

# Evaluación fenotípica y molecular de alelos de los genes *Ppd-1* en una población biparental de trigo pan

Lombardo, L. A., Nisi, M. M., Ghione, C. E., Fisore, G. D. y Helguera, M.

## RESUMEN

El constante incremento de las temperaturas –como consecuencia del cambio climático– en las regiones donde se cultiva trigo, exige ajustar el ciclo del cultivo a períodos más cortos para evitar o disminuir los estreses causados por las altas temperaturas. En este sentido, el descubrimiento de fuentes genéticas innovadoras de modulación de la espigazón, así como también el desarrollo de herramientas moleculares que permitan capitalizarlas, tienen un rol central en el mejoramiento de este cultivo. En el presente estudio se evalúa, bajo condiciones controladas, el efecto de los genes *Ppd-1* sobre la espigazón en una población biparental de trigo pan. Para tal fin, se desarrollaron marcadores moleculares inéditos para los genes *Ppd-A1* y *Ppd-B1*. Los resultados obtenidos muestran un efecto desigual de los loci *Ppd-1* (*Ppd-A1*, *Ppd-B1* y *Ppd-D1*) sobre la respuesta al fotoperíodo. *Ppd-D1* fue el locus con mayor efecto sobre la respuesta al fotoperíodo, mientras que *Ppd-B1* y *Ppd-A1* presentaron un efecto menor y nulo, respectivamente. Se concluye de este estudio, que la estimulación en condiciones de días largos no es un proceso esencial para que se produzca la espigazón en el trigo.

**Palabras clave:** trigo, fotoperíodo, *Ppd-1*, marcadores moleculares.

Lombardo, L. A., Nisi, M. M., Ghione, C. E., Fisore, G. D. and Helguera, M., 2017. Phenotypic and molecular evaluation of *Ppd-1* alleles in a bread wheat biparental population. *Agriscientia* 34 (II): 45-57

## SUMMARY

The constant increase in temperatures, as a consequence of climate change, affects the regions where wheat is grown and thus demands an adjustment of crop cycle to shorter periods with the purpose of decreasing the high temperature stress. Therefore, the discovery of new genetic sources of flowering modulation and the development of molecular tools that enable their use, take a main role in wheat breeding. In this study, the effect of *Ppd-1* on flowering time was evaluated in a bread wheat biparental population, under controlled conditions. Novel molecular markers for *Ppd-A1* and *Ppd-B1* genes were developed. The results showed an unequal effect of *Ppd-1* loci (*Ppd-A1*, *Ppd-B1* and *Ppd-D1*) on photoperiod response. *Ppd-D1* was the locus with the

greatest effect on photoperiod response, while *Ppd-B1* and *Ppd-A1* presented minor and null effects, respectively. It could be concluded that long day stimulation is not essential to wheat flowering.

**Key words:** wheat, photoperiod, *Ppd-1*, molecular markers.

L. A. Lombardo; Nisi, M. M., Ghione, C. E., Fisore, G. D. y Helguera, M.: Estación Experimental INTA Marcos Juárez, RP No12 Km 2,5, CP 2580, Marcos Juárez, Córdoba, Argentina. Correspondencia a: lombardo.lucio@inta.gob.ar

## INTRODUCCIÓN

Muchas especies de plantas responden a la duración relativa entre el día y la noche (Fosket, 1994); a este comportamiento se lo denomina sensibilidad al fotoperíodo o respuesta fotoperiódica (Shindo, Tsujimoto y Sasakuma, 2003). En este sentido, el trigo es esencialmente una planta de día largo ya que tanto sus antepasados como la mayoría de las variedades florecen más temprano cuando son expuestas a día largo. Según el tipo de respuesta al fotoperíodo (RF), los trigos pueden clasificarse como sensibles o insensibles (también denominados trigos neutrales). Los materiales sensibles florecen rápidamente en condiciones de día largo (>12 horas de luz diaria) pero alargan el tiempo a floración cuando son cultivados en condiciones de día corto (<10 horas de luz diaria), mientras que los materiales insensibles o neutrales florecen rápidamente tanto en condiciones de día largo (DL) como de día corto (DC).

Al igual que los germoplasmas enanos, la aparición de genotipos insensibles tuvo un gran impacto durante la "revolución verde", ya que los trigos de origen mexicano presentaron una amplia adaptación a diversas condiciones agroclimáticas debido a su baja sensibilidad al fotoperíodo (Syme, 1968). La insensibilidad al fotoperíodo es frecuentemente observada en trigos invernales adaptados a latitudes más bajas con demandas de ciclo corto y madurez rápida (Worland, Appendino y Sayers, 1994), así como en trigos de ciclo corto primaverales adaptados a latitudes bajas e intermedias como en Argentina (Gomez *et al.*, 2014).

La habilidad que tienen las variedades insensibles al fotoperíodo para florecer tempranamente es una ventaja en ambientes cálidos porque las plantas pueden tener un desarrollo completo y un llenado de grano antes

que aparezcan las temperaturas altas de verano y su déficit de agua asociado (Beales, Turner, Griffiths, Snape y Laurie, 2007).

El estudio de la base genética de la insensibilidad al fotoperíodo es importante ya que el incremento constante de las temperaturas en las regiones donde se cultiva el trigo como consecuencia del cambio climático, exige ajustar el ciclo del cultivo a períodos más cortos para evitar o disminuir los estreses causados por las temperaturas altas, con particular énfasis en aquellas regiones donde el estrés térmico ocurre durante el llenado de grano (Araus, Slafer, Royo y Serret, 2008).

La RF de los diferentes genotipos es generalmente controlada por una serie de genes denominados *Ppd-1* (Worland y Snape, 2001). Estos genes se ubican en el brazo corto de los cromosomas 2A, 2B y 2D y se denominan *Ppd-A1*, *Ppd-B1* y *Ppd-D1*, respectivamente.

La insensibilidad al fotoperíodo es dominante respecto a la sensibilidad (Keim, Welsh y McConnell, 1973). Respecto a la nomenclatura, los alelos de insensibilidad al fotoperíodo se designan con el nombre del *locus* seguido del sufijo *a* (por ejemplo, *Ppd-D1a*) y los alelos de sensibilidad con el sufijo *b* (McIntosh *et al.*, 2013).

Los productos de los *loci Ppd-1* son proteínas de la familia de los reguladores de pseudorespuesta (PRR, del inglés *pseudo-response regulator*). Estas proteínas se caracterizan por presentar un dominio regulatorio en la zona amino-terminal y un dominio de 43 aminoácidos denominado CCT (de *constans*, *constans-like*, *timing of cab1* [TOC1]) en el extremo carboxi-terminal (Turner *et al.*, 2005; Beales *et al.*, 2007).

Las proteínas PRR son un componente importante del reloj circadiano del trigo y regulan de manera directa la expresión de otras proteínas tales

como *flowering locus* y *nuclear factory-y* (Beales *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2011).

Hasta la fecha se han reportado un total de dos variantes alélicas insensibles para el *locus Ppd-A1*, la variante GS-100 y la variante GS-105 (Wilhelm, Turner y Laurie, 2009). Estas dos variantes alélicas se caracterizan por presentar una deleción en la zona promotora del gen. La variante GS-100 presenta una deleción de 1027pb y la GS-105 una de 1117pb (Figura 1). Wilhelm *et al.* (2009) desarrollaron un marcador que permite distinguir tanto estas dos variantes insensibles como la sensible del gen *Ppd-A1*. Bentley *et al.* (2011) utilizaron este marcador para caracterizar germoplasma de trigo tetraploide, hexaploide y sintético, y observaron que las mutaciones insensibles previamente descritas se encuentran asociadas a los grupos de trigo candeal y sintético, sugiriendo que estas mutaciones son de origen candeal.

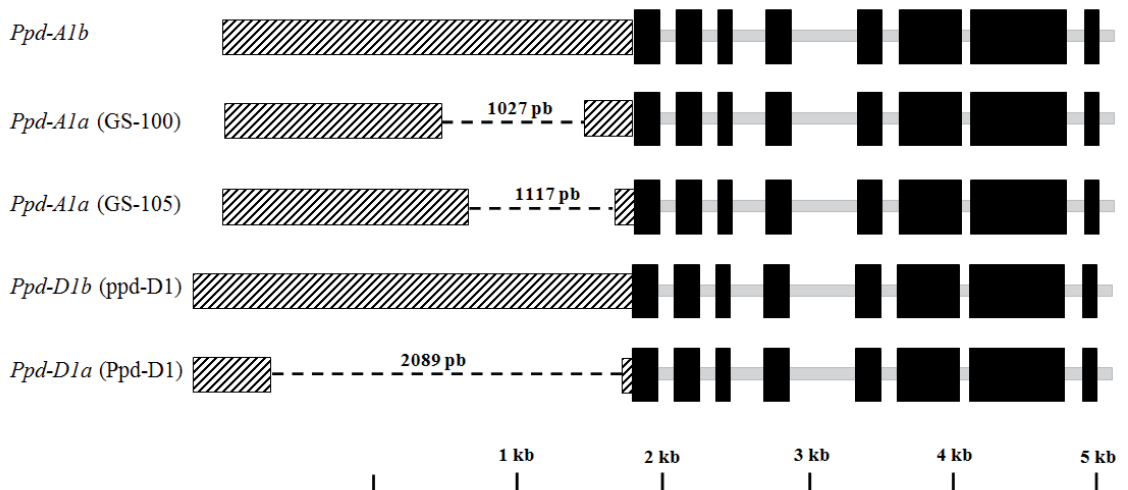
Para el *locus Ppd-D1* se describió una variante insensible denominada *Ppd-D1a* (Beales *et al.*, 2007). De manera análoga a lo descrito anteriormente para *Ppd-A1*, la variante *Ppd-D1a* presenta una deleción de 2089pb en el promotor del gen *Ppd-D1* (Figura 1). Recientemente han sido caracterizadas dos nuevas variantes alélicas para *Ppd-D1*: *Ppd-D1c*, portador de un transposón en el primer intrón; y *Ppd-D1d* con una deleción en el séptimo exón del gen (Cane *et al.*, 2013; Eagles *et al.*, 2014).

Por el momento no se han detectado mutaciones funcionales para el *locus Ppd-B1*; sin embargo,

se ha documentado que el número de copias de este gen puede variar afectando la respuesta al fotoperíodo. Se describe al alelo *Ppd-B1a* (alelo con tres copias funcionales del gen), hallado en el cultivar Sonora 64, como la variante alélica con mayor insensibilidad al fotoperíodo (Díaz, Zikhali, Turner, Isaac y Laurie, 2012).

Estudios previos reportaron que los cultivares provenientes de zonas geográficas ubicadas en latitudes altas presentan sensibilidad alta al fotoperíodo, mientras que aquellos que provienen de zonas ubicadas en latitudes bajas presentan insensibilidad al fotoperíodo (Martinic, 1975; Hunt, 1979; Kosner y Zurkova, 1996). Tras el desarrollo de marcadores moleculares para los genes *Ppd-1*, otros estudios más recientes (Yang *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2011) refuerzan esta observación mostrando que la frecuencia de aparición de alelos insensibles de *Ppd-1* se incrementa a medida que se analizan entradas provenientes de regiones de latitudes menores, sugiriendo que existe una combinación alélica de *Ppd-1* óptima para cada latitud. En este sentido, se ha observado que aproximadamente el 50 % de las variedades argentinas presentan insensibilidad al fotoperíodo, lo que se explica principalmente por la presencia de los alelos *Ppd-D1a*, y en menor medida por *Ppd-B1a* (Gomez *et al.*, 2014).

La evaluación del efecto de *Ppd-1* requiere quitar los efectos de otros genes de adaptación como los de vernalización y precocidad intrínseca, así como también los de otros genes del fondo genético que puedan interferir. En este sentido,



**Figura 1.** Variantes alélicas sensibles e insensibles de los genes *Ppd-A1* y *Ppd-D1*. Se representa con rectángulos rayados la región promotora del gen, con rectángulos negros los exones y con rectángulos grises los intrones. Las deleciones son representadas con líneas de puntos.

la evaluación del efecto de *Ppd-1* en condiciones controladas utilizando poblaciones biparentales segregantes para *Ppd-1*, mediante la comparación de su desarrollo bajo condiciones de DC vs. DL, permitiría maximizar el impacto de estos genes sobre la adaptación, facilitando la medición de su efecto. Estos tipos de estudios constituyen un primer paso para el uso de la variabilidad genética presente en los genes de respuesta al fotoperíodo *Ppd-1* como una estrategia alternativa para modular los componentes de adaptación en trigo, diferente a la de la utilización de los genes de vernalización.

En este trabajo se utilizó una población biparental segregante para la sensibilidad al fotoperíodo con el objetivo de establecer de forma precisa la contribución de alelos del gen *Ppd-1* a la respuesta al fotoperíodo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Desarrollo de la población y extracción de ADN

Los cultivares BioINTA 2001 (hábito de crecimiento primaveral, sensible a fotoperíodo y precoz) y Baguette Premium 11 (hábito de crecimiento primaveral, insensible al fotoperíodo y tardío) se utilizaron como progenitores de una población de 89 RIL (*Recombinant Inbred Lines*, líneas endocriadas recombinantes).

La población de RIL se obtuvo por el método SSD (*Single Seed Descent*, descendencia de una sola semilla; Brim, 1996) hasta alcanzar la sexta generación ( $F_6$ ). Las extracciones de ADN de los progenitores y las RIL se realizaron siguiendo el protocolo de microextracción propuesto por Weining y Langridge (1991). Al final del proceso se evaluó la cantidad y calidad del ADN purificado utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 8000. La concentración de los ADN se ajustó entre 100 ng/ $\mu$ l y 200 ng/ $\mu$ l con buffer TE (1X; pH 8,0).

### Caracterización molecular de *Ppd-1*

En la Tabla 1 se detallan los marcadores con los cuales fueron caracterizados BioINTA 2001 y Baguette Premium 11. De este set de marcadores, se utilizaron un total de cinco (dos para *Ppd-D1*, dos para *Ppd-B1* y uno para *Ppd-A1*) en la caracterización molecular de *Ppd-1* en las RIL (Tabla 1).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l incluyendo 100-150 ng de ADN genómico; 200  $\mu$ M de cada dNTP; 0,2  $\mu$ M de cada cebador; 1,5 mM de  $MgCl_2$ ; 1 U de Taq

ADN polimerasa. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 min seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, apareamiento a la temperatura descrita en la Tabla 1 durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s. Luego de los 30 ciclos se realizó un paso de extensión final a 72 °C durante 5 min.

El producto de amplificación del marcador Ppd-A1-LAL-F3 - Ppd-A1-LAL-R1 para *Ppd-A1* fue digerido con la enzima *HaeIII*. Para esta reacción se incubaron 10  $\mu$ l de producto de amplificación con 5 U de enzima *HaeIII* en un volumen final de 20  $\mu$ l en baño térmico a 37 °C, durante 2 h.

Los productos de PCR o digestión obtenidos se separaron por medio de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (acrilamida-bisacrilamida al 6 %) en buffer TBE 0,5X. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5  $\mu$ g/ml), se visualizaron bajo luz UV a 302 nm y se documentaron mediante fotografía digital.

### Desarrollo de marcadores moleculares para *Ppd-A1* y *Ppd-B1*

Se realizaron múltiples análisis bioinformáticos basados en secuencias de alelos de *Ppd-A1* y *Ppd-B1* publicadas en el trabajo de Beales *et al.* (2007). Los programas y bases de datos utilizados para dichos análisis fueron: CODDLE (Taylor, Kwong y Greene, 2003), GenBank (Benson, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell y Wheeler, 2005), Entrez (Maglott, Ostell, Pruitt y Tatusova, 2005), Clustal W (Thompson, Higgins y Gibson, 1994), Primer 3 Plus (Untergasser *et al.*, 2012) y Nebcutter (Vincze, Posfai y Roberts, 2003).

### Locus *Ppd-A1*

Para el desarrollo de un marcador molecular que permita diferenciar los dos alelos del locus *Ppd-A1* existentes en la población de BioINTA 2001/Baguette Premium 11, se realizó una búsqueda en GenBank, por medio de Entrez, de secuencias de trigo hexaploide para el gen *Ppd-A1* y se seleccionó una de ellas (DQ885756, cultivar Mercia) como representante del grupo.

Con el programa CODDLE (*Codons Optimized to Discover Deleterious Lesions*) se evaluó dicha secuencia y se determinó que el sexto intrón del gen *Ppd-A1* presentaba la mayor probabilidad de encontrar polimorfismos naturales. Posteriormente, se realizó un alineamiento de la zona de interés para las secuencias DQ885756 (gen *Ppd-A1* del

cultivar Mercia), DQ885763 (gen *Ppd-B1* del cultivar Mercia) y DQ885768 (gen *Ppd-D1* del cultivar Mercia) obtenidas de la base de datos de GenBank utilizando el programa Clustal W. Se detectaron mutaciones entre los genomas que podrían diferenciar al gen *Ppd-A1* de los genes *Ppd-B1* y *Ppd-D1*. Utilizando el programa Primer 3 Plus (Rozen y Skaletsky, 2000) se diseñó un par de cebadores genoma específicos denominados Ppd-A1-LAL-F3 y Ppd-A1-LAL-R1 que presentaron las siguientes características: (1) extremo 3' del cebador directo (Ppd-A1-LAL-F3) coincidió con la ubicación de uno de los sitios de especificidad genómica detectados con el alineamiento de los genes *Ppd-A1*, *Ppd-B1* y *Ppd-D1*; (2) la zona de hibridación del cebador Ppd-A1-LAL-F3 en el gen *Ppd-D1* presentó tres SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfismo de un solo nucleótido) con respecto a su contraparte para el gen *Ppd-A1* y; (3) la zona de hibridación del cebador Ppd-A1-LAL-R1 en el gen *Ppd-B1* presentó cuatro SNP con respecto a su contraparte para el gen *Ppd-A1*.

Tras realizar una reacción de PCR para los dos genotipos parentales de la población utilizando este par de cebadores, se obtuvo un único producto de amplificación de 548pb tanto para BioINTA 2001 como para Baguette Premium 11. La secuenciación de los productos de amplificación para BioINTA 2001 y Baguete Premium 11 y su posterior alineamiento con Clustal W junto con el ADNc del gen *Ppd-A1* para el cultivar Mercia (DQ885756) permitió detectar un total de siete SNP entre ambas variedades, de los cuales tres se encuentran dentro de regiones codificantes del gen *Ppd-A1*. Dado que una de las mutaciones detectadas (transversión C-G ubicada en la base 2538 del gen) coincidió con el sitio de restricción de la enzima *HaeIII*, detectado por Nebcutter, se usó esta enzima para digerir el producto de amplificación. La electroforesis de los productos de digestión reveló dos patrones de restricción diferenciales: BioINTA 2001 presentó un patrón de dos bandas (323 y 225pb), mientras que Baguette Premium 11 mostró un patrón de tres bandas (273, 225 y 50pb). De esta manera se desarrolló un marcador CAP (*Cut/Cleaved Amplified Polymorphism*) codominante y perfecto para el gen *Ppd-A1* que distingue los dos alelos en la población de BioINTA 2001/Baguette Premium 11.

### Locus *Ppd-B1*

Los cebadores de Blake *et al.* (2009) (Tabla 1) resultaron polimórficos para los padres de la población, generando un producto de amplificación de 1353pb en Baguette Premium 11, y ausencia

del mismo en BioINTA 2001, debido a que se trata de un marcador de tipo dominante. Para evitar o disminuir posibles errores durante la genotipificación de las líneas de la población, se convirtió este marcador en uno codominante. Por lo tanto, se desarrolló el cebador Ppd-B1-LAL-F1 (CCCA-ATATCTACTCCTCCGG), el cual combinado con Ppd2B\_SNP5R1 amplifica el alelo de BioINTA 2001 y no el de Baguette Premium 11. De esta manera, mediante dos PCR, una con la combinación de B6-RDR1 con Ppd2B\_SNP5R1 y otra con la combinación de Ppd-B1-LAL-F1 con Ppd2B\_SNP5R1, se pudo convalidar la constitución alélica para *Ppd-B1* para cada línea de la población.

Adicionalmente, se crearon y evaluaron los cebadores Ppd-B-LAL-F2 y Ppd-B-LAL-F3 (CCAGTGATGTCGTCGCACG y CCAGTGATGTCGTCGCA-CA, respectivamente) que, en combinación con Ppd2B\_SNP5R1, permitieron evidenciar el tipo de base en un SNP dentro del amplicón Ppd-B1-LAL-F1- Ppd2B\_SNP5R1 que fue detectado por el alineamiento de las secuencias de *Ppd-B1*: DQ885762.1 (cultivar Paragon), DQ885763.1 (cultivar Recital), DQ885761.1 (cultivar Mercia), DQ885764.1 (cultivar Renan), DQ885760.1 (cultivar Cheyenne), DQ885765.1 (cultivar Timstein) y DQ885757.1 (cultivar Chinese Spring).

### Ensayo en condiciones controladas

Se armaron germinadores para las 89 RIL y los dos parentales (seis plantas para cada genotipo). Tras un período de 24 h para inducir la germinación, todos los germinadores fueron colocados en una cámara fría a 4 °C durante un período de 6 semanas. Posteriormente se trasplantaron tres plantas por tratamiento y se determinaron los días a espigazón de cada planta.

El ensayo consistió en dos tratamientos: DC (8 h de luz diarias) y DL (20 h de luz diarias). Para lograr el tratamiento de DC, se realizó una estructura de *nylon* negro (cámara) con laterales y parte superior removibles. Durante todo el ensayo se cubrieron y descubrieron las plantas con la finalidad de mantener el fotoperíodo constante en 8 h de luz. Tras alcanzar la espigazón, cada una de las plantas del tratamiento de DC fue retirada de la cámara. El tratamiento de DL consistió en luz natural extendida con luz artificial mediante lámparas incandescentes de tungsteno, hasta alcanzar las 20 h de luz diarias.

Todas las plantas se distribuyeron aleatoriamente en ambos tratamientos (diseño completamente aleatorizado). Este ensayo fue realizado dos veces (ensayos R1 y R2, respectivamente) dentro de un

invernáculo refrigerado donde la temperatura se mantuvo en un rango de 18-24 °C.

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011). La RF se calculó como la diferencia de los promedios por tratamiento para cada entrada en los dos ensayos realizados. Sobre el set de datos obtenidos se realizaron análisis de normalidad (test Shapiro Wilk  $\alpha=0,05$ ) y análisis de correlación de Pearson.

El agrupamiento de haplotipos de *Ppd-1* según su respuesta al fotoperíodo se obtuvo por un análisis de conglomerados de esta variable, usando como criterio de clasificación la constitución molecular para los genes *Ppd-1*.

Las comparaciones presentadas se hicieron mediante test DGC con  $\alpha=0,05$  (Di Rienzo *et al.*, 2011) y las gráficas fueron realizadas con InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Se aplicó un MLM para determinar la significancia de los *loci Ppd-1* sobre la respuesta al fotoperíodo, tomado a los tres *loci Ppd-1* y sus interacciones como factores fijos y al ambiente como un factor aleatorio.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización molecular de BioINTA 2001 y Baguette Premium 11

Mediante los marcadores de Wilhelm *et al.* (2009) se obtuvieron productos de 452pb para ambos padres de la población (Tabla 1). Esto indica que ninguna de las variantes alélicas insensibles (GS-100, delección de 1027pb y GS-105 delección de 1117pb en la región del promotor) reportadas previamente por Wilhelm *et al.* (2009) para el gen *Ppd-A1* están presentes en los parentales de la población. Este resultado concuerda con lo publicado previamente por Bentley *et al.* (2011) y Gomez *et al.* (2014), quienes reportaron la ausencia de los alelos GS-100 y GS-105 en trigo pan.

Ninguno de los dos parentales generaron producto con el marcador de Díaz *et al.* (2012) y los cebadores Ppd-B-LAL-F3-PPD2B\_SNP5\_R1, pero sí lo hicieron con los cebadores Ppd-B-LAL-F2 - PPD2B\_SNP5\_R1 (Tabla 1). Este resultado indicaría que: 1) ninguno de los genotipos parentales presenta el alelo de insensibilidad de Sonora64 para *Ppd-B1* (*Ppd-B1<sup>a</sup>*) reportado por Díaz *et al.* (2012); y 2) el nucleótido presente en el segundo SNP detectado mediante los alineamientos de

secuencias de *Ppd-B1* es guanina en los dos genotipos parentales de la población. Este segundo punto, junto con el hecho de que la combinación de los pares de marcadores B6-RDR1F - Ppd2B\_SNP5R1 y Ppd-B1- LAL-F1 - Ppd2B\_SNP5R1 resultó polimórfica para ambos padres (Tabla 1), indicarían que Baguette Premium 11 presenta una combinación de SNP dentro de *Ppd-B1* de tipo C-G, mientras que BioINTA 2001 presenta una combinación G-G (Tabla 1). Al respecto, el patrón de SNP C-G dentro de *Ppd-B1* ha sido previamente reportado en los cultivares Cheyenne, Mercia, Renam y Cappelle-Desprez (Beales *et al.*, 2007). Por otro lado, el patrón de SNP G-G dentro de *Ppd-B1*, observado en este estudio en BioINTA 2001, es idéntico al observado en el cultivar Recital (Beales *et al.*, 2007).

Mediante el set de marcadores de Beales *et al.* (2007) para el *locus Ppd-D1* se observó la presencia del alelo insensible *Ppd-D1a* en Baguette Premium 11 y el alelo sensible *Ppd-D1b* en BioINTA 2001, en concordancia con lo descripto previamente por Vanzetti *et al.* (2013).

### Caracterización molecular de las RIL

Como era de esperarse en una población de RIL, las frecuencias de distribución observadas para los dos tipos de alelos existentes, para cada uno de los genes *Ppd-1*, fueron cercanas al 50 % (Tabla 2).

Por otro lado, para un tamaño de población de 89 líneas se esperaría una frecuencia de 11,13 líneas para cada uno de los ocho haplotipos posibles para los tres genes *Ppd-1*. Uno de estos haplotipos (*Ppd-A1<sup>B11</sup>*, *Ppd-B1<sup>B01</sup>*, *Ppd-D1<sup>B01</sup>*) presentó una cantidad de líneas mucho menor a la esperada (4 líneas). Los haplotipos restantes presentaron frecuencias similares a las esperadas, con un rango de variación de 8 a 15 líneas por cada haplotipo (Tabla 2). El test de bondad de ajuste de los datos arrojó un valor de  $\chi^2 = 7,988$  ( $p=0,3336$ ), lo que indica que la distribución observada coincide con la esperada.

### Evaluación de la RF en la población de RIL

Para ambos ensayos (R1 y R2) las distribuciones de frecuencias de los valores de días a espigazón, en condiciones de satisfacción fotoperiódica (día largo, DL) fueron normales según test de Shapiro Wilk: ( $DL^{R1}W^*=0,96$ ,  $p=0,0824$ ;  $DL^{R2}W^*=0,97$ ,  $p=0,2516$ ); sin embargo, los sets de datos provenientes de condiciones de fotoperíodo no satisfechas (día corto, DC) no presentaron

**Tabla 1.** Marcadores moleculares para los loci *Ppd-A1*, *Ppd-B1* y *Ppd-D1* utilizados en este estudio. Se resaltan en gris los marcadores usados en la población de RIL. En la parte derecha se detallan los productos obtenidos para BioINTA 2001 y Baguette Premium 11.

Locus	Tipo	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Ta (°C)	Referencias	Producto BioINTA 2001	Producto Baguette Premium 11
<i>Ppd-A1</i>	Marcador alelo específico	Ag5deL_F1	gfatgcgattgcctggaagt	Sensible: 452 Insensible/GS-100:	55	Wilhelm <i>et al.</i> (2009)	452pb	452pb
		Ag5deL_F2	cgtcaccatgcactctgt	380				
		Ag5deL_R2	ctggctccaagaggaacac	Insensible/GS-105: 290				
	Marcador CAP	Ppd-A1-LAL-F3	tcacaagtcggaaggt	Sin digerir: 548 Digestión Hae III:	T <sub>d</sub> 58-53	Este trabajo	Sin digerir: 548pb Digestión Hae III: 273pb + 225pb + 323pb + 225pb	Sin digerir: 548pb Digestión Hae III: 273pb + 225pb + 50pb
		Ppd-A1-LAL-R1	tccttctgctgttcacag	B01: 323 / 225 B11:273 / 225 / 50				
	Marcador alelo específico	Ppd-B-LAL-F2	ccagtgatgctgcgcacg	175	T <sub>d</sub> 60-54	Este trabajo	175pb	175pb
<i>Ppd-B1</i>	Marcador alelo específico	Ppd-B-LAL-F3	ccagtgatgctgcgcaca	175	T <sub>d</sub> 60-54	Este trabajo	Sin producto	Sin producto
		PPD2B_SNP5_R1	tcgaaatgatgatacaccatg					
	Marcador alelo específico	Ppd-B-LAL-F1	cccaatatctactctccgg	1353	T <sub>d</sub> 60-54	Este trabajo	1353pb	Sin producto
		PPD2B_SNP5_R1	tcgaaatgatgatacaccatg					
	Marcador alelo específico	B6-RDRF1	cccaatatctactctccgc	1353	T <sub>d</sub> 60-54	Blake <i>et al.</i> (2009)	Sin producto	1353pb
		PPD2B_SNP5_R1	tcgaaatgatgatacaccatg					
Marcador alelo específico	PpdB1_F31	ccaggcgagtgatttacaca	Insensible/ sonora64 : 223	T <sub>d</sub> 65-61	Díaz <i>et al.</i> (2012)	Sin producto	Sin producto	
	PpdB1_R36	gggcacgftaacacacctt						
<i>Ppd-D1</i>	Marcador alelo específico	Ppd-D1_F	acgcctcccactiacag	Sensible/Ppd-D1 <sup>B01</sup> : 414	55	Beales <i>et al.</i> (2007)	414pb	Sin producto
		Ppd-D1_R1	gttggtcaaacagagagc					
	Marcador alelo específico	Ppd-D1_F	acgcctcccactiacag	Insensible/Ppd-B1 <sup>B11</sup> : 288	55	Beales <i>et al.</i> (2007)	Sin producto	288pb
		Ppd-D1_R2	cactgggtgtagctgagatt					

pb; pares de bases, Ta: temperatura de apareamiento, T<sub>d</sub>: touchdown

**Tabla 2.** Número de líneas y porcentajes (%) para los diferentes alelos (parte superior) y para cada haplotipo (parte inferior) de los genes *Ppd-1* obtenidas en la población BioINTA 2001/Baguette Premium 11. Los alelos provenientes de Baguette Premium 11 se representan con el supraíndice B11 y los alelos provenientes de BioINTA 2001 se representan con el supraíndice B01.

	<i>Ppd-A1</i>	<i>Ppd-B1</i>	<i>Ppd-D1</i>	N° de líneas	%
<b>Frecuencia de alelos de <i>Ppd-1</i></b>	<i>Ppd-A1</i> <sup>B11</sup>			37	41,6
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B01</sup>			52	58,4
		<i>Ppd-B1</i> <sup>B11</sup>		50	56,2
		<i>Ppd-B1</i> <sup>B01</sup>		39	43,8
			<i>Ppd-D1</i> <sup>B11</sup>	50	56,2
			<i>Ppd-D1</i> <sup>B01</sup>	39	43,8
<b>Frecuencia de haplotipos de <i>Ppd-1</i></b>	<i>Ppd-A1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B11</sup>	14	15,7
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B01</sup>	11	12,4
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B11</sup>	8	8,9
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B01</sup>	4	4,5
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B11</sup>	13	14,6
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B11</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B01</sup>	12	13,5
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B11</sup>	15	16,9
	<i>Ppd-A1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-B1</i> <sup>B01</sup>	<i>Ppd-D1</i> <sup>B01</sup>	12	13,5

distribuciones normales ( $DC^{R1} W^*=0,92$ ,  $p<0,0001$ ;  $DC^{R2} W^*=0,90$ ,  $p<0,0001$ ). De manera análoga, la variable diferencia en días entre ambas condiciones de fotoperíodo (respuesta al fotoperíodo, RF), no presentó distribución normal para ninguno de los dos ensayos ( $RF^{R1} W^*=0,92$ ,  $p<0,0001$ ;  $RF^{R2} W^*=0,89$ ,  $p<0,0001$ ).

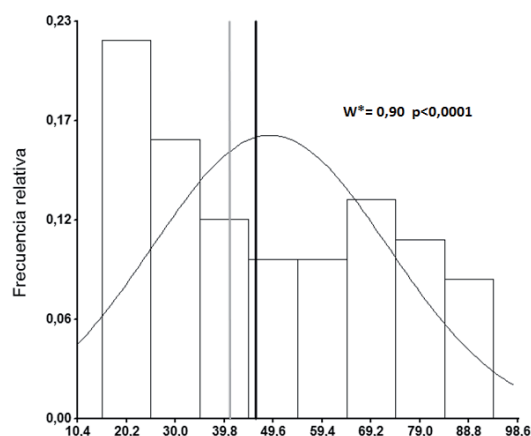
Dentro de cada ensayo se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson altos y significativos ( $r=0,99$ ;  $p<0,0001$ ) entre los días a espigazón, en condiciones de DC y la RF. En contraste, no se observaron valores de correlación altos entre días a espigazón en condiciones de DL con las variables días a espigazón en DC y RF (Tabla 3).

**Tabla 3.** Coeficiente de correlación de Pearson y valores p (resaltados en cursiva) asociados a variables para los dos ambientes evaluados. El supraíndice indica el ensayo.

	<i>DC</i> <sup>R1</sup>	<i>DL</i> <sup>R1</sup>	<i>RF</i> <sup>R1</sup>	<i>DC</i> <sup>R2</sup>	<i>DL</i> <sup>R2</sup>	<i>RF</i> <sup>R2</sup>
<i>DC</i> <sup>R1</sup>	1,00	0,04	<0,0001	<0,0001	0,0007	<0,0001
<i>DL</i> <sup>R1</sup>	0,20	1,00	0,73	0,03	<0,0001	0,16
<i>RF</i> <sup>R1</sup>	0,99	0,04	1,00	<0,0001	0,02	<0,0001
<i>DC</i> <sup>R2</sup>	0,66	0,23	0,63	1,00	<0,0001	<0,0001
<i>DL</i> <sup>R2</sup>	0,36	0,60	0,26	0,44	1,00	0,002
<i>RF</i> <sup>R2</sup>	0,64	0,15	0,63	0,99	0,32	1,00

Los coeficientes de correlación entre las mismas variables para ambos ensayos fueron en todos los casos altamente significativos ( $p<0,0001$ ) con valores que fluctuaron entre 0,60 y 0,66 (Tabla 3).

La RF promedio no fue normal y presentó una distribución hacia la derecha (Figura 2). Ambos parentales ocuparon una posición central en la misma (Figura 2). Este resultado indicaría la existencia de alelos de sensibilidad o insensibilidad al



**Figura 2.** Distribución de la respuesta fotoperiódica promedio de la población BioINTA 2001/Baguette Premium 11. Se muestra el ajuste normal y test de Shapiro Wilk ( $\alpha=0,05$ ). Las líneas verticales indican la posición ocupada por los genotipos parentales Baguette Premium 11 (gris) y BioINTA 2001 (negro).

fotoperíodo en ambos padres de la población.

Al contemplar el promedio de los datos de ambos ensayos para cada línea, el rango de variación en días a espigazón, en condiciones de DC, fue de 84,7 días, con un valor máximo de 142,0 días y un valor mínimo de 57,3 días, para la línea más tardía y la más precoz, respectivamente. En condiciones de DL, los valores máximo y mínimo de días a espigazón decayeron a 59,0 y 41,2 días, respectivamente, generando un rango de variación de 17,8 días. Por otro lado, la RF promedio varió en 78,3 días, presentando un máximo de 93,7 días y un mínimo de 15,3 días.

Un análisis de conglomerados de la RF usando

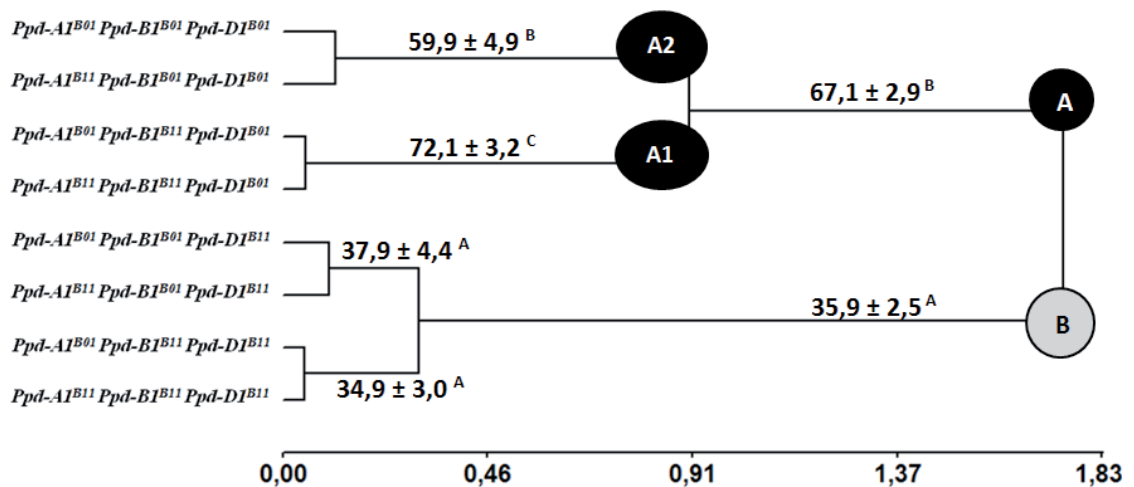


como criterio de clasificación la constitución molecular para los genes *Ppd-1*, muestra dos grupos con medias significativamente diferentes entre sí ( $67,1 \pm 2,9$  y  $35,9 \pm 2,5$ ), definidos según el alelo presente en el locus *Ppd-D1* (Figura 3): (A) líneas portadoras del alelo de BioINTA 2001 (*Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>; Ppd-B1<sup>B11</sup>/Ppd-B1<sup>B01</sup>; Ppd-D1<sup>B01</sup>*) y (B) líneas portadoras del alelo de Baguette Premium 11 (*Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>; Ppd-B1<sup>B11</sup>/Ppd-B1<sup>B01</sup>; Ppd-D1<sup>B11</sup>*). Esto indica que la constitución alélica del locus *Ppd-D1* es la que presenta el mayor efecto en la RF de la población en estudio.

Adicionalmente, dentro del grupo A se observan dos subagrupamientos según la constitución alé-

**Tabla 4.** Valores p correspondientes a los tres loci *Ppd-1* y sus interacciones. Se resaltan en gris los valores significativos.

Fuentes de variación	Valor p
<i>Ppd-A1</i>	0,9441
<i>Ppd-B1</i>	0,1912
<i>Ppd-D1</i>	<0,0001
<i>Ppd-A1*Ppd-B1</i>	0,5854
<i>Ppd-D1* Ppd-B1</i>	0,0323
<i>Ppd-A1* Ppd-D1</i>	0,3364
<i>Ppd-A1* Ppd-B1* Ppd-A1</i>	0,7834
R <sup>2</sup>	0,44
AIC	1556,82



**Figura 3.** Análisis de conglomerados de la RF promedio usando como criterio de clasificación la constitución molecular (haplotipo) para los genes *Ppd-1*. Se detallan las medias y los errores estándares para cada grupo. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ( $\alpha = 0,05$ ).

lica del locus *Ppd-B1* (grupos A1 y A2, Figura 3).

Tanto el locus *Ppd-D1* como la interacción *Ppd-D1\*Ppd-B1* mostraron efecto significativo sobre la RF de la población BioINTA 2001/Baguette Premium 11 (Tabla 4).

Estos resultados indicarían la existencia de tres grupos de RF según el haplotipo de *Ppd-1*: (1) líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>; Ppd-B1<sup>B11</sup>; Ppd-D1<sup>B01</sup>* (grupo A1, Figura 3); (2) líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>; Ppd-B1<sup>B01</sup>; Ppd-D1<sup>B01</sup>* (grupo A2, Figura 3); y (3) líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>; Ppd-B1<sup>B11</sup>/Ppd-B1<sup>B01</sup>; Ppd-D1<sup>B11</sup>*, (grupo B, Figura 3). Esto sugiere que los alelos *Ppd-D1<sup>B01</sup>* y *Ppd-B1<sup>B11</sup>* aportan sensibilidad al fotoperíodo y que el efecto de *Ppd-D1<sup>B01</sup>* es mayor que el de *Ppd-B1<sup>B11</sup>*.

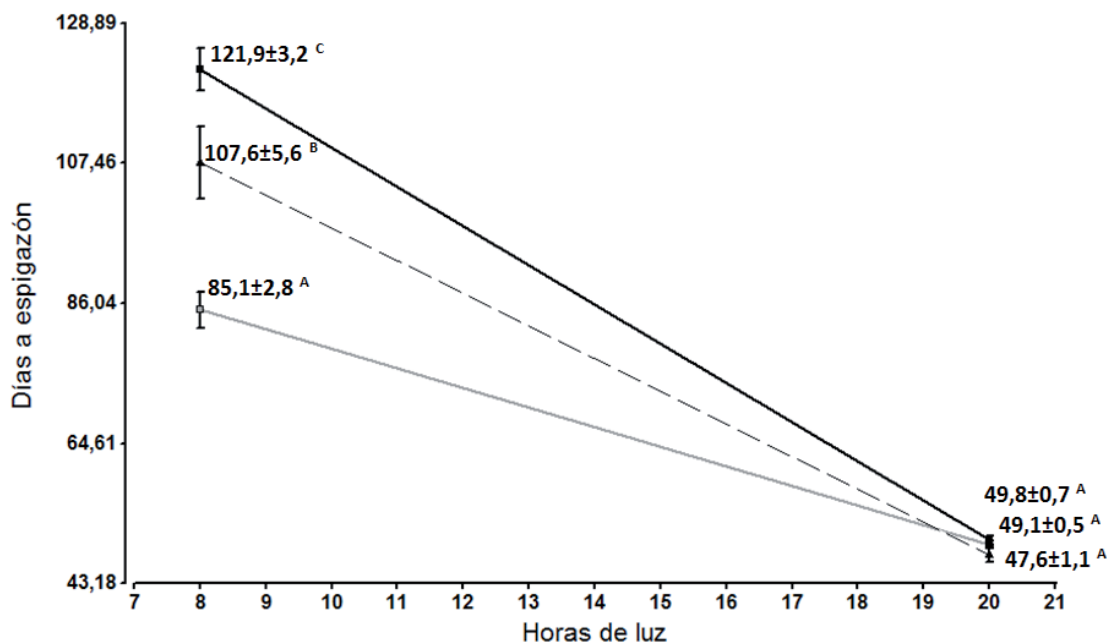
Para los tres grupos (A1, A2 y B, Figura 3) existió sensibilidad al fotoperíodo ya que en todos los casos los días a espigazón se acortaron al incrementar el

fotoperíodo de 8 a 20 h luz (Figura 4).

Los valores de sensibilidad fueron: 6,0 días/h, 4,9 días/h y 3,1 días/h para los grupos A1, A2 y B, respectivamente.

En el presente estudio se detectaron nuevas mutaciones dentro de las regiones codificantes del gen *Ppd-A1*. Dado que este gen no mostró efecto significativo sobre la respuesta fotoperiódica (Tabla 4) se puede inferir que ninguna de las mutaciones detectadas entre los cultivares Baguette Premium 11 y BioINTA 2001 para el gen *Ppd-A1* es funcional.

Se ha observado que los alelos del locus *Ppd-A1* detectados en el presente trabajo (*Ppd-A1<sup>B11</sup>* y *Ppd-A1<sup>B01</sup>*) poseen una distribución cercana al 50 % (58 % *Ppd-A1<sup>B01</sup>* y 42 % *Ppd-A1<sup>B11</sup>*) en germoplasma argentino (Lombardo, Nisi, Fissore y Helguera, 2013). Por tal motivo, el marcador CAP



**Figura 4.** Respuesta al fotoperíodo de la población BioINTA 2001/Baguette Premium 11. En línea negra se representa el grupo A1 (líneas con haplotipos *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B11</sup>*; *Ppd-D1<sup>B01</sup>*), en línea punteada el grupo A2 (líneas con haplotipos *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B01</sup>*; *Ppd-D1<sup>B01</sup>*) y en línea gris el grupo B (líneas con haplotipos *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B11</sup>/Ppd-B1<sup>B01</sup>*; *Ppd-D1<sup>B11</sup>*). Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí ( $\alpha = 0,05$ ).

para *Ppd-A1* desarrollado en este estudio puede ser usado como una herramienta para evaluar el efecto de *Ppd-A1* sobre componentes de adaptación o rendimiento en cruces de trigo hexaploide (García *et al.*, 2011), aunque el mismo no detecte una mutación funcional en dicho gen.

Los resultados obtenidos mostraron que las líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B11</sup>*; *Ppd-D1<sup>B01</sup>* (subgrupo A1, Figura 3) se diferenciaron significativamente de las líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B01</sup>*; *Ppd-D1<sup>B01</sup>* (subgrupo A2, Figura 3) en su RF (72,1 vs. 59,9 días, respectivamente). Debido a que el SNP utilizado para señalar el gen *Ppd-B1* en este estudio no es una mutación funcional para la RF vinculada a este gen (Beales *et al.*, 2007), la respuesta diferente reportada entre estas líneas podría deberse: (1) a la presencia de mutaciones funcionales no detectadas dentro de la secuencia del gen o (2) a una diferencia en el número de copias funcionales del gen *Ppd-B1* entre los cultivares BioINTA 2001 y Baguette Premium 11. En sustento con la segunda hipótesis, la variación en la respuesta fotoperiódica debida al gen *Ppd-B1* caracterizada hasta la fecha, solo fue explicada por la existencia de variación en el número de copias de este gen y no por mutaciones funcionales dentro del mismo (Díaz *et al.*, 2012).

Según el estudio realizado por Díaz *et al.* (2012),

los cultivares Cheyenne, Mercia, Renam y Cappelle-Desprez, presentan una copia del gen *Ppd-B1* mientras que el cultivar Recital presenta dos copias funcionales del gen *Ppd-B1*. Teniendo en cuenta que en el presente estudio se determinó que Baguette Premium 11 presenta una combinación de SNP dentro de *Ppd-B1* como la de los cultivares Cheyenne, Mercia, Renam y Cappelle-Desprez y BioINTA 2001 como la del cultivar Recital, junto con la observación que las líneas del subgrupo A2 (portadores del alelo *Ppd-B1<sup>B01</sup>*) fueron menos sensibles que las del subgrupo A1 (Figura 3), se podría sugerir que, de ser la segunda hipótesis correcta (existencia de diferente número de copias para *Ppd-B1*), Baguette Premium 11 presentaría una copia funcional del gen *Ppd-B1* como la reportada en los cultivares Cheyenne, Mercia, Renam y Cappelle-Desprez y BioINTA 2001 dos copias funcionales del gen *Ppd-B1* como el cultivar Recital. Futuros estudios permitirán determinar la naturaleza de la RF mediada por el locus *Ppd-B1* detectada en el presente trabajo.

La comparación de los rangos de días promedios para los tratamientos de 8 h de luz con los de 20 h de luz (84,7 vs. 17,8 días) indica que el aporte realizado por la precocidad en la fecha de espigazón (efecto del gen o genes *Eps*) es mucho menor que el de los genes *Ppd-1*. Esto es

confirmado por la alta correlación observada entre la fecha de espigazón en condiciones de DC y la RF (Tabla 3).

Los alelos *Ppd-D1*<sup>B01</sup> y *Ppd-B1*<sup>B11</sup> afectaron significativamente la RF en esta población (Figura 3; Tabla 4). Este resultado explicaría la distribución transgresiva documentada para la RF (Figura 2), dado que los alelos de reducción de sensibilidad provienen de progenitores diferentes.

En este estudio se detectaron tres grupos de RF según el haplotipo de *Ppd-1* (grupos A1, A2 y B, Figura 3). Los tres grupos mostraron sensibilidad al fotoperíodo (Figura 4). Este resultado indicaría que el alelo de "insensibilidad al fotoperíodo" *Ppd-D1a*, reportado previamente por Beales *et al.* (2007) presenta RF. A favor de esta observación se puede citar que Gomez *et al.* (2014) han reportado sensibilidad al fotoperíodo para cultivares de hábito de crecimiento primaveral portadores del alelo *Ppd-D1a*. Sin embargo, el hecho de que en ese trabajo se analizó un set reducido de variedades portadoras de *Ppd-D1a* (13 en total) dificulta concluir si el efecto observado proviene del *locus Ppd-D1* o de otros genes vinculados al fotoperíodo distribuidos de manera no balanceada en ese set de cultivares. Los resultados en el presente trabajo fueron obtenidos sobre un total de 50 RIL portadoras del alelo *Ppd-D1a* (*Ppd-D1*<sup>B11</sup>). El hecho de que en este tipo de poblaciones solo pueden segregarse dos formas alélicas para cada gen equitativamente distribuidas, sugiere que la respuesta observada en líneas *Ppd-A1*<sup>B11</sup>/*Ppd-A1*<sup>B01</sup>; *Ppd-B1*<sup>B11</sup>/*Ppd-B1*<sup>B01</sup>; *Ppd-D1*<sup>B11</sup> (grupo B, Figura 3) se debe a *Ppd-D1a*.

A diferencia de otros trabajos (Beales *et al.*, 2007; Gomez *et al.*, 2014), en este estudio se mantuvieron las condiciones de DC y DL (8 y 20 h de luz, respectivamente) de manera constante hasta la fecha de espigazón. Esto permitió maximizar los efectos de los genes vinculados al fotoperíodo. Adicionalmente, dado que todas las líneas pudieron espigar en condiciones de DC, se puede postular que la inducción de los *loci Ppd-1* por incremento en la exposición de horas de luz no es un proceso esencial para que se produzca la floración en trigo.

Desde el punto de vista del mejoramiento, Pugsley (1971) planteó que la insensibilidad al fotoperíodo es esencial para la adaptación del trigo al ambiente australiano aportado fundamentalmente por la presencia del alelo *Ppd-D1a* incorporado por material del CIMMYT a principio de la década de 1970. Por otro lado, a finales de esa década se difundieron materiales como Kite y Sunlin que se comportan como sensibles al fotoperíodo

(Eagles, Cane y Vallance, 2009) acortando el ciclo mediante la presencia de alelos primaverales para el gen *Vrn-1*. Este resultado sugiere la existencia de distintas combinaciones de alelos de respuesta a fotoperíodo y vernalización (combinado eventualmente con precocidad intrínseca) como estrategia para lograr una sintonía fina en la adaptación del trigo a un ambiente particular. Por ejemplo, en Argentina, la combinación de alelos de respuesta a fotoperíodo y vernalización más frecuente es insensible/primaveral (62 %) (Gomez *et al.*, 2014), sin embargo, esta se constituye por la presencia de *Ppd-D1a* (13/16 variedades evaluadas) o *Ppd-B1a* (3/16), ya que ninguna de las variedades primaverales evaluadas por Gomez *et al.* (2014) mostró la combinación *Ppd-B1a/Ppd-D1a* de alelos de insensibilidad al fotoperíodo. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran la existencia de un gradiente en la respuesta a fotoperíodo generado por la combinación de alelos de *Ppd-1* segregantes en la población biparental (Figuras 3 y 4). La disponibilidad de marcadores moleculares alelo-específicos utilizados en este estudio facilita enormemente el uso de esta información en distintas instancias del mejoramiento genético, como puede ser la caracterización de parentales de bloques de cruzamientos y selección de combinaciones homocigotas de interés en generaciones avanzadas de RIL.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrollaron marcadores moleculares para los *loci Ppd-A1* y *Ppd-B1* que pueden ser usados para la identificación de alelos en poblaciones segregantes.

Se identificaron nuevas mutaciones dentro de regiones codificantes del gen *Ppd-A1*. Sin embargo, ninguno de los alelos encontrados para *Ppd-A1* mostró un efecto significativo en la RF, lo que sugiere que las mutaciones detectadas no alteran la funcionalidad del gen.

La constitución alélica del *locus Ppd-D1* fue la que presentó mayor efecto en la RF de la población. Mediante este *locus* los materiales evaluados se clasificaron en: (A) líneas *Ppd-A1*<sup>B11</sup>/*Ppd-A1*<sup>B01</sup>; *Ppd-B1*<sup>B11</sup>/*Ppd-B1*<sup>B01</sup>; *Ppd-D1*<sup>B01</sup> con RF alta (67 días) y (B) líneas *Ppd-A1*<sup>B11</sup>/*Ppd-A1*<sup>B01</sup>; *Ppd-B1*<sup>B11</sup>/*Ppd-B1*<sup>B01</sup>; *Ppd-D1*<sup>B11</sup> con RF baja (36 días).

La constitución alélica del *locus Ppd-B1* también afectó la RF de la población, aunque con un efecto menor que la del *locus Ppd-D1*. El alelo con mayor sensibilidad para este *locus* fue *Ppd-B1*<sup>B11</sup> (alelo proveniente del parental con fenotipo insensible).

Mediante la combinación de los *loci* *Ppd-D1* y *Ppd-B1* se obtuvieron tres categorías de RF: (A1) líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B11</sup>*; *Ppd-D1<sup>B01</sup>* con mayor RF (72 días); (A2) líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B01</sup>*; *Ppd-D1<sup>B01</sup>* con una RF intermedia (60 días); y (B) líneas *Ppd-A1<sup>B11</sup>/Ppd-A1<sup>B01</sup>*; *Ppd-B1<sup>B11</sup>/Ppd-B1<sup>B01</sup>*; *Ppd-D1<sup>B11</sup>* con menor RF (36 días). Por lo tanto, los *loci* *Ppd-1* afectaron la RF según: *Ppd-D1* > *Ppd-B1* > *Ppd-A1*. La naturaleza de la RF mediada por el *locus* *Ppd-B1* detectada en el presente trabajo es inédita y será investigada en futuros estudios.

La estimulación en condiciones de DL no es un proceso esencial para que se produzca la espigazón en trigo ya que todas las líneas cultivadas en condiciones de DC pudieron espigar.

## BIBLIOGRAFÍA

- Araus, J. L., Slafer, G. A., Royo, C. y Serret, M. D. (2008). Breeding for Yield Potential and Stress Adaptation in Cereals. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27, 377-412.
- Beales, J., Turner, A., Griffiths, S., Snape, J. W. y Laurie, D. A. (2007). A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 115, 721-733.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Wheeler, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33 (Database Issue), D34–D38. <http://doi.org/10.1093/nar/gki063>
- Bentley, A. R., Turner, A. S., Gosman, N., Leigh, F. J., Maccaferri, M., Dreisigacker, S., Greenland, A. y Laurie, D. A. (2011). Frequency of photoperiod-insensitive *Ppd-A1a* alleles in tetraploid; hexaploid and synthetic hexaploid wheat germplasm. *Plant breeding*, 130, 10-15.
- Blake, N. K.; Lanning, S. P., Martin, J. M., Doyle, M., Sherman, J. D., Naruoka, Y. y Talbert, L. E. (2009). Effect of variation for major growth habit genes on maturity and yield in five spring wheat populations. *Crop Science*, 49(4), 1211-1220.
- Brim, C. A. (1966). A modified pedigree method of selection in soybean. *Crop science*, 6, 220.
- Cane, K., Eagles, H. A., Laurie, D. A., Trevaskis, B., Vallance, N., Eastwood, R. F., Gororo, N. N., Kuchel, H. y Martin, P. J. (2013). *Ppd-B1* and *Ppd-D1* and their effects in southern Australian wheat. *Crop and Pasture Science*, 64, 100.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, Y. C. (2011). InfoStat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. URL <http://www.infostat.com.ar>, 8, 195-199.
- Díaz, A., Zikhali, M., Turner, A. S., Isaac, P. y Laurie, D. A. (2012). Copy number variation affecting the *Photoperiod-B1* and *Vernalization-A1* genes is associated with altered flowering time in wheat (*Triticum aestivum*). *PLoS ONE*, 7(3), e33234.
- Eagles, H. A., Cane, K. y Vallance, N. (2009). The flow of alleles of important photoperiod and vernalisation genes through Australian wheat. *Crop and Pasture Science*, 60, 646-657.
- Eagles, H. A., Cane, K., Trevaskis, B., Vallance, N., Eastwood, R. F., Gororo, N. N., Kuchel, H. y Martin, P. J. (2014). *Ppd1*, *Vrn1*, *ALMT1* and *Rht* genes and their effects on grain yield in lower rainfall environments in southern Australia. *Crop and Pasture Science*, 65, 159-170.
- Fosket, D. E. (1994). *Plant growth & development; a molecular approach* (pp. 580). San Diego: Academic Press.
- García, G., Serrago, R., Appendino, M. L., Lombardo, L., Vanzetti, L., Helguera, M. y Miralles, D. (2011). Variability of duration of pre-anthesis phases as a strategy for increasing wheat grain yield. *Field Crop Research*, 124, 408-416.
- Gomez, D., Vanzetti, L., Helguera, M., Lombardo, L., Frascchina, J. y Miralles, D. J. (2014). Effect of *Vrn-1*; *Ppd-1* genes and earliness per se on heading time in Argentinean bread wheat cultivars. *Field Crops Research*, 158, 73-81.
- Hunt, L. A. (1979). Photoperiodic responses of winter wheats from different climatic regions. *Journal of Plant Breeding*, 82, 70-80.
- Keim, D. L., Welsh, J. R., y McConnell, R. L. (1973). Inheritance of photoperiodic heading response in winter and spring cultivars of bread wheat. *Canadian Journal of Plant Science*, 53(2), 247-250.
- Kosner, J. y Zurkova, D. (1996). Photoperiodic response and its relation to earliness in wheat. *Euphytica*, 89, 59-64.
- Li, C., Distelfeld, A., Comis, A. y Dubcovsky, J. (2011). Wheat flowering repressor *VRN2* and promoter *CO2* compete for interactions with *NUCLEAR FACTOR-Y* complexes. *Plant Journal*, 67, 763-773.
- Lombardo, L. A., Nisi, M. M., Fissore, G. D. y Helguera, M. (2013). Caracterización fenotípica y molecular de alelos de *Ppd-A1* en trigo pan. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 24(1), 152.
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K. D., y Tatusova, T. (2005). Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Research*, 33 (Database Issue), D54–D58. <http://doi.org/10.1093/nar/gki031>
- Martinic, Z. F. (1975). Life cycle of common wheat varieties

- in natural environments as related to their response to shortened photoperiod. *CIMMYT Knowledge Center: John Woolston Library*, 76-083429.
- McIntosh, R. A., Yamazaki, Y., Dubcovsky, J., Rogers, J., Morris, C., Appels, R. y Xia, X. C. (2013). Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 12<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium. Yokohama, Japón, 31 pp.
- Pugsley, A. T. (1971). A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 22, 21-31.
- Rozen, S. y Skaletsky, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, en Krawetz, S. y Misener, S. (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (pp. 365-386). New Jersey: Humana Press.
- Seki, M., Chono, M., Matsunaka, H., Fujita, M., Oda, S., Kubo, K., Kiribuchi-Otobe, C., Kojima, H., Nishida, H. y Kato, K. (2011). Distribution of photoperiod-insensitive alleles *Ppd-B1a* and *Ppd-D1a* and their effect on heading time in Japanese wheat cultivars. *Breeding Science*, 61(4), 405-412.
- Shindo, C., Tsujimoto, H., y Sasakuma, T. (2003). Segregation analysis of heading traits in hexaploid wheat utilizing recombinant inbred lines. *Heredity*, 90, 56-63.
- Syme, J. R. (1968). Ear emergence of Australian; Mexican and European wheats in relation to time of sowing and their response to vernalization and daylength. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 8(34), 578-581.
- Taylor, N., Kwong, S. y Greene, E. A. (2003). CODDLE. <http://blocks.fhcrc.org/proweb/coddle/>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting; position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Turner, A., Beales, J., Faure, S., Dunford, R. P. y Laurie, D. A. (2005). The pseudo-response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley. *Science*, 310, 1031-1034.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., y Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <http://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Vanzetti, L., Yerkovich, N., Chialvo, E., Lombardo, L., Vaschetto, L. y Helguera, M. (2013). Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 391-399.
- Vincze, T., Posfai, J. y Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691.
- Weining, S. y Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphism in cereals based on polymerase chain reaction. *Theoretical and Applied Genetics* 82, 209-216.
- Wilhelm, E. P., Turner, A. S. y Laurie, D. A. (2009). Photoperiod insensitive *Ppd-A1a* mutations in tetraploid wheat (*Triticum durum* Desf.). *Theoretical and Applied Genetics*, 118, 285-294.
- Worland, T. y Snape, J. W. (2001). Genetic basis of worldwide wheat varietal improvement, en Bonjean, A. P. y Angus, W. J. (eds.). *The world wheat book: a history of wheat breeding* (pp. 61-67). Paris: Lavoisier Publishing.
- Worland, A. J., Appendino, M.L. y Sayers, E. J. (1994). The distribution, in European winter wheats, of genes that influence ecoclimatic adaptability whilst determining photoperiodic insensitivity and plant height. *Euphytica*, 80, 219-228.
- Yang, F. P., Zhang, X. K., Xia, X. C., Laurie, D. A., Yang, W. X. y He, Z. H. (2009). Distribution of the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* allele in Chinese wheat cultivars. *Euphytica* 165(3), 445-452.