total de 600 mil ha sembradas con trigo en el 2020, también pronostican un ahorro del 20% en insumos en agua y nitrógeno (Govaerts, 2011); pero lo que se necesitan son genotipos vigorosos para un buen establecimiento en estas condiciones.

Índice de emergencia (IE)

La emergencia de la plántula en el campo es fuertemente influenciada por condiciones ambientales; sin embargo el parámetro más usado para determinar el vigor de nacencia es el porcentaje de emergencia, aunque por la influencia del ambiente es mejor determinar el índice de emergencia (IE) que toma en cuenta los días a emergencia de cada una de las variedades (García y Lasa, 1991). No siempre los mayores tamaños de semilla muestran una mejor germinación o mejor vigor (Valadez *et al.*, 2007)

El IE se determina por los valores a través de las ecuaciones utilizadas por Flores *et al.* (2009). Dónde:

$$PE = \text{Número de semillas emergidas} \times 100 / \text{Número total de semillas}$$

$$IE = \frac{N_1 \cdot T_1 + N_2 \cdot T_2 + N_3 \cdot T_3 + \dots + N_n \cdot T_n}{\text{Número total de semillas emergidas}}$$

Longitud de coleóptilo y altura de planta

El establecimiento del cultivo del trigo es una de las mayores determinantes para el rendimiento, el coleóptilo largo una característica muy importante en esta etapa; coleóptilos cortos limitan el potencial de emergencia y aún más si se hacen siembras profundas (Rebetzke *et al.*, 2007) o bien en sistemas que se están adoptando actualmente como la agricultura de conservación. La longitud de coleóptilo está relacionada positivamente con la altura de planta en trigo, (Sanz de Cortazar *et al.*, 1980; Trethowan *et al.*, 2001) mientras que otros autores no hayan fuerte relación entre estas variables (Gulnaz *et al.*, 2011).

Se han hallado diferencias en cuanto a longitud de coleóptilo relacionados al tamaño de la semilla; pero no son tan sustancialmente grandes como las diferencias del tamaño de coleóptilo entre las diferentes variedades (Botwright *et al.*, 2001). Algunos estudios han informado de la relación entre la longitud de coleóptilos, emergencia de las plántulas y los efectos posteriores sobre el crecimiento temprano, biomasa y rendimiento de grano. Diferencias genotípicas de longitud coleóptilo son fuerte y positivamente correlacionado con el número de plantas emergidas con siembra profundas. Rebetzke *et al.* (2004) informaron que la longitud del coleóptilo de la progenie derivada de *Rht8*, *Rht9* y *Rht12* donantes del gen enanismo es generalmente más corto (7-13%), pero todavía un promedio 47% más corto el de coleóptilos de *Rht_1* y *Rht_2*.

Marcadores moleculares

Los marcadores son un polimorfismo de un fragmento del ADN que se puede detectar fácilmente mediante análisis fenotípico o molecular. El marcador puede hallarse dentro de un gen o en un ADN sin función conocida FAO (2008). Dado que los segmentos de ADN que se encuentran próximos entre sí en un cromosoma tienden a heredarse juntos. Anteriormente los caracteres poligénicos eran muy difíciles de analizar con el uso de los métodos tradicionales de fitomejoramiento, actualmente son identificados fácilmente utilizando marcadores moleculares. Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante (Mohan *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares asociados con rasgos agronómicos proporcionan a los fitomejoradores herramientas de detección rápida, rentable y no destructiva que son independientes del medio ambiente (Ellis *et al.*, 2005).

Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido – SNP), inserción o deleción de fragmentos de ADN de diversas longitudes, o duplicación o inversión de fragmentos de ADN, FAO (2008). Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP) representan una nueva forma de marcador funcional, es decir que ya está asociado a alguna característica fenotípica, sobre todo cuando se derivan de marcadores de secuencias expresadas. La gran mayoría de los SNPs tienen dos alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o “silvestre” y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones (Checa, 2007). SNPs están distribuidos en el genoma humano en un promedio aproximado de 1 SNP por cada 1.000 pares de bases. En cambio a los marcadores de microsatélites que son secuencias cortas de ADN repetidas, SNPs pueden ser utilizados en los estudios de ligamiento para la identificación de genes de enfermedades, en las pruebas de genéticas, y para la determinación de la pérdida de heterocigosidad (LOH); SNPs son más frecuentes que los microsatélites, muchos SNPs se encuentran dentro de los genes, lo que afecta directamente el producto del gen (proteína) (Ahmadian *et al.*, 2000).

Marcador para Rht_1 se localizó en regiones homólogas del cromosoma 4B, este marcador fue fuertemente correlacionado con una reducción en la altura, que representan el 23% de la varianza fenotípica en la población estudiada. Actualmente han desarrollado marcadores Rht_1. Éste marcador se

puede describir como "marcador perfecto", en el sentido de que es específico para el cambio de par de bases responsable del fenotipo semi-enano (Ellis *et al.*, 2002).

Generalidades de los Rht

El Norin 10 x Brevor 14 fue usado por Norman Borlaug y otros como parte de programas de mejoramiento de trigo en el CIMMYT (Ellis *et al.*, 2002).

La reducción en el alargamiento del tallo en las variedades modernas que contienen estos alelos es causada por una respuesta limitada a la fitohormona, giberelina (AG) (Gale *et al.*, 1981), resultando en una reducción de longitud del tallo y produciendo beneficios a través de un aumento en el número de granos, además de una buena respuesta a altas dosis de fertilización nitrogenada. Los genes *Rht_b1* y *Rht_d1* que son los genes insensibles al ácido giberelico, por lo que reducen el tamaño de la planta se originaron en los 1930's en la variedad enana Norin 10, variedad Japonesa Daruma (Allan, 1989).

Los genes enanos Rht, *Rht-B1* y *Rht-D1* codifican proteínas DELLA, que actúan para reprimir AG-sensible al crecimiento, y sus alelos mutantes de *Rht-B1b* y *Rht D1b* se cree que confieren enanismo mediante la producción de formas más activas de estos represores de crecimiento (Gómez y Agustín, 2006).

Rht_b1 es localizado en el cromosoma 4B (Gale y Marshall, 1976), está altamente correlacionado con la reducción de altura en plantas y representa el

23% de la variación fenotípica de la población estudiada por Ellis *et al.* (2002). Años atrás, la selección para este gen se determinaba germinando las semillas con ácido giberelico, las plantas que contenían los genes mutantes no mostraban respuesta a AG externo. Actualmente la selección es asistida por marcadores perfectos para *Rht_B1* fueron desarrollados utilizando una población de dobles haploides que segregó para este alelo (Ellis *et al.*, 2002). Un marcador perfecto muy específico que detecta una mutación en un sólo par de bases como responsable del fenotipo enano. Existen otros genes de enanismo para ser utilizados en programas de mejoramiento, que tienen la capacidad de reducir la altura de planta sin afectar tanto la longitud de coleóptilos (Rebetzke *et al.*, 2011).

Genes *Rht_4*, *Rht_5* y *Rht_13*

Rht_5 se localiza en el cromosoma 3B el gen *Rht_8* se localiza en el cromosoma 2D (Ellis *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2007), la variedad japonesa Akakomugi fue la mayor fuente Europea en cultivares que portan el gen enanismo *Rht_8*, está muy extendido en trigos del sur y de Europa Central, así como varios cultivares rusos. Akakomugi fue utilizado por primera en 1920 para introducir genes no sólo para los semienanos (*Rht_8*), sino también, sin saberlo, por la precocidad (Worland *et al.*, 1998), Rebetzke *et al.* (1999) publican que el efecto del enanismo sobre la longitud del coleóptilo con *Rht_8* es insignificante.

El gen *Rht13* se encuentra en el cromosoma 7B (Ellis *et al.*, 2005; Richards *et al.*, 2007), Selección de *Rht13* aumenta el índice de cosecha y el número de granos para aumentar rendimiento de grano. El aumento en el número de granos refleja una mayor producción y ligeramente mayor biomasa (Rebetzke *et al.*, 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Localidades

El presente estudio se llevó a cabo en tres localidades cuya ubicación y características más relevantes se enuncian a continuación.

Ciudad Obregón Sonora, las coordenadas son 27°29' latitud norte y 109°59' longitud oeste. Se encuentra en las instalaciones del CENEB a 39 m.s.n.m., con una temperatura media anual de 31°C y un clima subtropical árido cálido (Inifap, 2013).

Toluca está ubicada a 19°17'29" de latitud norte y a los 99°39'38" de longitud oeste, con una altura de 2640 m.s.n.m., con clima húmedo, precipitación anual de 800 mm, un rango de temperatura de -14 a 29°C y un suelo limoso arcilloso de origen volcánico.

Texcoco, estado de México 19° 29' 53" N y 98° 47' 55" O a 2200 m.s.n.m., la precipitación media anual es de 650 mm, el suelo es un tipo arcilloso-limoso según la clasificación de Köppen, modificada por García (1981).

Material genético

En el presente estudio se utilizaron segregantes de 8 familias (7 familias trilineares) en F_2 y de una crusa en F_3 provenientes de la crusa de 4 líneas élite de CIMMYT que contienen *Rht_1* con 6 líneas provenientes de Australia sin *Rht_1* y longitud de coleóptilo largo. Se incluyen los progenitores de CIMMYT más dos líneas como controles para la comparación de coleóptilos largos o cortos, tal como aparece en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3. 1 Genotipos utilizados en el experimento.

Pedigree	Gen	No. De seg.
VOROBAY	Progenitor	1
ROELFS F2007	Progenitor	1
LONG COL- 10	Progenitor	1
SERI 82*	Col. Corto	1
HALBERD*	Col. Largo	1
LONG COL- 10/VORB	F_3	106
EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//ROLF07	F_2	40
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//ROLF07	F_2	40
EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB	F_2	40
EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//VORB	F_2	40
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//VORB	F_2	40
EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//LONG COL- 10	F_2	40
EBW10 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONG COL- 10	F_2	80
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//LONG COL- 10	F_2	40

Seri* y Halberd* sólo se utilizan en experimentos para medir longitud de coleóptilo como testigos de coleóptilo corto y largo respectivamente. Sólo se incluyen progenitores de CIMMYT.

Evaluación agronómica

Invierno 2010-2011

En noviembre de 2010 se sembraron en la estación de CIMMYT en Cd. Obregón Sonora. Las segregantes F_2 y F_3 de las cruzas, en surcos dobles de

5m de largo por 0.70m de ancho en 3 diferentes profundidades 5, 10 y 15 cm, (en este trabajo sólo se incluyen datos de las profundidades de 5 y 15 cm). Durante este ciclo no se toman datos debido a que la etapa de segregación en la que se encontraban las plantas es muy temprana por tanto había una alta variabilidad, la cosecha se hace en masa y algunas espigas separadas, las cuales son llevadas a la estación de Texcoco para ser sembradas en Toluca y Texcoco. En Texcoco se hacen las mediciones de longitud de coleóptilo.

Primavera 2011

Este ciclo se llevó a cabo en las estaciones experimentales de CIMMYT Toluca y Batán Texcoco, estado de México; las segregantes con dos juegos iguales para ambas localidades evaluadas en el 2011 fueron F₃ y F₄, las cuales fueron sembradas en condiciones normales a 5 cm de profundidad en surcos dobles de 5m de largo por 0.70 m de ancho entre surco y surco a doble hilera. La importancia de este ciclo aparte del avance de generación es la selección en ambas localidades para resistencia a enfermedades como diferentes especies de royas, septoria, etc., (CIMMYT e IPO, 1987), las escalas para la calificación de enfermedades fue de acuerdo a las establecidas por Duveiller *et al.*, (2012) descartando las líneas que no muestran resistencia. Los datos de estas variables no se muestran debido a que las enfermedades no tienen ninguna relación con las variables de interés para éste estudio.

Invierno 2011-2012

En el ciclo 2011-2012 teniendo ya F_4 y F_5 se repitió el experimento de siembras en diferentes profundidades, para confirmar la hipótesis que, a mayor profundidad de siembra se tiene más oportunidad de seleccionar genotipos con tallo corto y coleóptilos más largos (Rebetzke *et al.* 2007). En el ciclo 2011-2012 sólo se seleccionaron plantas de estatura baja (80-95 cm) además de un buen comportamiento agronómico. La cosecha de las familias segregantes fue espiga individual. Las variables que se registraron fueron altura de planta, longitud de coleóptilo y tipo de alelo que contiene cada segregante, las segregantes nuevamente son llevadas a las estaciones de Texcoco y Toluca. En Texcoco se repite la medición de longitud de coleóptilos.

Primavera 2012

Este es el último ciclo en dónde se toman datos de altura de planta en el experimento sembrado en Batán el 4 de junio, también se calificó para roya de tallo y hoja, tanto en Toluca como en Batán, Texcoco; para el experimento de coleóptilos se incluyen todos los progenitores a diferencia del ciclo pasado, (Cuadro 3.2).

Cuadro 3. 2 Genotipos y número de segregantes en cada cruza, en F_2 y F_4 .

Cruza	Profundidad de Siembra			
	Y10-11*		Y11-12*	
	5 cm	15 cm	5cm	15cm
EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//ROLF07	40	40	26	33

EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//VORB	40	40	20	22
EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//LONG COL- 10	80	80	8	15
EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB	40	40	48	10
EBW10 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONG COL- 10	80	80	1	26
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//LONG COL- 10	80	80	21	19
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//ROLF07	40	40	18	17
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//VORB	40	40	42	7
LONG COL- 10/VORB	96	96	215	163
LONG COL- 10				
ROELFS F2007				
VOROBAY				
EBW10 TALL# ¶				
EBW11 TALL#1¶				
JANS-Rht5¶				
SILVERSTAR-Rht13B¶				
SILVERSTAR-Rht4B¶				
WESTONIA-Rht5¶				
SERI M82				
HALBERD				

Y10-11* son segregantes F₂, Y11-12* son segregantes F₄. Ciclo primavera 2011 y 2012.
¶ Testigos que sólo se utilizaron para el ciclo Y11-12.

En Texcoco se sembraron las segregantes procedentes de Cd. Obregón para longitud de coleóptilo y el tejido cosechado se utilizó para las extracciones de ADN y SNPs.

Determinación de longitud de coleóptilo en condiciones controladas

De las segregantes de ambos ciclos de invierno se evaluaron para longitud de coleóptilos, del primer ciclo las segregantes que se cosecharon fue en masa, por cada entrada se seleccionaron 8 semillas mientras que de espiga individual sólo una por cada entrada para el ciclo PV-2011, para el ciclo PV-2012 sólo 4 semillas por entrada de espiga individual. El método para la medición de coleóptilos se basa con algunas modificaciones en la metodología

usada por Rebetzke *et al.*, (2007); Las pruebas se realizan en CIMMYT Texcoco, y se utilizaron charolas plásticas de 22x29x8 cm de tamaño se sembraron semillas con una buena calidad visible; las charolas contienen una mezcla de tierra previamente desinfectada con vermiculita 5:3. Las semillas fueron colocadas a 2 cm de profundidad, en cada charola con 6 columnas y 8 filas. Una vez sembradas se envuelven con bolsas plásticas oscuras y se meten en cámaras de germinación durante 14 días sin luz y a una temperatura de 18°C. Una vez pasados los 14 días se procedió a medir la longitud del coleóptilo desde el embrión, hasta la terminación del coleóptilo donde nace la primera hoja verdadera.



Figura 3. 1 Charolas con sustrato para medir longitud de coleóptilos y plántulas listas para toma de datos.

Extracción de ADN, PCR y SNP

El tejido vegetal utilizado fue el cosechado en las plántulas que se germinaron para medir longitud de coleóptilo en Texcoco ciclo Primavera 2012. La extracción del ADN se hizo mediante la técnica de CTAB de acuerdo a los protocolos de CIMMYT, (2006) pasando al proceso posterior de la PCR en

placas de 384 muestras a una temperatura de 94-57-72°C, en las muestras contenían ya el master mix (Primer) y Reaction Mix (polimerasa, dNTPs y Cl⁻ Na⁺) la cantidad de cada uno de los componentes se calculó de acuerdo al número de muestras corridas por día con el programa Kasp Volume Calculator.

Los genotipos Krichauff identificado como como VIC (T) y Pavón como FAM (C) fueron los controles utilizados en el genotipado SNP (Cuadro 3.3). Estos controles ya han sido ampliamente probados por el equipo de Biotecnología de Trigo en CIMMYT, Krichauff es una variedad con *Rht_1*; mientras que Pavón es una variedad sin *Rht_1*, lo que nos permitió una buena separación por la diferencia de la longitud de onda que transmiten los fluoróforos durante la lectura, para los heterocigotos se hace una mezcla de ambos controles en porciones iguales. Las muestras fueron colocadas en placas de 384 cavidades, de las cuales los primeros los 12 primeros pozos fueron para control positivo, control negativo, heterocigoto y blancos (agua) en tres repeticiones cada uno. Una vez hecha la lectura el software SNPviewer arrojó una gráfica (fig. 3.3) que representa cada uno de los grupos X:X, X:Y o bien Y:Y, los grupos se seleccionan y automáticamente los transfiere a Klust Caller, otro software para crear la base de datos con cada una de las muestras y su genotipo. Los SNP permiten no sólo detectar deleciones si no también inserciones o el cambio de un solo par de bases como ocurre en el caso de *Rht_B1*. Se utilizó el equipo BMG de LABTECH por el método KASP y SNP line de Kbioscience (Robinson, 2011), con los siguientes iniciadores:

F 5' GTGGCGCAGAAGCTGGAG[C/T] 3'

R 5' ATGGGCGGCGTGGGCGCC 3'(Ellis *et al.*, 2002)

Cuadro 1.3 Lectura de Fluorescencia para cada control utilizado en Rht_1.

	Excitación (nm)	Emisión (nm)
FAM	485	520
VIC	520	560

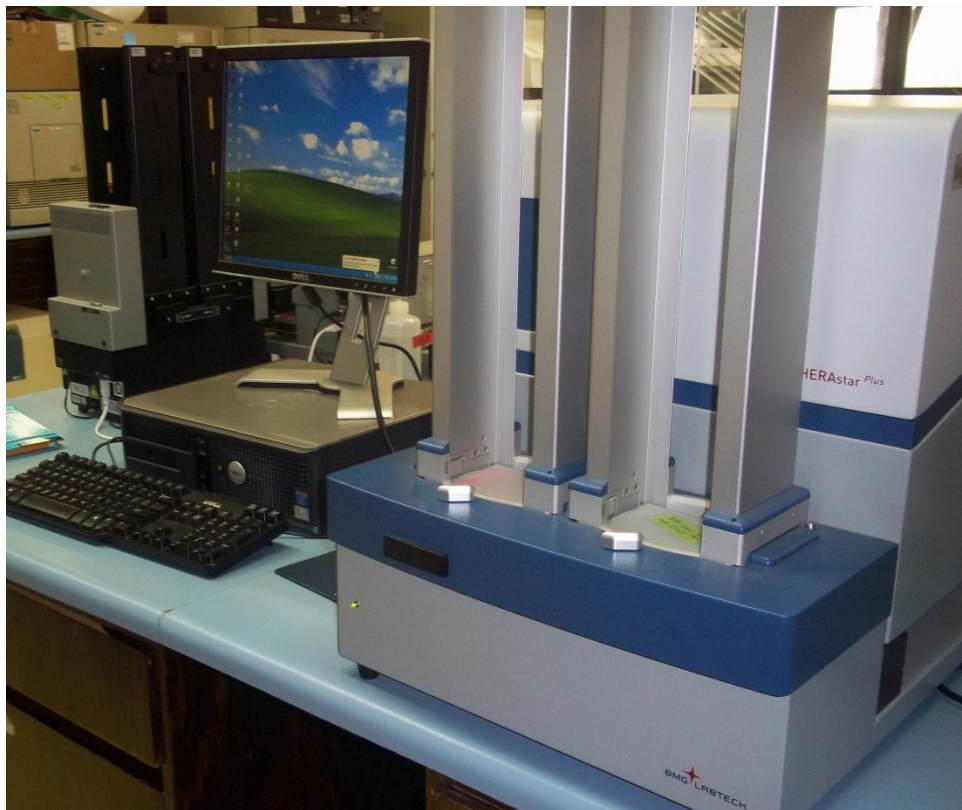


Figura 3. 2 Equipo BMG LABTECH, genotificador para SNPs.

La base de datos para la interpretación es muy sencilla, con el programa Kluster Caller, la cual sólo se basa en el rango de longitud de onda transmitido, dónde cada muestra es etiquetada como X:X para genotipos sin *Rht_1* (tipo silvestre), Y:Y para genotipos con *Rht_1* (tipo mutante), y X:Y para los

heterocigotos, (Kbioscience, 2012). Los datos obtenidos se analizan como un factor donde hay tres diferentes niveles X:X, XY y Y:Y.

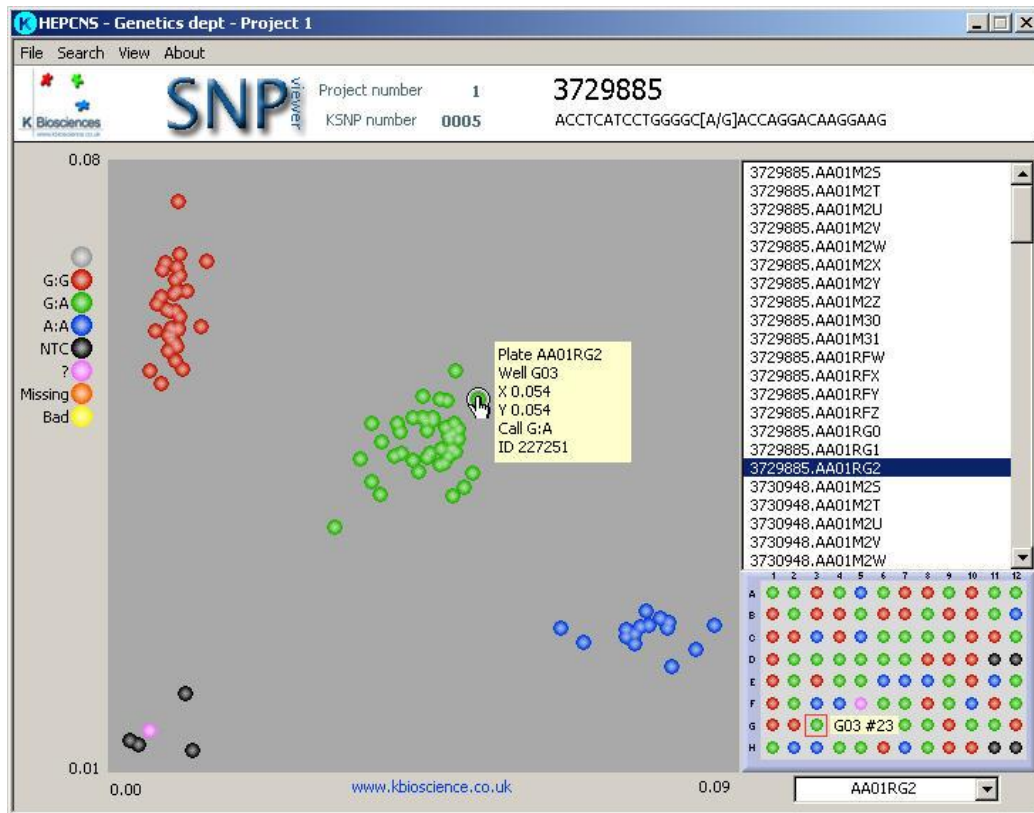


Figura 3. 3 Vista de SNPviewer para la separación de muestras de acuerdo a los alelos presentes.

La separación de grupos para Rht_1 permitió hacer una comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$) y una correlación de longitud de coleóptilo con altura de planta.

Selección de las mejores segregantes

En ambos ciclos provenientes de Cd. Obregón se seleccionaron las mejores líneas para longitud de coleóptilos, en el ciclo Y10-11 con datos sólo de coleóptilo, debido a que se consideró una etapa muy temprana y la segregación mucha como para medir altura de planta u otras variables, la selección en campo sólo fue visual.

En el ciclo Y11-12 se incluyeron datos de marcadores SNP's dónde se seleccionaron líneas sin *Rht_1* (X:X) también llamadas tipo silvestres para este gen, altura de planta baja en un rango de 90 a 110 cm y coleóptilos que estén por arriba del promedio de las segregantes dentro de cada cruce, para esto se hizo una prueba de *t*. Las semillas provenientes de este ciclo se utilizan para medir longitud de coleóptilo y al mismo tiempo para cosechar tejido para la extracción de ADN en las instalaciones de CIMMYT Batán Texcoco, descrito anteriormente.

Diseño experimental

Se utilizó un diseño de parcelas divididas con arreglo en bloques completos al azar utilizando modelo lineal mixto siguiente:

$$\gamma_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_{j+} + \alpha * \beta + \delta_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

μ = Efecto común a todas las observaciones

α_i = Efecto de las segregantes de las diferentes cruces (1,...,14)

β_j = Efecto de las profundidades de siembra (5,15)

$\alpha * \beta$ = Interacción entre segregantes de las cruzas y profundidades de siembra

δ_{ij} = Error de la parcela grande

ε_{ij} = Error de la parcela chica

Se realizó un análisis combinado de dos ciclos de selección bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha * \beta + \gamma_k + \gamma * \beta + \gamma * \alpha * \beta + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

μ = Efecto común a todas las observaciones

α_i = Efecto de las diferentes profundidades de siembra (1,2)

β_j = Efecto de los ciclos de selección (1,2)

$\alpha * \beta$ = Interacción de ciclos por profundidades de siembra

γ_k = Efecto de las diferentes segregantes (1,...,12)

$\gamma * \beta$ = Interacción de las diferentes segregantes por ciclos de selección

$\gamma * \alpha * \beta$ = Interacción de segregantes, en diferentes profundidades de siembra y diferentes ciclos de selección

δ_{ij} = Error de la parcela grande

ε_{ij} = Error de la parcela chica

Análisis estadístico

El análisis de varianza individual (ANOVA) para los ciclos Invierno 2010-2011 y 2011-2012 se realizó utilizando el procedimiento proc mixed

perteneciente al paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) versión 9.0; en el ciclo 2011-2012.

Se realizó un análisis combinado con dos ciclos de selección, así como un análisis de correlación de las variables de altura de planta con longitud de coleóptilo, se hicieron pruebas de medias de acuerdo a Tukey P 0.05. Por último se hizo un cálculo de porcentaje de aparición de *Rht_1* en ambas profundidades de siembra.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Longitud de coleóptilo ciclo Y10-11

En el análisis de varianza de la evaluación de segregantes de las cruzas en diferentes profundidades de siembra no se reportaron diferencias significativas para longitud de coleóptilos en las diferentes profundidades de siembra; pero fueron altamente significativas entre las diferentes cruzas (Cuadro 4.1), lo que sugiere que la variabilidad de la longitud de coleóptilos, es afectada únicamente por los progenitores involucrados.

Cuadro 4. 1 Análisis de Varianza para longitud de coleóptilo de las segregantes de diferentes cruzas, seleccionadas en diferentes profundidades de siembra.

Fuente	GL	SC	CM	Valor F
Rep	1	219.50	219.50	512.34**
Prof_Siembra	1	27.58	27.58	64.37
Rep*Prof_Siembra	1	0.43	0.43	
Cruza	11	3634.37	330.40	22.95**
Cruza*Prof_Siembra	11	158.37	14.40	3.14*
Error Experimental	21	96.42	4.59	

En las repeticiones también se hallan diferencias significativas esto es debido a que las segregantes se cosecharon en masa, y sumando que la variabilidad en esta etapa es muy alta. La interacción de profundidad de siembra por cruzas es significativa debido a que las familias dentro de cada crusa había una amplia variabilidad para longitud de coleóptilo lo que permitió hacer una muy buena selección de genotipos con coleóptilos largos.

La comparación de medias con una prueba *t* permitió seleccionar las segregantes dentro de cada craza que se encuentren por arriba del promedio de longitud de coleóptilos y con buen aspecto agronómico en campo.

Cuadro 4. 2 Comparación de la media $P \leq 0.01$ de segregantes de diferentes cruzas con testigos para longitud de coleóptilos y sus estimadores.

Segregantes	Testigos	Estimado r
EBW10TALL#1/JANZ-Rht5//ROLF07	LONG COL- 10	-13.3
EBW10TALL#1/JANZ-Rht5//VORB	LONG COL- 10	-16.5
EBW10TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB	LONG COL- 10	-12.1
EBW11TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//ROLF07	LONG COL- 10	-15.5
EBW11TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//VORB	LONG COL- 10	-18.5
EBW10TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//LONG COL-10	ROELFS F2007	23.9
EBW10TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB	ROELFS F2007	10.1
EBW10TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONG COL- 10	ROELFS F2007	22.4
EBW11TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//LONG COL-10	ROELFS F2007	16.5
EBW10TALL#1/JANZ-Rht5//ROLF07	VOROB EY	15.9
EBW10TALL#1/JANZ-Rht5//VORB	VOROB EY	12.7
EBW10TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//LONG COL-10	VOROB EY	31.0
EBW10TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB	VOROB EY	17.1
EBW10TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONG COL- 10	VOROB EY	29.4
EBW11TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//LONG COL-10	VOROB EY	23.6
EBW11TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//ROLF07	VOROB EY	13.7
EBW11TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//VORB	VOROB EY	10.7

Las cruzas en la mayoría de los casos de fueron superiores a los testigos, y aún mejores cuando tienen como progenitor a Long Col-10, lo que sugiere que sea este el mejor progenitor para longitud de coleóptilo. WESTONIA-Rht5 es otro de los progenitores que contienen las segregantes que se encuentran por arriba de la media en las demás segregantes se seleccionaron de forma individual las que tienen coleóptilos largos.

Análisis de varianza para el ciclo Y11-12

Para este ciclo en un análisis individual siguió mostrando diferencias altamente significativas para las cruzas ($P \leq 0.01$), lo que nos indica que al menos una craza es diferente a las demás igual que el ciclo anterior (Cuadro 4.3). En este ciclo ya no existen diferencias para repeticiones debido a que la segregación es muy poca, además de que la cosecha fue por espiga separada.

Cuadro 4. 3 Análisis de Varianza de Longitud de Coleóptilo para el ciclo Y11-12

Fuente	GL	SC	CM	Valor F
Rep	1	1050.03	1050.03	9.07
Prof_Siembra	1	544.27	544.27	4.7
Rep*Prof_Siembra	2	231.6	115.8	
Cruza	18	63131	3507.29	6.41**
Cruza*Prof_Siembra	9	4927.02	547.45	2.88
Error experimental	1253	238080	190.01	

Se unieron los datos de altura de planta y tipo de alelo, silvestre o mutante, en cuanto a alelo hay diferencias significativas ($P \leq 0.05$), debido a que las diferencias causadas se deben únicamente a los progenitores y a los alelos presentes ya sea con *Rht_1* o sin *Rht_1* (Cuadro 4.3), es decir dentro de cada grupo de segregantes habrá también diferencias ya que dentro de cada grupo hay 3 tipos de alelos, los tipo silvestre, mutante y heterocigotos, aunque lo interesante en esta etapa se eligieron líneas sin *Rht_1* debido a que ya son líneas avanzadas y las frecuencias de heterocigotos son muy bajas, los alelos silvestres son los que nos dan los coleóptilos más largos pudiendo atribuir esto

que se encuentran otros tipos de *Rht*, (*Rht4*, *Rht5* y *Rht13*) que bajan porte de planta sin afectar tanto la longitud del coleóptilo (Rebetzke *et al.* 2011).

Es importante recalcar en base a el Cuadro 4.4, que las diferencias debidas a los alelos, X:X sin *Rht_1*, Y:Y con *Rht_1* y X:Y para heterocigotos; los coleóptilos más largos pertenecen a las segregantes sin *Rht_1*, mientras que las segregantes con *Rht_1* tienen coleóptilos más cortos tanto en 5 cómo en 15 cm de profundidad. Los alelos son los que dan las diferencias para longitud de coleóptilo, podemos observar que los alelos tipo silvestres dan los coleóptilos más largos; mientras que los mutantes tuvieron coleóptilos más cortos, sin importar la diferencia en cuanto a profundidad de siembra, Jamali y Arain (2008), encuentran que genes enanizantes no afectan a la longitud coleóptilo. La base genética puede afectar la longitud coleóptilo de las distintas variedades.

Cuadro 4. 4 Comparación de promedios de longitud de coleóptilo de acuerdo a la profundidad de siembra y al tipo de alelo.

Profundidad de siembra	Tipo de alelo	N	Promedio
SEGREG-15CM	X:X a	20	106.5
SEGREG-15CM	X:Yab	12	104.7
SEGREG-5CM	X:X a	20	104.5
SEGREG-15CM	Y:Y b	18	97.2
SEGREG-5CM	Y:Y b	19	94.6
SEGREG-5CM	X:Yab	8	92.9
LSD			4.93

Medias con la misma letra se consideran estadísticamente iguales.

Estudios recientes no han hallado una buena relaciones entre la longitud de coleóptilo con la altura de planta (Gulnaz *et al.*, 2011), mientras que otros

encuentran estas características altamente relacionadas (Sanz de Cortazar *et al.*, 1980).

Independientemente de los alelos, si son mutantes o no, otra variable de importancia en cuanto a la longitud de coleóptilo son los progenitores con los que fue formada la cruce.

En los análisis de correlación no se hallaron relaciones altas para estas dos variables que son altura de planta con longitud de coleóptilo (Cuadro 4.5).

Cuadro 4. 5 Correlación de altura de plata con longitud de coleóptilo por familia estudiada.

Entrada	Segregantes	Correlación
1	EBW10 TALL#1/ JANZ-Rht5 //ROLF07	-0.11
2	EBW10 TALL#1/ JANZ-Rht5 //VORB	0.12
3	EBW10 TALL#1/ SILVERSTAR-Rht4B // LONG COL- 10	-0.21
4	EBW10 TALL#1/ SILVERSTAR-Rht4B //VORB	0.11
5	EBW10 TALL#1/ WESTONIA-Rht5 // LONG COL – 10	0.16
6	EBW11 TALL#1/ SILVERSTAR-Rht13B // LONG COL- 10	-0.08
7	EBW11 TALL#1/ SILVERSTAR-Rht13B //ROLF07	0.14
8	EBW11 TALL#1/ SILVERSTAR-Rht13B //VORB	0.08
9	EBW11 TALL#1/ WESTONIA-Rht5 // LONG COL- 10	0.36
10	LONG COL - 10 /VORB	0.19

Los resultados anteriores sugieren que los progenitores están influyendo en la longitud de coleóptilos y están interactuando con los *Rht_1* con los otros tipos de *Rht*, por lo que nuevamente se confirma que los progenitores son de gran importancia para la selección de coleóptilos largos. Es importante contemplar que estos progenitores contienen genes alternativos de *Rht* (*Rht4*, *Rht5* y *Rht13*) que reducen altura de planta, pero con la ventaja de no afectar tanto la longitud del coleóptilo.

Con la clasificación de medias en el Cuadro 4.6 se observa que los mejores progenitores para longitud de coleóptilos son JANZ-Rht5, LONG COL-10 y WESTONIA-Rht5. Estos progenitores interactúan para coleóptilos largos, manteniendo su promedio por arriba de la media general.

Cuadro 4. 6 Agrupación de medias para el ciclo Y11-12 para longitud de coleóptilo.

Agrupación Tukey				Mean	N	Cruza				
	A			127.1	2	HALBERT				
B	A			121.5	2	JANS-Rht5				
B	A	C		118.2	11	EBW10 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONGCOL- 10				
B	D	A	C	118.0	3	LONG COL- 10				
B	D	A	C	115.3	12	EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//LONG COL- 10				
E	B	D	A	C	112.0	2	EBW11 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONGCOL- 10			
E	B	D	A	C	F	110.5	2	WESTONIA-Rht5		
E	B	D	A	G	C	F	108.2	10	EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//LONG COL- 10	
E	B	D	H	A	G	C	F	104.0	12	EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//VORB
E	B	D	H	A	G	C	F	102.5	18	LONG COL AUS SELS- 10/VORB
E	B	D	H		G	C	F	101.8	16	EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//ROLF07
E	B	D	H		G	C	F	98.4	14	EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//VORB
E	B	D	H		G	C	F	97.1	14	EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB
E	B	D	H		G	C	F	97.0	1	SILVERSTAR-Rht4B
E		D	H		G	C	F	93.6	14	EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//ROLF07
E		D	H		G		F	93.5	2	SILVERSTAR-Rht13B
E			H		G		F	89.0	2	EBW10 TALL#1
			H		G		F	86.1	2	SERI M82
			H		G			84.5	2	EBW11 TALL#1
			H					83.0	2	ROLF07

Medias con la misma letra se consideran estadísticamente iguales. El LSD fue de 26.

Análisis combinado

En el análisis combinado los resultados al igual que los individuales muestran diferencias para las segregantes de las diferentes cruzas (cuadro 4.7).

Cuadro 4. 7 Análisis combinado para los ciclos Y10-11 y Y11-12.

Fuente	GL	SC	CM	F Calculada
Ciclo	1	63.56	63.56	0.89
rep(Ciclo)	2	143.1	71.55	
Prof	1	0.15	0.15	0.03
Ciclo*Prof	1	17.3	17.3	3.21
Ciclo*rep*Prof	2	10.77	5.38	
Ent	11	15961.46	1451.04	29.55**
Ciclo*Ent	11	720.45	65.5	1.33
Prof*Ent	11	519.47	47.22	0.96
Ciclo*Prof*Ent	11	540.16	49.11	
Error experimental	45	1353.88	30.09	

Las medias de longitud de coleóptilo no son diferentes de un ciclo a otro, esto se puede deber a que no se está considerando una secuencia en cuanto al historial de selección, sólo se están obteniendo las medias de las segregantes en general y no de la familia o subfamilia a la cual pertenecen (cuadro 4.6). Para este análisis ya no se tomó en cuenta la profundidad de siembra, esto porque la siembra en cada uno de los análisis individuales no tiene ningún efecto sobre la longitud de coleóptilo, por lo que no fue necesario anexar ese factor.

Con base a este análisis se seleccionaron segregantes de las cruzas con mayor longitud de coleóptilo y dentro de ellas las que están por encima del promedio, además de altura de planta baja sin *Rht_1*.

Cuadro 4. 8 Promedios de longitud de coleóptilo en mm en diferentes ciclos de selección en dos profundidades de siembra.

Segregantes de las cruzas	Y10-11	Y11-12
EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//ROLF07	92.7	94.6
EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//VORB	93.7	95.2

EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//LONGCOL- 10	116.6	117.6
EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB	96.0	96.8
EBW10 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONG COL-10	113.7	116.0
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//LONGCOL- 10	110.6	112.7
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//ROLF7	87.7	89.3
EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//VORB	95.0	96.3
EBW11 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONG COL-10	96.5	104.3
LONG COL - 10/VORB	96.9	98.7
EBW11 TALL#1	80.0	82.3
EBW10 TALL#1	71.0	80.0
HALBERT	122.5	125.0
JANS-Rht5	111.0	116.3
LONG COL- 10	105.0	112.4
ROLF07	80.5	81.8
SERI M82	84.3	84.9
SILVERSTAR-Rht13B	94.5	94.0
SILVERSTAR-Rht4B	89.0	89.3
VOROBAY	80.0	80.0
WESTONIA-Rht5	117.0	113.8

En el cuadro 4.8, se muestran la comparación de medias de un análisis combinado de ambos ciclos donde se sembró en diferentes profundidades; las profundidades no han mostrado diferencias para longitud de coleóptilos, en este caso sólo se muestra que cruza son las mejores para longitud de coleóptilo, y LONG COL-10 es el progenitor que se pudo considerar como el mejor donador de coleóptilo largo, ya que el promedio de las segregantes de las cruza que tienen como progenitor a ésta línea se mantienen arriba de la media (Cuadro 4.6).

En el análisis del ciclo Y11-12 se observan las segregantes que contienen a Long Col-10 son mejores para longitud de coleóptilos ya que en comparación de medias siempre están en los primeros lugares para esta característica, y para el análisis combinado se encuentran nuevamente las líneas que tienen a

este progenitor en la comparación de medias (Cuadro 4.9). Los genes alternativos están funcionando perfectamente para aumentar longitud de coleóptilos sin afectar altura de planta, al combinar los genes alternativos que no tienen alguna correlación de la altura de planta con la longitud del coleóptilo es como se logra esto (Cuadro 4.5).

Cuadro 4. 9 Promedios a través de dos ciclos de evaluación para longitud de coleóptilo

t Grupo	Mean	N	Cruza
A	123.8	4	HALBERT
B A	117.1	8	EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//LONG COL- 10
B A	115.4	4	WESTONIA-Rht5
B A	114.9	8	EBW10 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONGCOL – 10
B	113.6	4	JANS-Rht5
B	111.7	8	EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//LONG COL- 10
B C	108.7	8	LONG COL- 10
D C	100.4	4	EBW11 TALL#1/WESTONIA-Rht5//LONGCOL- 10
D E	97.8	8	LONG COL- 10/VORB
D E	96.4	8	EBW10 TALL#1/SILVERSTAR-Rht4B//VORB
D E	95.6	8	EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//VORB
D E	94.4	8	EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//VORB
D E	94.3	4	SILVERSTAR-Rht13B
D E F	93.6	8	EBW10 TALL#1/JANZ-Rht5//ROLF07
G E F	89.1	4	SILVERSTAR-Rht4B
G E F	88.5	8	EBW11 TALL#1/SILVERSTAR-Rht13B//ROLF07
G H F	84.6	4	SERI M82
G H	81.1	4	ROLF07
G H	81.1	4	EBW11 TALL#1
G H	80.0	2	VOROBAY
H	75.5	4	EBW10 TALL#1

Calculado el porcentaje de aparición de alelos del total de segregantes procedentes de dos profundidades de siembra (Cuadro 4.10), sugiere que la profundidad de siembra en este experimento ayuda a seleccionar mayor cantidad de segregantes sin *Rht_1* que corresponde al alelo X:X , aunque por

los análisis anteriores, muestran que los genes alternativos involucrados tuvieron gran influencia aumentar longitud de coleóptilo sin tener relación alguna con la altura de planta.

Cuadro 4. 10 Porcentaje de alelos presentes en segregantes F5 de trigo seleccionados en dos profundidades de siembra.

Prof. De siembra (cm)	Alelo	Porcentaje
15	X:X	51.9
15	X:Y	4.5
15	Y:Y	43.6
5	X:X	32.7
5	X:Y	6.2
5	Y:Y	61.1

V. CONCLUSIONES

Con base en los resultados del presente trabajo y las condiciones bajo las que se condujo, se concluye que:

Longitud de coleóptilo es una característica difícil de seleccionar en diferentes profundidades de siembra, entre las cuales no se encontraron diferencias significativas en este trabajo.

En este estudio la longitud de coleóptilo se atribuye mayormente a efectos genéticos, ya que utilizar un progenitor con coleóptilo largo y seleccionar genotipos con ausencia de *Rht_1*, permitió seleccionar coleóptilos generalmente más largos.

La presencia de segregantes sin *Rht_1* es mayor en las segregantes seleccionadas a una profundidad de 15 cm, pero por la influencia de genes alternativos no hay una diferencia significativa para la longitud de coleóptilo.

El mejor progenitor para longitud de coleóptilo fue el LONG COL -10, ya que mantuvo el promedio de las familias donde participó siempre arriba de la media.

VI. LITERATURA CITADA

- Agropanorama, 2013. Producción Mundial de Trigo. Available at: <http://www.agropanorama.com/news/Produccion-Mundial-de-Trigo.htm> [Accessed February 12, 2013].
- Ahmadian, A., B. Gharizadeh, A. C. Gustafsson, F. Sterky, 2000. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Analyticalbiochemistry*, 280(1):103–110.
- Allan, R.E., 1989. Agronomic comparisons between Rht1 and Rht2 semidwarf genes in winter wheat. *Crop Sci* 29: 1103–1108.
- Borlaug, N., 1972. La revolución verde, paz y humanidad: conferencia pronunciada en ocasión de la recepción del Premio Nobel de la Paz de 1970. In CIMMYT, ed. Vol. 3 de Serie reimpresos y traducciones CIMMYT. Oslo, Noruega.
- Botwright, T.L., G.J. Rebetzke, A.G. Condon and R.A. Richards 2001. Influence of variety , seed position and seed source on screening for coleoptile length in bread wheat (*Triticumaestivum* L .). *Euphytica*, 119:349–356.
- Cárdenas, A., Iriso, M.; Sánchez, Ignacio, G., 2008. Retos de la agroindustria TLCAN : Del dicho al hecho. Canimolt. México, D.F.
- Checa, M., 2007. Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas*, 20(3):213–221.

CIMMYT, 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Chemistry & ..., Tercera ed. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract> [Accessed April 8, 2013].

CIMMYT, 2012. Programa Global de Trigo. Available at: <http://www.cimmyt.org/es/programas-y-unidades/programa-global-de-trigo> [Accessed February 12, 2013].

CIMMYT e IPO, 1987. Conferencia regional sobre la septoriosis del trigo. In L. T. van B. Mohan Kohli Man, ed. Montevideo, Uruguay, p. 262.

Duveiller, E., P.K. Singh, M. Mezzalama, R.P. Singh, A. Dababat, 2012. Wheat diseases and pests. A guide for field identification (2nd Edition). CIMMYT. Mexico, D.F. Mexico.

Ellis, H., W. Spielmeyer, K.R. Gale, G.J. Rebetzke, R.A. Richards, 2002. "Perfect" markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 105(6-7):1038–1042.

Ellis, M., G. J. Rebetzke, F. Azanza, R. A. Richards, W. Spielmeyer, 2005. Molecular mapping of gibberellin-responsive dwarfing genes in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 111(3):423–430.

FAO, 2008. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Sección C. Available at: <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s17.pdf> [Accessed June 12, 2013].

Flores, E., P. Moratinos, M. Ramírez, D. E. García, 2009. Evaluación de la emergencia y las características morfológicas iniciales de *Tamarindus indica* L. con fines agroforestales. *Pastos y Forrajes*, 32(2), p.1. Available

at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942009000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es [Accessed May 20, 2013].

Gale, D., Marshall, A. & Rao, M. V, 1981. A classification of the norin 10 and tom thumb dwarfing genes in british ,mexican , indian and other varieties. *Euphytica*, 30:355–361.

Gale, M.D. & Marshall, G.A., 1976. The chromosomal location of *gai 1* and *Rht_1*, genes for gibberellin insensitivity and semi- dwarfism , in a derivative of norin 10 wheat. *Heredity*, 37(2):283–289.

García, A. y Lasa, J.M., 1991. Ensayos de vigor de nascencia-revisionbibliografica. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Estación Experimental del aula DEI. Zaragoza, Boletín no. 14:12–13.

García, E., 1973. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen. Segunda edición. Inst. de Geografía, UNAM. 146 pp.

Gómez Cadenas, A. & Agustín, P.G., 2006. Fitohormonas : Metabolismo y modo de acción U. Jaume, ed., Available at: http://books.google.com.mx/books?id=6MfjE2eQO4kC&dq=proteinas+della&source=gbs_navlinks_s.

Govaerts, B., 2011. Enlace, enlazando al sector agrícola con la agricultura de conservación. CIMMYT. México, D. F. México. II(4)

Gulnaz, S., M. Sajjad, I, Khaliq, A. Salamkhan and S. H. Khan, 2011. Relationship among Coleoptile length , plant height and tillering capacity for developing improved wheat varieties. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13(1):130–133.

Inifap, (2013). Características Agro-climáticas y agro-ecológicas: Campo experimental Norman E. Borlaug. CENEB. Available at: <http://www.inifap-noroeste.gob.mx/ceneb.aspx> [Accessed May 20, 2013].

Infoacera, 2013. Precios diarios de contado internacional: Trigo. SAGARPA. Available at: http://www.infoacera.gob.mx/fisicos/trg_pci.asp [Accessed May 19, 2013].

Inforural, 2013. Pactan precio piso del trigo en 3 mil 800 pesos por tonelada en beneficio de productores michoacanos :: Noticias Nuevas :: Info Rural Noticias Agrarias Info Rural. Available at: <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article121378> [Accessed May 19, 2013].

Jamali, K. & Arain, S., 2008. Coleoptile length studies in semi-dwarf wheat (*Triticum aestivum* L.) with different dwarfing genes. In 11th International Wheat Genetics Symposium 2008 Proceedings. Sydney University Press, p. 221. Available at: [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Nt99CyZWJYwC&oi=fnd&pg=PA221&dq=Coleoptile+length+studies+in+semi-dwarf+wheat+\(+Triticum+aestivum+L+.\)+with+different+dwarfing+genes&ots=S3AUv8in4Z&sig=LqAA4ucWPiGrfp-73VMR801XZqs](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Nt99CyZWJYwC&oi=fnd&pg=PA221&dq=Coleoptile+length+studies+in+semi-dwarf+wheat+(+Triticum+aestivum+L+.)+with+different+dwarfing+genes&ots=S3AUv8in4Z&sig=LqAA4ucWPiGrfp-73VMR801XZqs) [Accessed September 26, 2011].

Kbioscience, 2012. SNPviewer ver.3.2.2.16., England. Available at: <http://www.lgcgenomics.com/genotyping/kasp-genotyping-reagents/?data=kasp-genotyping-reagents> [Accessed August 13, 2012].

Lafitte, H.R., 2001. FAO Plant Production and Protection Series. Depósito de documentos de la FAO. Available at: <http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s19.htm> [Accessed February 12, 2013].

Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T. G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia and T. Sasaki 1997. Genome mapping , molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding* 3:87–103.

Payne, T., 2011. Recursos genéticos del trigo. Available at: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=234&Itemid=362&lang=es [Accessed February 9, 2013].

Peña Bautista, R.J., Perez Herrera, P., Villaseñor Mir E., Gómez Valdez, M.M., Mendoza Lozano, M.A. 2008. Calidad de la cosecha de trigo en México. Ciclo primavera-verano 2006. Publicación Especial del CONASIST-CONATRIGO, Tajín No. 567, Col. Vertiz Narvarte, Delegación Benito Juárez C.P. 03600 México, D.F. 28p.

Poehlman, J. M. 2005 “Mejoramiento Genético de las Cosechas” 2ª ed. México. Limusa Wiley.

Rebetzke, G., R.A. Richards, N.A. Fettell, M. Long, A.G. Condon, R.I. Forrester , T.L. Botwright, 2007. Genotypic increases in coleoptile length improves stand establishment, vigour and grain yield of deep-sown wheat. *Field Crops Research*, 100(1):10–23.

Rebetzke, G J, R.A. Richards, V.M. Fischer & B.J. Mickelson, 1999. Breeding long coleoptile , reduced height wheats. *Euphytica*, 159:159–168.

Rebetzke, G J, Richards, R. A. Sirault, X R R, Morrison, A D, 2004. Genetic analysis of coleoptile length and diameter in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 55(7):733–743.

Rebetzke, G J, M. H. Ellis, D. G. Bonnett, R. A. Richards, 2007. Molecular mapping of genes for Coleoptile growth in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 114(7):1173–1183.

- Rebetzke, G.J., M.H. Ellis, D.G. Bonnett, A.G. Condon, D. Falk, R.A. Richards 2011. The Rht13 dwarfing gene reduces peduncle length and plant height to increase grain number and yield of wheat. *Field Crops Research*, 124(3):323–331.
- Richards, R., W. Spielmeyer, G. Rebetzke, M. Ellis, M. Watt, 2007. Above-ground traits to increase the yield of water-limited wheat shoot traits to raise the water-limited yield CSIRO. ed., Canberra, Australia.
- Robinson, P., 2011. KASP Genotypic Manual. Kbioscience, England, pp.1–8.
- Sanz de Cortazar, C., Hacke E., E. & Ramírez A., I., 1980. Relación entre longitud de coleoptilo y altura de planta adulta en trigos candeales, *Triticum durum* Desf. *Agricultura Técnica*, 40(1):18–21.
- Trethowan, R., R.P. Singh, J. Huerta-Espino, J. Crossa, M. Van Ginkel, 2001. Coleoptile length variation of near-isogenic Rht lines of modern CIMMYT bread and durum wheats. *Field Crops Research*, 70(3):167–176.
- Valadez G., J., E., M.O.L. & Mendoza C., C., 2007. Tamaños de semilla, sustancias vigorizantes y pruebas de vigor en sorgos tolerantes al frío. *Agrociencia*, 41(2):169–179.
- Worland, A.J., V. Korzun, M. S. Röder, M. W. Ganai, C. N. Law, 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene Rht8 in wheat . Part II .The distribution and adaptive significance of allelic variants at the Rht8 locus of wheat as revealed by microsatellite screening. *Theoretical and Applied Genetics*. 96:1110–1120.