

CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACIÓN CARILLANCA  
TEMUCO - REGIÓN DE LA ARAUCANÍA

**INFORME**

**FINAL**

**CODIGO FIA-PI-C-2005-1-A-064**

**“Mejoramiento de la competitividad  
y sustentabilidad del cultivo del  
trigo en el sur de Chile:  
Aplicaciones biotecnológicas para  
generar trigos con alto contenido  
proteico del grano y tolerantes al  
aluminio fitotóxico”**

**INIA-CRI Carillanca**

Agosto, 2010

TEMUCO-CHILE



GOBIERNO DE

**CHILE**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS

CHILE  
POTENCIA ALIMENTARIA Y FORESTAL

FUNDACION PARA LA INNOVACION  
AGRARIA

*Nobitudo*



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACIÓN PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

OFICINA DE PARTES - FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	26. AGO. 2010
Hora	9:50
N° Ingreso	14672

INFORME FINAL  
DE AVANCE  
TECNICO Y DE DIFUSION

FIA-PI-C-2005-1-A-064

**‘Mejoramiento de la competitividad  
y sustentabilidad del cultivo del  
trigo en el sur de Chile:  
Aplicaciones biotecnológicas para  
generar trigos con alto contenido  
proteico del grano y tolerantes al  
aluminio fitotóxico’**

INIA-CRI Carillanca

Agosto, 2010

TEMUCO-CHILE



## ***I. ANTECEDENTES GENERALES***

- Código FIA-PI-C-2005-3- A-064
- Nombre del Proyecto: "Mejoramiento de la competitividad y sustentabilidad del cultivo del trigo en el sur de Chile: Aplicaciones biotecnológicas para generar trigos con alto contenido proteico del grano y tolerantes al aluminio fitotóxico".
- Región o Regiones de Ejecución: IX Región de La Araucanía
- Agente Ejecutor: INIA Carillanca
- Agente(s) Asociado(s) : Agrocomercial del Sur Limitada.
- Coordinador del Proyecto: Javier Alejandro Zúñiga Rebolledo
  
- Costo Total (*Programado y Real*):

Programado	Real
177.022.203	166.535.789

- Aporte del FIA (en pesos; porcentaje del costo total) (*Programado y Real*)

Programado	Real
84.842.401 (47.9%)	74.355.987 (44.6%)

- Período de Ejecución (*Programado y Real*):

Programado	Real
5 Diciembre de 2005 a 1 de Junio de 2010	5 de Diciembre a 30 de Junio de 2010

## **II. RESUMEN EJECUTIVO**

El objetivo del proyecto fue contribuir a aumentar la competitividad del trigo cultivado en suelos ácidos del centro sur y sur de Chile incrementando su rendimiento y calidad por medio de la genética molecular. Los objetivos planteados incluyeron desarrollar líneas isogénicas conteniendo los alelos *TaALMT1-V* y *NAM-B1b*, asociados en diversos estudios a incrementos en tolerancia a aluminio y contenido de proteína respectivamente. La finalidad fue comparar el comportamiento de las líneas en relación a parámetros de producción y calidad sin las complicaciones que implican hacerlo con variedades no relacionadas. La introgresión de dichos alelos en líneas adaptadas se realizó por medio de la estrategia Marker Assisted Backcross, que permitió generar materiales experimentales con los alelos deseados y al mismo tiempo, monitorear la recuperación del genoma elite. El segundo objetivo fue evaluar el comportamiento de las líneas en un rango de condiciones de acidez y saturación por aluminio en el suelo, tanto en invernadero como en campo. Los resultados de la evaluación en invernadero demuestran que el alelo *TaALMT1-V* es efectivo en conferir tolerancia a aluminio, expresada como menores pérdidas de rendimiento respecto del potencial. El comportamiento de líneas primaverales e invernales en este aspecto no difiere. Por otro lado, el ensayo en campo demostró que el alelo *TaALMT1-V* permitió que las líneas primaverales tolerantes a aluminio rindieran hasta 30% más de grano que las líneas que portaban la versión sensible del alelo. Así mismo, las líneas portadoras del alelo *NAM-B1b* tuvieron un 8% más de proteína respecto de las líneas con la versión alternativa de ese gen. La evaluación de la proteína en un jardín de líneas invernales arrojó incrementos de hasta un 24% de proteína en las líneas portadoras del alelo *NAM-B1b*, lo que requiere ser confirmado en nuevos ensayos en parcelas. Los resultados de campo fueron analizados desde una perspectiva económica, y los resultados indican que las líneas desarrolladas tendrán un impacto económico positivo en el rubro, especialmente en los sistemas de pequeños productores, que actualmente no tienen acceso a las tecnologías aplicadas por productores comerciales. Las ventajas de los genes de tolerancia a aluminio se expresaron mejor a niveles de encalado reducido, y esta práctica sin duda será más accesible para los pequeños productores. Se requiere estudiar y desarrollar paquetes adecuados para transferir los resultados del proyecto a dicho segmento de productores.



### ***III. INFORME TÉCNICO (TEXTO PRINCIPAL)***

#### **1. Objetivos del Proyecto:**

##### **Introducción**

El proyecto consideró que para aumentar la competitividad del trigo que se cultiva bajo condiciones limitantes en las zonas centro sur y sur de nuestro país, es necesario no sólo aumentar su rendimiento sino que, dada la asociación negativa que existe entre rendimiento y contenido de proteína, debe hacerse sin afectar negativamente su calidad industrial. Esta última consideración es importante puesto que la calidad del trigo comienza a jugar un rol cada vez más importante en la comercialización exitosa de este cereal, observándose precios diferenciados para el grano de acuerdo a parámetros de calidad relacionados con el contenido de proteína tales como el contenido de gluten húmedo y su fuerza.

Para lograr incrementos del rendimiento del trigo en suelos ácidos sin afectar negativamente el contenido de proteína del grano se planteó evaluar la posible utilidad de alelos funcionales de los genes ALMT1 y NAM-B1, ausentes en la gran mayoría de las variedades nacionales de trigo. Para ello fue necesario introgresar dichos alelos en líneas elites nacionales por medio de la estrategia Marker Assisted Backcrossing (MAB) y luego comparar el rendimiento y la calidad de las líneas desarrolladas en relación a las líneas elites originales. En tercer lugar, se planteó la necesidad de realizar suficiente difusión de los avances del proyecto, tomando en cuenta que los resultados más importantes se conocerían sólo al finalizar el mismo. En esta sección se presenta un análisis del cumplimiento de los Objetivos Específicos, en función de los resultados e impactos obtenidos, y luego el análisis correspondiente al Objetivo General.



## Objetivos Específicos

### 1.- Generar líneas avanzadas de trigo con mayor contenido de proteína del grano y con mayor tolerancia al aluminio fitotóxico.

El logro de este objetivo se conseguiría al transferir alelos funcionales de los genes *TaALMT1* y *NAM-B1* a líneas primaverales e invernales de trigo elite. Tal como se detalla en sección 4, el proyecto logró desarrollar líneas simples primaverales (que contienen uno de los dos genes, *TaALMT1* ó *NAM-B1*), líneas dobles primaverales (que contienen ambos genes, *TaALMT1* y *NAM-B1*) y las líneas simples y dobles invernales respectivas. El cumplimiento fue acorde a lo programado si bien el desarrollo de las líneas invernales fue más lento de lo esperado debido a problemas iniciales para controlar la calidad de la floración de las poblaciones. Adicionalmente a lo estipulado en el proyecto, se caracterizó la variabilidad del gen *TaALMT1* en una colección de variedades comerciales y tradicionales de trigo chileno. Este análisis arrojó una alta frecuencia de la variante genética que otorga sensibilidad al aluminio en suelos ácidos en trigos comerciales chilenos, corroborando los supuestos iniciales del proyecto en cuanto a que sólo ocasionalmente han aparecido variedades comerciales tolerantes a dicho estrés. Por otro lado, se descubrieron variantes únicas del gen *TaALMT1* en el germoplasma de variedades comerciales y tradicionales nacionales, lo que ha abierto interesantes perspectivas de continuidad para nuestra línea de investigación en producción de cultivos bajo estrés abiótico, tanto desde la perspectiva aplicada como científica. Atendiendo al hecho que efectivamente se desarrollaron las líneas comprometidas en los plazos definidos, este objetivo se cumplió en un 100%.



## 2.- Evaluar el efecto de los genes introgresados en las nuevas líneas, en relación a parámetros de producción y calidad.

Para cumplir el objetivo se planteó evaluar las líneas en experimentos preliminares y de campo. Los primeros se realizarían en macetas en INIA Carillanca, mientras que lo particular del ensayo de campo era que se realizaría bajo condiciones similares a las de los productores, lo que implicó encontrar un sitio fuera de la estación experimental.

El planteamiento original (ensayos preliminares para líneas simples altas en proteína y simples tolerantes a aluminio, y ensayos de campo para líneas simples altas en proteína y simples tolerantes a aluminio) se modificó debido a que i) el contenido de proteína de grano en plantas que han sido cultivadas en maceta no es representativa de lo que sucede en campo y a que ii) no se dispuso a tiempo de las líneas simples invernales para incluirlas en ensayos de campo. El esquema de evaluación de las líneas consistió finalmente en a) un ciclo de ensayos en invernadero de las líneas simples primaverales para aluminio en 2008/2009, b) un ciclo de ensayos en invernadero de las líneas simples invernales para aluminio en 2009/2010, c) un jardín de evaluación en campo de líneas simples invernales para proteína y fenología en 2008/2009 y d) un ensayo de campo para líneas simples y dobles primaverales para aluminio y proteína en 2009/2010.

Las evaluaciones de tolerancia a aluminio de las líneas invernales y primaverales conducidas en invernadero con un suelo entre 0 y 42% de saturación por aluminio, demostraron que la introgresión del alelo *TaALMT1-V* fue capaz de reducir las pérdidas de rendimiento ocasionadas por la toxicidad del aluminio. El conjunto de evaluaciones desarrolladas en campo (Jardín de Evaluación y Ensayo de Campo) permitió determinar que, de acuerdo a lo esperado, el contenido de proteína de las líneas primaverales e invernales portadoras del alelo *NAM-B1b*, fue entre 8 y 23% superior al de las líneas con el alelo *NAM-B1a*. Así mismo, el rendimiento de las líneas primaverales con el alelo de tolerancia a aluminio *TaALMT1-V* superó en 14 a 20 qq/Ha a las líneas con el alelo de sensibilidad *TaALMT1-I*, en un suelo que presentaba hasta un 23.5% de saturación por aluminio. La línea primaveral que contiene los alelos *NAM-B1b* y *TaALMT1-V* superó significativamente tanto en rendimiento como en contenido de proteína a la línea original. El rendimiento de esta línea "doble" fue levemente inferior a la de la línea simple tolerante a aluminio. Esta diferencia puede estar relacionada al menor peso de los granos observado en la línea que contiene el alelo *NAM-B1b*. Este efecto no deseado se ha descrito en la literatura, pero no obstante no tuvo significancia estadística.

Las evaluaciones efectuadas demostraron que la manipulación de los dos genes tuvo un efecto positivo sobre dos características varietales asociadas con el valor económico del cultivo. Si bien los resultados de las evaluaciones efectuadas son promisorios, es necesario recordar que recién corresponden a un primer año de evaluaciones. Dado el potencial de las líneas avanzadas desarrolladas, se incorporaron a los ensayos rutinarios del Programa Nacional de Trigo en la presente temporada. El objetivo propuesto en el Proyecto, "Evaluar el efecto de los genes introgresados en las nuevas líneas, en relación a parámetros de producción y calidad" se cumplió en un 100%.



### **3.- Difundir los resultados del proyecto.**

La difusión de los resultados del proyecto se realizaría mediante cuatro tipos de actividades: 2 Publicaciones científicas, 4 Presentaciones en congresos, 1 Charla de difusión y 1 Día de Campo.

#### **Publicaciones Científicas.**

Las dos publicaciones comprometidas están en fase de redacción. Se hace el alcance que en el proyecto presentado se especificaba que las publicaciones se harían sobre la base de los resultados del último año y el compromiso era que estuvieran enviadas a revistas.

#### **Presentaciones en Congresos.**

Se hicieron 10 presentaciones en congresos (lista en Anexo I), superando ampliamente la meta de 4 propuestas inicialmente. Uno de los trabajos presentados como poster al Congreso Nacional de Redbio Chile (2007) fue seleccionado para ser expuesto oralmente en dicho congreso.

#### **Charlas de difusión.**

Se realizaron 4 charlas de difusión formales en las que se presentaron los tópicos cubiertos por el proyecto (lista en Anexo I). Adicionalmente se mostró el proyecto a unos 1.200 alumnos de liceos de la región, convocados con motivo de la actividad Casa Abierta en INIA Carillanca.

#### **Día de Campo.**

Se realizó un Día de Campo en la localidad de Botacura, Comuna de Gorbea, IX Región. En la ocasión se mostró el ensayo de las líneas primaverales. La ocasión contó con la presencia de 45 agricultores de la zona, para quienes el trigo es una alternativa en la rotación con el cultivo principal correspondiente a la papa. Dado que el cultivo de la papa se realiza en suelos ácidos y con un uso muy limitado de enmiendas calcáreas, el uso de variedades de trigo tolerantes a aluminio es una necesidad para productores del secano costero de la Araucanía. Este segmento de productores y sus necesidades de variedades de trigo tolerantes a aluminio, son el foco de un proyecto de transferencia tecnológica que se formulará en el corto plazo a partir de los resultados del presente proyecto.



## Objetivo General

El objetivo general del proyecto fue:

“Mejorar la competitividad y sustentabilidad del cultivo del trigo en el sur de Chile mediante la explotación de genes y estrategias de fitomejoramiento innovadores para generar trigos con alto contenido proteico del grano y tolerantes al aluminio fitotóxico”.

Dos aspectos determinantes en la competitividad del trigo son el rendimiento y la calidad del grano. El primero porque afecta la producción por unidad de superficie y la segunda porque afecta el valor económico de la producción. En el proyecto se realizó un ensayo agronómico de las líneas desarrolladas, en condiciones de producción similares a las de productores pequeños, es decir limitada por acidez y saturación por aluminio en el suelo. Los resultados dan cuenta de un aumento promedio del rendimiento de 30% utilizando las líneas desarrolladas en el proyecto. Adicionalmente, se observaron incrementos promedio del contenido proteico del 8% con las líneas del proyecto. Incorporando estos datos en la evaluación económica del rubro, se tienen resultados compatibles con los supuestos iniciales del proyecto, es decir el uso de una línea sin alelo de tolerancia a aluminio en un suelo ácido resultó en pérdidas significativas de rendimiento que se tradujeron en resultados económicos negativos a tres niveles de encalado: 0, 0.75 y 6 ton/Ha. Bajo las mismas condiciones, el uso de una línea con alelo de tolerancia permitió obtener rentabilidad positiva en todos los niveles de encalado. Bajo las condiciones de la temporada, el rendimiento y la proteína de las líneas aumentaron al aumentar la dosis de encalado. Sin embargo también aumentó el costo lo que contrarrestó los mayores ingresos por producción y calidad. De esta manera, los mejores resultados económicos se obtuvieron con una aplicación de cal de 0.75 Ton/Ha para un suelo con 23.5% de saturación por aluminio. De esta manera los resultados del primer año de evaluación de las líneas fueron compatibles con la visión del proyecto respecto de la complementariedad entre el uso de líneas tolerantes a aluminio y encalado parcial.

De acuerdo a la evaluación, los trigos con proyecto poseen mayor tolerancia al aluminio y mayor contenido de proteína que los trigos sin proyecto, lo que se tradujo en un incremento significativo en la producción por hectárea y la mejora de parámetros de calidad que significaron mayores ingresos. Un trigo más rentable es un trigo más competitivo, y un trigo con pisos productivos y de calidad mayor puede adaptarse mejor a los vaivenes de los ciclos agrícolas, lo que lo hace sustentable. Al considerar los datos experimentales de una temporada y localidad de ensayo se estima que el objetivo general del proyecto se cumplió plenamente. Sin embargo, se hace presente que es necesario proseguir las evaluaciones de la tecnología extendiéndola hacia otros genotipos, sitios y ciclos de producción para validarla completamente. Bajo estos términos se estima que el objetivo general del proyecto se cumplió satisfactoriamente.



## 2. Metodología del Proyecto:

### Estrategia de transferencia de alelos *TaALMT1-V* y *NAM-B1b* a líneas elite nacionales mediante Marker Assisted Backcross (MAB).

Se transfirieron los alelos *NAM-B1b* (previamente denominado *QGpc.ndsu.6Bb*) y *TaALMT1-V* (previamente denominado *Alt* y *ALMT1*) a un par de líneas receptoras elite para generar dos líneas avanzadas elite de trigo con mayor contenido de proteína y mayor tolerancia a aluminio fitotóxico. La fuente del alelo de alta proteína provino de una línea donante cedida por el Dr. Jorge Dubcovsky (University of California, Davis, USA) y el alelo de tolerancia a aluminio fitotóxico provino de la línea CAR3911 perteneciente al germoplasma de trigo de INIA.

La **estrategia general** para la creación de las líneas avanzadas elite consideró básicamente los siguientes principios:

- Transferir los genes de interés a líneas elite adaptadas, de modo que la evaluación del impacto de los genes fuera válida desde el punto de vista de la producción local.
- Las líneas desarrolladas debían retener los altos potenciales de producción, adaptación y calidad de las líneas elite utilizadas en su creación, de modo que la evaluación del impacto de los genes fuera lo más simple y directa posible.
- La estrategia de transferencia de los genes debía ser intensiva y precisa, considerando los márgenes de tiempo del proyecto y la naturaleza del mejoramiento de cultivos anuales.

Se utilizaron dos líneas elite receptoras: una de hábito invernal y otra de hábito primaveral, ambas pertenecientes al Programa Nacional de Trigos de INIA, las que habían sido evaluadas extensivamente en diversos ambientes productivos durante los años previos al proyecto, mostrando altos potenciales de rendimiento, adaptación y calidad.

Se generaron dos poblaciones paralelas por cada línea receptora elite: una para introgresar el gen de alta proteína y la otra para el gen de tolerancia a aluminio fitotóxico. Una vez que se completó el desarrollo de las líneas simples respectivas, estas se combinaron para generar la línea avanzada elite con los dos genes, o líneas dobles.

Las transferencias de genes se realizaron en base a Marker Assisted Backcross (MAB). Cada ciclo de retrocruzamiento consistió en dos etapas: preselección y selección. El objetivo de la preselección fue identificar individuos que retuvieran el gen de interés y presentaran menos arrastre por ligamiento (linkage drag). Se utilizó un conjunto de marcadores ligados a los genes de interés y otro de marcadores distribuidos en los flancos del intervalo cromosómico que los contiene. Por otra parte, el objetivo de la selección posterior fue identificar individuos que presentaran una mayor proporción de genoma de la línea receptora (genoma elite), para utilizarlo en la producción de la siguiente generación de retrocruzas. En este caso se utilizaron más de 130 microsatélites que cubrieron el 80% del genoma de la especie, de modo de monitorear la recuperación del genoma elite. En cada ciclo, los embriones inmaduros producto de la polinización controlada se extrajeron en condiciones de asepsia y cultivaron *in vitro* para acelerar el avance de generaciones. Luego del último retrocruzamiento, las plantas en cada población se autopolinizaron y se seleccionaron en la descendencia los individuos homocigotos para el gen de interés.

La combinación de las líneas simples para generar las líneas dobles se realizó cruzando las mejores líneas simples y seleccionando molecularmente los individuos homocigotos para ambos genes en la primera generación de autopolinización de los híbridos. La estrategia de selección molecular fue secuencial, identificando primero los individuos homocigotos para el gen *TaALMT1* y luego entre éstos, a aquellos homocigotos para el gen *NAM-B1*.



### **Validación de un sistema molecular para la selección indirecta del gen *TaALMT1* en poblaciones de mejoramiento (Actividad no considerada en planificación original)**

En el período antecedente se ensayó un marcador perfecto para detectar variación en la región promotora del gen *TaALMT1* (Sasaki et al 2006). Debido a que el marcador permitió distinguir claramente las líneas parentales Kumpa y CAR3911, se decidió validarlo como método para seleccionar plantas tolerantes sin tener que recurrir a los ensayos hidropónicos. Para ello se correlacionó la variación genotípica individual de líneas BC2 de la cruce Kumpa x CAR3911, con la variación de la tolerancia a aluminio medida a través de ensayo hidropónico.

### **Caracterización de la variación del gen *TaALMT1* en trigos comerciales y tradicionales chilenos (Actividad no considerada en planificación original)**

Se obtuvieron semillas de 50 variedades comerciales liberadas entre 1970 y 2004, y 30 variedades tradicionales. Dos lotes de 10 semillas por cada entrada se desinfectaron y germinaron en placas Petri. Se preparó ADN de cada lote y se estudió la variabilidad del gen *TaALMT1* mediante PCR, de acuerdo a los procedimientos detallados en Sasaki et al. (2006). Las 10 plantas individuales de un lote que amplificó más de un alelo fueron analizadas individualmente. Plantas individuales que mostraron alelos distintos a los descritos fueron aisladas y multiplicadas para posteriores evaluaciones.

### **Caracterización molecular de un alelo del gen *TaALMT1* presente en trigos comerciales y tradicionales chilenos (Actividad no considerada en planificación original)**

Se caracterizó por secuenciación una pequeña región del promotor del gen en este alelo, asociada al nivel de actividad transcripcional del gen. El nuevo alelo se amplificó mediante PCR utilizando los partidores P1 y P4, que amplifican la región promotora completa y una región menor, que correspondería a la zona variable de dicho promotor (Sasaki et al 2006). Las amplificaciones se realizaron con la enzima Easy-A High Fidelity PCR Cloning Enzyme (Stratagene), a partir del ADN de plantas que presentaban el alelo. Las bandas amplificadas se clonaron en el vector pSC-A utilizando las cepas SoloPack de *E. coli*, los cuales forman parte del sistema de clonamiento Strataclone PCR Cloning Kit (Stratagene). Los clones obtenidos para ambos fragmentos fueron aislados y se comprobó que poseían los insertos esperados. Los plásmidos recombinantes se enviaron al Servicio de Secuenciación de la Universidad Católica de Chile. El análisis de la secuencia se realizó mediante software online.

### **Multiplicación de líneas experimentales.**

Aproximadamente 60 gramos de semilla de las líneas se sembraron y cultivaron en condiciones de invernadero y campo en INIA CRI Carillanca, empleando prácticas estándar para el cultivo. El propósito fue incrementar semilla para los ensayos, resguardando la integridad de los genotipos generados.

### **Evaluación de líneas experimentales.**

El planteamiento original (ensayos preliminares para líneas simples altas en proteína y simples tolerantes a aluminio, y ensayos de campo para líneas simples altas en proteína y simples tolerantes a aluminio) se modificó debido a que i) el contenido de proteína de grano en plantas que han sido cultivadas en maceta no representa lo



que sucede en campo y a que ii) no se dispuso a tiempo de las líneas simples invernales para incluirlas en ensayos de campo. El esquema de evaluación de las líneas consistió finalmente en a) un ciclo de ensayos en invernadero de las líneas simples primaverales para aluminio en 2008/2009, b) un ciclo de ensayos en invernadero de las líneas simples invernales para aluminio en 2009/2010, c) un jardín de evaluación en campo de líneas simples invernales para proteína y fenología en 2008/2009 y d) un ensayo de campo para líneas simples y dobles primaverales para aluminio y proteína en 2009/2010.

- a) Ensayo en Invernadero de las líneas simples primaverales para aluminio en 2008/2009: Las líneas primaverales e invernales simples tolerantes a aluminio se evaluaron en condiciones de invernadero en un suelo con 47% de saturación de aluminio, el que se incubó con  $\text{CaCO}_3$  para obtener rangos de saturación de aluminio fluctuantes entre 47.5 y 1.9%. En este rango se comparó la producción de grano por planta de las isolíneas generadas en el proyecto respecto de la línea primaveral original, sensible a aluminio.
- b) Ensayos en Invernadero de las líneas simples invernales para aluminio en 2009/2010: Mismo esquema detallado en el punto anterior, pero realizado con las isolíneas invernales generadas en el proyecto respecto de la línea invernal original sensible a aluminio.
- c) Jardín de Evaluación en campo de líneas simples invernales para proteína y fenología en 2008/2009: Se evaluaron en campo 21 líneas invernales simples altas en proteína, 24 líneas invernales simples tolerantes a aluminio y la línea invernal original. Dada la escasez de semilla se sembró un surco de 1 metro por línea, con 30 cm de separación entre surcos. En este ensayo se comparó el contenido de proteína y la fenología de las líneas desarrolladas frente a la línea original.
- d) Ensayo de Campo para líneas simples y dobles primaverales para aluminio y proteína en 2009/2010. Este ensayo se realizó en un suelo con 25% de saturación de aluminio en la localidad de Botacura, Comuna de Gorbea, IX Región. El suelo se suplementó con Carbonato de Calcio para obtener rangos de saturación con aluminio fluctuantes entre 3.7 y 23.5%. En este rango de saturaciones se evaluaron 3 líneas primaverales desarrolladas en el proyecto (Isolínea I, con alelo *TaALMT1* sensible a aluminio y con alelo *NAM-B1a* de baja proteína; Isolínea V, con alelo *TaALMT1* tolerante a aluminio y con alelo *NAM-B1a* de baja proteína e Isolínea V+HGP, con alelo *TaALMT1* tolerante a aluminio y con alelo *NAM-B1b* de alta proteína). En el ensayo se midió rendimiento de grano, peso de granos, peso de hectolitro y contenido de proteína.

### Principales problemas metodológicos enfrentados.

1. Se presentaron problemas con la calidad y fecha de floración de las líneas invernales, debido a su largo ciclo de desarrollo y requerimiento prolongado de vernalización. Además, los primeros ciclos de selección en estas poblaciones requerían una etapa de selección fenotípica de heterocigotos para el gen *TaALMT1*, lo que demoraba el inicio del siguiente ciclo.
  2. Las bajas temperaturas en la sala de invernadero disponible para el proyecto afectaron la floración de la línea primaveral cuando se avanzaron poblaciones en invierno.
  3. La línea primaveral elegida resultó ser heterogénea para el gen de tolerancia al aluminio, hecho que solo pudo demostrarse una vez que se validó el marcador molecular para el gen *TaALMT1*.
  4. Existieron zonas en los genomas para los que no se pudo determinar información molecular confiable, para determinar con precisión el grado de recuperación de genoma elite.
- Adaptaciones o modificaciones introducidas durante la ejecución del proyecto, y razones que explican las discrepancias con la metodología originalmente propuesta.



1. Se intentó optimizar la eficiencia de floración de la línea invernal, manejando tiempos y temperaturas de vernalización. Sin embargo no fue posible acelerar el ciclo de desarrollo debido al largo ciclo de la planta, de manera que se generó un atraso de alrededor de dos a tres meses en los plazos de obtención de las líneas invernales mejoradas. Se validó un marcador molecular para reemplazar la selección fenotípica de heterocigotos para el gen *TaALMT1* por la selección molecular.
2. Se selló la cámara de acceso a invernadero para proteger las plantas primaverales del frío extremo y con ello se consiguió revertir el problema del frío que afectaba a estas líneas.
3. El hecho que la línea primaverale era heterogénea implicó que se detuvo el programa de introgresión del gen de tolerancia a la línea primaverale, y en lugar de eso se comenzaron a purificar los biotipos encontrados. En la población para introgresar el gen de alta proteína se seleccionaron líneas dobles, lo que permitió adelantar su desarrollo con respecto a lo planificado.
4. Se encargaron nuevos marcadores para detallar las zonas en las que no se poseía información. Con ello se elevó la cobertura del genoma a un promedio de 82%. Aun así persistieron zonas en que no se desconoce el origen parental.

## Protocolos y métodos utilizados.

### Transferencia de alelos de alta proteína y tolerancia a aluminio a trigos elite nacionales

#### Poblaciones F<sub>1</sub>

Para iniciar la transferencia de los alelos de alta proteína (*NAM-B1b*) y de alta tolerancia a aluminio (*TaALMT1-V*) al germoplasma de trigos elite nacionales, se generaron poblaciones F<sub>1</sub> entre líneas donantes de dichos alelos y líneas elites receptoras (Cuadros 1 y 2). La línea donante del alelo de alta proteína *NAM-B1b* (línea HGP-00622/121) fue cedida amablemente por el Dr. Jorge Dubcovsky (University of California, Davis, USA). La línea donante del alelo de tolerancia a aluminio *TaALMT1-V* fue desarrollada por el Programa de Nacional de Trigos de INIA.

**Cuadro 1.** Alelos para los genes *NAM-B1* y *TaALMT1* en líneas receptoras y donantes del proyecto.

Línea	NAM-B1	TaALMT1
Pandora – INIA	a	Heterogénea
Kumpa – INIA	a	I
HGP-00622/121	b	I
CAR3911	a	V

**Cuadro 2.** Poblaciones desarrolladas mediante cruzamiento controlado de líneas receptoras y donantes.

Población	Línea Receptora	Línea Donante	Tipo de Línea a Desarrollar
PxH	Pandora - INIA	HGP-00622/121	Primaveral de Alta Proteína
PxC	Pandora - INIA	CAR3911	Primaveral de Alta Tolerancia a Aluminio
KxH	Kumpa - INIA	HGP-00622/121	Invernal de Alta Proteína
KxC	Kumpa - INIA	CAR3911	Invernal de Alta Tolerancia a Aluminio

#### Marker Assisted Backcross

Las poblaciones F<sub>1</sub> fueron el punto de partida para introgresar los alelos deseados y recuperar el genoma de las líneas receptoras empleando la estrategia Marker Assisted Backcross (MAB). Esta se llevó a cabo mediante un proceso recurrente que consistió en i) retrocruzamientos, ii) cultivo *in vitro* de embriones inmaduros, iii) selección de individuos que portaban los genes de interés, iv) que tuvieran menos linkage drag y v) más genoma de la línea receptora elite. El objetivo fue seleccionar el mejor individuo para generar el siguiente ciclo de retrocruzadas.

Para la selección molecular de recombinantes portadores del alelo *NAM-B1b* se empleó el marcador Xucw89, localizado a 0.1cM del gen *NAM-B1* en el cromosoma 6BS (Cristóbal Uauy, University of California Davis, USA, comunicación personal). Para la selección de recombinantes portadores del alelo *TaALMT1-V* en el cromosoma 4DL se utilizó inicialmente una prueba hidropónica que discriminaba las plantas sensibles de las tolerantes en solución nutritiva. Luego, se utilizó una población F<sub>2</sub> segregante generada en el proyecto para validar un marcador perfecto reportado por Sasaki et al (2006). En adelante, se utilizó esta prueba molecular para seleccionar recombinantes por ser más simple, más categórica y por lo tanto menos susceptible a error.

Además, en cada ciclo se emplearon microsatélites para seleccionar líneas recombinantes con segmentos introgresados pequeños para así reducir el linkage drag. Un set de 150 microsatélites polimórficos, distribuidos

cada 20 a 25 cM en cada uno de los 21 cromosomas de la especie se utilizaron para monitorear la recuperación de genoma recurrente. La información se analizó mediante el programa Graphical Genotype (GTT, Wageningen, Holanda), lo que permitió identificar fácilmente los individuos con mayor porcentaje de padre recurrente (Van Berloo, 1999).

En el ciclo final de retrocruzamiento, se seleccionó el mejor individuo para fijar el gen de interés mediante autopolinización y posterior selección de acuerdo al siguiente cuadro.

**Cuadro 3.** Procedimientos efectivos de selección de líneas empleados en las diferentes poblaciones del proyecto.

Población	Generación	Procedimiento	N° Líneas Selectas	Combinaciones	
				TaALMT1	NAM-B1
PxH	BC <sub>5</sub> S <sub>1</sub>	Clasificación de individuos para el gen <i>NAM-B1</i> , luego clasificación según el alelo <i>TaALMT1</i> . Selección de líneas con distintas combinaciones de los alelos <i>NAM-B1</i> y <i>TaALMT1</i> en estado homocigoto.	20	I V VII	b b b
PxC	Pandora - INIA	Debido a que durante la validación del marcador perfecto para el gen <i>TaALMT1</i> se descubrió que la variedad Pandora - INIA es heterogénea para ese locus, en lugar de continuar con las retrocruzas se procedió a aislar las isolíneas homocigotas respectivas desde la variedad.	3	I V VII	a a a
KxH	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	Selección de individuos homocigotos para <i>NAM-B1b</i>	25	I	b
KxC	BC <sub>3</sub> S <sub>1</sub>	Selección de individuos homocigotos para <i>TaALMT1-V</i>	22	V	a



### 3. Actividades del Proyecto:

En Mayo de 2008 se presentó a la Fundación para la Innovación Agraria una reprogramación de actividades y presupuesto del proyecto (Documento Plan de Trabajo Proyecto/Estudio Código FIA-PI-C-2005-3-A-064). Esta modificación permitió reorganizar las actividades para reflejar mejor el estado actual de ejecución del proyecto. En el siguiente cuadro resumen se compara las actividades programadas y las que efectivamente se ejecutaron. Adicionalmente se explican las razones de las discrepancias entre lo programado y las efectivamente realizadas.

**Cuadro 4.** Comparación entre actividades programadas y su ejecución.

OBJETIVO	MACROACTIVIDADES ORIGINALES	ACTIVIDAD REPROGRAMADA	RAZON DE CAMBIO	OBSERVACIONES
1.- Generar líneas avanzadas de trigo con mayor contenido de proteína del grano y con mayor tolerancia al aluminio fitotóxico.	<b>Macro actividades 1.1 y 1.2</b> Originalmente diseñadas para desarrollar líneas simples primaverales e invernales altas en proteína o altas en tolerancia a aluminio.	1.- Desarrollo de líneas invernales simples de alta tolerancia a aluminio fitotóxico y de alta proteína	Las líneas primaverales se completaron en tiempo programado. Las invernales se retrasaron y por eso se reenfocó en ellas.	Al finalizar el proyecto se lograron desarrollar todas las líneas simples comprometidas.
	<b>Macro actividad 1.3</b> Originalmente diseñada para desarrollar líneas simples primaverales e invernales dobles, altas en proteína y altas en tolerancia a aluminio.	2.- Desarrollo de línea invernal doble alta tolerancia a aluminio fitotóxico y de alta proteína	La línea doble primaveral se desarrolló antes de tiempo gracias a la heterogeneidad de la línea receptora.	Al finalizar el proyecto se desarrollaron todas las líneas dobles comprometidas.
2.- Evaluar el efecto de los genes introgresados en las nuevas líneas en relación a parámetros de producción y calidad.	<b>Macro actividad 2.1</b> Originalmente diseñada para incrementar semillas de líneas simples seleccionadas y así contar con material suficiente para ensayos.	3.- Multiplicación de líneas seleccionadas	Sin cambio respecto de original.	Actividad desarrollada con normalidad respecto de lo programado.
	<b>Macro actividades 2.2, 2.3 y 2.4</b> Diseñadas para obtener un sitio de prueba con productores, y obtener suelo para hacer ensayos de líneas simples de alta proteína y tolerantes a aluminio en condiciones de invernadero.	4.- Ensayo Preliminar	Se eliminó ensayo de proteína (2.3) y se mantuvo solo el de aluminio (2.4) para líneas primaverales y se añadió jardín de observación y análisis de proteína para las líneas invernales.	Actividad reprogramada finalizada con éxito.
	<b>Macro actividades 2.5 y 2.6</b> Diseñadas para evaluar en campo líneas simples de alta proteína y tolerantes a aluminio.	5.- Ensayo Principal	Se realizó ensayo en campo tal como se programó, pero se incluyeron líneas simples y dobles primaverales. Las líneas simples invernales no se incluyeron por el retraso en su desarrollo.	Actividad reprogramada concluida con éxito.

Cuadro 4 continuación...

<b>3.- Difundir los resultados del proyecto.</b>	<b>Macro actividad 3.1</b>	6.- Publicaciones.	Sin cambio respecto de original.	Publicaciones en preparación, pues se realizan sobre la base de los resultados de los ensayos recién terminados de evaluar.
	<b>Macro actividad 3.2</b>	7.- Presentaciones en congresos	Sin cambio respecto de original.	Actividad concluida con éxito.
	<b>Macro actividad 3.3</b>	8.- Charlas de Difusión	Sin cambio respecto de original.	Actividad concluida con éxito.
	<b>Macro actividad 3.4</b>	9.- Día de campo	Sin cambio respecto de original.	Actividad concluida con éxito.



#### 4. Resultados del Proyecto:

Desarrollo de líneas elite nacionales simples y dobles conteniendo alelos de tolerancia a aluminio (*TaALMT1-V*) y de alto contenido de proteína (*NAM-B1b*) mediante Marker Assisted Backcross (MAB).

En los siguientes cuadros resúmenes se detalla el origen de las líneas primaverales e invernales seleccionadas en el proyecto.

**Cuadro 5.** Líneas Primaverales Simples y Dobles

Línea	Origen	<i>NAM-B1</i>	<i>TaALMT-1</i>	Tipo
1	P x H BC5-S119-31-16-12-24-21	b	I	Simple
2	P x H BC5-S119-31-16-12-24-26	b	I	Simple
3	P x H BC5-S119-31-16-12-24-29	b	I	Simple
4	P x H BC5-S119-31-16-12-24-57	b	I	Simple
5	P x H BC5-S119-31-16-12-24-64	b	I	Simple
6	P x H BC5-S119-31-16-12-24-83	b	I	Simple
7	P x H BC5-S119-31-16-12-24-95	b	I	Simple
1	P x H BC5-S119-31-16-12-24-5	b	V	Doble
2	P x H BC5-S119-31-16-12-24-20	b	V	Doble
3	P x H BC5-S119-31-16-12-24-22	b	V	Doble
4	P x H BC5-S119-31-16-12-24-30	b	V	Doble
5	P x H BC5-S119-31-16-12-24-43	b	V	Doble
6	P x H BC5-S119-31-16-12-24-60	b	V	Doble
7	P x H BC5-S119-31-16-12-24-62	b	V	Doble
1	P x H BC5-S119-31-16-3-9-9	b	VII	Doble
2	P x H BC5-S119-31-16-3-9-11	b	VII	Doble
3	P x H BC5-S119-31-16-3-9-27	b	VII	Doble
4	P x H BC5-S119-31-16-3-9-51	b	VII	Doble
5	P x H BC5-S119-31-16-3-9-73	b	VII	Doble
6	P x H BC5-S119-31-16-3-9-81	b	VII	Doble
1	Pandora-INIA	a	I	Simple
2	Pandora-INIA	a	V	Simple
3	Pandora-INIA	a	VII	Simple

**Cuadro 6.** Líneas Invernales Simples y Dobles

Línea	Origen	NAM-B1	TaALMT-1	Tipo
1	KxH 4-46-11-19	b	I	Simple
2	KxH 4-46-11-26	b	I	Simple
3	KxH 4-46-11-36	b	I	Simple
4	KxH 4-46-11-37	b	I	Simple
5	KxH 4-46-11-38	b	I	Simple
6	KxH 4-46-11-39	b	I	Simple
7	KxH 4-46-11-41	b	I	Simple
8	KxH 4-46-11-43	b	I	Simple
9	KxH 4-46-11-54	b	I	Simple
10	KxH 4-46-11-55	b	I	Simple
11	KxH 4-46-11-56	b	I	Simple
12	KxH 4-46-11-61	b	I	Simple
13	KxH 4-46-11-65	b	I	Simple
14	KxH 4-46-11-67	b	I	Simple
15	KxH 4-46-11-68	b	I	Simple
16	KxH 4-46-11-84	b	I	Simple
17	KxH 4-46-11-87	b	I	Simple
18	KxH 4-46-11-88	b	I	Simple
19	KxH 4-46-11-95	b	I	Simple
20	KxH 4-46-11-103	b	I	Simple
21	KxH 4-46-11-106	b	I	Simple
22	KxH 4-46-11-107	b	I	Simple
1	KxC 33-25-55-2	a	V	Simple
2	KxC 33-25-55-3	a	V	Simple
3	KxC 33-25-55-7	a	V	Simple
4	KxC 33-25-55-8	a	V	Simple
5	KxC 33-25-55-25	a	V	Simple
6	KxC 33-25-55-27	a	V	Simple
7	KxC 33-25-55-75	a	V	Simple
8	KxC 33-25-55-83	a	V	Simple
9	KxC 33-25-55-86	a	V	Simple
10	KxC 33-25-55-90	a	V	Simple
11	KxC 33-25-55-103	a	V	Simple
12	KxC 33-25-55-108	a	V	Simple
13	KxC 33-25-55-117	a	V	Simple
14	KxC 33-25-55-150	a	V	Simple
15	KxC 33-25-55-151	a	V	Simple
16	KxC 33-25-55-162	a	V	Simple

Cuadro 6 continuación...

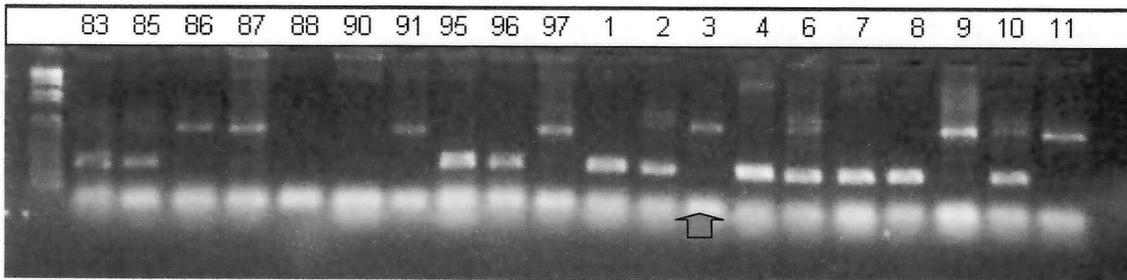
17	KxC 33-25-55-172	a	V	Simple
18	KxC 33-25-55-186	a	V	Simple
19	KxC 33-25-55-188	a	V	Simple
20	KxC 33-25-55-194	a	V	Simple
21	KxC 33-25-55-200	a	V	Simple
22	KxC 33-25-55-219	a	V	Simple
1	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
2	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
3	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
4	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
5	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
6	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
7	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
8	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
9	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble
10	KxC 33-25-55-75 x KxH4-46-11-56	b	V	Doble

El siguiente cuadro resumen detalla el tipo y número de líneas desarrolladas a partir de una línea elite primaveral y otra inveral, ambas de altos rendimientos potenciales.

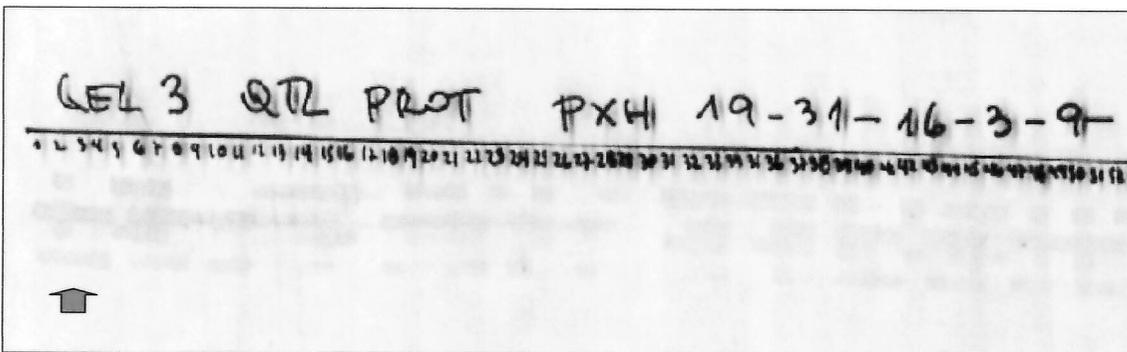
Cuadro 7. Tipo y número de líneas derivadas de las líneas receptoras empleadas en el proyecto.

Línea elite receptora	Combinaciones		Denominación	Tolerancia	Proteína	Número
	TaALMT1	NAM-B1				
Pandora - INIA	I	a	original	-	-	1
	V	a	simple	+	-	1
	VII	a	simple	+	-	1
	I	b	simple	-	+	7
	V	b	doble	+	+	7
	VII	b	doble	+	+	6
Kumpa - INIA	I	a	original	-	-	1
	V	a	simple	+	-	25
	I	b	simple	-	+	22
	V	b	doble	+	+	10

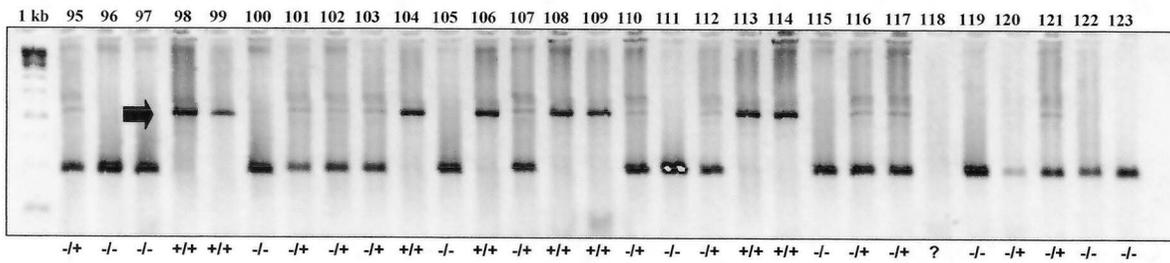
El proceso molecular de selección de las líneas dobles se ilustra en las figuras 1, 2 3 y 4 y se resumen los resultados en la Tabla 1.



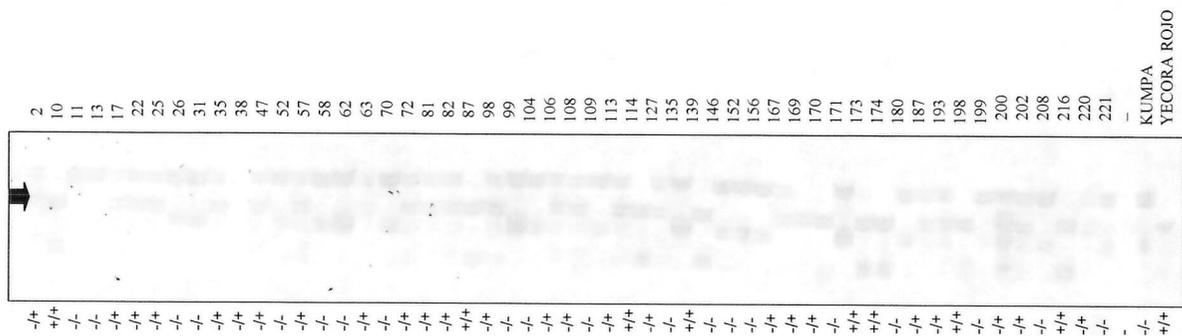
**Figura 1.** Análisis de la región promotora del gen *TaALM1* en las progenies BC5-S1 PxH 19-31-16-12-24- (83-97) y BC5-S1 PxH 19-31-16-3-9-(1-11). La flecha indica la presencia del alelo V en estado homocigoto.



**Figura 2.** Análisis del gen *NAM-B1* en la progenie BC5-S1 PxH 19-31-16-3-9- . La flecha señala el alelo *NAM-B1b* en estado homocigoto.



**Figura 3.** Evaluación molecular del gen de tolerancia a aluminio *TaALMT1* en la progenie KxC F1-S1. (-/-) Genotipo sensible I/ I, (-/+) genotipo heterocigoto I/ V, (+/+) tolerante V/ V, (?) problema de amplificación en la PCR. Los números en la parte superior de la figura indican el número de descendiente. La flecha negra señala el fragmento de 986 bp correspondiente al gen *TaALMT1-V*, asociado a tolerancia a aluminio.



**Figura 4.** Evaluación molecular de gen *NAM-B1b* asociado a mayor contenido de proteína de grano, en individuos homocigotos para el gen *TaALMT1-V* seleccionados a partir de la progenie segregante F1-S1 de Kumpa. (-/-) No portador de *NAM-B1b*, (-/+) genotipo heterocigoto, (+/+) portador de *NAM-B1b*, (-) control negativo de agua. Los números en la parte superior de la figura indican el número del descendiente. La flecha negra señala el fragmento de 122 bp ligado al alelo *NAM-B1b*.



**Tabla 1.** Resultados de evaluación y selección de líneas doble homocigotas para los genes *TaALMT1-V* y *NAM-B1b* utilizando los marcadores moleculares.

N°	ALMT#4	Xuhw89	N°	ALMT#4	Xuhw89	N°	ALMT#4	Xuhw89	N°	ALMT#4	Xuhw89
1	-/+	n.a.	56	-/+	n.a.	111	-/-	n.a.	166	-/+	n.a.
2	+/+	-/+	57	+/+	-/+	112	-/+	n.a.	167	+/+	-/+
3	-/+	n.a.	58	+/+	-/-	113	+/+	-/+	168	-/-	n.a.
4	-/+	n.a.	59	-/+	n.a.	114*	+/+	+/+	169*	+/+	+/+
5	-/+	n.a.	60	-/-	n.a.	115	-/-	n.a.	170*	+/+	+/+
6	-/+	n.a.	61	-/+	n.a.	116	-/+	n.a.	171	+/+	-/-
7	-/-	n.a.	62	+/+	-/-	117	-/+	n.a.	172	-/+	n.a.
8	-/-	n.a.	63	+/+	-/+	118	?	n.a.	173*	+/+	+/+
9	-/+	n.a.	64	-/-	n.a.	119	-/-	n.a.	174*	+/+	+/+
10*	+/+	+/+	65	-/-	n.a.	120	-/+	n.a.	175	-/+	n.a.
11	+/+	-/-	66	-/+	n.a.	121	-/+	n.a.	176	-/+	n.a.
12	-/+	n.a.	67	?	n.a.	122	-/-	n.a.	177	-/+	n.a.
13	+/+	-/-	68	-/+	n.a.	123	-/-	n.a.	178	-/-	n.a.
14	-/+	n.a.	69	-/+	n.a.	124	-/-	n.a.	179	-/+	n.a.
15	-/+	n.a.	70	+/+	n.a.	125	-/-	n.a.	180	+/+	-/-
16	-/+	n.a.	71	-/+	n.a.	126	-/+	n.a.	181	?	n.a.
17	+/+	-/+	72	+/+	-/+	127	+/+	-/+	182	?	n.a.
18	-/-	n.a.	73	-/+	n.a.	128	-/-	n.a.	183	-/-	n.a.
19	-/+	n.a.	74	-/-	n.a.	129	-/-	n.a.	184	-/-	n.a.
20	-/+	n.a.	75	-/+	n.a.	130	-/+	n.a.	185	-/+	n.a.
21	-/-	n.a.	76	-/-	n.a.	131	-/+	n.a.	186	-/+	n.a.
22	+/+	-/+	77	-/+	n.a.	132	?	n.a.	187	+/+	-/+
23	-/+	n.a.	78	-/+	n.a.	133	-/+	n.a.	188	-/+	n.a.
24	-/-	n.a.	79	-/-	n.a.	134	-/+	n.a.	189	-/+	n.a.
25	+/+	-/+	80	-/+	n.a.	135	+/+	-/-	190	-/+	n.a.
26	+/+	-/-	81	+/+	-/+	136	-/-	n.a.	191	-/+	n.a.
27	-/-	n.a.	82	+/+	-/+	137	-/+	n.a.	192	-/+	n.a.
28	-/+	n.a.	83	?	n.a.	138	-/+	n.a.	193	+/+	-/+
29	-/-	n.a.	84	-/+	n.a.	139*	+/+	+/+	194	-/+	n.a.
30	-/+	n.a.	85	?	n.a.	140	-/+	n.a.	195	-/+	n.a.
31	+/+	-/-	86	?	n.a.	141	-/+	n.a.	196	-/-	n.a.
32	-/+	n.a.	87*	+/+	+/+	142	-/+	n.a.	197	-/-	n.a.
33	-/+	n.a.	88	-/+	n.a.	143	-/+	n.a.	198*	+/+	+/+
34	?	n.a.	89	?	n.a.	144	-/+	n.a.	199	+/+	-/-
35	+/+	-/+	90	-/+	n.a.	145	-/+	n.a.	200	+/+	-/+
36	-/-	n.a.	91	-/-	n.a.	146	+/+	-/-	201	-/+	n.a.
37	-/-	n.a.	92	-/+	n.a.	147	-/+	n.a.	202	+/+	-/+
38	+/+	-/+	93	-/-	n.a.	148	-/-	n.a.	203	-/-	n.a.
39	-/-	n.a.	94	-/+	n.a.	149	-/-	n.a.	204	-/+	n.a.
40	-/-	n.a.	95	-/+	n.a.	150	-/+	n.a.	206	-/+	n.a.
41	-/-	n.a.	96	-/-	n.a.	151	-/-	n.a.	207	-/-	n.a.
42	?	n.a.	97	-/-	n.a.	152	+/+	-/-	208	+/+	-/-
43	-/+	n.a.	98	+/+	-/+	153	-/-	n.a.	209	-/+	n.a.
44	-/+	n.a.	99	+/+	-/-	154	-/+	n.a.	210	-/+	n.a.
45	-/+	n.a.	100	-/-	n.a.	155	-/+	n.a.	212	-/+	n.a.
46	?	n.a.	101	-/+	n.a.	156	+/+	-/-	213	-/-	n.a.
47	+/+	-/+	102	-/+	n.a.	157	-/-	n.a.	214	?	n.a.
48	-/-	n.a.	103	-/+	n.a.	158	-/+	n.a.	215	?	n.a.
49	-/+	n.a.	104	+/+	-/-	159	-/+	n.a.	216*	+/+	+/+
50	-/+	n.a.	105	-/-	n.a.	160	-/+	n.a.	218	-/-	n.a.
51	?	n.a.	106	+/+	-/+	161	-/-	n.a.	219	-/-	n.a.
52	+/+	-/-	107	-/+	n.a.	162	-/+	n.a.	220	+/+	-/+
53	-/-	n.a.	108	+/+	-/+	163	-/-	n.a.	221	+/+	-/-
54	-/-	n.a.	109	+/+	-/-	164	-/-	n.a.	222	-/+	n.a.
55	-/+	n.a.	110	-/+	n.a.	165	-/+	n.a.			

(-/+ ) Heterocigoto, (-/-) no portador de los alelos *TaALMT1-V* o *NAM-B1b*, (+/+) portador de ambos alelos en estado homocigoto. (n.a) No analizado, (?) dato perdido, (\*) planta doble homocigota seleccionada para multiplicación de semillas.

En las tablas 2 y 3 y en las figuras 5 y 6 se presentan los resultados que dan cuenta del uso de marcadores moleculares para acelerar la introgresión de los alelos *NAM-B1b* y *TaALMT1-V*.

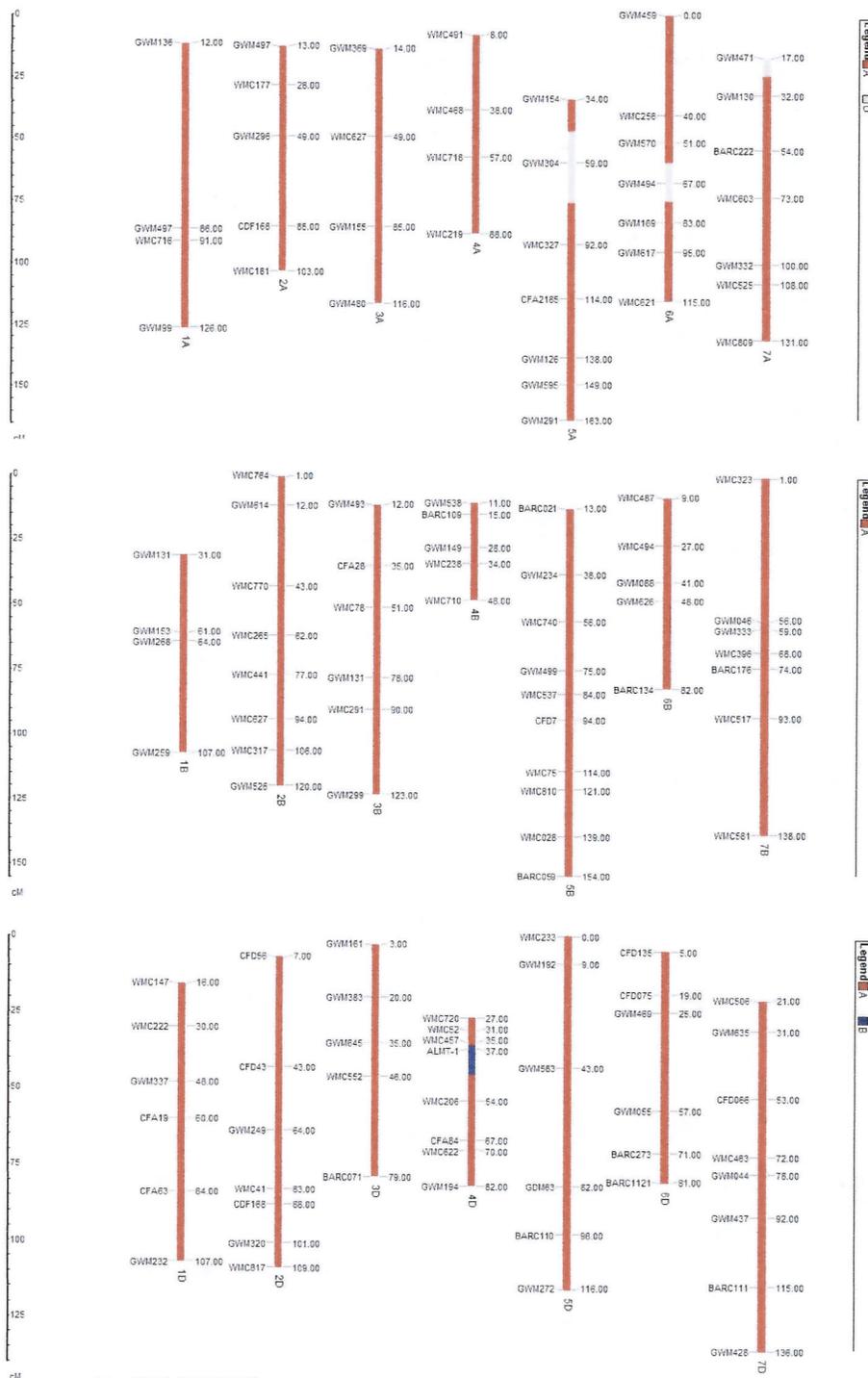
**Tabla 2.** Tamaño de genoma según mapa consenso de trigo y cobertura de genoma utilizada en la genotipificación gráfica de cromosomas.

Característica	Genoma			TOTAL
	A	B	D	
Tamaño genoma (cM)	944	847	778	2569
SSRs polimórficos (N°):				
Kumpa x CAR3911	38	45	47	130
Kumpa x Yecora rojo	34	39	33	106
Cobertura genoma (%)				
Kumpa x CAR3911	78	81	81	80
Kumpa x Yecora rojo	76	76	81	77

**Tabla 3.** Tabla resumen de genotipificación gráfica completa de cromosomas en las líneas simples BC3-S1 utilizadas como parentales en la generación de líneas dobles.

Genoma	Genoma A		Genoma B		Genoma D		Total recuperación(c) %
	%	cM	%	cM	%	cM	
BC3-S1 Kumpa X Car3911 33-25-55-75:							
A(a)	91.4	680	100	694	97.3	614	
H(a)	0	0	0	0	0	0	
B(a)	0	0	0	0	0	0	
U(a)	8.6	64	0	0	2.7	17	
Cobertura(b)	78	744	81	694	81	631	
Recuperación(c)	71	580	81	562	79	497	77
BC3-S1 Kumpa X Yecora rojo Gcp-B1 4-46-11-56:							
A(a)	91.7	659	83	541	82	522	
H(a)	0	0	7	45	2.7	17	
B(a)	0	0	1.9	12	0	0	
U(a)	8.3	60	7.3	47	15	95	
Cobertura(b)	76	719	76	645	81	634	
Recuperación(c)	70	500	63	411	66	422	66

(A) Genoma Kumpa recuperado, (H) genoma heterocigoto, (B) genoma Car3911 o Yecora rojo en estado homocigoto, (U) datos perdidos por problemas de amplificación en la PCR. (a) Valores calculados utilizando como base el genoma cubierto con marcadores SSRs, (b) genoma cubierto con marcadores SSR, y (c) genoma Kumpa recuperado calculado utilizando como base el tamaño total de genoma según mapa consenso de trigo.



**Figura 5.** Graphical Genotype de la línea simple BC3-S1 KxC 33-25-55-75, utilizada como progenitora de las líneas dobles. En rojo (A) se muestra el genoma Kumpa recuperado durante el proceso de retrocruza y en azul (B) la región 4DL conteniendo el gen *TaALMT1-V* introgresado y en estado homocigoto. Las regiones indicadas en gris (U) corresponden a zonas no determinadas por problemas de amplificación por PCR.

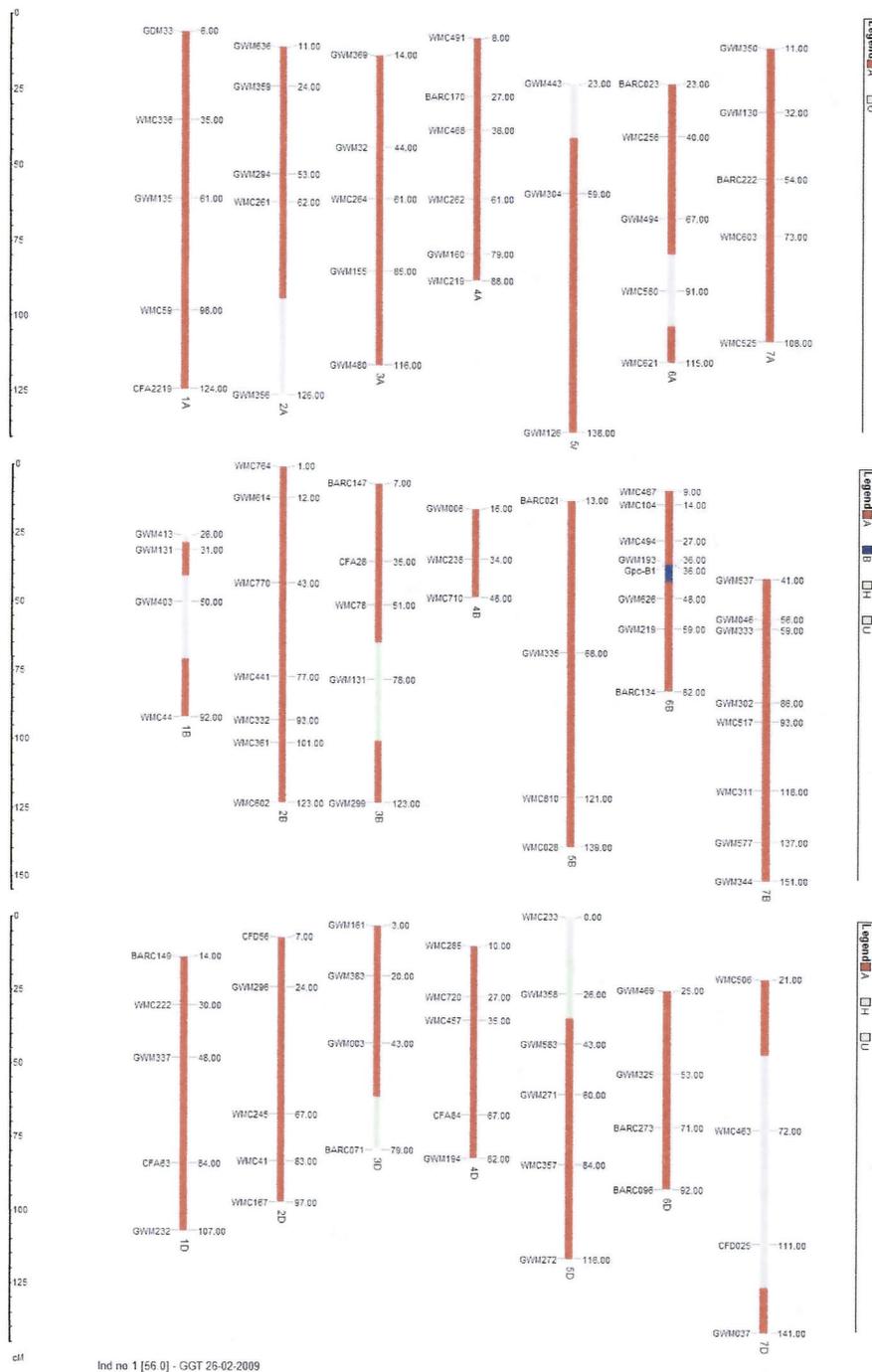


Figura 6. Graphical Genotype de la línea simple BC3-S1 KxH 4-46-11-56, utilizada en la generación de líneas dobles. En rojo (A) se muestra el genoma Kumpa recuperado durante el proceso de retrocruza y en azul (B) la región 6BS conteniendo el gen *NAM-B1b* introgresado y en estado homocigoto. Las regiones indicadas en gris (U) corresponden a zonas no determinadas por problemas de amplificación por PCR y en verde (H) se muestran las zonas que aún permanecían heterocigotas.



En general se puede concluir que el éxito del proyecto se relacionó estrechamente con la disponibilidad de las herramientas biotecnológicas que hicieron posible la introgresión de los genes en las líneas adaptadas. Sin ellas, no habría sido posible desarrollar avances rápidos y precisos en mejoramiento simultáneo de dos características determinantes de la competitividad del cultivo.

### **Validación de un sistema molecular para la selección indirecta del gen *TaALMT1* en poblaciones de mejoramiento (Actividad no considerada en planificación original)**

En el Cuadro 8 se presentan datos correspondientes a la comparación de ensayo hidropónico versus el análisis de tolerancia basado en el empleo del marcador para el gen *TaALMT1*, en individuos de la población BC<sub>2</sub> KxC. Por razones de espacio no se incluyen todos los individuos analizados. Exceptuando los casos de las plantas 33-7 y 33-43, la correspondencia entre ambos análisis fue perfecta, es decir, el análisis molecular predijo correctamente la tolerancia al aluminio de las líneas BC analizadas. Este resultado permitió aplicar el marcador en la selección de planta BC tolerantes, de este modo eliminando la necesidad de utilizar el ensayo hidropónico y añadiendo mayor eficacia al proceso de la introgresión.

El análisis molecular preliminar del gen *TaALMT1* en la variedad Pandora reveló que dicha variedad podría contener dos variantes de ese gen. Como una de las variantes podría corresponder a un alelo de tolerancia, y en consecuencia abrir la posibilidad a la rápida subselección de un biotipo tolerante, se analizaron semillas individuales escogidas al azar desde un lote representativo de la variedad. En cada planta se analizó el gen *TaALMT1* y se midió la tolerancia a aluminio en el test hidropónico estándar, frente a controles apropiados.

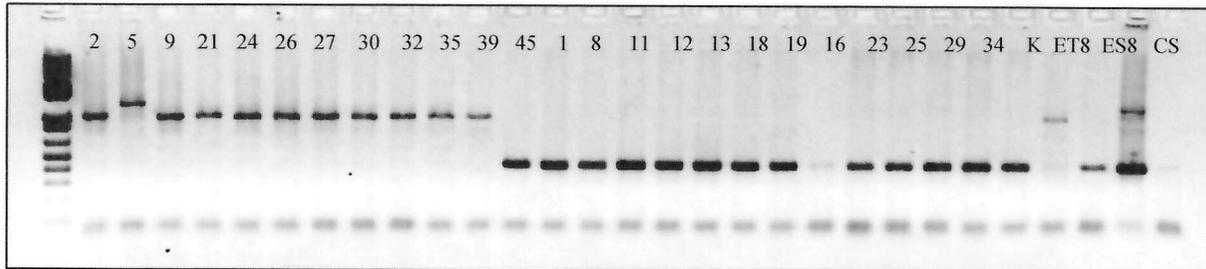
La figura 7 muestra los resultados del análisis molecular. Tal como lo indicaron los análisis preliminares, el cultivar Pandora es heterogéneo en el locus *TaALMT1* para los alelos I y V. El fenómeno de la heterogeneidad genética en las variedades de trigo ha sido reportado previamente, salvo que en general se haya restringida a genes neutros, como las proteínas de almacenamiento. Este hallazgo se reportó en uno de los trabajos presentado a congreso (ver lista en Anexos).

El análisis hidropónico de las plantas individuales reveló que aquellas que poseen el alelo I son sensibles a aluminio, mientras que las que presentan el alelo V son tan tolerantes a aluminio como la línea donante CAR3911, en las condiciones estandarizadas del ensayo (Cuadro 9). Estos hallazgos explican la segregación distorsionada del fenotipo en la población PxC detectada inicialmente, y la observación de una tolerancia intermedia en campo para esta variedad. Estos antecedentes hicieron estimar que era más eficiente purificar genéticamente las plantas de tipo I y V y detener el programa de introgresión del gen *TaALMT1* de CAR3911 en Pandora. Ello aportó el beneficio de contar tempranamente con plantas con fenotipo tolerante en base al mismo alelo que se pretendía introgresar.

Con este hallazgo se abrió además la posibilidad de detectar biotipos tolerantes en las poblaciones de retrocruzas que se estaban utilizando para introgresar el gen de alta proteína, y en consecuencia acelerar el desarrollo de la línea doble primaveral. Este supuesto demostró ser correcto. Estas situaciones ilustraron de la mejor manera el impacto del uso de marcadores moleculares en el mejoramiento de especies cultivadas.

**Cuadro 8.** Datos fenotípicos y moleculares para tolerancia a aluminio en individuos de la población BC<sub>2</sub> KxC. Se incluyen datos de los primeros 44 individuos analizados.

Genotipo	Nº	Hidroponia	Marcador TaALMT1	Match
BC2 K X C	33-1	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-2	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-3	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-4	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-5	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-6	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-7	Tolerante	I	No
BC2 K X C	33-8	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-9	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-10	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-11	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-12	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-13	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-14	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-15	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-17	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-19	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-20	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-21	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-22	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-23	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-24	Sensible	-	Si
BC2 K X C	33-25	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-26	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-27	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-29	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-30	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-31	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-32	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-33	Sensible	-	
BC2 K X C	33-34	Sensible	-	
BC2 K X C	33-35	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-36	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-37	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-38	Tolerante	I-V	Si
BC2 K X C	33-39	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-40	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-41	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-42	Sensible	I	Si
BC2 K X C	33-43	Sensible	I-V	No
BC2 K X C	33-44	Sensible	I	Si



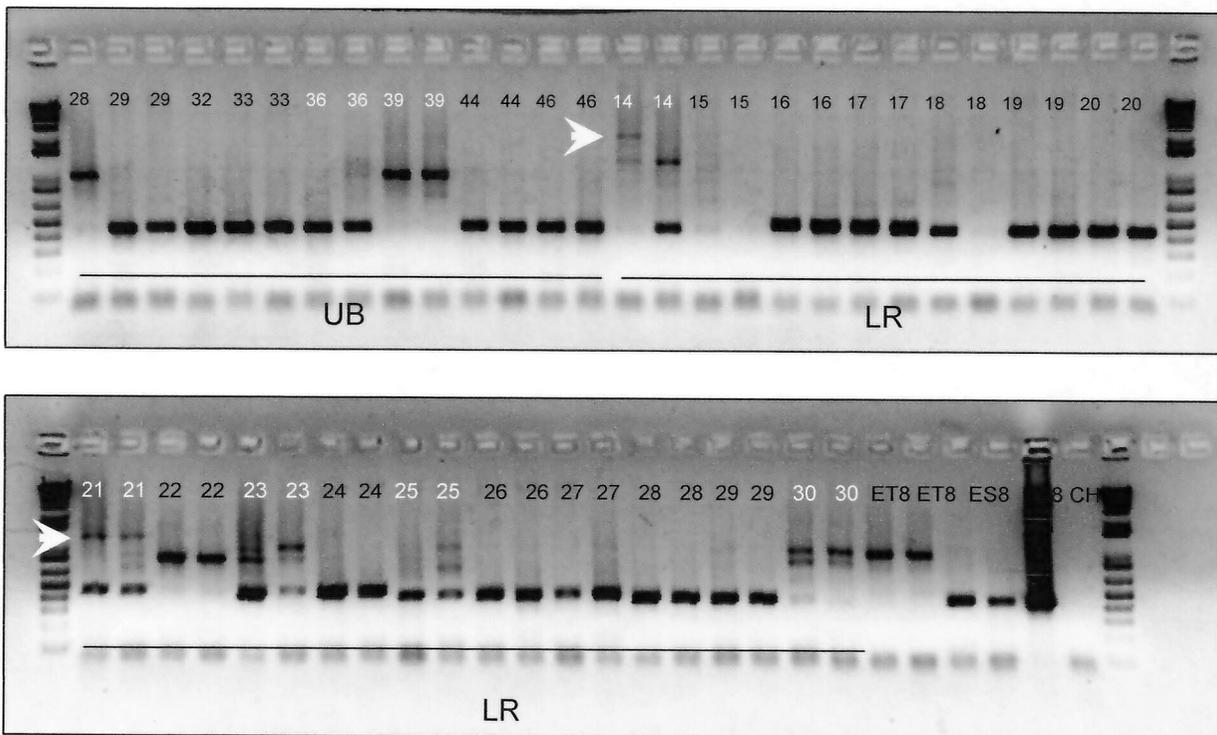
**Figura 7. Análisis molecular del promotor del gen *TaALMT1* en plantas individuales de la variedad Pandora.** K, Kumpa; ET8, línea tolerante Tipo V; ES8, línea sensible Tipo I; CS, Chinese Spring línea sensible Tipo III. 2 a 34, plantas individuales de Pandora. Los alelos se distinguen según el tamaño del fragmento amplificado.

**Cuadro 9. Datos fenotípicos y moleculares para tolerancia a aluminio en plantas individuales de la variedad Pandora.**

Genotipo	Nº	Hidroponia	Marcador <i>TaALMT1</i>	Matching
Pandora	1	Sensible	I	Si
Pandora	2	Tolerante	V	Si
Pandora	5	Tolerante	V	Si
Pandora	8	Sensible	I	Si
Pandora	9	Tolerante	V	Si
Pandora	11	Sensible	I	Si
Pandora	12	Sensible	I	Si
Pandora	13	Sensible	I	Si
Pandora	16	Sensible	I	Si
Pandora	18	Sensible	I	Si
Pandora	19	Sensible	I	Si
Pandora	21	Tolerante	V	Si
Pandora	23	Sensible	I	Si
Pandora	24	Tolerante	V	Si
Pandora	25	Sensible	I	Si
Pandora	26	Tolerante	V	Si
Pandora	27	Tolerante	V	Si
Pandora	29	Sensible	I	Si
Pandora	30	Tolerante	V	Si
Pandora	31	Sensible	-	
Pandora	32	Tolerante	V	Si
Pandora	34	Sensible	I	Si
Pandora	35	Tolerante	V	Si
Pandora	36	Tolerante	V	Si
Pandora	39	Tolerante	V	Si
Pandora	45	Sensible	I	Si

**Caracterización de la variación del gen *TaALMT1* en trigos comerciales y tradicionales chilenos (Actividad no considerada en planificación original)**

El análisis de una colección de variedades antiguas y nuevas de trigo reveló una amplia variabilidad alélica para el gen *TaALMT1*, detectándose 5 de los 6 tipos de promotores reportados, y a lo menos tres tipo de promotor no reportado previamente (figura 8 y cuadro 10). Estos nuevos alelos deben continuar estudiándose pues representan una genética autóctona potencialmente beneficiosa para la pequeña agricultura del trigo. Los hallazgos se difundieron en congreso SIRGEAL 2009 y se trabaja en la edición de una publicación científica con dichos resultados.

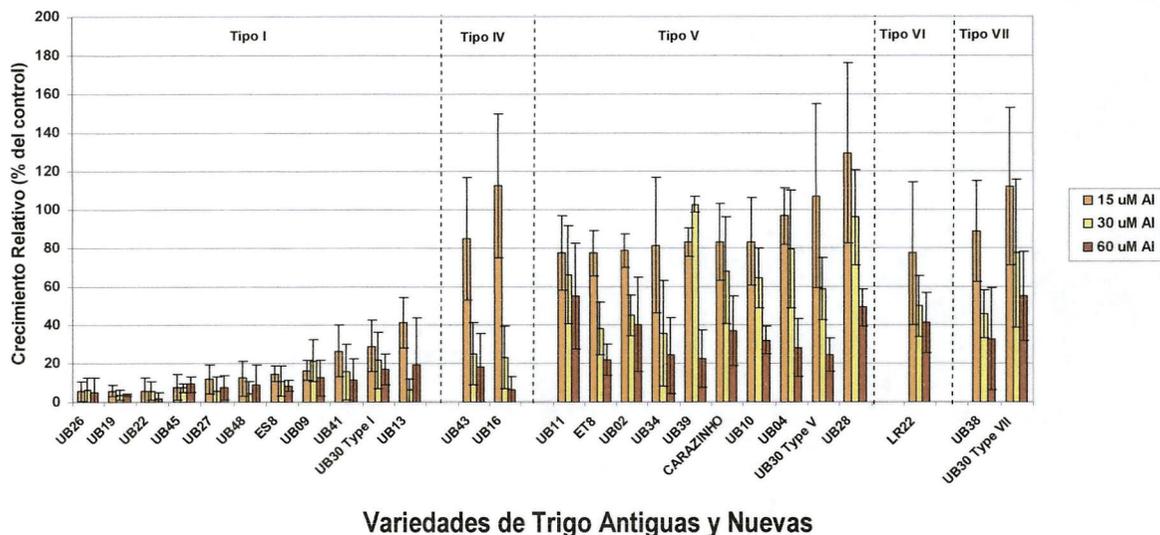


**Figura 8. Análisis molecular del gen *TaALMT1* en variedades modernas (UB) y antiguas (LR) de trigo cultivado en Chile. Los alelos se distinguen según el tamaño del fragmento amplificado. Flecha blanca indica alelos no reportados previamente. Individuos identificados con números blancos presentan heterogeneidad.**

**Cuadro 10. Resumen de análisis del gen *TaALMT1* en 77 variedades modernas y antiguas de trigo cultivado en Chile.**

Tipo de líneas	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Tipo V	Tipo VI	nuevo a	nuevo b	nuevo c
Homogéneas	44	0	0	2	9	1	1	0	0
Heterogéneas	18	2	0	2	15	3	4	1	1
Total	62	2	0	4	24	4	5	1	1

El alelo más frecuente en el germoplasma es el Tipo I. Los promotores asociados a tolerancia son V y VI, según investigaciones realizadas en Australia. En esas mismas investigaciones, el promotor asociado a sensibilidad es el Tipo I. No obstante, en otro estudio realizado en Japón esta relación no es la misma, habiéndose encontrado plantas Tipo I tolerantes y Tipo V sensibles. Al parecer las relaciones entre tipo de promotor y sensibilidad estarían restringidas a pedigríes específicos, de manera que se evaluó preliminarmente esta relación en el germoplasma nacional (Figura 9). El análisis hidropónico de las líneas homogéneas reveló una importante asociación entre tipo de promotor y tolerancia, medida en base a crecimiento radical relativo. No obstante ser un método funcional para evaluar tolerancia a aluminio, es importante señalar que la variación individual en el fenotipo medido es alta, de modo que sería conveniente disponer de un método cuantitativo más directo para evaluar el daño ocasionado por el aluminio en las raíces de las plantas. La conclusión más importante es que ciertos tipos de alelos deben ser evitados en los programas de mejoramiento que deseen liberar variedades de trigo adaptadas a la zona de suelos ácidos del centro sur y sur del país.

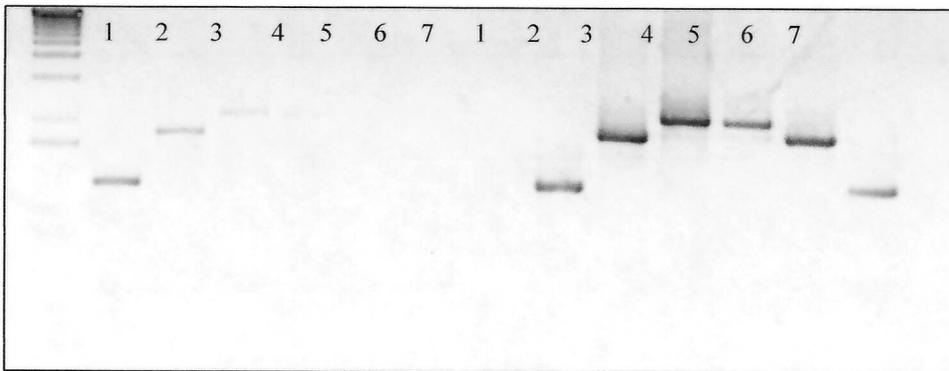


**Figura 9.** Análisis hidropónico de plantas homogéneas para los tipos de promotores *TaALMT1* especificados. UB y LR representan distintas variedades modernas y antiguas de trigo cultivado en Chile. Crecimiento relativo medido con respecto al crecimiento observado para cada genotipo en solución sin aluminio.

Los tres alelos encontrados en la colección no están descritos en la literatura y serían un recurso genético interesante de estudiar. Las líneas que los contienen se purificaron genéticamente para producir líneas homocigotas para posteriores estudios. Entre ellos, se está avanzando en la evaluación de la tolerancia a aluminio relativa a alelos conocidos.

### Caracterización molecular de un alelo del gen *TaALMT1* presente en trigos comerciales y tradicionales chilenos (Actividad no considerada en planificación original)

La figura 10 muestra los fragmentos derivados del alelo *TaALMT1-VII* que fueron clonados. La información de secuencias obtenidas indicó que efectivamente se amplificaron y clonaron regiones de ADN correspondientes al promotor del gen *TaALMT1*. En base a la secuencia se concluyó que la estructura del promotor es interesante, puesto que sugiere la posibilidad de codificar una mayor capacidad para exudar ácidos orgánicos, lo que se relacionaría con una mayor tolerancia al aluminio en suelos ácidos. Los resultados de ensayos en maceta de líneas que contienen este alelo (ver próximo capítulo) sugiere una posible mayor tolerancia de esta línea. En consecuencia se debería estudiar posteriormente los niveles de exudación de ácidos orgánicos en esta línea para verificar un posible rol en la mayor tolerancia. En el Cuadro 11 se presentan los resultados del análisis comparativo de motivos estructurales o motifs, presentes en las secuencias tipo I a VI.



**Figura 10.** Amplificación de un fragmento del promotor del gen *TaALMT1* desde genotipos: 1, Pandora Tipo I; 2, Pandora Tipo V; 3, Pandora Tipo VII; 4, Chinese Spring Tipo III; 5, ET8 Tipo V; 6, ES8 Tipo I y 7, control negativo.

Se completó la secuenciación del alelo *TaALMT1-VII* encontrado en variedades nacionales. Como se mencionó previamente, la estructura del promotor es interesante, puesto que sugiere la posibilidad de codificar una mayor capacidad para exudar ácidos orgánicos, lo que se relacionaría con una mayor tolerancia al aluminio en suelos ácidos. Esta hipótesis se verificará en los ensayos gracias a que se cuenta con líneas isogénicas para varios alelos *ALMT1*, incluido el recién descubierto. En el Cuadro 11 se presentan los resultados del análisis comparativo de motivos estructurales o motifs, presentes en las secuencias tipo I a VI.

**Cuadro 11.** Análisis comparativo de motivos estructurales presentes en el promotor de los alelos I a VI, incluido el nuevo alelo VII encontrado en variedades chilenas.

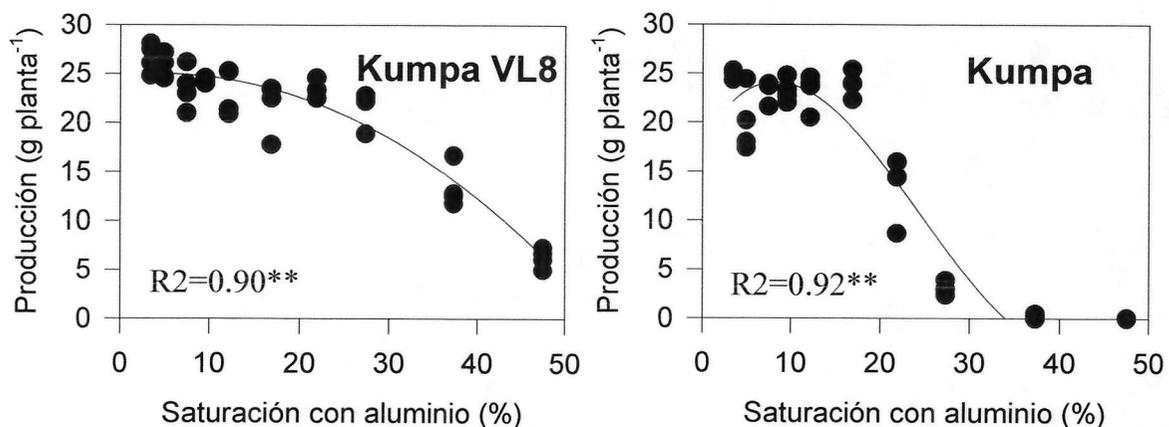
MOTIF		PROPOSED FUNCTION	REFERENCE	PLACEdb SITE #	PRESENCE IN		
PLACEdb Name	Sequence				Box(times)	allele	times
MYB2AT	TAACTG	Binding site for ATMYB2 transcription factor which is involved in regulation of genes that are responsive to water stress in Arabidopsis	Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K. An Arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence Plant Cell 5:1529-1539 (1993)	S000177	A(1)	I	1
						II	1
						III	1
						IV	2
						V	3
						VI	1
MYCATERD1	CATGTG	water-stress; erd (early responsive to dehydration)	Tran LS, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson SD, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Isolation and functional analysis of arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. Plant Cell. 16: 2481-2498 (2004).	S000413	A(1)	I	1
						II	1
						III	1
						IV	2
						V	3
						VI	1
4: ACGTATERD1	ACGT	etioloation; erd (early responsive to dehydration)	ACGT sequence (from -155 to -152) required for etioloation-induced expression of erd1 (early responsive to dehydration) in Arabidopsis	S000415	C(1); B(1); D(1);	I	3
						II	3
						III	6
						IV	4
						V	5
						VI	7
CURECORECR	GTAC	(copper-response element) copper;oxygen; hypoxic;	Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depege N, Huijser P, Merchant S. A regulator of nutritional copper signaling in Chlamydomonas is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 18730-18735.(2005)	S000493	A(1);B(1); C(1)	I	3
						II	3
						III	5
						IV	5
						V	7
						VI	7
HEXAMERATH4	CCGTCG	hexamer motif of Arabidopsis thaliana (A.t.) histone H4 promoter	Chaubet N, Fienet M, Clement B, Brignon P, Gigot C. Identification of cis-elements regulating the expression of an Arabidopsis histone H4 gene. Plant J 10:425-435 (1996)	S000146	B(4); D(1)	I	5
						II	5
						III	10
						IV	9
						V	13
						VI	13
ANAERO2CONSENSUS	AGCAGC	One of 16 motifs found in silico in promoters of 13 anaerobic genes involved in the fermentative pathway	Mohanty B, Krishnan SP, Swarup S, Bajic VB. Detection and preliminary analysis of motifs in promoters of anaerobically induced genes of different plant species. Ann Bot (Lond).96: 669-681 (2005)	S000478	A(4); C(1); D(1)	I	6
						II	6
						III	12
						IV	10
						V	14
						VI	14
ARR1AT	NGATT	ARR1-binding element found in Arabidopsis; ARR1 is a response regulator	Sakai H, Aoyama T, Oka A. Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. Plant J. 24: 703-711 (2000)	S000454	A(4), D(4)	I	8
						II	8
						III	16
						IV	12
						V	16
						VI	16
					VI	20	

## Evaluación de líneas experimentales.

### Ensayos en invernadero

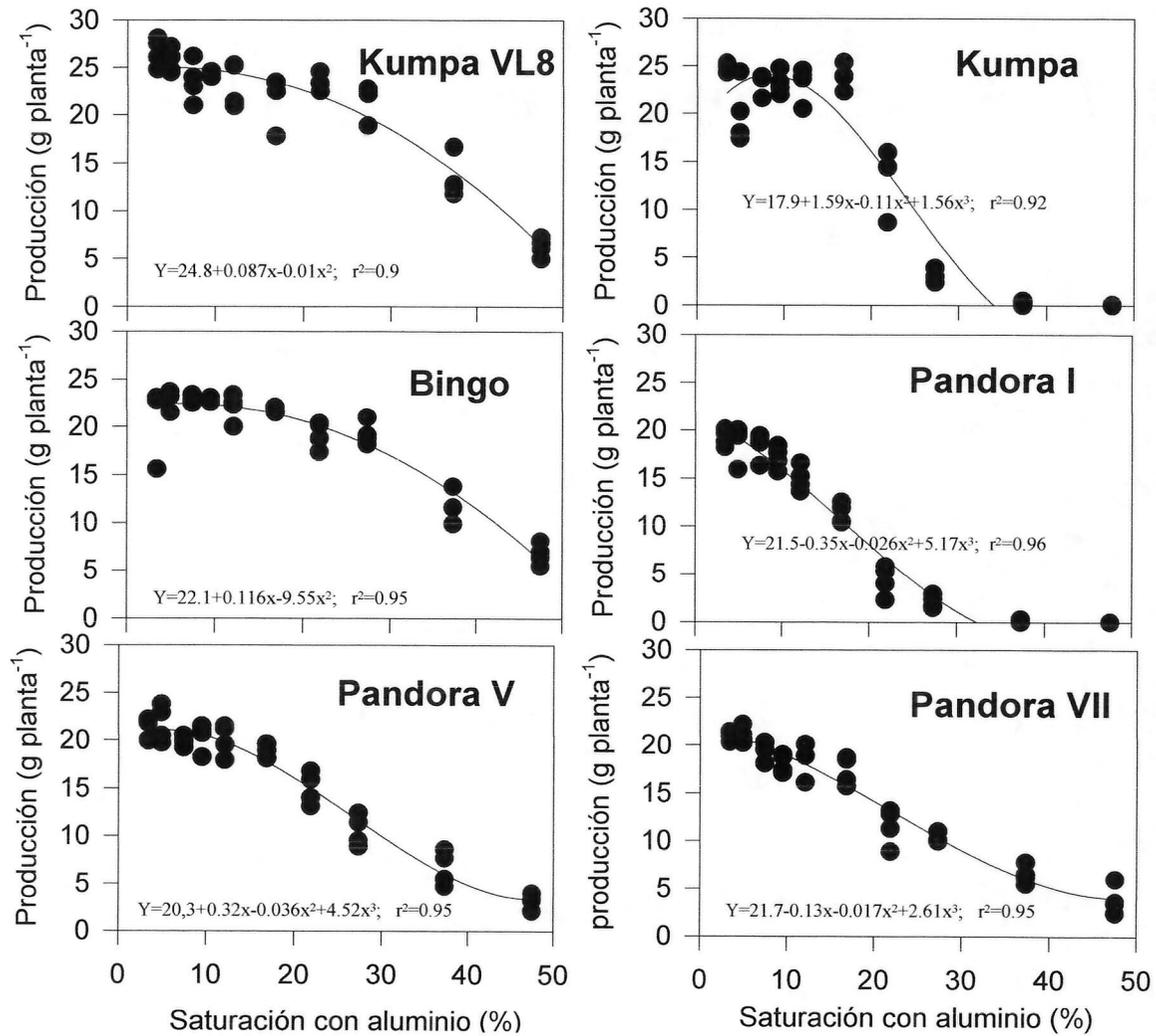
Los materiales introgressados con el gen *TaALMT1* generados en el objetivo específico N° 1 se evaluaron en condiciones de invernadero en un suelo con 47% saturación de aluminio, el que se incubó con  $\text{CaCO}_3$  para obtener rangos de aluminio en el suelo fluctuante entre 47,5 y 1,9% saturación. En este rango se evaluó el comportamiento de Kumpa-INIA (línea receptora, sensible a aluminio), y la línea simple Kumpa a la que se le introgressó el alelo *TaALMT1-V* (Kumpa VL8).

Mientras que, Kumpa prácticamente no produjo grano a 30% de saturación de aluminio en el suelo, a este nivel de estrés la producción del genotipo Kumpa VL8 se redujo en sólo 20% (Figura 12)



**Figura 12.** Producción de grano (g planta<sup>-1</sup>) en los genotipos Kumpa-INIA y Kumpa VL8, en un amplio rango de saturación con aluminio en el suelo. Los valores se ajustaron a ecuaciones de segundo (Kumpa VL8) y tercer grado (Kumpa).

En los ensayos de invernadero también se incorporaron las líneas simples primaverales desarrolladas (I, V y VII), y el cv. Bingo como control resistente. En la Figura 13 se presenta el comportamiento de estos genotipos, comparados con el Kumpa-INIA y la aislínea Kumpa VL8. De acuerdo a estos resultados, el genotipo Kumpa VL8 muestra un comportamiento similar al control resistente Bingo, probablemente uno de los genotipos de trigo con mayor resistencia al aluminio desarrollado en Chile. Se observa también que el potencial de las líneas ensayadas es distinto, lo que añade otra dimensión al análisis del problema de la tolerancia en suelos ácidos. En efecto, el cv. Kumpa (que no porta alelos de resistencia conocidos a la fecha) presenta comportamiento superior al cv. Pandora I (también sensible al aluminio) (Figura 14).



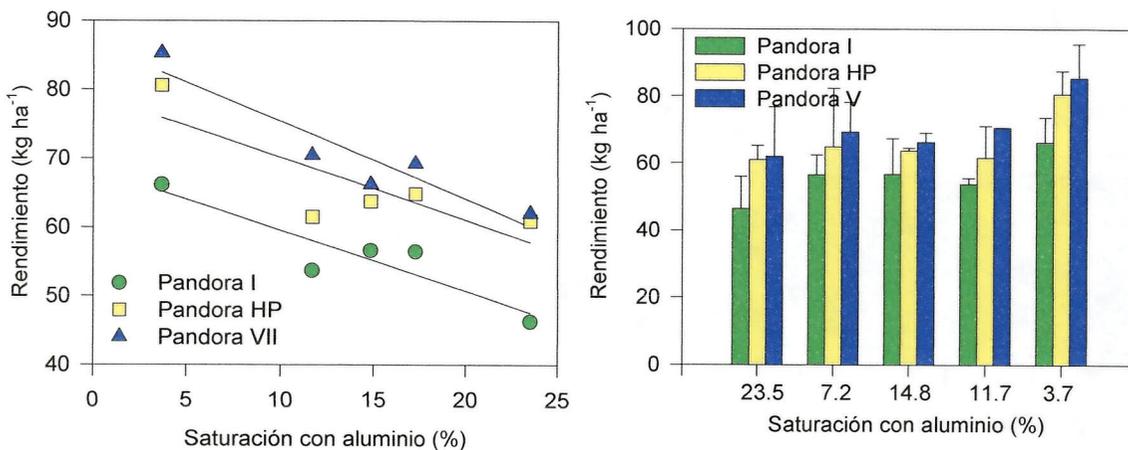
**Figura 14.** Comportamiento de seis genotipos de trigo en respuesta a diferentes niveles de saturación con aluminio en el suelo. Para cada genotipo, la variable dependiente se ajustó a la ecuación con mayor coeficiente de determinación.



## Ensayos en campo

Los materiales primaverales desarrollados en el objetivo específico N° 1 se evaluaron en condiciones de campo, en un suelo con 25% saturación con aluminio (Botacura, Comuna de Gorbea, IX Región). El suelo se suplementó con cinco niveles de  $\text{CaCO}_3$  para obtener rangos de saturación con aluminio fluctuante entre 3,7 y 23,5%. En este rango se evaluó la línea Pandora I (sensible al aluminio, baja proteína), la isolínea Pandora V (resistente al aluminio, baja proteína) y la isolínea Pandora HGP (tolerante a aluminio y de alta proteína).

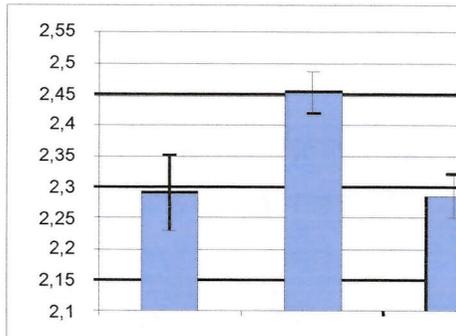
**Rendimiento en grano.** Probablemente por las características propias del suelo, o como consecuencia del manejo al que estuvo previamente sometido, no fue posible alterar la concentración de aluminio en el suelo de manera proporcional a la aplicación de  $\text{CaCO}_3$ . Aun cuando esta situación elevó el error experimental particularmente en tratamientos intermedios con  $\text{CaCO}_3$ , la respuesta diferencial al aluminio es evidente al comparar concentraciones extremas (Figura 14).



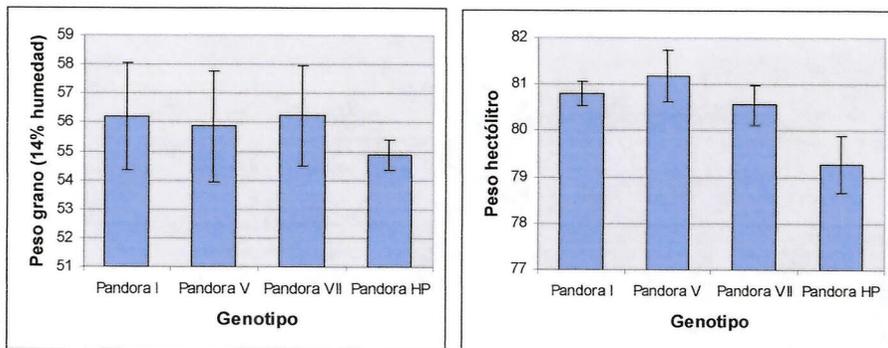
**Figura 14.** Respuesta al aluminio fitotóxico de los genotipos Pandora I (sensible), Pandora V (tolerante) y Pandora HGP (tolerante), en un suelo de la comuna de Gorbea, IX región. Temporada 2009/2010



**Contenido de nitrógeno en el grano.** En promedio de tratamientos de  $\text{CaCO}_3$ , Pandora HGP produjo 6,9% más nitrógeno en el grano que las isolíneas Pandora I y Pandora V (Figura 15). Este resultado permite concluir que el alelo *NAM-B1b* fue capaz de inducir un incremento del contenido de proteína en variedades de alto potencial de rendimiento cultivadas en suelos ácidos. Lo que es más importante, este incremento en contenido de proteína no significó una reducción del rendimiento significativo de la línea (Figura 16).



**Figura 15.** Contenido de Nitrógeno de Grano de los genotipos Pandora I, Pandora V y Pandora HGP, en un suelo de la comuna de Gorbea, IX región. Temporada 2009/2010. Los valores que se presentan corresponden al promedio de tratamientos de  $\text{CaCO}_3 \pm$  la desviación estándar (n=15)



**Figura 16.** Peso de granos y Peso de Hectolitro de los genotipos Pandora I, Pandora V, Pandora VII y Pandora HGP, en un suelo de la comuna de Gorbea, IX región. Temporada 2009/2010. Los valores que se presentan corresponden al promedio de tratamientos de  $\text{CaCO}_3 \pm$  la desviación estándar (n=15)



## Resumen de Evaluaciones

Las líneas simples invernales portadoras del alelo *NAM-B1b* tuvieron un 23% adicional de proteína ( $p < 0.01$ ) respecto de las no portadoras, mientras que en las primaverales la diferencia en contenido de proteína a favor de las líneas portadoras de dicho alelo fue de un 8% ( $p < 0.001$ ). Respecto de rendimiento, los ensayos en maceta mostraron que las líneas simples primaverales e invernales portadoras del alelo *TaALMT1-V* produjeron más grano y materia seca total por planta en suelos con un rango amplio de condiciones de saturación por aluminio, respecto de plantas no portadoras. A su vez, el ensayo de campo mostró que las líneas primaverales portadoras del alelo *TaALMT1-V* rindieron 6,1 y 8,2 Ton/Ha en los tratamientos con 23.5 y 3.7% de saturación por aluminio respectivamente. En las mismas condiciones, las líneas no portadoras rindieron solo 4,6 y 6,6 Ton/Ha respectivamente. Un aspecto que inicialmente no estaba contemplado evaluar durante el proyecto fue el comportamiento de las líneas dobles, las cuales poseen el gen de alta proteína y el gen de tolerancia a aluminio. La línea doble evaluada en campo superó en rendimiento y contenido de proteína a la línea original (sin alelo *TaALMT1-V* y sin alelo *NAM-B1b*), y superó en contenido de proteína a la línea simple que contenía el alelo *TaALMT1-I*. En general, no se observaron diferencias en fenología entre las líneas originales y las líneas derivadas por la introgresión de los genes.

## Cuadro comparativo de los resultados esperados en la propuesta de proyecto y los alcanzados finalmente.

En el siguiente cuadro resumen se compara los resultados esperados y los que efectivamente se alcanzaron. Adicionalmente se explican las razones de las discrepancias entre lo programado y aquellos efectivamente alcanzados.

**Cuadro 12.** Comparación entre resultados esperados y alcanzados.

OBJETIVO	RESULTADOS ESPERADOS	INDICADOR	VALOR INDICADOR	RESULTADO ALCANZADO
1.- Generar líneas avanzadas de trigo con mayor contenido de proteína del grano y con mayor tolerancia al aluminio fitotóxico.	1.- Líneas Invernales Simples. Una línea que contienen el gen TaALMT1 y otra que contiene el gen NAM-B1, ambas derivadas de la línea Invernal del proyecto.	Resultados moleculares de cada línea, peso de grano de cada línea.	Homocigosis para gen respectivo, 5 gramos de semilla por línea.	Logrado, 25 líneas TaALMT1 y 22 líneas NAM-B1. Se incluye líneas simples primaverales desarrolladas.
	2.- Línea Invernal Doble. Una línea que contiene los genes TaALMT1 y NAM-B1, derivada de la línea Invernal del proyecto.	Resultados moleculares de la línea, peso de grano de la línea.	Homocigosis para dos genes, 5 gramos de semilla de la línea.	Logrado, 10 líneas dobles invernales, con alelos TaALMT1 y NAM-B1. En el caso de las primaverales se desarrollaron 7 líneas dobles.
2.- Evaluar el efecto de los genes introgresados en las nuevas líneas en relación a parámetros de producción y calidad.	3.- Semilla de Líneas Primaverales Simples y Dobles. Semillas de líneas que contienen el gen ALMT1, otra que contiene el gen NAM-B1 y otra que contiene ambos genes, derivadas de la línea primaverales del proyecto.	Peso de la semilla de cada línea.	Aproximadamente 300 gramos de semilla por línea.	Logrado, semilla se multiplicó y excedió lo programado debido a que estos materiales se desarrollaron tempranamente en el proyecto.
	4.- Ensayo Preliminar. Un ensayo efectuado con cantidades limitadas de materiales genéticos, destinado a obtener información preliminar de su comportamiento frente a un rango amplio de condiciones de saturación de aluminio, en condiciones estándares de fertilización y otros manejos.	Efecto de tratamientos sobre un número de parámetros medidos para las líneas en evaluación.	Efecto de tratamientos sobre 10 parámetros: espigadura, floración, senescencia, morfología planta, biomasa aérea, rendimiento de grano, índice de cosecha, peso hectolitro, componentes de rendimiento, proteína de grano, aluminio en grano.	Logrado, ensayo realizado, evaluados los principales parámetros relacionados a rendimiento, fenología y composición. Características diferenciadoras de las líneas testeadas conocidas.
	5.- Ensayo Principal. Un ensayo efectuado con cantidades no limitadas de materiales genéticos, destinado a obtener información acerca de su comportamiento frente a un rango definido y significativo de condiciones de saturación de aluminio, en condiciones estándares de fertilización y otros manejos	Efecto de tratamientos sobre un número de parámetros medidos para las líneas en evaluación.	Efecto de tratamientos sobre 14 parámetros: espigadura, floración, senescencia, morfología planta, biomasa aérea, rendimiento de grano, índice de cosecha, peso hectolitro, componentes de rendimiento, macro y micronutrientes de grano, aluminio en hojas y grano, balance de nitrógeno en hojas y granos, calidad industrial de granos.	Logrado, ensayo realizado, evaluados los principales parámetros relacionados a rendimiento, fenología y composición. Características diferenciadoras de las líneas testeadas conocidas.
3.- Difundir los resultados del proyecto.	6.- Publicaciones. 2 Publicaciones en revistas científicas indexadas en ISI, 1 Publicación divulgativa.	Número de artículos enviados.	2 artículos.	No logrado. Publicaciones están en proceso de escritura pues se basan en resultados de ensayo 2009/2010 cuyos resultados se conocieron recientemente.
	7.- Presentaciones. Poster o charlas en congresos del área.	Número de posters o charlas presentadas.	2 posters o charlas.	Logrado. 8 presentaciones a congresos, 1 charla oral en congreso.



Cuadro 12 continuación...

	8.- Charlas. Charla 1, a grupo compuesto por académicos y estudiantes. Charla 2, a AFC, extensionistas e INDAP.	Lista de asistencia a charla.	de 2 listas de asistentes a charlas.	Logrado, 4 charlas formales en total a productores y académicos principalmente, más de 1200 alumnos de liceos presenciaron charlas informales durante programas Casa Abierta y 1000 Científicos 1000 Aulas.
	9.- Día de Campo. Parcelas demostrativas a productores trigueros de la región de la Araucanía.	Lista de asistencia a día de campo.	de 1 lista de asistentes a día de campo con parcelas demostrativas.	Logrado, día de campo en Botacura con presencia de productores de la zona, que presenta problemas de acidez y toxicidad por aluminio en los suelos.

**Razones que explican las discrepancias entre los resultados esperados y los obtenidos.**

No hubo discrepancias entre los resultados esperados y los efectivamente logrados.



## 5. Fichas Técnicas y Análisis Económico:

A continuación se entrega el detalle de la estructura de costos, ingresos y evaluación económica para la producción de trigo con variedades desarrolladas por el proyecto y sin aplicación de cal, a modo de ejemplo, ya que esta estructura se puede variar de acuerdo con los siguientes valores obtenidos de los ensayos técnicos del proyecto:

Tipo de Variedades	Aplicación Cal ton/ha	Rendimiento qqa/ha	Precio \$
<b>Actuales</b>	0	46.30	11.317
<b>Actuales</b>	0.75	56.43	11.317
<b>Actuales</b>	6	66.00	11.317
<b>Desarrolladas</b>	0	62.00	11.883
<b>Desarrolladas</b>	0.75	69.20	11.883
<b>Desarrolladas</b>	6	85.30	11.883

*La estructura de ingresos se determinó a continuación*

ITEM	UNIDAD	CANTIDAD	VALOR ITEM (\$)	VALOR PARCIAL (\$)
INGRESOS POR VENTA	Quintales	62.0	11.883	736.732



**La estructura de costos se determinó continuación**

ITEM	VALOR UNITARIO (\$)	UNIDAD	CANTIDAD	VALOR ITEM (\$)	VALOR PARCIAL (\$)
<b>MAQUINARIA</b>					<b>118.199</b>
Trompo (Aplicación cal)	70.731	JMT	0,16	11.317	
Equipo de barra (Herbicida presiembra)	402.380	JMT	0,025	10.059	
Sembrado cero labranza (16 discos)	233.524	JMT	0,07	16.347	
Arado acequiador (Desagües)	39.295	JMT	0,16	6.287	
Equipo de barra (Herbicida hoja ancha)	402.380	JMT	0,025	10.059	
Equipo de barra (Herbicida gramíneas)	402.380	JMT	0,025	10.059	
Trompo (Aplicación nitrógeno)	314.359	JMT	0,02	6.287	
Trompo (Aplicación fertiyeso)	314.359	JMT	0,02	6.287	
Trompo (Aplicación N inicio encañado)	314.359	JMT	0,02	6.287	
Equipo de barra (Fungicida hoja bande)	402.380	JMT	0,025	10.059	
Cosechadora	157.180	JM	0,16	25.149	
<b>INSUMOS</b>					<b>368.786</b>
Cal agrícola	37.723	Tonelada	0	0	0
Semilla	277	Kilos	200	55.327	55.327
Fertilizantes	0				236.723
Urea (N)	389	Kilos	350	136.168	
Fosfato de Amonio (P)	479	Kilos	180	86.190	
Fertiyeso (S)	48	Kilos	300	14.365	
Pesticidas	0				76.736
Fungicidas	0				24.346
Indar flo (a la semilla)	7.182	Litros	0,4	2.873	
Duett (hoja bandera)	21.473	Litros	1	21.473	
Herbicidas	0				52.390
Roundup (presiembra)	4.459	Litros	3	13.377	
Aliado (presiembra)	165	Gramos	8	1.317	
Aliado	165	Gramos	8	1.317	
MCPA 750	7.317	Litros	0,8	5.854	
Topik	101.752	Litros	0,3	30.526	
<b>MANO DE OBRA</b>	<b>5.658</b>		<b>5,5</b>	<b>31.122</b>	<b>34.580</b>
Acarreo de insumos	6.287	JH	0,5	3.144	
Aplicación de cal agrícola	6.287	JH	0,5	3.144	
Siembra	6.287	JH	1	6.287	
Trazado de desagües	6.287	JH	1,5	9.431	
Aplicación fertilizantes y pesticidas	6.287	JH	1	6.287	
Cosecha	6.287	JH	1	6.287	
<b>FLETE</b>	<b>2.515</b>	<b>Quintales</b>	<b>62,0</b>	<b>155.922</b>	<b>155.922</b>
<b>TOTAL COSTOS DIRECTOS</b>					<b>877.486</b>
Imprevistos (5%)					33.875
<b>TOTAL COSTOS</b>					<b>711.361</b>



Evaluación económica para la producción de trigo con variedades desarrolladas por el proyecto y sin aplicación de cal

		Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
<b>Ingresos</b>		<b>736.732</b>	<b>736.732</b>	<b>736.732</b>	<b>736.732</b>	<b>736.732</b>
Producción	QQ/Año	62	62	62	62	62
Precio	QQ/\$	11.883	11.883	11.883	11.883	11.883
<b>Egresos</b>		<b>711.361</b>	<b>711.361</b>	<b>711.361</b>	<b>711.361</b>	<b>711.361</b>
Maquinaria		118.199	118.199	118.199	118.199	118.199
Insumos		368.786	368.786	368.786	368.786	368.786
Mano de obra		34.580	34.580	34.580	34.580	34.580
Flete		155.922	155.922	155.922	155.922	155.922
Imprevistos (5%)		33.875	33.875	33.875	33.875	33.875
Inversiones						
<b>Beneficios Netos</b>		<b>25.371</b>	<b>25.371</b>	<b>25.371</b>	<b>25.371</b>	<b>25.371</b>
Tasa de Descuento		12%				
VAN (10%)		\$ 91.457				
TIR		No aplicable.				



## 5.2. Análisis económico actualizado, comparando con los análisis de la propuesta de proyecto.

### Supuestos iniciales:

- **Rendimiento:** aumento del número de quintales por hectárea. Al inicio de proyecto se estimó que con el desarrollo de nuevas variedades se obtendría un aumento de 11%, y a esto aplicando 300 kilos de cal se incrementa en un 15% adicional, lo que da un 26% de incremento en rendimiento. Los resultados del proyecto superaron esa expectativa, ya que el aumento promedio fue de un 30%.
- **Calidad:** aumento del contenido de proteína por grano. Al inicio del proyecto se consideró que las variedades de trigo que se generarían en el proyecto serían de tipo fuerte, a diferencia de las variedades actuales que son del tipo suave. El resultado está dado por el incremento en el contenido de proteína en un 8% superior a los contenidos de las variedades actuales.
- **Precio:** aumento del precio por mejor calidad. Si bien en la evaluación económica al inicio del proyecto no se consideró el aumento del precio por el aumento del contenido de proteína, dentro del cálculo propiamente tal, si se menciona como un factor relevante dentro de los efectos esperados del proyecto. Esto lo podemos ver en los precios de los trigos tipos suaves y duros, los que corresponden a los obtenidos con las variedades actuales y las variedades generadas por el proyecto, cabe mencionar que el precio del trigo está dado principalmente por el aumento del gluten y el valor W lo que está directamente relacionado con el contenido de proteína. Es por ello que en la evaluación actualizada se consideró un 5% de aumento del precio para los trigos obtenidos con las nuevas variedades.

### Resumen de escenario

	Sin aplicación de cal y con variedades actuales	Con aplicación de cal y con variedades actuales	Con aplicación de cal y con variedades actuales	Sin aplicación de cal y con variedades desarrolladas con el proyecto	Con aplicación de cal y con variedades desarrolladas por el proyecto	Con aplicación de cal y con variedades desarrolladas por el proyecto
<b>Celdas cambiantes:</b>						
Rendimiento por Ha	46,3	56,4	66,0	62,0	69,2	85,3
Cal aplicada por Ha	0	0,75	6	0	0,75	6
Precio del quintal	11.317	11.317	11.317	11.883	11.883	11.883
<b>Celdas de resultado:</b>						
Ingresos por Ha	523.977	638.618	746.922	736.746	822.304	1.013.620
Costos de Insumos por Ha	368.786	397.078	595.124	368.786	397.078	595.124
Costos de Fletes por Ha	116.439	141.914	165.982	155.922	174.029	214.519
Costos Imprevistos por Ha	31.901	34.589	45.695	33.875	36.195	48.122
<b>VAN por Ha</b>	<b>-\$ 526.033</b>	<b>-\$ 316.289</b>	<b>-\$ 766.583</b>	<b>\$ 91.506</b>	<b>\$ 224.299</b>	<b>\$ 11.089</b>



### **5.3. Análisis de las perspectivas del rubro, actividad o unidad productiva desarrollada, después de finalizado el proyecto.**

- **Perspectivas de las líneas desarrolladas en el proyecto dentro de las perspectivas del rubro:**

- Corto Plazo: transferir la líneas desarrolladas y su manejo adecuado a productores de trigo de la zona costera de la región de La Araucanía, que es la zona con mayores problemas de acides de suelo. Establecer un paquete replicable de capacitación en producción de trigos en suelos ácidos para la pequeña agricultura.
- Mediano Plazo: caracterizar y aprovechar nuevas fuentes de tolerancia a limitantes productivas abióticas descubiertas y evaluadas preliminarmente en el proyecto. Incorporar el Programa Inia de desarrollo de nuevas variedades los genes de tolerancia a aluminio y mayor contenido de proteína, que fueron estudiados en el proyecto.

### **5.4. Descripción estrategias de marketing de productos, procesos o servicios.**

Las líneas obtenidas en el proyecto se transferirán como semilla al Programa Nacional de Trigo de Inia, el cual las evaluará por dos años y se elijará las dos mejores para ser incorporadas en los ensayos estándar de trigos de INIA. Este ensayo estándar (7 localidades, dos años) producirá datos formales para inscribir las líneas avanzadas como nuevas variedades en el registro de variedades protegidas del Sag, A partir de ello la Unidad de Insumos Tecnológicos de Inia realizará el escalamiento de forma similar a como lo realiza con las otras variedades que actualmente Inia tiene en el mercado.

## 6. Impactos y Logros del Proyecto:

### *Impactos Productivos, Económicos y Comerciales*

<b>Logro</b>	<b>Al inicio del Proyecto</b>	<b>Al final del proyecto</b>	<b>Diferencial</b>
Formación de empresa o unidades de negocio	-----	-----	-----
Producción (qq/Ha)	55.8	70.6	14.8
Costos de producción (\$Ha)	631.295	670.466	39.171
Ventas y/o Ingresos (\$Ha)	-----	-----	-----
<i>Nacional</i>	631.330	839.177	207.847
<i>Internacional</i>	-----	-----	-----
Convenios comerciales	-----	-----	-----

### *Impactos Sociales*

<b>Logro</b>	<b>Al inicio del Proyecto</b>	<b>Al final del proyecto</b>	<b>Diferencial</b>
Nivel de empleo anual	-----	-----	-----
Nuevos empleos generados	-----	-----	-----
Productores o unidades de negocio replicadas	-----	-----	-----

## Impactos Tecnológicos

Logro	Numero			Detalle
	Nuevo en mercado	Nuevo en la empresa	Mejorado	
Producto	0	79	0	Líneas de Trigo Primaverales Tolerantes a Aluminio y de Mayor contenido de Proteína, adaptadas a suelos ácidos, susceptibles de inscribirse como nuevas variedades luego de pasar por el proceso de registro (2012)
Proceso	0	1	0	Proceso para incrementar simultáneamente rendimiento y proteína de variedades de trigo destinadas a cultivo en áreas de acidez y presencia de aluminio
Servicio	0	0	0	

Propiedad Intelectual	Número	Detalle
Patentes	0	
Solicitudes de patente	0	
Intención de patentar	0	
Secreto industrial	1	Proceso para incrementar simultáneamente rendimiento y proteína de variedades de trigo destinadas a cultivo en áreas de acidez y presencia de aluminio
Resultado no patentable	0	
Resultado interés público	1	Líneas de Trigo Primaverales Tolerantes a Aluminio y de Mayor contenido de Proteína, adaptadas a suelos ácidos, susceptibles de inscribirse como nuevas variedades luego de pasar por el proceso de registro



<b>Logro</b>	<b>Número</b>	<b>Detalle</b>
Convenio o alianza tecnológica	0	
Generación nuevos proyectos	1	Se presentará un proyecto para estudiar las nuevas líneas en relación a adaptación a deficiencia de fósforo.

### ***Impactos Científicos***

<b>Logro</b>	<b>Número</b>	<b>Detalle (Citas, título, descripción)</b>
Publicaciones	2	*** En proceso de escritura, resultados están disponibles solo el último mes del proyecto.
<i>(Por Ranking)</i>		
Eventos de divulgación científica	10	Ver lista de presentaciones en congresos en Anexo 1
Integración a redes de investigación		0

### ***Impactos en Formación***

<b>Logro</b>	<b>Numero</b>	<b>Detalle (Título, grado, lugar, institución)</b>
Tesis pregrado	0	
Tesis postgrado	0	
Pasantías	0	
Cursos de capacitación	0	



## 7. Problemas Enfrentados Durante el Proyecto:

- Legales  
No se presentaron problemas Legales
- Técnicos
  1. Se presentaron problemas con la calidad y fecha de floración de las líneas invernales, debido a su largo ciclo de desarrollo y requerimiento prolongado de vernalización. Además, los primeros ciclos de selección en estas poblaciones requerían una etapa de selección fenotípica de heterocigotos para el gen *TaALMT1*, lo que demoraba el inicio del siguiente ciclo.
  2. Las bajas temperaturas en la sala de invernadero disponible para el proyecto afectaron la floración de la línea primaveral cuando se avanzaron poblaciones en invierno.
  3. La línea primaveral elegida resultó ser heterogénea para el gen de tolerancia al aluminio, hecho que solo pudo demostrarse una vez que se validó el marcador molecular para el gen *TaALMT1*.
  4. Existieron zonas en los genomas para los que no se pudo determinar información molecular confiable, para determinar con precisión el grado de recuperación de genoma elite.
- Administrativos  
No se presentaron problemas Administrativos
- Gestión  
No se presentaron problemas de Gestión
- Medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.
  1. Se intentó optimizar la eficiencia de floración de la línea invernacional, manejando tiempos y temperaturas de vernalización. Sin embargo no fue posible acelerar el ciclo de desarrollo debido al largo ciclo de la planta, de manera que se generó un atraso de alrededor de dos a tres meses en los plazos de obtención de las líneas invernales mejoradas. Se validó un marcador molecular para reemplazar la selección fenotípica de heterocigotos para el gen *TaALMT1* por la selección molecular.
  2. Se selló la cámara de acceso a invernadero para proteger las plantas primaverales del frío extremo y con ello se consiguió revertir el problema del frío que afectaba a estas líneas.
  3. El hecho que la línea primaveral era heterogénea implicó que se detuvo el programa de introgresión del gen de tolerancia a la línea primaveral, y en lugar de eso se comenzaron a purificar los biotipos encontrados. En la población para introgresar el gen de alta proteína se seleccionaron líneas dobles, lo que permitió adelantar su desarrollo con respecto a lo planificado.
  4. Se encargaron nuevos marcadores para detallar las zonas en las que no se poseía información. Con ello se elevó la cobertura del genoma a un promedio de 82%. Aun así persistieron zonas en que no se desconoce el origen parental.



## **8. Otros Aspectos de Interés**

## **9. Conclusiones y Recomendaciones:**

- Desde el punto de vista:
  - Técnico. Los materiales desarrollados exhiben mejor comportamiento agronómico y de calidad que los materiales originales, en una temporada y sitio de cultivo. Se continuará la evaluación del material en diferentes suelos tendiendo a obtener conclusiones mejor respaldadas.
  - Económico. No hay.
  - De gestión. No hay.

#### **IV. INFORME DE DIFUSIÓN**

##### **Trabajos presentados en congresos (10).**

1. Zúñiga J., Mathias M., Soto B., y Salvo-G. H. 2006. Introgresión de un gen para alto contenido proteico en variedades adaptadas de trigo (*Triticum aestivum* L.) mediante Marker Assisted Backcrossing y Graphical Genotyping. 57° Congreso Agronómico de Chile. 17 al 20 de octubre de 2006. Santiago, Chile.
2. Soto B., Mathias M., Zúñiga J., Salvo G., Peñaloza E. y Mora P. 2006. Introgresión de un gen que confiere tolerancia a aluminio fitotóxico en trigo (*Triticum aestivum* L.) mediante Gene Assisted Selection y Graphical Genotyping. 57° Congreso Agronómico de Chile. 17 al 20 de octubre de 2006. Santiago, Chile
3. Soto, B., Mathias, M., Zúñiga, J., Salvo-G, H. and Peñaloza, E. Validation and application of the *ALMT1* promoter region marker to introgress aluminum tolerance into elite wheat genetic background. VI encuentro REDBIO CHILE 2007. 22 al 26 de Octubre. Viña del Mar, Chile.
4. Mathias, M., Soto, B., Jobet, C., Peñaloza, E., Salvo, H. and Zúñiga, J. Allelic variability at the *ALMT1* gene promoter in a collection of wheat cultivars and landraces grown in Chile. VI encuentro REDBIO CHILE 2007. 22 al 26 de Octubre. Viña del Mar, Chile.
5. Mathias, M., Soto, B., Muñoz, G. and Zúñiga, J. Identification of a new *ALMT1* gene promoter allele conferring aluminum tolerance to wheat: advances on its molecular and functional characterization. II Reunión de Biología Vegetal. 5-6 de Noviembre 2008, Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
6. Mathias, M., Rathgeb P. and Zúñiga, J. Deploying *TaALMT1* gene variation in a Chilean ex-situ collection of wheat landraces: generation of near isogenic lines. SIRGEALC 2009, Pucón, Chile.
7. Peñaloza, E., Díaz, L., Zúñiga, J., Rathgeb, P. and Montenegro, A. Preliminary assesment of an in-soil and short term method to screen for resistance to phytotoxic aluminum in wheat. SIRGEALC 2009, Pucón, Chile.
8. Peñaloza, E., Montenegro, A., Díaz, L., Zúñiga, J., Mathias, M. and Toro, C. Performance of type VII allele of the *TaALMT1* gene in near isogenic lines of wheat grown in a high aluminum acid soil. SIRGEALC 2009, Pucón, Chile.
9. Zúñiga, J. Near Isogenic lines derived from heterogeneous bread wheat varieties: an accessible tool for agricultural research. SIRGEALC 2009, Pucón, Chile.



10. Mathias, M., Montenegro, A., Peñaloza, E., Soto, B. and Zúñiga, J. Growth patterns of near isogenic lines for aluminum tolerance TaALMT1 gene in wheat grown in phosphorus deficient and high aluminum soil. III Reunión de Biología Vegetal, La Serena 2009.

#### **Charlas técnicas.**

1. "Del ADN al Campo y a la Mesa: Creando mejores alimentos en base a Trigo con ayuda de la Biotecnología". Programa Mil Científicos 1000 Aulas – Explora, Conicyt. Colegio San Francisco de Renaico, 2007. 32 Alumnos de 8° Básico.
2. "Mejoramiento de calidad de granos mediante métodos Biotecnológicos". Ciclo de Capacitación Anual a Productores y Multiplicadores de Semilla organizado por el SAG. SAG Osorno, 2008. 25 asistentes, correspondientes a mejoradores, multiplicadores de semillas y funcionarios de servicios del agro.
3. "Mejoramiento de calidad de granos mediante métodos Biotecnológicos". Ciclo de Capacitación Anual a Productores y Multiplicadores de Semilla organizado por el SAG. SAG Temuco, 2009. 32 asistentes, correspondientes a mejoradores, multiplicadores de semillas y funcionarios de servicios del agro.
4. "Impacto de la Biotecnología en la producción vegetal". Taller de Biotecnología, Comité Operativo de Biodiversidad IX Región, organizado por CONAMA IX Región. Temuco, 2009. 27 asistentes, correspondientes a docentes y estudiantes de Biotecnología de la Universidad de la Frontera y funcionarios de servicios públicos (Intendencia, CONAMA).

#### **Días de Campo.**

1. "Día de Campo Botacura, Organizado por INIA, Agrocomercial del Sur, Agrobot y el Centro de Gestión de la Araucanía. Botacura, Comuna de Gorbea, IX región.

#### **Artículos en prensa.**

1. Artículo periodístico publicado Revista Campo Sureño, del Diario Austral de Temuco. 2008. Biotecnólogos de INIA Carillanca desarrollan investigación: APUESTAN POR TRIGOS CON ALTO CONTENIDO DE PROTEINAS Y RENDIMIENTO



## ***V. ANEXOS***



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACIÓN PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

ANEXO 1

**FICHAS DATOS PERSONALES Y DATOS DE ORGANIZACIONES**

## ANEXO 1.1 : FICHA DATOS PERSONALES

### Ficha Representante(s) Legal(es)

(Esta ficha debe ser llenada tanto por el Representante Legal del Agente postulante o Ejecutor como por el Representante Legal del Agente Asociado)

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante legal del Agente postulante o Ejecutor		
Nombres	Guillermo		
Apellido Paterno	Donoso		
Apellido Materno	Harris		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Subdirector Nacional de I&D		
Dirección (laboral)	Fidel Oteiza 1956 Piso 11 y 12		
País	Chile		
Región	Metropolitana		
Ciudad o Comuna	Providencia		
Fono	225-2118		
Fax	225-8773		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:gdonoso@inia.cl">gdonoso@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Representante legal del Agente Asociado		
Nombres	Alvaro		
Apellido Paterno	Dufournel		
Apellido Materno			
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	Agrocomercial del Sur Ltda.		
RUT de la Organización	77.636.270-0		
Tipo de Organización	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Gerente General		
Dirección (laboral)	Andrés Bello 870, Of. 7		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Temuco		
Fono	45-737370		
Fax	45-737370		
Celular	--		
Email	adufour@surnet.cl		
Web	--		
Género	Masculino <input type="checkbox"/>	X	Femenino <input type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		

### **Ficha Coordinadores y Equipo Técnico**

(Esta ficha debe ser llenada tanto por el Coordinador Principal, Coordinador Alterno y cada uno de los integrantes del Equipo Técnico)

Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador Principal		
Nombres	Javier Alejandro		
Apellido Paterno	Zúñiga		
Apellido Materno	Rebolledo		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Unidad de Biotecnología		
Profesión	Bioquímico		
Especialidad	Genética Molecular aplicada al mejoramiento de cereales		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:jzuniga@inia.cl">jzuniga@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Coordinador Alterno (EX)		
Nombres	Braulio		
Apellido Paterno	Soto		
Apellido Materno	Cerda		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Unidad de Biotecnología		
Profesión	Ingeniero Forestal, Magíster en Genética		
Especialidad	Genética Molecular aplicada al mejoramiento de cereales		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:bsoto@cgna.cl">bsoto@cgna.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Adolfo		
Apellido Paterno	Montenegro		
Apellido Materno	Barriga		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Departamento de Recursos Naturales		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, MSc		
Especialidad	Fertilología		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:amontene@inia.cl">amontene@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Enrique		
Apellido Paterno	Peñalosa		
Apellido Materno	Hernández		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Unidad de Biotecnología		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, Dr.		
Especialidad	Fisiología Molecular		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:epenaloz@inia.cl">epenaloz@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Claudio		
Apellido Paterno	Jobet		
Apellido Materno	Fornazzari		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Programa Nacional de Trigo		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, PhD		
Especialidad	Fitomejoramiento de trigo		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:cjobet@inia.cl">cjobet@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico y desde 2008 Coordinador Alternativo en reemplazo de Braulio Soto		
Nombres	Haroldo		
Apellido Paterno	Salvo		
Apellido Materno	Garrido		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Investigador Unidad de Biotecnología		
Profesión	Ingeniero Agrónomo, PhD		
Especialidad	Genética Molecular de cereales		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:hsalvo@inia.cl">hsalvo@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Luisa		
Apellido Paterno	Vera		
Apellido Materno	Quilodrán		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Jefe Laboratorio de Calidad de Trigo del INIA CRI Carillanca		
Profesión	Químico Laboratorista		
Especialidad	Análisis calidad de trigo		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:lvera@inia.cl">lvera@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Lorena		
Apellido Paterno	Díaz		
Apellido Materno	Albornoz		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Asistente de Investigación Unidad de Biotecnología		
Profesión	Técnico Universitario en Producción Agrícola		
Especialidad	Cultivo <i>in vitro</i>		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:ldiaz@inia.cl">ldiaz@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Técnico		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Carlos		
Apellido Paterno	Toro		
Apellido Materno	Cariqueo		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Operario		
Profesión	Ingeniero de Ejecución Agrícola		
Especialidad	Labores de campo		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:ctoro@inia.cl">ctoro@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Gonzalo		
Apellido Paterno	Marín		
Apellido Materno	Sandoval		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Operario		
Profesión	Técnico Agrícola		
Especialidad	Labores de campo		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:gmarin@inia.cl">gmarin@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input checked="" type="checkbox"/>	Femenino
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Técnico		



Tipo de actor en el Proyecto (A)	Equipo Técnico		
Nombres	Susana Verónica		
Apellido Paterno	Vergara		
Apellido Materno	Román		
RUT Personal			
Nombre de la Organización o Institución donde trabaja	INIA CRI Carillanca		
RUT de la Organización	61.312.000-9		
Tipo de Organización	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
Cargo o actividad que desarrolla en ella	Secretaria Unidad de Biotecnología		
Profesión	Secretaria Bilingüe		
Especialidad	--		
Dirección (laboral)	General López s/n		
País	Chile		
Región	IX Región de La Araucanía		
Ciudad o Comuna	Vilcún		
Fono	215706		
Fax	216112		
Celular	--		
Email	<a href="mailto:svergara@inia.cl">svergara@inia.cl</a>		
Web	--		
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino <input checked="" type="checkbox"/>
Etnia (B)	Sin clasificar		
Tipo (C)	Profesional		



### **Ficha Participantes o Beneficiarios Directos**

(Esta ficha debe ser llenada por cada uno de los beneficiarios directos o participantes vinculados al proyecto)

<b>Tipo de actor en el Proyecto (A)</b>	Empresario		
<b>Nombres</b>	Alvaro		
<b>Apellido Paterno</b>	Dufournel		
<b>Apellido Materno</b>			
<b>RUT Personal</b>			
<b>Nombre de la Organización o Institución donde trabaja</b>	Agrocomercial del Sur Ltda.		
<b>RUT de la Organización</b>	77.636.270-0		
<b>Tipo de Organización</b>	<input type="checkbox"/> Pública	<input type="checkbox"/> Privada	<input checked="" type="checkbox"/> X
<b>Cargo o actividad que desarrolla en ella</b>	Gerente General		
<b>Dirección (laboral)</b>	Andrés Bello 870, Of. 7		
<b>País</b>	Chile		
<b>Región</b>	IX Región de La Araucanía		
<b>Ciudad o Comuna</b>	Temuco		
<b>Fono</b>	45-737370		
<b>Fax</b>	45-737370		
<b>Celular</b>	--		
<b>Email</b>	adufour@surnet.cl		
<b>Web</b>	--		
<b>Género</b>	<input type="checkbox"/> Masculino	<input checked="" type="checkbox"/> X	<input type="checkbox"/> Femenino
<b>Etnia (B)</b>	Sin clasificar		
<b>Tipo (C)</b>	Profesional		

## ANEXO 1.2 : FICHA DATOS ORGANIZACIÓN

### Ficha Agentes Postulantes y Asociados

(Esta ficha debe ser llenada tanto por el Agente Postulante o Ejecutor, como por cada uno de los Agentes Asociados al proyecto)

<b>Tipo de actor en el Proyecto (D)</b>	Agente postulante o Ejecutor		
<b>Nombre de la organización, institución o empresa</b>	Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA)		
<b>RUT de la Organización</b>	61.312.000-9		
<b>Tipo de Organización</b>	Pública	<input checked="" type="checkbox"/>	Privada
<b>Dirección</b>	Fidel Oteiza 1956 Piso 11 y 12, Providencia		
<b>País</b>	Chile		
<b>Región</b>	Metropolitana		
<b>Ciudad o Comuna</b>	Santiago		
<b>Fono</b>	225-2118		
<b>Fax</b>	225-8773		
<b>Email</b>	--		
<b>Web</b>	<a href="http://www.inia.cl">http://www.inia.cl</a>		
<b>Tipo entidad (E)</b>	Institutos de investigación		

(D), (E) : Ver notas al final de este anexo



<b>Tipo de actor en el Proyecto (D)</b>	Agente(s) Asociado(s)		
Nombre de la organización, institución o empresa	AGROCOMERCIAL DEL SUR LTDA.		
<b>RUT de la Organización</b>	77.636.270-0		
<b>Tipo de Organización</b>	Pública	<input type="checkbox"/>	Privada <input checked="" type="checkbox"/>
<b>Dirección</b>	Andrés Bello 870, Of. 7		
País	Chile		
<b>Región</b>	IX Región de La Araucanía		
<b>Ciudad o Comuna</b>	Temuco		
Fono	45-737370		
<b>Fax</b>	45-737370		
<b>Email</b>	adufour@surnet.cl		
Web	--		
<b>Tipo entidad (E)</b>	Empresas productivas y/o de procesamiento		



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACIÓN PARA LA  
INNOVACIÓN AGRARIA

## ANEXO 2

### **MATERIAL DE DIFUSION**



- ❖ Röder, M., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M., Leroy, P. y Ganal, M. (1998). A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149: 2007-2023
- ❖ Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S., Ryan, P., Delhaize, E. y Matsumoto, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* 37(5):645-53.
- ❖ Tixier, M. H., Sourdille, P., Röder, M. Leory, P. y Bernald, M. 1997. Detection of wheat microsatellites using a non radioactive silver-nitrate staining method. *J. Genet. Breed.* 51: 175-177.
- ❖ Waquil P. y Matzenbacher R. (2000). Evaluating the potential impact of research on wheat for acid soils in Brazil. CIMMYT, México DF, México.
- ❖ Van Berloo, R. (1999). GGT: Software for the display of Graphical Genotypes. *The Journal of Heredity* 90:328-329



GOBIERNO DE CHILE  
MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INA - CARILLANCA



# DEPLOYING *TaALMT1* GENE VARIATION IN A CHILEAN EX-SITU COLLECTION OF WHEAT LANDRACES: GENERATION OF NEAR ISOGENIC LINES



GOBIERNO DE CHILE  
FUNDACION PARA LA  
INNOVACION AGRARIA



Mónica MATHIAS<sup>1</sup>, Paola RATHGEB<sup>2</sup> and Javier ZUÑIGA<sup>3</sup>

Unidad de Biotecnología de Plantas (UBP), INIA-Carillanca, Temuco, Chile.  
<sup>1</sup>mmathias@inia.cl, <sup>2</sup>prathgeb@inia.cl, <sup>3</sup>jzuniga@inia.cl

## INTRODUCTION

Aluminum toxicity is an important constraint to wheat (*Triticum aestivum* L.) production in southern Chile. The mechanism that protects wheat roots from aluminum toxicity in acidic soils relies on the Al-induced exudation of malate from the root apex. Allelic variation at the *TaALMT1* gene, located on the 4DL chromosome, control the variation for this trait. In fact, the introgression of functional *TaALMT1* alleles into elite, Al-sensitive genotypes by marker assisted backcross has proven to be an efficient and effective strategy to increase aluminum tolerance in modern wheat varieties (Soto *et al.*, 2007; Mathias *et al.*, 2007a). Breeding for elite Al-tolerant wheat varieties may benefit from the continuous discovery of novel *TaALMT1* alleles in non related germplasms. Wheat landraces (WLR) are valuable genetic resources that can be used to widen the genetic pool of modern cultivars (Dreisigacker *et al.*, 2005). In a previous work, we prospecting variation for *TaALMT1* in an ex-situ collection of Chilean WLR (Mathias *et al.*, 2007a; Figure 1). The results showed that some accessions contained potentially new *TaALMT1* alleles. Since 42% of the accessions were heterogeneous, meaning that it would be possible to identify plants within an accession carrying different alleles in homozygous state, they also represented a valuable source of Near Isogenic Lines (NIL) for *TaALMT1* alleles.

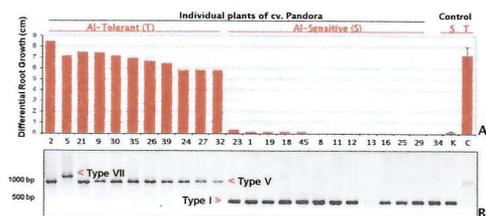


Figure 1. First evidence of heterogeneity for aluminum tolerance in cv. Pandora. A) Differential Root Growth of plants assayed in hydroponic solution (20 µM Al at pH 4.5). Error bars indicate SD of 10 repetitions. B) *TaALMT1* promoter region amplified by PCR. K: cv. Kumpa, Al-sensitive, and C: CAR3911, Al-tolerant. Promoter types are indicated by red arrows. SOURCE: Mathias *et al.* (2009).

## OBJECTIVES

The aim of this work is to report production of NIL sets derived from heterogeneous Chilean WLR accessions, carrying known and potentially new, functional alleles for the *TaALMT1* gene.

## RESULTS AND DISCUSSION

***TaALMT1* promoter region of Chilean WLRs.** The region of the *TaALMT1* gene containing the first kb upstream of the coding sequence shows discrete size polymorphism among different wheat genotypes. The underlying cause is the variation in type and number of specific sequence blocks contained in this region, which has led to their classification into "promoter types" I to VII. These can be recognized by PCR analysis (Sasaki *et al.*, 2006; Mathias *et al.*, 2007b) (Figure 1 and 3). Nine heterogeneous Chilean WLR accessions were analyzed for *TaALMT1* alleles. An additional set of five wheat cultivars were also included for comparison. Most promoter types known to date (I to II, IV to VII) were present in the analyzed genotypes (Table 1).

Table 1. *TaALMT1* promoter region analysis of heterogeneous Chilean wheat cultivars and landraces.

Wheat genotype	Plants carrying <i>TaALMT1</i> promoter types									Total plants (n <sup>o</sup> )	NILs (n <sup>o</sup> )	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX			
<b>Landraces</b>												
Atalaya	-	-	-	-	2 (0.16)	9 (0.53)	2 (0.16)	-	-	-	12	4
Argentino con barba	3 (0.75)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	-
Argentino sin barba	3 (0.75)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
Chinchilla	9 (0.56)	-	-	-	-	4 (0.25)	-	1 (0.62)	2 (0.13)	-	13	4
Futo	6 (0.49)	-	-	-	-	7 (0.53)	-	-	-	-	13	2
Hualtopen	-	-	-	-	1 (0.62)	14 (0.87)	1 (0.62)	-	-	-	16	3
Linaza	-	-	-	-	6 (0.42)	3 (0.21)	5 (0.35)	-	-	-	14	3
Oregon	6 (0.42)	8 (0.57)	-	-	-	-	-	-	-	-	14	2
Regional	-	-	-	-	10 (0.66)	5 (0.33)	-	-	-	-	15	2
<b>Cultivars</b>												
Carahue	3 (0.16)	-	-	-	13 (0.72)	-	-	-	-	2 (0.11)	16	2
Cordelia	-	-	-	-	8 (0.68)	-	-	-	-	1 (0.11)	9	-
Dolmino	100 (1.00)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	-
Madrae	1 (0.11)	-	-	-	8 (0.88)	-	-	-	-	-	9	2
Pantera CI	16 (0.42)	-	-	-	-	18 (0.52)	-	-	-	-	34	2
<b>TOTAL</b>											<b>289</b>	<b>26</b>

\* Heterozygous plants. Values in parenthesis indicate fraction of total plants evaluated.

**NIL sets derived from heterogeneous accessions.** Twenty six NILs differing in *TaALMT1* promoter type were isolated from different heterogeneous wheat landraces of this study. Currently they are being propagated in the greenhouse. The NIL sets will allow us to assess the contribution of specific alleles to the Al-tolerance phenotype. We expect to facilitate the preservation and access to these valuable phylogenetic resources, aiming at increasing the release of aluminum tolerant commercial cultivars in Chile.

## METHODS

Nine Chilean WLR and five cultivars presenting heterogeneity at the promoter region of the *TaALMT1* gene when analyzed by PCR (Sasaki *et al.*, 2006), were selected in a previous study (Mathias *et al.*, 2007). Bulk DNA samples from each accession were assayed by PCR according to Sasaki *et al.* (2006), employing the primer set #4. Plants from bulks amplifying more than one allele were analyzed individually to select out the corresponding isolines. To obtain grain from the different NIL sets, plants were grown in pots in the greenhouse and let to reach maturity under standard practices.

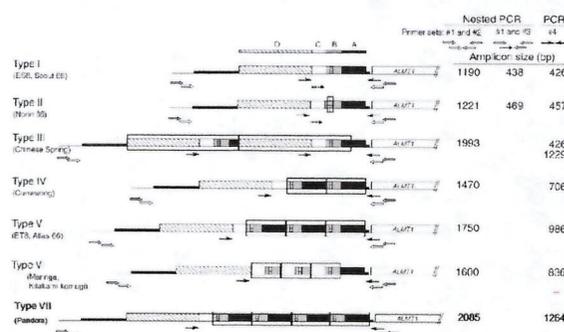


Figure 2. Structural diversity within the first two kb of the *TaALMT1* promoter region. Representative lines possessing the sequence types are included. Adapted from Sasaki *et al.* (2006).

**Evidence for new putative *TaALMT1* promoter types in the WLR sample.** On the basis of their distinctive amplicon size, putatively new *TaALMT1* promoter types were detected in the WLR sample. These were designed as Promoter Types VIII (~1500 bp) and IX (~2000 bp) (Figure 4). Further sequence analysis should permit to describe the promoter structure in detail. Since several studies show *TaALMT1* promoter structure influences the Al-tolerance levels of wheat from diverse origin (Sasaki *et al.*, 2006), we hypothesize that these new alleles could be interesting sources of Al-tolerance to breed Al-tolerant wheat.

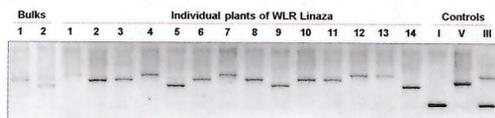


Figure 3. The Chilean wheat landrace Linaza is heterogeneous for *TaALMT1*. Bulks: bulked DNA samples each containing DNA from 10 individuals. 1-14: DNA samples from individuals composing bulks 1 or 2. Roman numerals stand for known *TaALMT1* promoter types I, V and III respectively, according to the nomenclature introduced by Sasaki *et al.* (2006).

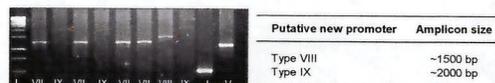


Figure 4. Putative new *TaALMT1* promoter types detected among individuals from the WLR Chinchilla. Roman numerals indicate the respective promoter type. L: ladder 1 kb.

## REFERENCES

Dreisigacker S., Zhang P., Warburton M.L., Skovmand B., Hoisington D., and Melchinger A.E. (2005) *Crop Sci.* 45:653-651.  
 Mathias M., Soto B., Muñoz G., Salvo H., Peñaloza E., and Zúñiga J. (2007a) VI encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria (REDBIO), 22 a 26 octubre 2007, Viña del mar, Chile.  
 Mathias M., Soto B., Muñoz G., and Zúñiga J. (2007b) II Reunión de Biología Vegetal, 5 a 6 noviembre 2007, Casa Central Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.  
 Mathias M., Montenegro A., Peñaloza E., Soto B., and Zúñiga J. 2009. IV Reunión de Biología Vegetal, 14 a 16 octubre 2009, La Serena, Chile.  
 Sasaki T., Ryan P.R., Delhaize E., Hebb D.M., Ogihara Y., Kawaura K., Noda K., Kojima T., Toyoda A., Matsumoto H., et al (2006) *Plant Cell Physiol.* 47: 1343-1354.  
 Soto B., Mathias M., and Zúñiga J. (2007) VI encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria (REDBIO), 22 a 26 octubre 2007, Viña del mar, Chile.

## ACKNOWLEDGMENTS

Competitive Grant FIA-PI-C-2005-3-A-064. Thanks to C. Jobet and G. Marín for seed stocks provided.



## NEAR ISOGENIC LINES DERIVED FROM HETEROGENEOUS BREAD WHEAT VARIETIES: AN ACCESSIBLE TOOL FOR AGRICULTURAL RESEARCH



Javier ZUÑIGA-REBOLLEDO

Unidad de Biotecnología de Plantas (UBP), INIA-Carillanca, Temuco, Chile.  
jzuniga@inia.cl



### INTRODUCTION

Commercial wheat breeding programs employ diverse selection strategies which are mainly based on practical and economical considerations. To fulfill the need for grain availability at the earliest possible stage, bulk selection is often favored over pure line breeding. When bulk selection is applied to populations derived from contrasting parents, the chance of capturing genetic variability for differing characters that are not subjected to direct or indirect selection is high. Hence, derived advanced lines and varieties may be composed of sister lines. These heterogeneous stocks can be subjected to further selection pressure to yield pure lines respect to the new, differing character being considered. The fact that bulk selection is applied at some stage for visually scored characters such as plant phenology, morphology and disease resistance, implies that a high proportion of genes are shared by the lines and thus can be considered as Near Isogenic Lines (NILs). NILs are valuable research tools because they provide the unique opportunity to test for gene effects without confounding effects from genetic background. NILs are commonly created by backcrossing and have been employed in mapping, genomic, cytogenetic and physiological studies (Harris and Taylor, 2004; Houde and Diallo, 2008).

### OBJECTIVES

The aims of the present work are to report the discovery of heterogeneous wheat varieties among Chilean germplasm and its successful utilization to derive NILs stocks for important characters such as bread-making quality and plant adaptation.

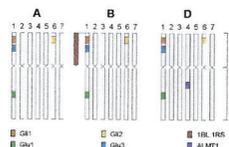


Figure 1. The haploid chromosome complement of modern bread wheat (*Triticum aestivum* L., 2n=42) consists of three homeologous genomes designated A, B and D, each including seven chromosomes (n=21). The genes associated to the loci genotyped in this work are distributed on 14 chromosome regions thus being highly informative regarding genetic uniformity of a given seed lot.

Heterogeneous wheat varieties can be a source of NILs differing in quality and adaptation. The use of pure line breeding is not always feasible because of time and resource constraints. The use of bulk selection at early stages of cultivar development in the absence of sufficient direct or indirect selective pressure can produce heterogeneous advanced lines and varieties. This represents an excellent opportunity to turn underscored genetic resources into valuable NILs for research. From a plant breeding perspective however, it may lead to incomplete deployment of the genetic potential of the crosses (Figures 5 and 6, Tables 2, 3 and 4).

Table 2. Industrial quality profile for Rupanco-INIA isolines.

Isoline	Protein (14% basis)	Wet Gluten (%)	Gluten Index (%)	Sedimentation (ml)	Stability (mm)	Decay (UB)
1/7+9/5+10	11.5	28.3	84.0	39.0	5.7	90
1/17+18/5+10	10.8	26.7	89.0	37.9	6.2	70
1/7+9/2+12	10.4	29.5	71.0	28.6	3.2	135
1/17+18/2+12	10.5	32.2	73.0	27.5	4.5	140

Values are average from 2 determinations.

### RESULTS AND DISCUSSION

Selected Chilean bread wheat varieties are heterogeneous. The four varieties were heterogeneous for one or more loci and contained from two to six isolines. The rest of the assayed loci remained homogeneous. (Figures 2, 3 and 4; Table 1).



Figure 2. High Molecular Weight Glutenin isolines in Dollicco-INIA (left) and Rupanco-INIA (right). GluB1 allelic protein bands are identified by green and blue arrowheads (7+9 and 14+15 on the left panel, 7+9 and 17+18 on the right panel). GluD1 alleles are indicated by red and yellow arrowheads (2+12 and 5+10 on the right panel).

Figure 3. Prolamin and Low Molecular Weight Glutenin isolines in Dalcachue-INIA. Left top: The characteristic secalin block at the ω-gliadin zone is present in isolines carrying the 1BL.1RS translocation (T). Left bottom: RIS1/Xpsp3000 co-amplification was equally effective to distinguish 1BL.1RS from 1BL.1BS isolines. Right: Six patterns of Low Molecular Weight Glutenin could be distinguished by SDS-PAGE among lines not carrying (NT) or carrying (T) the 1BL.1RS translocation.

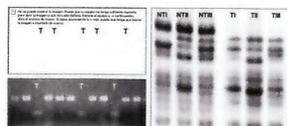


Figure 4. *TaALMT1* isolines in Pandora-INIA. The three different alleles were recognized on the basis of the amplicon size after Sasaki *et al.* (2006). ET8 and ES8 are tolerant and sensible control genotypes, respectively.

Table 3. Industrial quality profile for Dollicco-INIA isolines.

Isoline	Protein (14% basis)	Wet Gluten (%)	Gluten Index (%)	Sedimentation (ml)	Stability (mm)	Decay (UB)	W (x 10 <sup>-4</sup> Joule)	P/L (mm)
1/14+15/2+12	10.8	34.5	78.2	40.4	12.5	40	170	0.81
1/7+9/2+12	10.9	32.6	89.2	48.8	23.0	25	214	0.72

Values are average from 2 determinations.

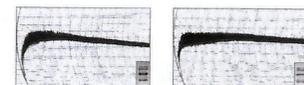


Figure 5. Farinographic curves obtained from Dollicco isolines 1/14+15/2+12 (left) and 1/7+9/2+12 (right). The isolate containing HMW glutenin subunit 7+9 shows more farinographic stability and less decay.

Table 4. Industrial quality profile for Dalcachue-INIA isolines.

Isoline	Protein (14% basis)	Wet Gluten (%)	Gluten Index (%)	Sedimentation (ml)	Stability (mm)	Decay (UB)
TI	11.3	32.4	73.8	25.4	5.5	111
NTI	10.9	33.1	69.0	31.6	8.9	88

Values are average from 2 determinations.

Table 1. Isoline composition of selected Chilean bread wheat varieties.

Wheat Genotype	Analyzed Plants	Isoline Frequency						Pure Isolines	Differing Loci
		1	2	3	4	5	6		
Dollicco-INIA	100	0.71	0.29	-	-	-	-	2	<i>GluB1</i>
Pandora-INIA	26	0.58	0.38	0.04	-	-	-	3	<i>ALMT1</i>
Rupanco-INIA	174	0.30	0.28	0.26	0.16	-	-	4	<i>GluB1</i> , <i>GluD1</i>
Dalcachue-INIA	45	0.40	0.22	0.13	0.07	0.07	0.02	6	<i>Glu3</i> , <i>Glf</i>

### METHODS

Seed stocks from wheat bread varieties Dalcachue-INIA, Dollicco-INIA, Pandora-INIA and Rupanco-INIA were obtained from the National Wheat Breeding Program (INIA). Heterogeneity for grain reserve proteins was demonstrated by glutenin analysis (Singh *et al.*, 1991) on bulk grain samples. Heterogeneity for the 1BL.1RS translocation was demonstrated on bulk DNA samples by RIS1 and Xpsp3000 PCR amplification (Koeber, 1995; Devos *et al.*, 1995) or by gliadin A-PAGE analysis (ISO, 1993) on bulk grain samples. Heterogeneity for *TaALMT1* gene was demonstrated on bulk DNA samples by ALMT4 PCR amplification (Sasaki *et al.*, 2006). Isoline separation and seed increase was done at the UBP facility. Preliminary field evaluations for agronomic performance and bread-making quality were carried on Dalcachue (Carrasco, 2005; Medina, 2006) and Rupanco (Zúñiga and Hewstone, unpublished data) NILs. Dollicco NILs were evaluated for agronomic performance and bread-making quality during 2007 and 2008. Pandora NILs were tested for aluminum tolerance under hydroponics culture (Mathias *et al.*, 2007).

### REMARKS

Genotyping of additional varieties or advanced materials may provide new isolines for research. In order to realize the full genetic potential of the crosses, programs aimed at increasing quality and adaptation to acid soils should recognize advanced lines that are heterogeneous for key loci before they are submitted to regional yield trials.

### REFERENCES

Harris N.S. and Taylor G.J. (2004) Cadmium uptake and translocation in seedlings of near isogenic lines of durum wheat that differ in grain cadmium accumulation. *BMC Plant Biology* 4:4  
 Houde M. and Diallo A.O. (2006) Identification of genes and pathways associated with aluminum stress and tolerance using transcriptome profiling of wheat near-isogenic lines. *BMC Genomics* 9:400  
 Carrasco T. (2005) Evaluación del efecto de la translocación (1BL/1RS) trigeno/centeno sobre algunos parámetros de calidad industrial en trigo Dalcachue-INIA (*Triticum aestivum* L.). Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile  
 Mathias M., Soto B., Muñoz G. and Zúñiga, J. (2007) Identification of a new *ALMT1* gene promoter allele conferring aluminum tolerance to wheat: advances on its molecular and functional characterization. II Reunión de Biología Vegetal, 5 a 8 noviembre 2008, Casa Central Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

### ACKNOWLEDGMENTS

Competitive Grants FIA PI-C-2005-3-A-064, FONDEF D981074 and CCA2009 MINAGRI. Thanks to C. Jobet and C. Hewstone for seed stocks provided, and to P. Ratzgeb, M. Mathias, M. Meli, L. Vera, R. Fulle and G. Marín for their helpful assistance.



# INTROGRESIÓN DEL GEN *ALMT-1* QUE CONFIERE TOLERANCIA A ALUMINIO FITOTÓXICO EN TRIGO MEDIANTE “GENE ASSISTED SELECTION Y GRAPHICAL GENOTYPING”



Braulio Soto, Mónica Mathias, Javier Zuñiga, Haroldo Salvo-G., Enrique Peñaloza y Paula Mora.

Unidad de Biotecnología INIA-Carillanca

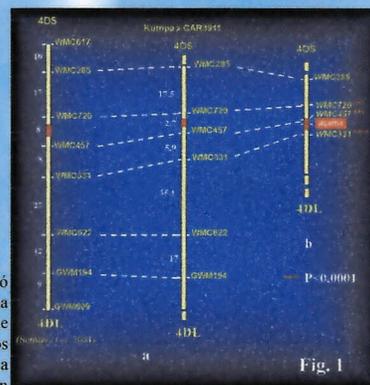
Autor por correspondencia: hsalvo@inia.cl

## INTRODUCCIÓN

Los suelos ácidos con presencia de aluminio fitotóxico ( $Al^{3+}$ ) son uno de los factores más limitantes para la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.). En Chile estos suelos se distribuyen en la zona centro-sur y sur del país en donde el problema se ha enfrentado mediante la aplicación de enmiendas calcáreas, cuya eficacia queda condicionada a los primeros centímetros del suelo. El mejoramiento genético unido a adecuadas prácticas agronómicas representa una solución más efectiva para incrementar la productividad de trigo en suelos ácidos. Recientemente, se clonó el gen *ALMT-1* (*Al-activated malate transporter*) que confiere tolerancia a  $Al^{3+}$  mediante la exudación radical de malato, localizado en el cromosoma 4DL, permitiendo aplicar una estrategia de “Al-Gene Assited Selection”. En este trabajo se presenta el desarrollo de un mapa de ligamiento genético en el cromosoma 4D para asociar marcadores SSR al gen *ALMT-1* y evaluar la aplicación de GAS-BC y/o MAS-BC en poblaciones de retrocruzamiento de trigo.

## MATERIAL Y METODOS

Se construyó una población de mapeo  $F_2$  a partir de la cruce de Kumpa-INIA x CAR3911, la cual se caracterizó de acuerdo a la tolerancia a  $Al^{3+}$  en solución nutritiva mediante “pulse-recovery” (Raman et al. 2002). El mapa de ligamiento genético se desarrolló utilizando como referencia 13 marcadores SSR en 4D del mapa de consenso de Somers, et al. (2004). Para el análisis de ligamiento genético se utilizó JoinMap 2.0, agrupando los marcadores con valores de “LOD score” de 1 a 5 y transformando los valores de recombinación genética a cM a través de la función de Kosambi (1944). Para identificar SSRs ligados al gen *ALMT-1* en 4DL se aplicó un análisis de varianza de una vía y posteriormente BSA (Michelmore et al. 1991). Para evaluar la aplicación de GAS se utilizó un partidor CAPS de la región codificante del gen *ALMT-1*. Para determinar polimorfismos genéticos entre los parentales, los productos PCR fueron digeridos con la enzima *XmnI* (Sasaki et al. 2004), en Kumpa-INIA, CAR3911 y los controles Carazhino, ET8 y ES8. Para la introgresión del gen *ALMT-1* se desarrollaron poblaciones de retrocruzamiento aplicando un esquema de GAS-BC y/o MAS-BC y graphical genotype para estimar el porcentaje de genoma elite y seleccionar individuos recombinantes en *ALMT-1*.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la población  $F_2$  se observó una segregación mendeliana 1:2:1, confirmando el control monogénico de la tolerancia en CAR3911. Lo anterior también se observó en poblaciones BC donde la tolerancia segregó 1:1. Un total de 7 SSR polimórficos fueron utilizados para desarrollar el mapa de ligamiento genético en 4D. La sintenia de los SSRs fue similar a otros mapas en 4D (Figura 1a) (Somers et al., 2004). Los SSRs WMC331 y WMC457 mostraron la mayor asociación con la variación fenotípica de la tolerancia ( $P < 0.0001$ ) (Figura 1b). La PCR para *ALMT-1*, generó un fragmento de 107 bp en Kumpa-INIA, CAR3911, Carazhino, ET8 y ES8 (Sasaki, et al. 2004). La digestión con *XmnI* generó dos fragmentos de 57 y 50 bp en ES8 característicos en los genotipos sensibles a  $Al^{3+}$  y ausencia de digestión en ET8, Carazhino y CAR3911 (107 bp) observado en los genotipos tolerantes (Figura 2). Sin embargo, no se observó digestión en Kumpa-INIA (sensible), lo que sugiere que en este cultivar existiría una mutación diferente en la región codificante de *ALMT-1* que carece del sitio *XmnI* presente en ES8. El mismo polimorfismo ocurre entre el cultivar Atlas 66 (tolerante) y Scout 66 (sensible). Sin embargo, el grado de polimorfismo genético aún es bajo para diferenciar un mayor número de genotipos contrastantes lo que



## Introgresión del gen *ALMT-1*

Se evaluó hidropónicamente una población BC<sub>1</sub> de 70 individuos, la cual segregó 1:1 para la tolerancia. Utilizando los marcadores WMC457 y WMC331, de mayor ligamiento genético se introgresó la región genómica que contiene al gen *ALMT-1* (Figura 3a).

## Recuperación de genoma elite en cromosoma 4D

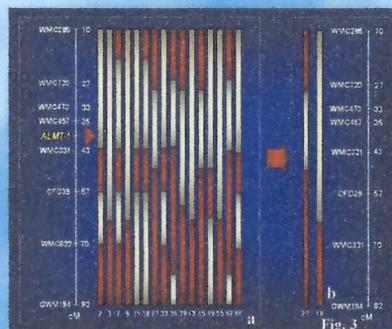
Utilizando el mapa de ligamiento genético construido en 4D, se estimó en las líneas recombinantes tolerantes los porcentajes de recuperación de genoma elite y la presencia de eventos de recombinación cercanos al gen *ALMT-1*. Las líneas BC<sub>1-21</sub> y BC<sub>1-45</sub> presentaron un 72,2 % de recuperación y se seleccionaron para un análisis profundo en los 21 grupos de ligamiento con 100 SSRs de manera de estimar la recuperación total de genoma elite bajo un esquema de MAS-BC (Frisch, et al.1999) y generar la próxima generación BC<sub>2</sub>. La línea BC<sub>1-49</sub> recuperó sólo un 18,8% con eventos de recombinación en los SSRs WMC622 y GWB194 (Figura 3b).

## Proyecciones

Se evaluarán otros marcadores generados a partir de la región promotora “upstream” del gen *ALMT-1* cuya caracterización molecular indicaría un mayor grado de polimorfismo entre genotipos contrastantes y eventualmente aplicar la estrategia GAS. Se continuará analizando el resto del genoma en las líneas recombinantes BC<sub>1</sub> en los 21 grupos de ligamiento mediante MAS-BC y GG de manera de seleccionar los individuos con mayor proporción de genoma elite y a partir de estos desarrollar la población BC<sub>2</sub>. Se proyecta que en BC<sub>3</sub> se alcanzará al menos un 90% de genoma elite recuperado llevando las líneas al estado homocigoto para *ALMT-1*. Se liberará una variedad elite tolerante a  $Al^{3+}$  que podrá utilizarse como parental donante en los programas de mejoramiento genético del país.

## Bibliografía

- Frisch et al., 1999. Crop Science. 39: 1295-1301
- Raman et al., 2002. Theoretical and Applied Genetics. 105: 458-464
- Somers et al., 2004. Theoretical and Applied Genetics. 109: 1105-1104
- Michelmore et al., 1991. PNAS. 88: 9828-9832
- Sasaki et al., 2004. The Plant Journal. 37: 645-653
- Raman et al., 2005. Genome. 48: 781-791
- Sasaki et al., 2006. Plant and Cell Physiology. Online ISSN 1471-9053



# FORMULARIO DE INSCRIPCIÓN DE TRABAJOS

57° CONGRESO AGRONÓMICO DE CHILE  
7° CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE FRUTICULTURA  
3<sup>er</sup> CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE HORTICULTURA

17 al 20 de octubre de 2006  
Santiago – Chile

Expositor: Braulio Soto Cerda

Institución o Empresa: INIA Carillanca

Dirección: Casilla 58-D Temuco

Teléfono: 45-215706

Fax: 45-216112

E-mail: [bsoto@inia.cl](mailto:bsoto@inia.cl)

Presentación	Oral		Poster	x
--------------	------	--	--------	---

\* marque con una X el tipo de Presentación que realizará.

Área temática del trabajo: cultivos anuales, trigo, estrés abiótico, biotecnología aplicada.

Necesidad de elementos audiovisuales:

Data show*		Retroproyector		Proyector diapositivas	
------------	--	----------------	--	------------------------	--

\* marque con una X el elemento audiovisual que utilizará, de preferencia Data Show

## **Introgresión de un gen que confiere tolerancia a aluminio fitotóxico en trigo (*Triticum aestivum* L.) mediante Gene Assisted Selection y Graphical Genotyping**

Soto B., Mathias M., Zúñiga J., Salvo G., Peñaloza E. y Mora P.

INIA Carillanca, Unidad de Biotecnología, Temuco. [hsalvo@inia.cl](mailto:hsalvo@inia.cl)

El aluminio fitotóxico ( $Al^{3+}$ ) presente en los suelos ácidos de las zonas centro sur y sur de Chile, es uno de los factores que limita seriamente la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.) y otros cultivos. Aunque existe consenso en que la opción más sustentable para paliar los efectos de este estrés es el uso de variedades de trigo tolerantes en conjunto con el manejo agronómico, en Chile aún no existen variedades tolerantes. Nuestro grupo ha caracterizado y seleccionado líneas de trigo de alta tolerancia, útiles en el desarrollo de variedades adaptadas. Con este objetivo, se mapeó la región genómica asociada a la tolerancia a aluminio fitotóxico en la línea CAR3911. El análisis de mapeo comparativo demostró que la región genómica involucrada coincide con la posición del gen *ALMT1* mapeado en otras variedades, cuya variación ha sido recientemente asociada a la tolerancia a aluminio fitotóxico. La región genómica que contiene el gen *ALMT1* de la línea CAR3911, se está introgresando en variedades de trigo altamente productivas pero sensibles al estrés, a través de una estrategia GAS que combina la selección directa de genes con genotipificación gráfica para recuperar con una alta eficiencia el background genético de las líneas receptoras.

Agradecimientos: Fundación para la Innovación Agraria (FIA), INIA y CGNA (Consortio de Genómica Nutricional Agroacuicola)

# Introgresión de un gen para alto contenido proteico en variedades adaptadas de trigo (*Triticum aestivum* L.) mediante Marker Assisted Backcrossing y Graphical Genotyping.

Javier Zúñiga, Mónica Mathias, Braulio Soto y Haroldo Salvo.

INIA Carillanca, Unidad de Biotecnología, Temuco.

E-mail: [jzuniga@inia.cl](mailto:jzuniga@inia.cl)

## I INTRODUCCIÓN

Uno de los principales atributos de calidad nutricional e industrial del trigo es el contenido de proteína del grano (GPC). El progreso en el mejoramiento genético de éste carácter ha sido modesto debido a la escasa variabilidad genética del germoplasma elite y a su correlación negativa con el rendimiento. *Gpc-B1* es un gen que ha sido introgresado en trigo tetraploide y hexaploide desde *T. turgidum* var. *dicoccoides*, que incrementa el contenido de proteína del grano sin afectar el rendimiento, siendo por tanto una fuente atractiva de variabilidad genética para el mejoramiento de GPC (Distelfeld *et al.*, 2006). Con el objeto de validar su efecto bajo las condiciones de alta productividad de las zonas centro-sur y sur de Chile, nuestro grupo inició la introgresión de *Gpc-B1* desde la línea donante Yecora Rojo-Gpc-B1 en dos cultivares receptores elite adaptados, Pandora-INIA y Kumpa-INIA de hábito primavera-vernal e invernal, respectivamente. La estrategia de selección asistida por marcadores moleculares en poblaciones de retrocruzamiento (MAS-BC) (Frisch *et al.*, 1999) en conjunto con Graphical Genotyping (GG), está permitiendo detectar los individuos más interesantes desde el punto de vista de la introgresión de *Gpc-B1* y del avance en la recuperación de genoma elite. A continuación se detalla el avance obtenido en la introgresión del gen de alta proteína en el cultivar Pandora-INIA.

## III RESULTADOS

**Avance en la introgresión de *Gpc-B1* en el cultivar Pandora.** La población BC<sub>1</sub> Pandora x Yecora Rojo-Gpc-B1 (n=132), presentó 33 individuos portadores de la región *Gpc-B1* de Yecora Rojo. El análisis con SSRs ubicados a 2 cM rodeando *Gpc-B1* asegura la introgresión de todos los componentes genéticos de interés que causarían el aumento en el porcentaje de proteína del grano. Desde el punto de vista de recuperación de genoma elite en el cromosoma portador 6B, sólo 12 individuos presentan eventos de recombinación interesantes por lo que fueron seleccionados para la evaluación del resto del genoma junto a seis plantas de resguardo (Cuadro 1). En la Figura 1, se muestra el mayor avance genético logrado por las líneas BC<sub>2</sub> 19, 28 y 10, las cuales superaron el promedio de la población. Hasta el momento, sólo la población BC<sub>2</sub>-19 (n=33) ha sido evaluada y los resultados muestran que la mitad de la descendencia es portadora de *Gpc-B1* y de sus extremos (Figura 2). En la Figura 3, se muestra el Graphical Genotype de la línea BC<sub>2</sub>-19 y en la Figura 4, el avance en la recuperación de genoma elite en cromosoma 6B logrado por sus descendientes BC<sub>2</sub>, donde sólo dos individuos son superiores. En el futuro se espera encontrar, dentro de las otras poblaciones BC<sub>2</sub> generadas, nuevos recombinantes en torno a *Gpc-B1* y en el total del genoma, para la generación de poblaciones BC<sub>3</sub>.

**Precisión de la estrategia.** Desde el punto de vista de los resultados genéticos obtenidos, el valor promedio estimado de recuperación de genoma elite en BC<sub>2</sub> fue inferior a lo teórico esperado para este tipo de población, 42% versus 75%. Lo anterior, se debe a que el número de SSRs polimórficos disponibles en el laboratorio sólo cubrieron un 74% del genoma (Cuadro 2). Con la introducción de 36 nuevos SSRs se espera tener una estimación genética más precisa, similar a lo observado en otras poblaciones estudiadas con mayor cobertura genómica.

La utilización de este tipo de metodología es pionera en Chile y claramente muestra las ventajas del análisis genético molecular como herramienta de selección. Las cifras muestran que es posible reducir sobre un 90% el tamaño de las poblaciones en estudio (Cuadro 1), lo que a su vez permite reducir costos de análisis y requerimientos de infraestructura incrementando la eficiencia en la generación de nuevas variedades.

Cuadro 1. Avance en la selección de individuos superiores utilizando la estrategia MAS-BC y GG.

Población	Individuos (n)	Criterios de selección		
		Selección I (QTL <i>Gpc-B1</i> )	Selección II (Recuperación % 6B)	Selección III (Recuperación genoma)
F <sub>2</sub>	100	-	-	-
BC <sub>1</sub>	132	33	18	3
BC <sub>2</sub>	303	15	2	-
M.M.	-	3	8	95

(M.M.) Marcadores moleculares utilizados y (%) cromosoma.

Cuadro 2. Precisión de la estrategia MAS-BC y GG en la población Pandora x Yecora Rojo-Gpc-B1.

Características generales (Pandora x Yecora Rojo)	Genomas analizados			Total
	A	B	D	
SSRs disponibles laboratorio	91	102	106	305
SSRs polimórficos	46	61	59	166
SSRs utilizados	33	39	28	100
Densidad media SSRs (cM/SSR)	22,1	15,88	24,58	20,8
Cobertura de genoma (cM)	663	556	690	1909
Cobertura de genoma (%)	70,2	65,6	83,6	71,8*

(\*) valor promedio

## II MATERIAL Y METODOS

Las poblaciones F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> y BC<sub>2</sub> fueron generadas a través de cruzamientos dirigidos. La mantención de plantas se realizó bajo invernadero climatizado en condiciones estándares de fertilización y riego. La extracción de ADN de cada individuo se realizó a partir de hojas frescas utilizando el método de lisis alcalina de Paris y Carter (2001) y el convencional descrito por Fulton *et al.* (1995). Para asistir la introgresión de *Gpc-B1*, se utilizó el marcador Xuhw89 (Distelfeld *et al.*, 2006) ligado a 0,1 cM del gen y los SSRs GWM508 y GWM193 mapeados a 2 cM (Somers *et al.*, 2004). La recuperación de genoma elite fue monitoreada mediante el análisis de 100 SSRs separados a 20 cM entre sí. Se utilizaron las condiciones de PCR contenidas en base de datos de Grain genes (2006), los productos PCR fueron separados en geles de secuenciación de poli-acrilamida al 6% y fueron visualizados a través de tinción con nitrato de plata. Finalmente, los datos fueron ingresados en una matriz y analizados con el software GGT 2006.

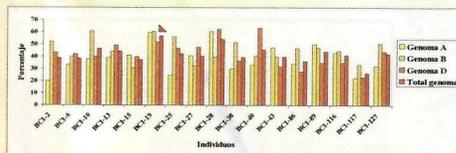


Figura 1. Avance en la recuperación de genoma elite en población BC<sub>2</sub> Pandora x Yecora Rojo-Gpc-B1. (▲) Individuo con mayor porcentaje de genoma elite recuperado seleccionado para producción de población BC<sub>3</sub>.

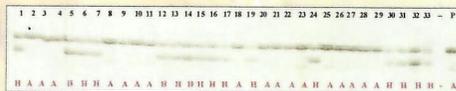


Figura 2. Detección de la introgresión de *Gpc-B1* en población BC<sub>2</sub> a través del marcador ligado Xuhw89. (1-33) Descendientes BC<sub>2</sub> planta 19 Pandora x Yecora Rojo-Gpc-B1, (P) Pandora-INIA, (H) Yecora Rojo-Gpc-B1, (A) genotipo receptor, (H) genotipo donante, (H) genotipo heterocigoto portador de *Gpc-B1*.

## IV CONCLUSIONES

Hasta el momento, la estrategia MAS-BC en conjunto con GG, ha permitido seleccionar dos individuos BC<sub>2</sub> que presentan mayor porcentaje de genoma elite recuperado y que contienen la región genómica *Gpc-B1* introgresada.

La estrategia de selección utilizada permite reducir el tamaño de las poblaciones en estudio y el volumen de trabajo en valores superiores al 90%, facilitando la tarea de identificación de individuos superiores.

Los resultados sugieren que en el futuro cereano será posible contar con materiales BC<sub>3</sub> de alto nivel en cuanto a su mayor contenido de proteína del grano y recuperación de genoma elite de Pandora.

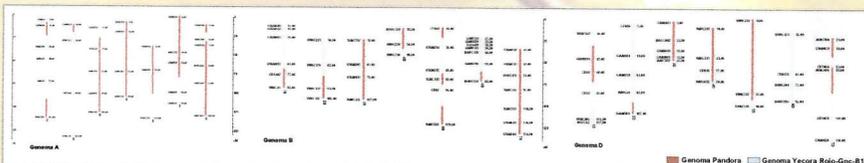


Figura 3. Graphical genotype elaborado para el individuo BC<sub>2</sub> 19 Pandora x Yecora Rojo-Gpc-B1, portador de *Gpc-B1* y superior en recuperación de genoma elite.

## V BIBLIOGRAFÍA

Distelfeld, A., C. Uauy, T. Fahima, and J. Dubcovsky. 2006. Physical map of the wheat high-grain protein content gene *Gpc-B1* and development of a high-throughput molecular marker. *New Phytol.* 169(4):753-63.

Frisch, M., M. Bohn, and A.E. Melchinger. 1999. Comparison of Selection Strategies for Marker-Assisted Backcrossing of a Gene. *Crop Science* 39:1295-1301.

Fulton, T. M., J. Chunwongse, and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Report* 13: 207-209.

Paris, M. y M. Carter. 2000. Cereal DNA: A rapid High-Throughput Extraction Method for Marker Assisted Selection. *Plant Molecular Biology Reporter*. 18:357-360.

Roder, M., V. Korzun, K. Wendebake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy, and M.W. Ganal. 1998. A Microsatellite Map of Wheat. *Genetics* 149:2007-2023.

Grain Genes: a database for Triticaceae and Avena. 2006. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.html>

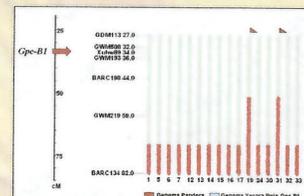


Figura 4. Recuperación de genoma elite en cromosoma 6B en individuos BC<sub>2</sub> portadores de *Gpc-B1* originados a partir de la línea 19. (1-33) descendientes BC<sub>2</sub> y (▲) individuos BC<sub>2</sub> seleccionados para generar poblaciones BC<sub>3</sub>.

## Agradecimientos

Trabajo financiado con fondos aportados por Fundación para la Innovación Agraria-FIA Proyecto FIA-PLC-2005-3-4-064

# FORMULARIO DE INSCRIPCIÓN DE TRABAJOS

57° CONGRESO AGRONÓMICO DE CHILE  
7° CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE FRUTICULTURA  
3<sup>er</sup> CONGRESO SOCIEDAD CHILENA DE HORTICULTURA

17 al 20 de octubre de 2006

Santiago – Chile

Expositor: Javier Zúñiga Rebolledo

Institución o Empresa: INIA Carillanca

Dirección: Casilla 58-D Temuco

Teléfono: 45-215706

Fax: 45-216112

E-mail: [jzuniga@inia.cl](mailto:jzuniga@inia.cl)

Presentación	Oral	Poster	x
--------------	------	--------	---

\* marque con una X el tipo de Presentación que realizará.

Área temática del trabajo: cultivos anuales, trigo, calidad, biotecnología aplicada.

Necesidad de elementos audiovisuales:

Data show*	Retroproyector	Proyector diapositivas
------------	----------------	------------------------

\* marque con una X el elemento audiovisual que utilizará, de preferencia Data Show

## **Introgresión de un gen para alto contenido proteico en variedades adaptadas de trigo (*Triticum aestivum* L.) mediante Marker Assisted Backcrossing y Graphical Genotyping.**

Zúñiga J., Mathias M., Soto B., y Salvo-G. H.

INIA Carillanca, Unidad de Biotecnología, Temuco. [jzuniga@inia.cl](mailto:jzuniga@inia.cl)

Uno de los principales atributos de calidad nutricional e industrial del trigo es el contenido de proteína del grano (GPC). El progreso en el mejoramiento genético de este carácter ha sido modesto debido a la escasa variabilidad genética del germoplasma elite y a su correlación negativa con el rendimiento. *Gpc-B1* es un gen que ha sido introgresado en trigo tetraploide y hexaploide desde *T. turgidum* var. *diccocooides*, que incrementa el contenido de proteína del grano sin afectar el rendimiento, siendo por tanto una fuente atractiva de variabilidad genética para el mejoramiento del GPC. Con el objeto de validar su efecto bajo las condiciones de alta productividad de las zonas centro-sur y sur de Chile, nuestro grupo inició la introgresión del gen en trigos elite mediante retrocruzas asistidas por marcadores (MA-BC) y genotipificación gráfica (GG). Para estos efectos, se desarrollaron poblaciones de retrocruzas entre la línea donante Yecora Rojo-*Gpc-B1* y diversos cultivares. La selección de individuos portadores del gen se realizó en base a marcadores ligados a 0.1 cM del gen, y la recuperación del genoma elite se monitoreó mediante el análisis de 100 microsatélites polimórficos distribuidos a intervalos aproximados de 20 cM, en los 21 grupos de ligamiento. La evaluación de la población BC<sub>1</sub> de la cruce Pandora-INIA x Yecora Rojo-*Gpc-B1* reveló que un 10% de los individuos segregantes presentaron porcentajes de recuperación del genoma elite superiores a lo esperado. Este avance indica una rápida y eficiente recuperación del genoma elite y la introgresión del gen *Gpc-B1* necesitará un número menor de retrocruzas que las requeridas por la estrategia convencional.

## RESUMEN Nº 705

### Validation and Application of the *ALMT1* Promoter Region Marker to Introgress Aluminum Tolerance into Elite Wheat Genetic Backgrounds

Braulio Soto<sup>§</sup>, Mónica Mathias, Enrique Peñaloza, Haroldo Salvo-G and Javier Zúñiga

Unidad de Biotecnología de Plantas, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

<sup>§</sup> Author for correspondence: bsoto@inia.cl

Wheat (*Triticum aestivum* L.) production in the south of Chile occurs in acid soils characterized by fitotoxic aluminum ( $Al^{3+}$ ) concentrations that reduce the productivity of this species by 50%. The use of Al-tolerant cultivars is a cost-effective alternative to improve wheat production in acid soils. However, the lack of reliable molecular markers for this trait has hampered the use of MAS-based strategies to breed for Al-tolerance in wheat. Recently, the sequence variation at the promoter of the *ALMT1* gene from wheat was associated to different levels of Al-stimulated malate efflux from root apices and Al-tolerance, providing a potentially useful genetic marker to fasten the development of new Al-tolerant cultivars. In this work we report the validation and use of the *ALMT1* gene promoter marker to assist the transfer of the Al-tolerance gene from the line INIA-CAR3911 to the cultivar Kumpa-INIA, via marker assisted backcross. Kumpa-INIA and INIA-CAR3911 have Al-tolerance levels similar to the reference lines ES8 and ET8, respectively. The PCR assay for *ALMT1* promoter type showed that Kumpa-INIA and INIA-CAR3911 had promoter types I and V, respectively. Root re-growth measures in the INIA-CAR3911 x Kumpa-INIA  $F_2$  population (170 individuals), showed that a single locus controlled Al-tolerance in this cross. Linkage analysis showed that *ALMT1* promoter type and root re-growth co-segregated completely in this population. In a  $BC_1$  population derived from a cross between the same parents, both root re-growth phenotypic assay and *ALMT1* PCR assay were equally effective in selecting the heterozygous individuals for further backcrossing. The incorporation of the *ALMT1* gene promoter marker to ongoing backcrossing efforts will facilitate the development of wheat cultivars with enhanced Al-tolerance.

This work was funded by Fundación para la Innovación Agraria (FIA - Chile), through competitive grant FIA-PI-C-2005-1-A-064.

## RESUMEN N°578

### **Allelic Variability at the *ALMT1* Gene Promoter in a Collection of Wheat Cultivars and Landraces Grown In Chile**

Mónica Mathias<sup>1</sup>, Braulio Soto<sup>1</sup>, Claudio Jobet<sup>2</sup>, Enrique Peñaloza<sup>1</sup>, Haroldo Salvo<sup>1</sup> and Javier Zúñiga<sup>1,§</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología de Plantas, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

<sup>2</sup> Programa Nacional de Trigo, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

§ Author for correspondence: [jjuniga@inia.cl](mailto:jjuniga@inia.cl)

The wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene encodes an Al-activated malate transporter that controls the Al-activated malate efflux from root apices. This mechanism accounts for most of the tolerance response to aluminum stress in wheat, and *ALMT1* is thus regarded as the main gene controlling Al-tolerance in this species. Sequence variation, occurring within the first 1000 bp of the *ALMT1* gene promoter region, has been linked to different levels of Al-activated malate efflux from root apices and Al-tolerance in different wheat germplasm. In this work we describe the sequence variability present at the *ALMT1* gene promoter region in wheats grown in Chile. A set of 42 cultivars, released since 1920, and 28 landraces were assayed for *ALMT1* promoter sequence type (*ALMT1* promoter type or *ALMT1* allele). Seed samples were obtained from the National Bank Germplasm maintained by INIA-Chile. *ALMT1* promoter types were determined by PCR on bulked-DNA samples, and a set of varieties and lines representing the six reported *ALMT1* promoter types (I to VI) were employed as reference. Just four of the six previously described promoter types were detected in the Chilean germplasm analyzed. A new promoter type of about 1100 bp, tentatively named Type VII, was detected in four accessions. The bulked-DNA analysis strategy allowed the detection of 16 accessions that were heterogeneous for the *ALMT1* locus, three of which possessing up to three different *ALMT1* alleles. The phenotypic characterization of individuals from a heterogeneous cultivar showed that plants possessing the Type I promoter had Al-tolerance levels similar to the ES8 sensible line, while those harboring Type V, or the novel Type VII promoter we found, were similar in phenotype to the ET8 tolerant line. The variability found might be exploited to breed new wheat Al-tolerant cultivars and complement the current strategies to deal with aluminum stress under acidic soils in Chile.

This work was funded by Fundación para la Innovación Agraria (FIA - Chile), through competitive grant FIA-PI-C-2005-1-A-064. We are grateful to P. Rathgeb, L. Díaz, P. Andrade, E. Melgarejo, A. Acosta and G. Marín for their excellent technical assistance to this work.

## IDENTIFICATION OF A NEW *ALMT1* GENE PROMOTER ALLELE CONFERRING ALUMINUM TOLERANCE TO WHEAT: ADVANCES ON ITS MOLECULAR AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

MONICA MATHIAS, BRAULIO SOTO, GASTÓN MUÑOZ AND JAVIER ZÚÑIGA<sup>§</sup>

Unidad de Biotecnología de Plantas, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

§: corresponding author: [jzuniga@inia.cl](mailto:jzuniga@inia.cl)

### ABSTRACT

Aluminum toxicity in acid soils prevailing in the central and south regions of Chile severely limits the productivity of wheat. The allelic variability at the promoter of the *ALMT1* gene, which encodes an aluminum activated malate transporter, has been linked to increased levels of malate exudation and aluminum tolerance in wheat. We studied the frequency of the six previously reported *ALMT1* promoter alleles in a collection of 76 wheat cultivars and landraces grown in Chile. A new allele, designated as Type VII, was discovered in the population at a frequency of 2,6%. From plants carrying this new allele, a 2,1 kb fragment containing the *ALMT1* promoter region was amplified, cloned and sequenced. The available sequence suggest that Type VII allele would have a structure such as the BA region, linked to higher transcriptional activity of the *ALMT1* gene, would be repeated four times. The evaluation under hidroponic culture of isogenic lines carrying alleles Types I, V or VII, showed that the Type VII allele confers the highest level of aluminum tolerance. These results suggest that the Type VII allele could be used in breeding programs to develop new aluminum tolerant wheat cultivars.

Research funded by grant FIA-PI-C-2005-1-A-064.

## Growth patterns of Near Isogenic Lines for the aluminum tolerance *TaALMT1* gene in wheat grown in phosphorus-deficient and high aluminum content soils.

Mónica Mathias<sup>1</sup>, Adolfo Montenegro<sup>1</sup>, Enrique Peñaloza<sup>1</sup>, Braulio Soto<sup>1</sup>, and Javier Zúñiga<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA-Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile.

<sup>2</sup> Corresponding author, E-mail: [jjuniga@inia.cl](mailto:jjuniga@inia.cl).

Aluminum ( $Al^{+3}$ ) toxicity is one of the major soil constraints affecting crop production in acid soils worldwide. This stress is frequently associated with phosphorus deficiency in most soils of southern Chile where wheat (*Triticum aestivum* L.) is broadly cultivated. To improve  $Al^{+3}$  tolerance in this species, a marker assisted backcrossing strategy was used to introgress different *TaALMT1* gene variants into a high-yielding but  $Al^{+3}$  sensitive Chilean cultivar. As result, a series of Near Isogenic Lines for the *TaALMT-1* alleles I, V and VII was developed. To know whether different alleles for this gene affect the plant performance, these lines were grown in two phosphorus-deficient acid soils contrasting in  $Al^{+3}$  saturation. The P-Olsen in both soils was about  $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , while the aluminum saturation was 1.2 and 20%. Plants were grown in potted soil under greenhouse, which were arranged in a split plot design. Above and underground plant biomass was harvested every 15 days, on which fresh weight, dry weight, leaf area and grain yield were measured. Compared to the Al-tolerant genotypes (alleles V and VII), Al-stress significantly reduced plant biomass and leaf area in the Al-sensitive genotype (allele I). Consequently, grain yield of sensitive lines was reduced by over 90%. Though both tolerant genotypes showed similar growth pattern in each soil, there was a trend towards a better performance in the soil having a 20% Al saturation. Although further studies are required to fully explain the observed behavior, these results emphasize the importance the *TaALMT1* gene might have in developing wheat cultivars adapted not only to phytotoxic aluminum but also to phosphorus deficient soils.

**Keywords:** Wheat breeding - *TaALMT1* - Aluminum toxicity - Acid soils.

## PRELIMINARY ASSESSMENT OF AN IN-SOIL AND SHORT-TERM METHOD TO SCREEN FOR RESISTANCE TO PHYTOTOXIC ALUMINUM IN WHEAT

Enrique PEÑALOZA, Lorena DÍAZ, Javier ZÚÑIGA, Paola RATHGEB, Adolfo MONTENEGRO

Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile  
epenalo@inia.cl

### ABSTRACT

The effectiveness of an in-soil method to screen for aluminum toxicity was assessed in 12 wheat varieties of known allelic variant for the *TaALMT1* gene. Seedlings were planted on top of rhizoboxes filled with soil of high and a low exchangeable Al and grown for two weeks. By using the root length as phenotypic marker, this technique allowed discriminating resistant from susceptible genotypes as well as heterogeneous populations. Data from PCR-based molecular markers for the *TaALMT1* alleles correlated with the phenotype predicted by rhizoboxes in 11 out of 12 assayed varieties. Based on reasons for this discrepancy, the in-soil based method would be more effective than allelic discrimination to screen for aluminum resistant in wheat.

### INTRODUCTION

Resistance to phytotoxic aluminum (Al) has traditionally been considered as one of the main objectives in breeding wheat varieties for acid soils. Recent evidence showing that the expression of *TaALMT1* gene strongly correlates with Al resistance in this species is facilitating the achievement of such goal. This major gene encodes a membrane-localized protein, which confers Al-activated malate efflux in wheat (Sasaki et al., 2006). *TaALMT1* gene shows considerable variability along its promoter region with six allelic variant being at present identified (Sasaki et al., 2006; Raman et al., 2008). Though the availability of markers for each allele might allow discriminating Al-susceptible from Al-resistant phenotypes, some genotypes do not match with such allelic variants. Since this potential bias may hamper any PCR-based molecular screening, we explored the effectiveness of using the Al-induced root length inhibition as phenotypic marker to screen for resistant to phytotoxic Al in wheat.

### MATERIAL AND METHOD

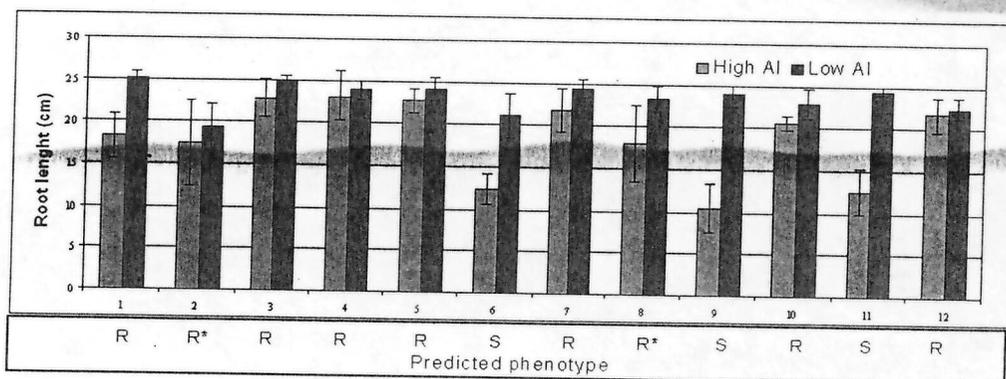
Ten seedling from each of 12 Chilean wheat varieties of known allelic variant for the *TaALMT1* gene were planted on top of rhizoboxes containing acid soils with high and low exchangeable Al. Plants were growth for 2 weeks, after which allelic discrimination by PCR and root length was evaluated. Criteria to predict resistant/susceptible phenotypes as well as heterogeneous populations were based on deviation from mean root length on each genotype grown at both high and low levels of exchangeable Al. Predicted phenotypes were confirmed by PCR-based allelic discrimination.

### RESULT AND DISCUSSION

In spite of the small number of plants that were screened for each variety, the method allowed distinguish Al-susceptible from Al-resistant genotypes, as well as those heterogeneous for this trait. Discrepancies between in-soil and PCR-based discriminations were as follow.

a) Rhizoboxes predicted two heterogeneous populations (R\* in Fig 1) instead of four previously classified by molecular analyses (right column on Table 1). However, further PCR analyses showed that the wrong predictions were indeed homocigous (genotype 12 in Fig 1 and Table 1), or partially heterogeneous populations (genotype 9 in Fig 1 and Table 1). Both exceptions indicate that a 10-plant sample would not be sufficient for this method to correctly predict mixed genotypes.

b) Rhizoboxes scored genotype 10 as resistant (Fig 1), in spite of being molecularly characterized as susceptible (Table 1). Such inconsistency indicates genotype 10 as having a pedigree different from the conventional type I allele, as occurs in some type I Al-resistant landraces from Nepal (Raman et al., 2008). Based on this result, molecular analysis by itself would not be sufficient to discriminate resistant from susceptible phenotypes, as it would be the in-soil based method. We are at present working on improving this method so as be also able to distinguish within the five Al-resistant alleles in wheat.



**Figure 1.** Root length of 12 wheat varieties grown in an acid soil of high and low exchangeable Al. The rhizobox-predicted phenotypes are shown at the bottom (R: resistant, S: susceptible, R\* mix).

**Tabla 1:** PCR-based allelic discrimination of 12 wheat varieties (10-plants each). For each variety, the *TaALMT1* allele and its corresponding phenotype are shown at the right columns.

Wheat variety	Genotype on Fig 1	PCR-based allelic discrimination										<i>TaALMT1</i> allele	Phenotype	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Taita	1	IV	?	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	R
Trauco	2	I	I	V	I	V	I	V	I	V	I	V	I+V	R*
Quino	3	?	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	R
Pandora VII	4	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	VII	R
Puelche	5	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	R
Kumpa	6	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S
Quijote	7	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	R
Malihue	8	I	IV	IV	I	IV	IV	I+IV	IV	IV	IV	I+IV	R*	
Pandora	9	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I+V+VII	S*	
Rupanco	10	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S
Huayun	11	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	S
Carahue	12		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I+V	R*

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- SASAKI T, RYAN PR, DELHAIZE E, HEBB DM, OGIHARA Y, NODA K, MATSUMOTO H, YAMAMOTO Y. 2006. Analysis of the sequence up-stream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminium tolerance. *Plant Cell Physiol* 47:1343-1354.
- RAMAN H, RYAN PR, RAMAN R, STODART BJ, ZHANG K, MARTIN P, WOOD R, SASAKI T, YAMAMOTO Y, MACKAY M, HEBB DM, DELHAIZE E. 2008. Analysis of *TaALMT1* traces the transmission of aluminum resistance in cultivated wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 116:342-354.

## ACKNOWLEDGEMENTS.

This work is being supported by the Fundación para la Innovación Agraria (FIA, PI-C-2005-3-A-064).

## PERFORMANCE OF TYPE VII ALLELE OF THE *TaALMT1* GENE IN NEAR ISOGENIC LINES OF WHEAT GROWN IN A HIGH-ALUMINUM ACID SOIL

Enrique PEÑALOZA\*, Adolfo MONTENEGRO, Lorena DÍAZ, Javier ZÚÑIGA, Mónica MATHIAS, Carlos TORO

Unidad de Biotecnología, INIA Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile

\*epenalo@inia.cl

### ABSTRACT

To know whether a recently identified aluminum (Al) resistant allele (type VII) from the *TaALMT1* gene would perform better than the Al resistant type V allele, near isogenic lines for types I, V and VII alleles derived from wheat cv. Pandora were potted in a high Al content acid soil. The soil was amended with  $\text{CaCO}_3$  so as to obtain exchangeable Al levels varying from 0.1 to 1.35  $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$ . Based on grain yield, aboveground biomass, root biomass and mineral composition of grains, it was found that that type VII allele does not differ significantly from type V, and that both confer resistance to phytotoxic Al in wheat.

### INTRODUCTION

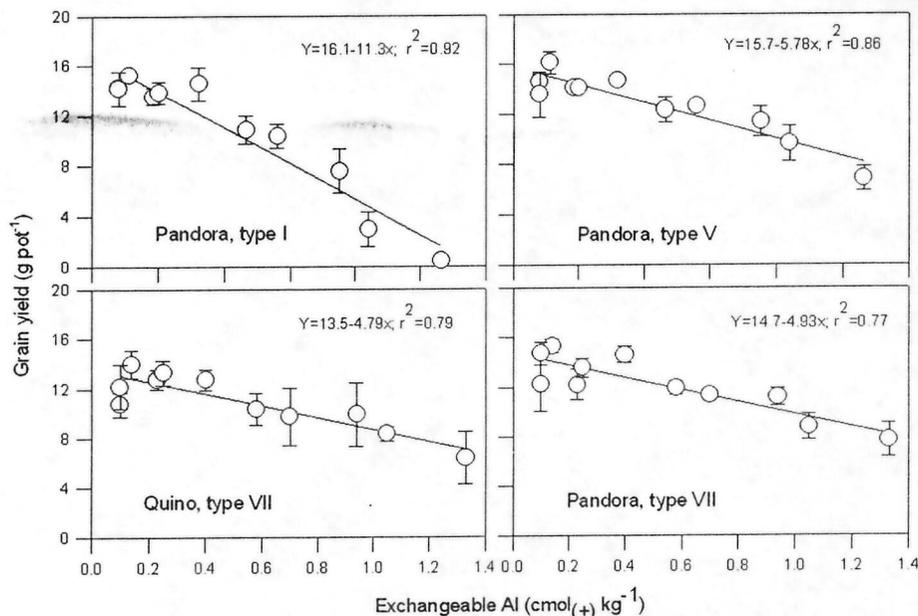
The *TaALMT1* gene encodes an aluminum-activated membrane protein, which is responsible for the malate efflux in wheat. Six alleles (type I to VI) and allele variants of this gene have so far been identified in this species, each being associated to a different level of resistance to phytotoxic aluminum (Sasaki *et al.*, 2006; Raman *et al.*, 2008). Among these, type V represents the most common allele in most Al-resistant wheat cultivars whereas a recently reported allele variant (type VII) seems to be scarcely distributed. Molecular analyses on the *TaALMT1* promoter shows that some wheat cultivars released from Chilean breeding programs are heterogeneous for the presence of these alleles. By using such diversity, near isogenic lines (NILs) belonging to types I, V and VII derived from the high-yielding Chilean cv. Pandora were developed (Zuñiga *et al.*, unpublished). Since there seems to be a correlation between allelic types and resistance to aluminum, we hypothesized type VII would have a better performance in response to this stress. This work summarizes an in-pot experiment on which the effect of soil aluminum on agronomic traits of these NILs was studied.

### RESULTS AND DISCUSSION

The ANOVA for grain yield showed a significant ( $P < 0.01$ ) genotype x Al treatment interaction, which was mainly explained by the effect of Al on the susceptible genotype (type I). Regression analyses for grain yield at each Al treatment predicted grain yield losses of 6.7, 3.6 and 3.3% for types I, V and VII alleles, as exchangeable Al increases 0.1  $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$ . The slope for resistant genotypes (types V and VII) closely matches the response found for cv. Quino (type VII), on which grain yield losses of 3.5% per 0.1  $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$  exchangeable Al increases was predicted (Fig 1). Grain yield does not change when data between 0.1 and 0.4  $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$  were omitted from the analyses, which would indicate Al up to about 8% saturation does not affect grain yield significantly. A genotype x Al treatment interaction was also observed for aboveground biomass and root biomass, which was again explained by the effect of Al on the susceptible genotype. Al treatments mainly affected N and Mn in grains but the effect were not dependent on the genotype. Results show that type VII allele does not differ from type V, and that both confer resistance to phytotoxic Al in wheat. We are at present evaluating whether this performance also occurs under field conditions.

### MATERIAL AND METHODS

Near isogenic lines for types I, V and VII alleles of the *TaALMT1* gene derived from cv. Pandora were potted in a high-aluminum acid soil, along with a well-known Al-resistant cv. Quino (type VII). The soil was amended with  $\text{CaCO}_3$  so as to obtain Al treatments ranged from 0.1 to 1.35  $\text{cmol}(+) \text{kg}^{-1}$  exchangeable Al (40 to 1.5% Al saturation). At maturity, shoot and root biomass, grain yield and mineral composition of grains were measured.



**Figure 1.** Relationship between exchangeable aluminum and grain yield of four genotypes representing three alleles of the *TaALMT1* gene.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- SASAKI T, RYAN PR, DELHAIZE E, HEBB DM, OGIHARA Y, NODA K, MATSUMOTO H, YAMAMOTO Y. 2006. Analysis of the sequence up-stream of the wheat (*Triticum aestivum* L.) *ALMT1* gene and its relationship to aluminium tolerance. *Plant Cell Physiol* 47:1343-1354.
- RAMAN H, RYAN PR, RAMAN R, STODART BJ, ZHANG K, MARTIN P, WOOD R, SASAKI T, YAMAMOTO Y, MACKAY M, HEBB DM, DELHAIZE E. 2008. Analysis of *TaALMT1* traces the transmission of aluminium resistance in cultivated wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 116:342-354.

**ACKNOWLEDGEMENTS.** This work was supported by the Fundación para la Innovación Agraria (FIA, PI-C-2005-3-A-064).



Un Programa CONICYT  
**explora**

**CONICYT**  
COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN  
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



GOBIERNO DE CHILE

# CONSTANCIA



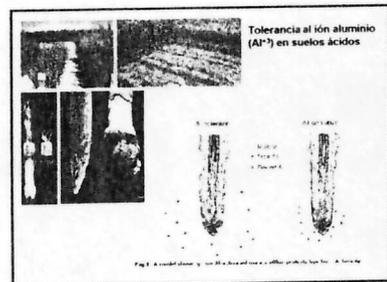
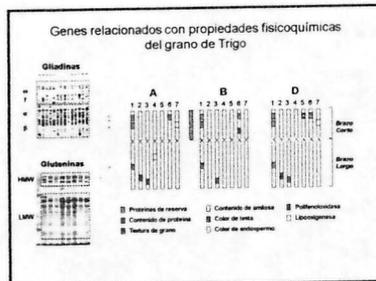
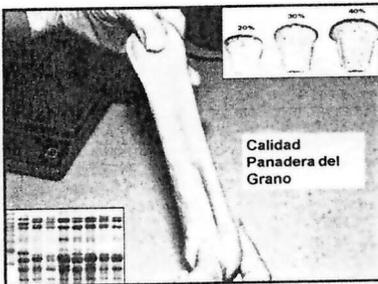
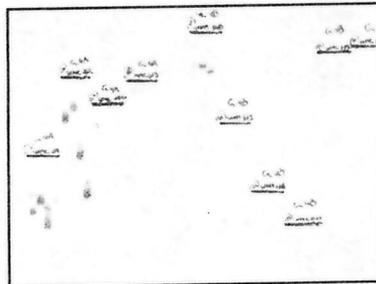
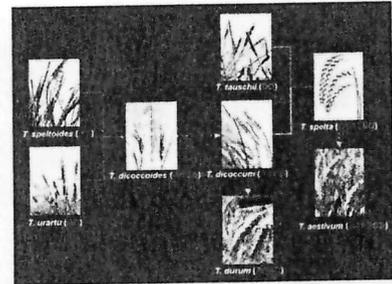
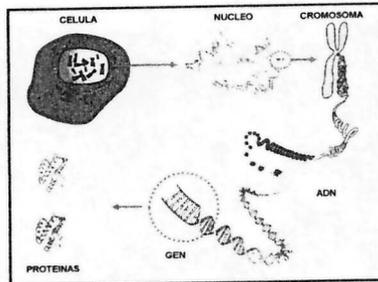
Felipe Gallardo Arriagada, Académico del Departamento de Ciencias Químicas de la Universidad de La Frontera y Coordinador Regional del Programa EXPLORA CONICYT. Deja constancia que el (la) Señor (a) Javier Zúñiga Rebolledo, Investigador de INIA Carillanca, participó en la actividad 1000 Científicos 1000 Aulas, dictando la charla magistral "Del ADN el campo y la mesa. Creando mejores alimentos en base a trigo con ayuda de la biotecnología", el 4 de noviembre de 2008, en la Escuela Particular N° 44 San Francisco de Asís, de la comuna de Renaico. Actividad enmarcada en la XIV Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología, realizada del 3 al 9 de noviembre del presente año.

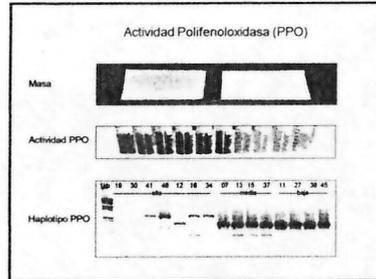
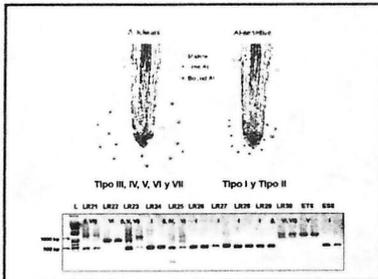
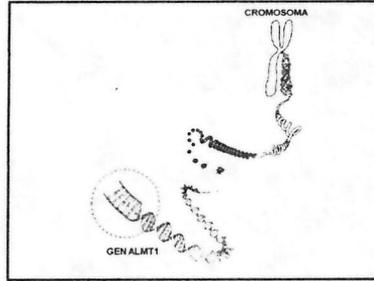
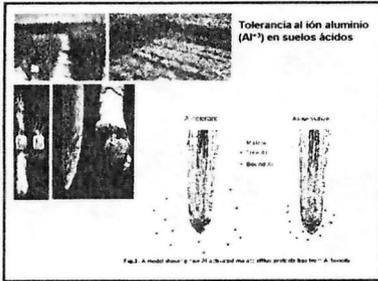
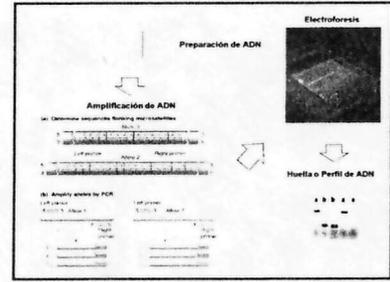
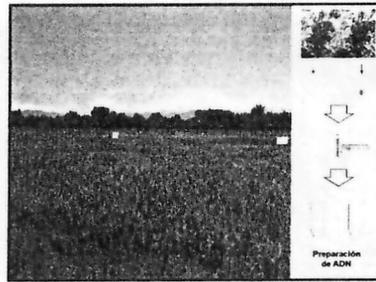
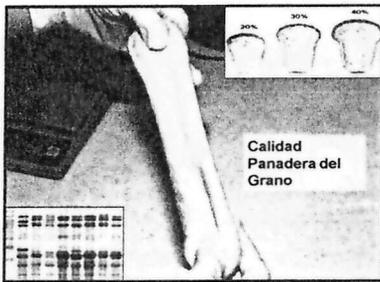
Agradecemos la colaboración en esta iniciativa que promueve la Divulgación y Valoración de la Ciencia y la Tecnología, particularmente hacia el ámbito educacional, y en la cual su compromiso ha permitido desarrollar con éxito las metas propuestas por el Programa EXPLORA CONICYT.

**SEMANA NACIONAL DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA**

Temuco, noviembre de 2008.







CHILE  
Presidencia Académica y Científica

Del ADN al Campo y a la Mesa:  
Creando mejores Alimentos en base a  
Trigo con ayuda de la Biotecnología.

Javier Zúñiga Rebolledo, Bioquímico

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Unidad de Biotecnología - Centro Regional de Investigación  
Carilanca - Temuco  
E-mail: jzr@iia.uchile.cl



**Del ADN al Campo y a la Mesa:  
 Creando mejores Alimentos en base a  
 Trigo con ayuda de la Biotecnología.**

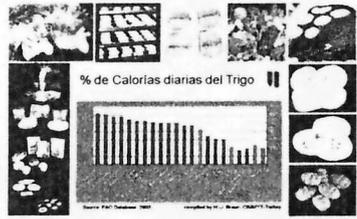
Javier Zúñiga Rebolledo, Bioquímico

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
 Unidad de Biotecnología - Centro Regional de Investigación  
 Carrilanca - Temuco  
 E-mail: jzuniga@inia.cl

**El Trigo es fuente alimenticia de primera  
 importancia para los seres humanos**



**El Trigo es fuente alimenticia de primera  
 importancia para los seres humanos**



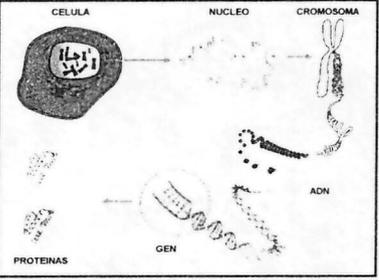
% de Calorías diarias del Trigo

Source: FAO, September 1989. compiled by Dr. M. M. Khan, CIMMYT, Mexico

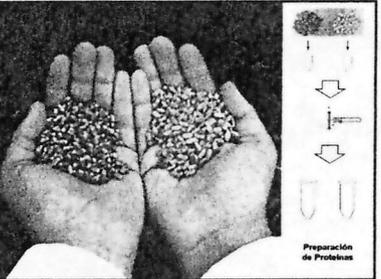
**La Cadena Económica  
 Trigo - Harina - Pan**



Productores, Trigo, Molinos, Harina, Panaderos, Pan, Variedades, Mejoradores



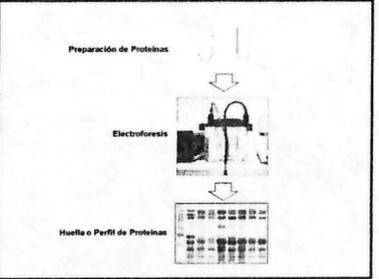
**Preparación de Proteínas**



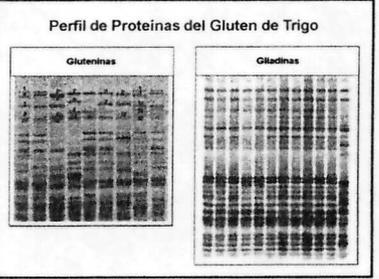
**Preparación de Proteínas**

**Electroforesis**

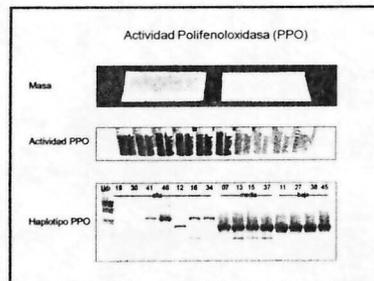
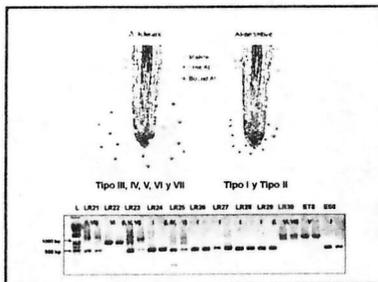
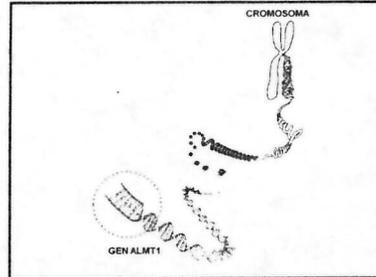
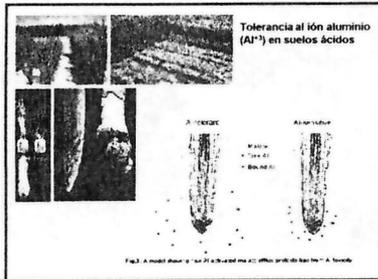
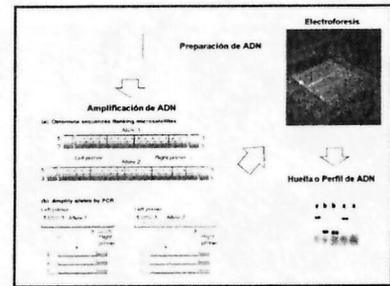
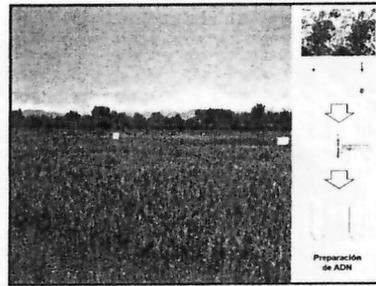
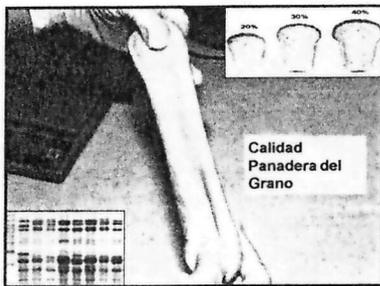
**Huella o Perfil de Proteínas**



**Perfil de Proteínas del Gluten de Trigo**



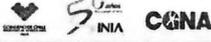
Gluteninas, Gliadinas






**Del ADN al Campo y a la Mesa:  
 Creando mejores Alimentos en base a  
 Trigo con ayuda de la Biotecnología.**

Javier Zúñiga Rebolledo, Bioquímico  
 INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
 Unidad de Biotecnología - Centro Regional de Investigación  
 Carilanca - Temuco  
 E-mail: jzr@iia.cl

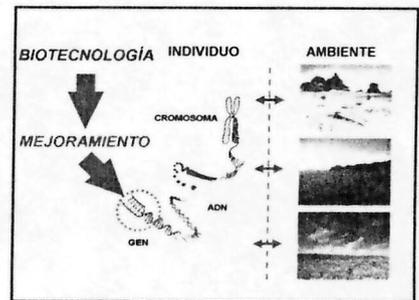
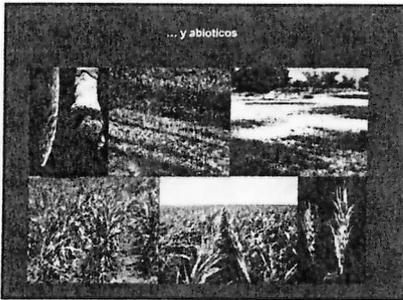


Reunión del Comité Operativo de Biodiversidad IX Región  
 Taller de Biotecnología

## Impacto de la Biotecnología en la producción vegetal

Javier Zúñiga Rebolledo  
 Bioquímico

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
 Unidad de Biotecnología - CONA - Centro Regional de Investigación Chillan - Temuco  
 Email: jzuniga@inia.cl

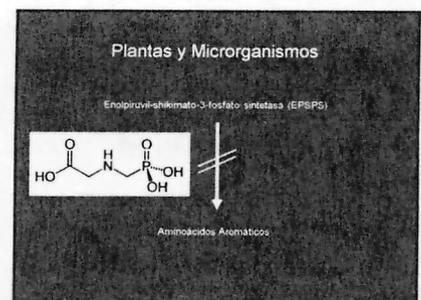
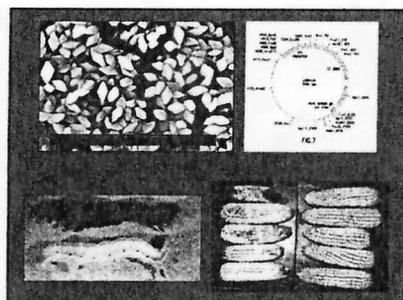


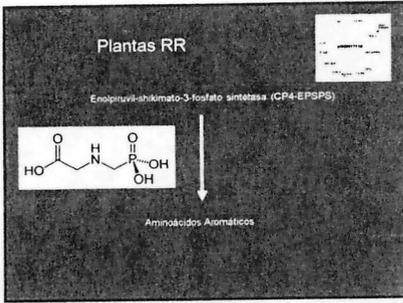
**Nacional:**

- Ley de Transgénicos: "Chile no produce OGMs para consumo" (pero se pueden importar OGMs con el mismo fin)
- OGM como herramientas de investigación en laboratorios
- Incorporación reciente de Biotec a Programas de Mejoramiento

**Internacional:**

Situaciones Diversas respecto de capacidades de creación de OGM, Legislaciones, Superficies cultivadas.  
 Caso de Argentina: <http://www.agbioforum.org/v6n3/v6n3a01-trigo.htm>





**Table 1.** Transgenic events approved for commercialization in Argentina before December 2001.

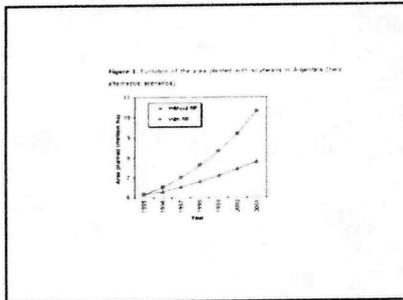
Species	Introduced Feature	Transformation event	Applicant	Registration #
Soybean	Roundup Ready	CP4-3	Novartis	FAO/SA 4-47
	glyphosate		Novartis	12-22-96
Corn	Roundup Ready	CP4	Novartis	FAO/SA 4-33
	glyphosate		Novartis	12-24-95
Corn	Roundup Ready	CP4-3	Novartis	FAO/SA 4-47
	glyphosate		Novartis	12-22-96
Cotton	Roundup Ready	CP4-3	Novartis	FAO/SA 4-47
	glyphosate		Novartis	12-22-96
Corn	Roundup Ready	CP4-3	Novartis	FAO/SA 4-47
	glyphosate		Novartis	12-22-96
Cotton	Roundup Ready	CP4-3	Novartis	FAO/SA 4-47
	glyphosate		Novartis	12-22-96
Corn	Roundup Ready	CP4-3	Novartis	FAO/SA 4-47
	glyphosate		Novartis	12-22-96

Novartis Crop Research Laboratory, Corporation of Agricultural Biotechnology (CONAGIA) website: <http://www.conagia.com.ar>

**Table 2.** Permits for the release of GMOs into the environment by type of organization.

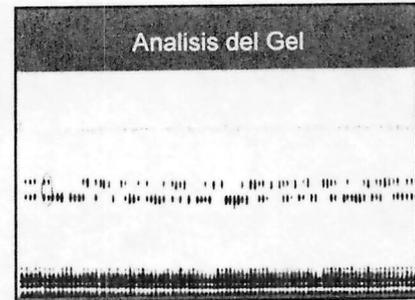
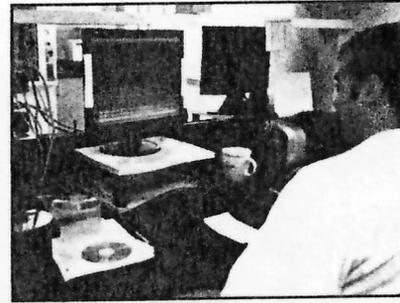
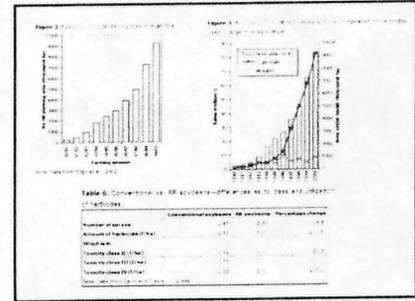
Organization	1991/92	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	Total
Transnational Corporations	22	27	28	18	15	10	10	10	10	10	10	10	142
Local Companies	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Government agencies	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
Universities	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>162</b>						

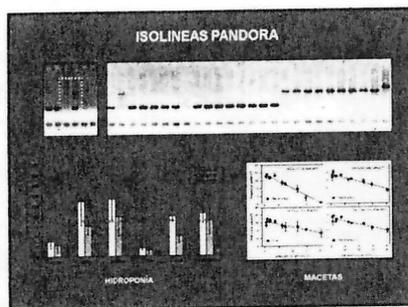
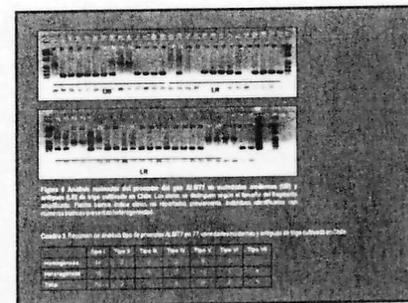
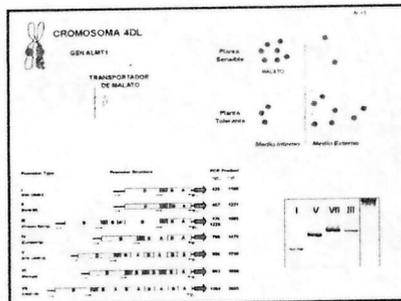
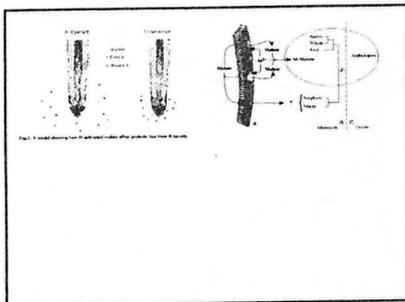
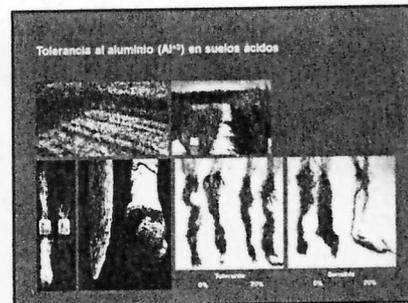
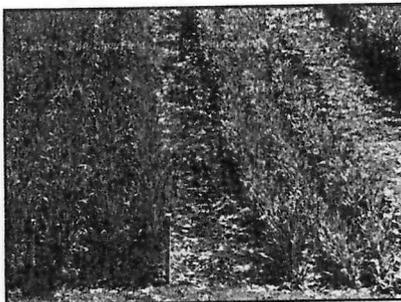
Note: Prepared by the authors based on data obtained from the National Institute of Agricultural Biotechnology (CONAGIA) website.



**Table 3.** Soybean production in Argentina (1995-2002).

Year	Production (thousand tons)
1995	1,000
1996	1,500
1997	2,000
1998	2,500
1999	3,000
2000	3,500
2001	4,000
2002	4,500





**Original de artículo periodístico publicado Revista Campo Sureño, del Diario Austral de Temuco. 2008**

*Biotecnólogos de INIA Carillanca desarrollan investigación*

**APUESTAN POR TRIGOS CON ALTO CONTENIDO DE PROTEINAS Y RENDIMIENTO**

Según las estadísticas, el promedio de rendimiento triguero en la zona centro-sur y sur del país es de 45 qq/ha, el más alto del Cono Sur y uno de los más altos del mundo. Si bien los buenos rendimientos son noticias gratas para el productor, no se puede decir lo mismo de la industria procesadora. Ello porque mientras mayores son los rendimientos por hectárea, la proteína del grano tiende a estar menos concentrada, afectando negativamente la calidad industrial de las harinas.

Proteínas bajas en la harina obtenida de dichos granos implica menos gluten disponible para formar la estructura tridimensional del pan. En productos de estructura esponjosa como la marraqueta, esto significa panes de menor volumen y miga defectuosa. Por esta razón, buena parte de los trigos producidos en Chile debe ser mezclada en molino con trigos “fuertes” importados, que poseen más proteína, para producir harinas de calidad y productos finales aceptables para el consumidor nacional.

“La relación negativa entre rendimiento y concentración proteica de los granos se conoce desde hace mucho tiempo, y ha impedido mejorar el contenido de proteína al mismo tiempo que se mejora el rendimiento de las nuevas variedades. Además, debido a que el manejo del cultivo -especialmente la fertilización nitrogenada- tiene una mayor incidencia sobre el contenido de proteína que la genética propiamente tal, el progreso en el mejoramiento genético para esta importante característica tecnológica ha sido lento”, explica el investigador Javier Zúñiga de INIA Carillanca.

***Investigación concreta***

Para abordar este problema, investigadores de INIA Carillanca están evaluando la utilidad de un gen que incrementa el contenido de proteína del grano sin causar una disminución del rendimiento. De funcionar bajo nuestras condiciones de producción, significaría un aumento del contenido de proteína de la producción local de grano, y del valor de éstos para la industria nacional.

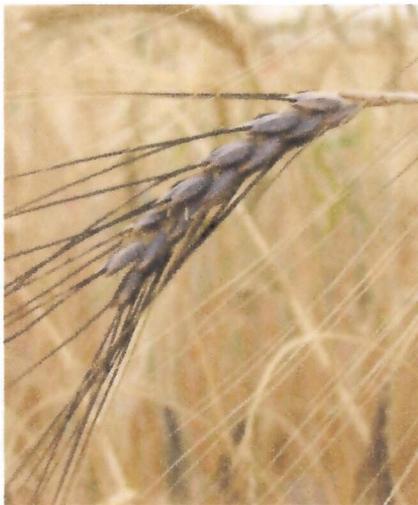
El gen, denominado NAM-B1, fue transferido al trigo desde la especie *Triticum dicoccoides* mediante cruzamientos en la Universidad de California (Davis, CA., USA). Una línea experimental de trigo que contiene ese gen, desarrollada y donada por el Dr. Jorge Dubcovsky,

fue utilizada por investigadores de la Unidad de Biotecnología de INIA Carillanca para introducir el gen en variedades adaptadas nacionales, en el marco del proyecto FIA PIC-2005-3A064. La primera línea avanzada nacional que contiene el gen NAM-B1 se desarrolló en sólo dos años de intenso trabajo, gracias a una combinación de estrategias de selección molecular y avance generacional, y en la actualidad se incrementa la semilla para realizar ensayos y bloques demostrativos que permitirán comprobar el valor de este gen novedoso en el contexto del fitomejoramiento nacional.

Los resultados de las primeras experiencias en campo con trigos de alta proteína se conocerán el otoño de 2010, cuando se coseche y evalúe el primero de una serie de ensayos que compararán el rendimiento y calidad de las nuevas líneas con la de trigos comerciales cultivados hoy en día.

En las regiones del Biobío y de la Araucanía se localizan unas 60.000 explotaciones trigueras, las que producen en conjunto casi el 70% del trigo producido en el país. De acuerdo al INE, un alto porcentaje de estas explotaciones corresponden al segmento de la agricultura familiar campesina, para quienes el cultivo del trigo representa tanto la posibilidad de obtener ingresos como proveerse de una fuente alimenticia de primer orden. Por lo tanto, aumentar el contenido de proteína del trigo también implica mejorar la nutrición de un segmento importante de la población.

Esta iniciativa, que cuenta con la participación de Agrocomercial del Sur Ltda., se suma a otras que INIA Carillanca lleva adelante para valorizar al trigo nacional frente al trigo extranjero, tales como el desarrollo constante de trigos con mejor calidad panadera y la creación de variedades de trigo blanco para el desarrollo de harinas funcionales.



*Triticum dicoccoides*, la especie donante del gen para aumentar el contenido de proteína del grano de trigo. Imagen cortesía de Zvi Peleg.



## **PROGRAMA**

---

- 10:30 – 11:00 hrs. : Inscripciones
- 11:00 – 11:30 hrs. : Uso de TICs en el Cultivo de Papa.
- 11:30 – 12:00 hrs. : Manejo de Tizón Tardío en Papa.
- 12:15 – 14:00 hrs. : Recorrido de Campo
- Líneas Experimentales de Trigo y Avena.
  - Tecnología en la Aplicación de Productos Químicos.
  - Manejo de Semilleros de Papa
- 14:00 – 15:30 hrs. : Almuerzo
- 15:30 – 16:15 hrs. : Experiencia y logros GTT Botacura.

Carillanca, febrero de 2010.



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA E INGENIERIA FORESTAL**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS ANIMALES**

Santiago, 30 de mayo de 2005.

Señora  
Margarita d'Etigny L.  
Directora Ejecutiva  
Fundación para la Innovación Agraria  
Presente.

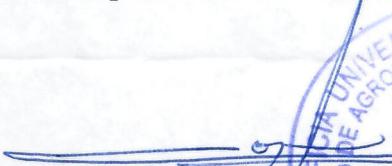
De mi consideración:

En el Concurso de Proyectos y Estudios de Innovación Agraria 2005, Línea de Financiamiento a Proyectos de Innovación Agraria-Nacional, hemos presentado a la Fundación una propuesta con la P. Universidad Católica de Chile como Agente Postulante, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y la empresa Agroindustrial y Comercial Valle Arriba S.A. como Agentes Asociados, con folio de bases 080 y nombre del proyecto "Desarrollo del producto cordero como alimento funcional para el mercado nacional y de exportación, utilizando un subproducto de la industria aceitera olivícola".

En tal proyecto, en que cumpla el papel de coordinador, no ha sido posible estampar la firma del representante legal de la empresa Agroindustrial y Comercial Valle Arriba S.A. por encontrarse fuera del país.

Por la razón expuesta vengo en solicitar a usted tenga a bien autorizarnos a entregar los convenios y compromisos con la firma del representante legal de Valle Arriba S.A. en los próximos días.

Esperando una favorable acogida a esta solicitud, le saluda atentamente:

  
Claudio Aguilar G.  
Coordinador de la propuesta  
P. Universidad Católica de Chile.

