

Agrupamiento de genotipos de la colección nacional de trigo en base a genes de interés agronómico*

Clustering of genotypes of the national collection of wheat based on genes of agronomic interest

María del Pilar Suaste Franco¹, Víctor M. Zamora Villa¹, M. Humberto Reyes Valdes¹, Héctor E. Villaseñor Mir^{2§}, Amalio Santacruz Varela³ y Ernesto Solís Moya⁴

¹Departamento de Fitomejoramiento- Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Calzada Antonio Narro No. 1923, Colonia Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. C. P. 25325 (suastef.mp@hotmail.com; zamora2602@yahoo.com.mx; mathgenome@gmail.com). ²Campo Experimental Valle de México-INIFAP. Carretera Los Reyes- Texcoco, Coatlinchán, Texcoco km 13.5, Estado de México. C. P. 56250. (hevimir3@yahoo.com.mx). ³Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillos, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. (asvarela@colpos.mx). ⁴Campo Experimenta Bajío - INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Roque, Celaya, Guanajuato, México. C. P. 38110. (esolismoya@hotmail.com). [§]Autor para correspondencia: hevimir3@yahoo.com.mx.

Resumen

En la búsqueda de diversidad para incluir en los programas de mejoramiento es de gran importancia el estudio de la colección nacional de trigo como fuente donadora de genes y con base en el comportamiento genotípico y fenotípico de sus accesiones detectar las asociaciones de importancia entre ambos caracteres, así como agrupar individuos con fondos genético similares para características de interés agronómico como tolerancia a royas, gluteninas, altura, vernalización. Para evaluar los caracteres fenotípicos, el ensayo se estableció en Nanacamilpa, Tlaxcala y Roque, Guanajuato, durante dos ciclos en cada localidad, otoño-invierno 2010-2011 y 2011-2012 en Roque, y primavera-verano 2011 y 2012 en Nanacamilpa. Para las variables genotípicas se usaron 16 marcadores moleculares asociados a diferentes características de interés en trigo, para royas: *Lr68*, *Lr34*, *Lr46* y *Sr2*; gluteninas: *Glu-A1b*, *Glu-B1a* y *Glu-D1*; altura de planta: *Rht-B1* y *Rht-D1*; fotoperiodo: *Ppd-D1a*; vernalización: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* y *Vrn-D1a*; dureza del endospermo: *PinA-D1a* y *PinB-D1a*; y contenido de amilosa: *GBSS*. Las medias de los caracteres fenotípicos se conjuntaron con los resultados de los marcadores y se analizaron mediante un análisis de conglomerados, usando

Abstract

In pursuit of diversity to include breeding programs is of great importance to study the national collection of wheat gene donor source and based on the genotypic and phenotypic behaviour of their accessions detect significant associations between the two characters, and to group individuals with similar genetic backgrounds for traits of agronomic interest as tolerance to rust, glutenin, height, vernalization. In order to assess the phenotypic characteristics, testing autumn-winter 2010-2011 and 2011-2012 in Roque was set in Nanacamilpa, Tlaxcala and Roque, Guanajuato for two cycles in each locality, and spring-summer 2011 and 2012 in Nanacamilpa. For genotypic variables 16 molecular markers associated with different characteristics of interest in wheat, for rust were used: *Lr68*, *Lr34*, *Lr46* and *Sr2*; glutenins: *Glu-A1b*, *Glu-B1a* and *Glu-D1*; plant height: *Rht-B1* and *Rht-D1*; photoperiod: *Ppd-D1a*; vernalization: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1a*; endosperm hardness: *PinA-D1a* and *PinB-D1a*; and amylose: *GBSS*. The mean phenotypic characters came together with the results of the markers and analysed by cluster analysis using Ward's methodology (1963). 12 groups which were formed varieties of group 5 were the earliest with an average cycle to flowering and maturity of 74.8 and

* Recibido: septiembre de 2014
Aceptado: febrero de 2015

la metodología de Ward (1963). Se formaron 12 grupos de los cuales, las variedades del grupo 5 fueron las más precoces con un ciclo medio a floración y madurez de 74.8 y 118.6 dds respectivamente. Las variedades más tardías están comprendidas en el grupo 6 (sin alelos *Ppd-D1*) con una diferencia de hasta 14.3 días en el ciclo a madurez. En general los grupos 3, 4 y 12 poseen variedades con características deseables (precocidad, resistencia a enfermedades y genes asociados a la calidad industrial).

Palabras clave: agrupamientos, fenotipo, genotipo, marcadores moleculares.

Introducción

En 1943 se estableció la Oficina de Estudios Especiales (OEE), y científicos norteamericanos llegaron a México para ofrecer su apoyo técnico. En 1944 llega Norman E. Borlaug para hacerse cargo del programa, constituyéndose el grupo pionero de genetistas del trigo (*Triticum aestivum* L.) Mexicano, que liberaron variedades semi-enanas con potencial de rendimiento superior a 8 t ha⁻¹ y amplia adaptación a diferentes regiones no solo del país, sino del mundo, provocando el liderazgo en México de la Revolución Verde. Las primeras variedades de trigo lanzadas fueron ‘Supremo 211’, ‘Frontera’, ‘Kenia Rojo’ y ‘Kenia Blanco’. En 1949, se liberaron las primeras variedades resistentes a roya del tallo (‘Yaqui 48’, ‘Nasas 48’ y ‘Chapingo 48’) (Borlaug, 1968). Las primeras variedades semi-enanas en México fueron ‘Pitic 62’ y ‘Pénjamo 62’ (Hanson *et al.*, 1982). De esta forma se fue integrando la colección nacional de trigo que actualmente cuenta con un número aproximado de 236 accesiones, que comprende desde variedades criollas hasta variedades recientemente liberadas, y que en conjunto, son una gran fuente de variabilidad genética.

Los Programas de Mejoramiento Genético de Trigo en México, desde sus inicios a mediados de los 40’s a la fecha, han trabajado durante dos ciclos agrícolas al año en ambientes ampliamente contrastantes. Durante los años setenta y ochenta, la introducción de germoplasma y la recombinación genética a través de retrocruzas entre trigos de hábito de primavera con los de hábito de invierno (I x P), así como las recombinaciones entre trigo y centeno (*Secale cereale* L.), permitieron mejorar simultáneamente para adaptación, estabilidad, rendimiento y resistencia

118.6 dds respectivamente. The later varieties are included in Group 6 (no alleles *Ppd-D1*) with a difference of up to 14.3 days in the cycle to maturity. Generally, groups 3, 4 and 12 have varieties with desirable characteristics (earliness, and disease resistance genes associated with industrial quality).

Keywords: clusters, genotype, molecular markers, phenotype.

Introduction

In 1943 the Office of Special Education (OEE) was established, and American scientists came to Mexico to provide technical support. In 1944 Norman Borlaug arrives to take over the program, becoming the Mexican pioneering group of geneticists from wheat (*Triticum aestivum* L.), who freed semi-dwarf varieties with higher yield potential than 8 t ha⁻¹ and wide adaptation on different regions not only the country but the world, causing the lead in Mexico Green Revolution. The first wheat varieties were released ‘Supremo 211’, ‘Frontera’, ‘Kenya Rojo’ and ‘Kenya Blanco’. In 1949, early varieties resistant to stem rust were released (‘Yaqui 48’, ‘Nasas 48’ and ‘Chapingo 48’) (Borlaug, 1968). The first semi-dwarf varieties in Mexico were ‘Pitic 62’ and ‘Pénjamo 62’ (Hanson *et al.*, 1982). In this way it integrated the national collection of wheat which currently has an approximate number of 236 accessions, ranging from landraces to recently released varieties, and together, are a great source of genetic variability.

Programs for Wheat Breeding in Mexico, since its inception in the mid-40's to date, have worked for two crop cycles per year in widely contrasting environments. During the seventies and eighties, the introduction of germplasm and genetic recombination through backcrossing between spring wheats habit with winter habit (I x P) and the recombination between wheat and rye (*Secale cereale* L.) allowed simultaneous improvement for adaptation, stability, yield and disease resistance, thanks to the translocation of chromosome segment 1BL/1RS, which led to favourable genes such as *Lr26*, *Sr31*, *Yr9* and *PM8* (Villarreal, 1995).

Currently, improvement approaches have profiled earliness, high yield, tolerance to lodging, resistance to rusts, bunt and improve industrial quality, for it is necessary to use higher genetic variability (Villaseñor *et al.*, 2004).

a enfermedades, gracias a la translocación del segmento cromosómico 1BL/1RS, que acarreó genes favorables como *Lr26*, *Sr31*, *Yr9* y *PM8* (Villarreal, 1995).

Actualmente los enfoques del mejoramiento se han perfilado a precocidad, alto rendimiento, tolerancia al acame, resistencia a royas, carbón parcial y mejorar la calidad industrial, para ello es necesario hacer uso de mayor variabilidad genética (Villaseñor *et al.*, 2004).

El desarrollo de la genética molecular en el cultivo de trigo ha sido relativamente lenta, en comparación con otros cultivos como el maíz (*Zea mays* L.), el arroz (*Oryza sativa* L.) o los tomates (*Solanum lycopersicum* L.), debido principalmente al nivel de ploidía del trigo, y al tamaño y la complejidad de su genoma (Gupta *et al.*, 1999); sin embargo, existen un gran número de marcadores moleculares asociados a genes o regiones del ADN de interés en trigo, en este trabajo se incluyen solo algunos de los más importantes, que confieren en conjunto características de calidad, resistencia a enfermedades, precocidad y tolerancia al acame, todo ello con la finalidad de incrementar el rendimiento.

Los marcadores denominados secuencias simples repetidas (SSRs, por sus siglas en inglés), también llamados microsatélites, consisten en la detección de secuencias repetidas del tipo (GT) o (CT)_n, las cuales se encuentran presentes de manera dispersa en genomas de eucariotes con un alto grado de variación en el número de repeticiones, en diferentes individuos (Tautz y Renz, 1984). Las ventajas de los microsatélites sobre otro tipo de marcadores basados en sistemas de PCR, resulta de su potencial de análisis automatizado, su naturaleza codominante, la detección de alto número de alelos y alto nivel de polimorfismo (Rafalski y Tingey, 1993). Lo anterior indica que los microsatélites, representan una alternativa para su uso en cartografía, sobre todo en especies donde el nivel de polimorfismo es muy bajo como en el caso del trigo.

Otro tipo de marcadores son los Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), que representan una nueva forma de marcador funcional, es decir que con frecuencia está asociado a alguna característica fenotípica, sobre todo cuando se derivan de marcadores de secuencias expresadas. La gran mayoría de los SNPs tienen dos alelos los cuales están representados por la sustitución de una base por otra. En las poblaciones, este tipo de alelos se clasifican en alelo principal o "silvestre" y alelo raro o mutante, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones (Checa, 2007).

The development of molecular genetics in wheat cultivation has been relatively slow compared to other crops such as maize (*Zea mays* L.), rice (*Oryza sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.) due ploidy level mainly wheat, and the size and complexity genome (Gupta *et al.*, 1999); however, there are a large number of molecular markers associated with genes or DNA regions of interest in wheat, this study includes only some of the most important characteristics conferring together quality, disease resistance, early maturity and tolerance lodging, all in order to increase yield.

The markers called simple sequence repeats (SSRs), also known as microsatellites, consist in detecting repeated sequences of type (GT) or (CT)_n, which are sparsely present in eukaryotic genomes with a high degree of variation in the number of repeats in different individuals (Tautz and Renz, 1984). The advantages of microsatellite markers on other PCR based systems, resulting in the potential for automated analysis, the codominant nature, detecting high number of alleles and high level of polymorphism (Rafalski and Tingey, 1993). This indicates that microsatellites, represent an alternative for use in mapping, particularly in species where the level of polymorphism is very low as in the case of wheat.

Another type of markers are the Single Nucleotide Polymorphism (SNPs), representing a new form of functional marker, i.e. that often is associated with a phenotypic trait, especially when derived from expressed sequence. The vast majority of SNPs have two alleles which are represented by the substitution of one base for another. In populations, such alleles are classified as primary or "wild" and rare allele or mutant allele, based on the observed frequency in populations (Checa, 2007) classification.

In this study, the presence of different genes of agronomic interest, of which interest for rust resistance was determined were *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* and *Sr2*; relevant to the response to photoperiod, the allelic variant *Ppd-D1a*, which gives photoperiod sensitivity; interest for the reduction of plant height, dwarfing genes *Rht-B1b* (*Rht1*) and *Rht-D1b* (*Rht2*); relevant to the vernalization requirement, the allelic variants *VrnA1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1a*, which confers spring growth habit; of interest to the starch content, the GBSS gene (*Wx-B1*), which does not reduce amylose; relevant to the content of high molecular weight glutenin, *Glu-A1b*, *Glu-B1a* and *Glu-D1*, the loci

En el presente estudio se determinó la presencia de diferentes genes de interés agronómico, de los cuales, de interés para resistencia a royas fueron *Lr34*, *Lr46*, *Lr68* y *Sr2*; de interés para la respuesta al fotoperiodo, la variante alelica *Ppd-D1a*, la cual otorga sensibilidad al fotoperiodo; de interés para la reducción de altura de planta, los genes de enanismo *Rht-B1b* (*Rht1*) y *Rht-D1b* (*Rht2*); de interés para el requerimiento de vernalización, las variantes alelicas *VrnA1*, *Vrn-B1* y *Vrn-D1a*, las cuales confieren el hábito de crecimiento de primavera; de interés para el contenido de almidón, el gen *GBSS* (*Wx-B1*), el cual no reduce el contenido de amilosa; de interés para el contenido de gluteninas de alto peso molecular, los loci *Glu-A1b*, *Glu-B1a* y *Glu-D1*, los codifican para las subunidades *Ax*2*, *Bx7OE* y *5+10* respectivamente; por último, de interés para determinar la dureza de grano, los genes *PinA-D1a* y *PinB-D1a*.

Es de gran importancia para los mejoradores de plantas, estudiar la variabilidad genética existente en poblaciones como la colección nacional de trigo para detectar fuentes donadoras de genes que permitan incrementar la expresión de los caracteres de interés agronómico.

Con base en lo expuesto, el objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de 16 genes de interés agronómico en 150 genotipos de la colección nacional de trigo, y medir los caracteres fenotípicos altura de planta, días floración, días a madures y porcentaje de infección de roya lineal amarilla, bajo la hipótesis de que se puede agrupar a los genotipos de trigo que posean genes y características similares.

Material y métodos

Material vegetativo

La colección nacional de trigo se estima en 236 genotipos aproximadamente, de los cuales 213 son trigos harineros (*Triticum aestivum*), 19 cristalinos (*Triticum durum*) y 4 Triticales (*Triticosecale*). Para este estudio se consideraron 150 genotipos, todos del tipo harinero.

Localización

El ensayo se estableció en Nanacamilpa, Tlaxcala y Roque, Guanajuato, cuya localización geográfica aproximada es 19° 29' 34" latitud norte, 98° 33' 54" longitud oeste y 2 831 msnm y 20° 32' latitud norte, 100° 48' longitud oeste

coding for *Ax*2*, *Bx7OE* and 5+10 subunits respectively; Finally, of interest to determine the hardness of grain, *PinA-D1a* and *PinB-D1a* genes.

It is of great importance for plant breeders, the analysis of genetic variability in populations such as the national collection of wheat donor sources to detect genes which increase the expression of the characteristics of agronomic interest.

Based on the above, the objective of this research was to determine the presence of 16 genes of agronomic interest in 150 genotypes of the national collection of wheat, and measure phenotypic characteristics plant height, days flowering, days to maturity and percentage of infection of stripe rust under the assumption that you can group the wheat genotypes possessing genes and similar features.

Materials and methods

Vegetative material

The national collection of wheat is estimated at approximately 236 genotypes, of which 213 are bread wheat (*Triticum aestivum*), 19 crystal (*Triticum durum*) and 4 triticale (*Triticosecale*). For this study, 150 genotypes, all kinds of flour were considered.

Location

The trial was set on Nanacamilpa, Tlaxcala and Roque, Guanajuato to, the approximate geographical location is 19° 29' 34" north latitude, 98° 33' 54" west longitude and 2 831 meters and 20° 32' north latitude, 100° 48' west longitude and 1 752 meters respectively. Two cycles in each locality, autumn-winter (OI) 2010-2011 and 2011-2012 Roque and spring-summer (PV) 2011 and 2012 in Nanacamilpa cycles in which the agronomic variables evaluated were established (phenotypic).

DNA extractions were performed in the Graduate College of Agricultural Sciences, Campus Montecillo, in the Laboratory of Genetics Department extractions. Amplification and reading fragments was performed at the Laboratory of Applied Molecular Genetics CIMMYT, located in El Batán, Texcoco, State of Mexico.

y 1752 msnm respectivamente. Se establecieron dos ciclos en cada localidad, otoño-invierno (O-I) 2010-2011 y 2011-2012 en Roque, y primavera-verano (P-V) 2011 y 2012 en Nanacamilpa, ciclos en los cuales se evaluaron las variables agronómicas (fenotípicas).

Las extracciones de ADN se llevaron a cabo en el Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, campus Montecillo, en el Laboratorio de Extracciones del Departamento de Genética. La amplificación y lectura de fragmentos se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT, ubicado en El Batán, Texcoco, Estado de México.

Variables de estudio

Se evaluaron variables fenotípicas y genotípicas. Las variables fenotípicas fueron: 1) días a floración (DF), contados desde la siembra hasta la exposición de 50% de espigas por unidad experimental; 2) días a madurez (DM), contabilizados desde la siembra hasta que 50% de las plantas de la unidad experimental adquieren un color dorado, el grano ya no se amasa fácilmente con los dedos, coincidiendo con la madurez fisiológica; 3) altura de planta (AP), medida desde la base del suelo hasta el final de la espiga, cuando la planta ya alcanzó la madurez fisiológica; y 4) roya amarilla (Yr%), se mide en porcentajes de 0 a 100 y la reacción puede ser resistente (r), moderadamente resistente (mr), moderadamente susceptible (ms) y susceptible (s).

Para las variables genotípicas se usaron 16 marcadores moleculares, asociados a diferentes características de interés en trigo. Para royas se emplearon: *Lr68*, *Lr34*, *Lr46* y *Sr2*; para gluteninas: *Glu-A1b*, *Glu-B1a* y *Glu-D1*; altura: *Rht-B1* y *Rht-D1*; fotoperiodo: *Ppd-D1a*; vernalización: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* y *Vrn-D1a*; dureza del endospermo: *PinA-D1a* y *PinB-D1a*; y contenido de almidón: *GBSS*.

La extracción de ADN se realizó en un robot de extracción de la marca “Thermo scientific”, utilizando el kit de extracción “MagJET” de la misma marca y siguiendo el protocolo establecido por la empresa. La amplificación de fragmentos se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las técnicas empleadas para la amplificación fueron mediante secuencias simples repetidas (SSRs) y polimorfismo de un simple nucleótido (SNPs). La lectura e interpretación de fragmentos para los SSRs se realizó mediante geles de agarosa y electroforesis, mientras que para los SNPs se utilizó el equipo BMG de LABTECH por el método KASP y SNP line de “Kbioscience”.

Study variables

Phenotypic and genotypic variables were evaluated. The phenotypic variables were: 1) days to flowering (DF), counted from sowing to 50% exposure of spikes per experimental unit; 2) days to maturity (DM), recorded from planting until 50% of the experimental unit plants acquire a golden colour, grain and not easily knead with fingers to coincide with physiological maturity; 3) plant height (AP), measured from the base of the soil until the end of the pin when the plant already reached physiological maturity; and 4) Yellow Rust (Yr%), is measured as a percentage from 0 to 100 and the reaction can be resistant (r), moderately resistant (MR), moderately susceptible (ms) and subject (s).

For genotypic variables 16 molecular markers associated with different characteristics of interest in wheat were used. To rusts were used: *Lr68*, *Lr34*, *Lr46* and *Sr2*; for glutenins: *Glu-A1b*, *Glu-B1a* and *Glu-D1*; height: *Rht-B1* and *Rht-D1*; photoperiod: *Ppd-D1a*; vernalization: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1a*; endosperm hardness: *PinA-D1a* and *PinB-D1a*; and content of amylose: *GBSS*.

DNA extraction was performed on a robot removal of the trademark “Thermo scientific”, using the extraction kit “MagJET” of the same brand and following the protocol established by the company. Fragment amplification was performed by the Polymerase chain reaction (PCR) techniques were used for amplification by simple sequence repeats (SSRs) and single nucleotide polymorphism (SNPs). The reading and interpretation for SSRs fragments was performed by agarose gel electrophoresis, whereas for the BMG LABTECH SNPs equipment used by the method and SNP KASP line “Kbioscience”.

Molecular markers for SSRs were *GBSS*, *Glu-B1a* (TA_BAC17 and TA_BAC24), *Glu-A1b*, *Lr68*, *Vrn-A1* and *Vrn-B1*. For SNP's were: *Glu-D1*, *Lr34*, *Lr46*, *Sr2*, *Rht-B1*, *Rht-D1*, *PinA-D1a*, *PinB-D1a*, *Ppd-D1a* and *Vrn-D1a*.

Cluster analysis

This analysis basically separated into groups that are different from each other to objects or individuals and within each group the objects or individuals forming it are very similar to each other. By agglomeration individuals start alone in groups of one, then the closest individuals are gradually grouped until finally all individuals remain

Los marcadores moleculares para SSRs fueron: *GBSS*, *Glu-B1a1* (TA_BAC17 y TA_BAC24), *Glu-A1b*, *Lr68*, *Vrn-A1* y *Vrn-B1*. Para SNP's fueron: *Glu-D1*, *Lr34*, *Lr46*, *Sr2*, *Rht-B1*, *Rht-D1*, *PinA-D1a*, *PinB-D1a*, *Ppd-D1a* y *Vrn-D1a*.

Análisis de conglomerados

Este análisis básicamente separa en grupos que son diferentes entre sí a los objetos o individuos y dentro de cada grupo los objetos o individuos que lo conforma son muy parecidos entre sí. Mediante la aglomeración los individuos inician solos en grupos de uno, posteriormente los individuos más cercanos son gradualmente agrupados hasta que finalmente todos los individuos quedan dentro de un único grupo, lo cual es representado mediante un dendrograma. Otro procedimiento consiste en definir k grupos o conglomerados aleatorios y entonces se mueven los objetos entre estos grupos para reducir la variación dentro de ellos y maximizar la diferencia entre ellos, buscando que esta sea lo más grande posible, tal como lo hace la metodología propuesta por Ward (1963). Las distancias entre los individuos son calculadas mediante una generalización de la distancia euclidiana (d_{ij}):

$$d_{ij} = \sqrt{\{(x_{i1} - x_{j1}) + (x_{i2} - x_{j2})\}}$$

La cual para p atributos quedará como:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

Comparación de medias multivariadas

Se aplicó la prueba de t univariada y T_2 multivariada para contrastar los grupos generados:

$$T_2 = n_1 n_2 (x_1 - x_2)' C^{-1} (x_1 - x_2) / (n_1 + n_2)$$

Donde: n_1, n_2 = número de observaciones asociadas con los vectores de medias x_1 y x_2 ; C = matriz con las estimaciones conjuntas de varianza covarianza de los n_1 y n_2 datos.

La significancia del valor calculado del parámetro T_2 es comprobada mediante una prueba de F calculada como:

$$F = (n_1 + n_2 - p - 1) T_2 / \{(n_1 + n_2 - 2)p\}$$

Comparada con valores tabulados con p y $(n_1 + n_2 - p - 1)$ grados de libertad, donde " p " representa el número de variables utilizadas en la comparación de los dos grupos de medias (Manly, 1986).

within a single group, which is represented by a dendrogram. Another method is to define k random groups or clusters and then the objects between these groups move to reduce variation within them and maximize the difference between them, looking for this to be as large as possible, as does the methodology proposed by Ward (1963). The distances between individuals are calculated using a generalization of Euclidean distance (d_{ij}):

$$d_{ij} = \sqrt{\{(x_{i1} - x_{j1}) + (x_{i2} - x_{j2})\}}$$

P which attributes to be as:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

Comparison of multivariate stockings

t univariate test was applied and T_2 multivariate to compare the generated groups:

$$T_2 = n_1 n_2 (x_1 - x_2)' C^{-1} (x_1 - x_2) / (n_1 + n_2)$$

Where: n_1, n_2 = number of observations associated with mean vectors x_1 and x_2 ; C = matrix with pooled estimates of the variance covariance $data_{n1}$ and n_2 .

The significance of the calculated value of T_2 parameter is tested by F test calculated as:

$$F = (n_1 + n_2 - p - 1) T_2 / \{(n_1 + n_2 - 2)p\}$$

Compared tabulated with p y $(n_1 + n_2 - p - 1)$ degrees of freedom values, where " p " represents the number of variables used in the comparison of the two groups of middle (Manly, 1986).

Results and discussion

12 groups were retained because they were classified with either the 150 genotypes. The groups five and three were the largest, both comprised of 24 strains, while the six group was smaller, comprising only three varieties. In Figure 1 the 12 clusters are observed, the group number is indicated to the left of it.

In the Table 1, the genotypes that comprise each of the 12 groups of Figure 1 and 2 are indicated.

Resultados y discusión

Se retuvieron 12 grupos ya que con ellos se clasificó bien a los 150 genotipos. Los grupos cinco y tres fueron los más grandes, ambos conformados por 24 variedades, mientras que el grupo seis fue el de menor tamaño, formado solamente con tres variedades. En la Figura 1 se observan los 12 agrupamientos, el número de grupo está indicado a la izquierda del mismo.

En el Cuadro 1 se indican los genotipos que conforman cada uno de los 12 grupos de la Figura 1 y 2.

Dado que los valores de las variables genotípicas están representados por ceros y unos, el valor medio más alto será 1 (cuando esté presente la secuencia de ADN buscada en todas las variedades del grupo), por lo cual podemos hablar en porcentajes si este lo multiplicamos por 100. En el Cuadro 2 aparecen los valores medios de cada grupo y se observa que las variedades del grupo 5 fueron las más precoces con un ciclo medio a floración y madurez de 74.8 y 118.6 dds respectivamente; asimismo, el gen que controla la respuesta al fotoperiodo *Ppd-D1a* (Yang *et al.*, 2009), se encuentra presente en 90% de las variedades de este grupo. Las variedades más tardías están comprendidas en el grupo 6 (sin alelos *Ppd-D1a*) con una diferencia de hasta 14.3 días en el ciclo a madurez. Esto es de gran importancia ya que para algunos productores, sobre todo los que hacen uso de agua de presas, esas dos semanas hacen la diferencia entre sembrar dos cultivos por ciclo agrícola o no.

Los grupos 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10 y 12 también tienen presente el alelo *Ppd-D1a* en una alta frecuencia, y sus ciclos son considerados precoces, excepto el del grupo 1, que contradictoriamente tiene un ciclo a floración y madurez ligeramente tardía, pero el gen *Ppd-D1a* se encuentra presente en 100% de las variedades de ese grupo. Una posible respuesta a ese fenómeno podría ser que, ese grupo tiene un alto porcentaje de variedades con el gen *Vrn-D1a* (70%), el cual a pesar de estar asociado con variedades de hábito de primavera, también se asocia con el hábito de crecimiento facultativo (tanto de primavera como de invierno), ya que está presente en variedades que van desde hábitos de crecimiento de primavera (sin requerimiento de vernalización) hasta variedades con requerimientos de vernalización intermedia (Zhang *et al.*, 2012).

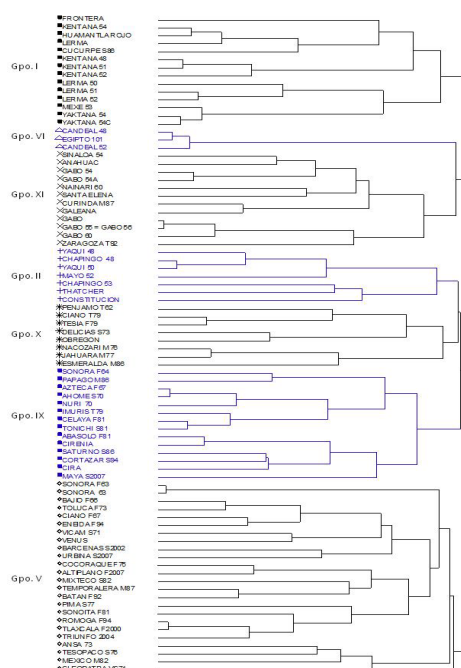


Figura 1. Agrupamiento de las variedades en 12 grupos del análisis de conglomerados: grupos I, VI, XI, II, X, IX y V

Figure 1. Grouping of varieties in 12 cluster analysis groups: group I, VI, XI, II, X, IX and V.

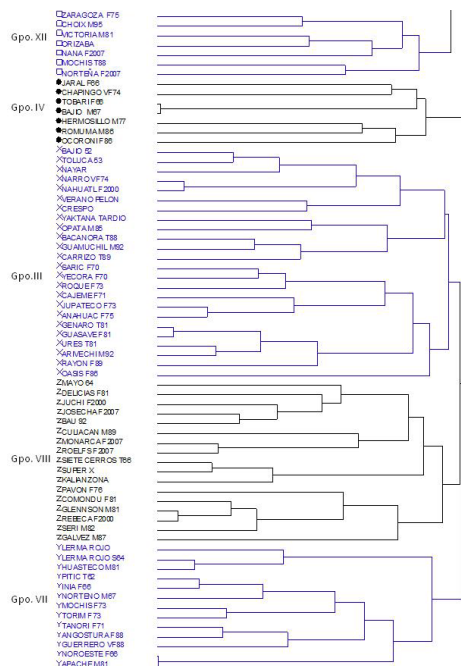


Figura 2. Agrupamiento de las variedades en 12 grupos del análisis de conglomerados: grupos XII, IV, III, VIII y VII.

Figure 2. Grouping of varieties in 12 groups of cluster analysis: groups XII, IV, III, VIII and VII.

Otros grupos que también tienen una frecuencia alta de alelos *Vrn-D1a* son el 3, 5, 7, 8 y 12 (100, 70, 100, 70 y 90% respectivamente). Los grupos 2, 4, 6, 9, 10 y 12 tienen una alta frecuencia del alelo *Vrn-A1*, el cual es el *loci* principal de vernalización en trigo, asociado al habito de crecimiento de primavera, es decir, variedades que no requieren vernalización (McIntosh *et al.*, 2007). El 90% de las variedades del grupo 12 presentan ambos tipos de alelos (*Vrn-D1a* y *Vrn-A1*).

Considering that, the values of genotypic variables are represented by ones and zeros, the highest average value is 1 (when the DNA sequence sought in all varieties of the group is present), so we can talk in percentages if this is multiplied 100. The Table 2 shows the mean values of each group and observed that the varieties of group 5 were the earliest with an average cycle to flowering and maturity of 74.8 and 118.6 dds respectively; Also, the gene that controls the response to *Ppd-D1a* photoperiod (Yang *et al.*, 2009), is present in 90%

Cuadro 1. Genotipos que conforman cada uno de los 12 grupos.

Table 1. Genotypes that form each of the 12 groups.

Grupo	Genotipos
I	'Frontera', 'Kentana 48', 'Lerma 50', 'Lerma 51', 'Kentana 51', 'Kentana 52', 'Lerma 52', 'Mexce 53', 'Kentana 54', 'Yaktana 54', 'Yaktana 54C', 'Huamantla Rojo', 'Cucurpe S86' y 'Lerma'.
II	'Yaqui 48', 'Chapingo 48', 'Yaqui 50', 'Mayo 52', 'Chapingo 53', 'Constitución' y 'Thatcher'.
III	'Bajío 52', 'Toluca 53', 'Yaktana Tardío', 'Saric F70', 'Yécora F70', 'Cajeme F71', 'Jupateco F73', 'Roque F73', 'Narro VF74', 'Anáhuac F75', 'Genaro T81', 'Guasave F81', 'Ures T81', 'Opata M85', 'Oasis F86', 'Bacanora T88', 'Carrizo T89', 'Rayón F89', 'Arivechi M92', 'Guamuchil M92', 'Náhuatl F2000', 'Verano Pelón', 'Nayar' y 'Crespo'.
IV	'Jarl F66', 'Tobari F66', 'Bajío M67', 'Chapingo VF74', 'Hermosillo M77', 'Romuma M86' y 'Ocoroni F86'.
V	'Sonora F63', 'Sonora 63', 'Bajío F66', 'CIANO F67', 'Vicom S71', 'Ansa 73', 'Toluca F73', 'Cleopatra VS74', 'Cocoraque F75', 'Tesopaco S76', 'Pima S77', 'Sonoita F81', 'México M82', 'Mixteco S82', 'Temporalera M87', 'Eneida F94', 'Batán F92', 'Romoga F94', 'Tlaxcala F2000', 'Bárcenas S2002', 'Triunfo 2004', 'Urbina S2007', 'Altiplano F2007' y 'Venus'.
VI	'Candéal 48', 'Candéal 52' y 'Egipto 101'.
VII	'Lerma Rojo', 'Pitic T62', 'Lerma Rojo S64', 'INIA F66', 'Noroeste F66', 'Norteño M67', 'Tanori F71', 'Mochis F73', 'Torim F73', 'Apache M81', 'Huasteco M81', 'Guerrero VF88' y 'Angostura F88'.
VIII	'Mayo 64', 'Siete Cerros T66', 'Super X', 'Pavón F76', 'Comondu F81', 'Delicias F81', 'Glennson M81', 'Seri M82', 'Gálvez M87', 'Culiacán M89', 'Juchi F2000', 'Rebeca F2000', 'Josecha F2007', 'Monarca F2007', 'Roelfs F2007', 'Kalianzona' y 'Bau 92'.
IX	'Sonora F64', 'Azteca F67', 'Ahome S70', 'Nuri 70', 'Imuris T79', 'Abasolo F81', 'Celaya F81', 'Tonichi S81', 'Saturno S86', 'Pápago M86', 'Cortázar S94', 'Maya S2007', 'Cirenia' y 'Cira'.
X	'Pénjamo T62', 'Delicias S73', 'Nacozari M76', 'Jahuara M77', 'CIANO T79', 'Tesia F79', 'Esmeralda M86' y 'Obregón'.
XI	'Sinaloa 54', 'Gabo', 'Gabo 54', 'Gabos 54A', 'Gabo 55', 'Nainari 60', 'Gabo 60', 'Curinda M87', 'Zaragoza T92', 'Santa Elena', 'Galeana' y 'Anáhuac'.
XII	'Zaragoza F75', 'Victoria M81', 'Mochis T88', 'Choix M95', 'Norteña F2007', 'Nana F2007' y 'Orizaba'.

Cuadro 2. Número de individuos y valores medios en las variables genotípicas y fenotípicas.
Table 2. Number of individuals and mean values in the genotypic and phenotypic variables.

Variable	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
No. Obs.	14	7	24	7	24	3	13	17	14	8	12	7
DF	82.5	77.9	77.9	76.4	74.8	85.3	76.2	78.7	75.3	75.6	80.2	77.7
DM	124.5	121.5	122.6	120.9	118.6	132.9	120.7	122.6	119.6	121.3	123.9	121.6
<i>Ppd-D1a</i>	1	0	0.9	1.0	0.9	0	1	0.9	1	1	0.1	1
AP	116.7	114.3	92.4	90.6	87.6	117	91.1	93.5	87.9	94.3	112.7	90
<i>Rht-B1</i>	0.1	0	0.8	0.3	0.1	0	0.8	0.9	0	0.8	0.1	0.4
<i>Rht-D1</i>	0	0	0.2	0.7	1	0	0.3	0.1	1.0	0.1	0	0.7
Yr	25.5	14.5	22.3	15.2	23.3	6.8	19.7	25.1	14.3	23.6	22.5	13.2
<i>Lr68</i>	0.1	0	0	0.4	0.3	0	0	0.2	0	0	0	1
<i>Lr34</i>	0.8	0	0.6	0.9	0.4	0	0.3	0.1	0.1	1	0.1	0.9
<i>Lr46</i>	1	0.4	0.7	0.4	0.9	1	1	1	1	0	1	0.9
<i>Sr2</i>	0	0.7	0.6	0.1	0.5	0	0.8	0.2	0.4	0.4	0	0
GBSS	1	1	1	1.0	1	0	1	0.6	0.9	0.6	0.7	0.7
<i>Glu-A1b</i>	0	1	0.5	0.4	0.7	1	0.5	0.6	0.7	0.5	0.9	0.7
<i>Glu-B1a1</i>	0	0	0	1.0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Glu-D1</i>	0	0.9	0.9	0.6	0.8	0	0.8	0.8	0.5	0	0.1	0.7
<i>PinA-D1a</i>	1	0.3	0.1	0.7	0.5	1	0.2	0.1	0.4	0.4	0.7	0.3
<i>PinB-D1a</i>	1	0.6	0.9	0.3	1	0	1	1	1	0.8	1	1
<i>Vrn-D1a</i>	0.7	0.6	1	0.1	0.7	0	1	0.7	0.3	0	0.2	0.9
<i>Vrn-A1</i>	0	1	0.1	0.7	0.4	1	0	0.3	0.9	1	0.3	0.9
<i>Vrn-B1a</i>	0.4	0.1	0.1	0.3	1	1	0	0.9	0	0.4	1	0.6
<i>Vrn-B1b</i>	0.4	0	0	0.1	0	0	1	0.1	0	0	0	0.1
<i>Vrn-B1</i>	0.2	0.9	0.9	0.6	0	0	0	0	1	0.6	0	0.3

DF= días a floración; DM= días a madurez; AP= altura de planta; Yr= roya amarilla evaluada en campo; *Ppd-D1a*= gen de respuesta al fotoperiodo; *Rht-B1* y *Rht-D1*= genes de enanismo; *Lr68*, *Lr34* y *Lr4*= genes de resistencia a roya de la hoja; *Sr2*= gen de resistencia a roya del tallo; GBSS= gen de contenido de almidón; *Glu-A1b*, *Glu-B1a1* y *Glu-D1*= loci que codifican para gluteninas de alto peso molecular (subunidad Ax2*, BxOE y 5+10 respectivamente); *PinA-D1a* y *PinB-D1a*= genes que determinan dureza de grano; *Vrn-D1a*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1a*, *Vrn-B1b* y *Vrn-B1*= loci principales de vernalización.

En este mismo cuadro también se observa que los grupos de mayor interés respecto a la altura de planta son nuevamente el 5 y 6, ya que al primer grupo corresponden las variedades de altura muy reducida, mientras que en grupo 6 se encuentran las más altas. Asimismo, se observa que de las variedades del grupo 6 ninguna presenta los genes de enanismo, en cambio, las del grupo 5 todas cuentan con el gen *Rht-D1*, este gen junto con *Rht-B1* son los genes de enanismo en trigo (Ellis *et al.*, 2002). El gen que pudiera influir mayormente en la altura de planta es el *Rht-D1* (más que *Rht-B1*), ya que los grupos que tuvieron una alta frecuencia de este gen fueron también los de porte más bajo (4, 5, 9 y 12), mientras que las variedades de los grupos que tuvieron presencia del gen *Rht-B1* son ligeramente más altas (3, 7, 8 y 10).

En lo que respecta a royas, las variedades del grupo 6 (solo tres variedades de las más antiguas) resultaron ser las más resistentes a la enfermedad, contando únicamente con la presencia del alelo *Lr46*, mientras que las del grupo

of strains of this group. The later varieties are included in Group 6 (no alleles *Ppd-D1a*) with a difference of up to 14.3 days in the cycle to maturity. This is very important because for some producers, especially those who use water from dams, those two weeks make the difference between growing two crops per farm or cycle.

Groups 1, 3, 4, 7, 8, 9, 10 and 12 also have in mind the *Ppd-D1a* allele at a high frequency, and its cycles are considered early, except group 1, which ironically has a cycle to flowering and maturity slightly late, but the *Ppd-D1a* gene is present in 100% of the varieties that group. One response to this phenomenon could be that this group has a high percentage of varieties with *Vrn-D1a* gene (70%), which despite being associated with varieties habit of spring, is also associated with cigarette Optional growth (both spring and winter), and which is present in varieties ranging from spring growth habit (no vernalization requirement) to intermediate varieties vernalization requirements (Zhang *et al.*, 2012).

8 fueron las más susceptibles. Lo anterior no concuerda con Lillemo *et al.* (2011), quienes confirman los efectos aditivos de *Lr68* con otros genes de resistencia a roya de la hoja, así como también confirman que *Lr68* muestra un efecto mayor que *Lr34* y *Lr46*. Otros de los grupos resistentes a la enfermedad fueron el 4 y 12, destacados por tener la presencia de los alelos *Lr34*, *Lr46* y *Lr68* en combinación; sobre todo el grupo 12, que mostró las mayores frecuencias de estos tres alelos (100% de *Lr68*, 90% de *Lr34* y 90% de *Lr46*), su porcentaje de infección fue apenas de 13.2%, el cual es muy aceptable. Los resultados concuerdan con los de Herrera *et al.* (2012), quienes demostraron que el efecto combinado de *Lr34*, *Lr46* y *Lr68* en algunas variedades da resultados cerca de la inmunidad.

La gran mayoría de los genotipos de la colección nacional de trigo estudiados tienen presente el gen *GBSS* (loci *Wx-B1* de tipo silvestre) previamente asociado a características de calidad para la industria panadera y de galletas, (no reduce el contenido de amilosa) (Miura *et al.*, 1994), excepto las del grupo 6; los grupos 8, 9, 10, 11 y 12 tienen presente el gen en más de 60% de las variedades que los integran. Otro componente responsable de calidad de harina son las gluteninas (Martínez *et al.*, 2012); los genotipos del grupo 1 ninguna cuenta con el complejo *Glu-1* (*Glu-A1b*, *Glu-B1a* y *Glu-D1*), mientras que las del grupo 4 todas tienen el gen *Glu-B1a* (100%) que codifica para la subunidad B x 7 sobre expresado, asociado con una mejor fuerza de la masa de harina de trigo (Liu *et al.*, 2008); 40% de las variedades tienen presente el gen *Glu-A1b* que codifica para la subunidad *Ax2**, la cual tiene efectos positivos en la fabricación de pan (Nakamura, 2000); y 60% *Glu-D1*, que codifica la subunidad 5+10 que es la mejor combinación para gluteninas de alto peso molecular (Liu *et al.*, 2008). Estas dos características (royas y calidad) pudieran considerarse como dos de los principales objetivos de los programas de mejoramiento genético de trigos mexicanos junto con la reducción de la altura de planta.

El alelo *Glu-B1a* se encontró únicamente en el grupo 4. Los grupos 6, 10 y 11 solo tienen la presencia de *Glu-A1b*. En el resto de los grupos (2, 3, 5, 7, 8, 9 y 12) está presente tanto *Glu-A1b* como *Glu-D1*. En lo que se refiere a la textura del endospermo o dureza, las variedades del grupo 1 se clasifican como «suave», ya que 100% de estas tiene presente los alelos de tipo salvaje *PinA-D1a* y *PinB-D1a*. Ambos actúan juntos en la determinación de la textura de grano, la presencia de ambos loci determina suavidad, mientras que la ausencia de

Other groups have also a high frequency of alleles *Vrn-D1a* are 3, 5, 7, 8 and 12 (100, 70, 100, 70 and 90% respectively). Groups 2, 4, 6, 9, 10 and 12 have a higher frequency of allele *Vrn-A1*, which is the main loci of vernalization in wheat, associated with growth habit spring, i.e. varieties that do not require vernalization (McIntosh *et al.*, 2007). 90% of the varieties of group 12 have both types of alleles (*Vrn-D1a* and *Vrn-A1*).

The same table also shows that the groups of interest regarding plant height are again 5 and 6, since the first group includes varieties of very low height, while in Group 6 are the highest. It also shows that varieties of Group 6 presents no dwarfing genes; however, the group 5 all have the *Rht-D1* gene *Rht-B1* with this gene are the wheat dwarfing genes (Ellis *et al.*, 2002). The gene could influence mainly in plant height is the *Rht-D1* (more than *Rht-B1*), since the groups had a high frequency of this gene were also lower bearing (4, 5, 9 and 12), while varieties groups were present *Rht-B1* gene are slightly higher (3, 7, 8 and 10).

Regarding rusts varieties, group 6 (only three of the oldest varieties) were the most resistant to the disease, relying solely on the presence of allele *Lr46*, while group 8 were the most susceptible. This is not consistent with Lillemo *et al.* (2011), who confirmed effects *Lr68* additives with other resistance genes leaf rust, as well as confirm that *Lr68* shows a greater than effect *Lr34* and *Lr46*. Other resistant groups of disease were 4 and 12, featured by having the presence of *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* combined alleles; especially the group 12, which showed the highest frequencies of these three alleles (*Lr68* 100%, *Lr34* 90% and *Lr46* 90%), the infection rate was only 13.2%, which is very acceptable. The results agree with those of Herrera *et al.* (2012), who showed that the combined effect of *Lr34*, *Lr46* and *Lr68* in some varieties gives results close to the immunity.

The majority of the national collection genotypes have studied wheat *GBSS* gene present (*Wx-B1* loci wild type) previously associated with quality characteristics for the baking industry and cookies, (not reduce amylose) (Miura *et al.*, 1994), except for the group. 6; groups 8, 9, 10, 11 and 12 have this gene in over 60% of the varieties they cover. Another charge of quality flour component are glutenins (Martínez *et al.*, 2012.); Group 1 genotypes has any complex *Glu-1* (*Glu-A1b*, *Glu-B1a* and *Glu-D1*), while group 4 all have the *Glu-B1a* (100%) gene encoding the B x 7 subunit overexpressed, associated with better strength of the dough of wheat flour (Liu *et al.*, 2008); 40% of this variety have the *Glu-A1b* gene encoding the *Ax2**, which has positive

cualquiera de los dos determina endospermo de tipo duro (Morris *et al.*, 2001). También pueden considerarse «suave» las de los grupos 5, 9 y 11, ya que todas las variedades cuentan con *PinB-D1a* y 50, 40 y 70% respectivamente de *PinA-D1a*. El resto de los grupos (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 y 12) solo tienen presente ya sea *PinA-D1a* ó *PinB-D1a*, por lo cual se les puede clasificar como variedades «duras». Turnbull y Rahman (2002) indican que se prefieren las harinas de trigos duros para hornear pan con levadura, mientras que las harinas de trigos blandos se prefieren para la fabricación de galletas y pasteles.

La utilidad del análisis de conglomerados ha sido reportada por varios autores quienes indican que permite una caracterización parcial o previa de los genotipos comprendidos en los grupos y que arrojan información de su comportamiento y posible utilidad (Ye *et al.*, 2001).

Conclusiones

De los 12 grupos formados, las variedades del grupo 6 son las que poseen menor número de características favorables para un programa de mejoramiento, de los 13 genes deseados, solo presenta 5. Si se desea la obtención de variedades precoces, se deben considerar las variedades de los grupos 5, 9 y 10 como fuentes de donación de alelos para esta característica. Las variedades de los grupos 1, 3, 4, 5 y 12 son las indicadas para heredar el conjunto de genes *Lr68*, *Lr46*, *Lr34* y *Sr2*. Si se desea la obtención de variedades con características deseables para la industria (calidad), los grupos 3, 4, 7, 8 y 12 son los indicados.

En general los grupos 3, 4 y 12 poseen variedades con características deseables (precocidad, resistencia a enfermedades y genes asociados a la calidad industrial) para un programa de mejoramiento.

Agradecimientos

La presente investigación se realizó con el apoyo del proyecto Núm. 146788 denominado: 'Sistema de mejoramiento genético para generar variedades resistentes a royas, de alto rendimiento y alta calidad para una producción sustentable de trigo en México'. Del fondo S0007-2010-03 de la convocatoria SAGARPA-CONACYT.

effects on bread making (Nakamura, 2000) subunit; 60% and *Glu-D1*, coding for the subunit 5+10 which is the best combination for high molecular weight glutenin (Liu *et al.*, 2008). These two features (rusts and quality) could be regarded as two of the main objectives of breeding programs for Mexican wheat with reduced plant height.

The *Glu-B1a* allele found only in group 4. The groups 6, 10 and 11 only have the presence of *Glu-A1b*. In the rest of the groups (2, 3, 5, 7, 8, 9 and 12) both *Glu-A1b* is present as *Glu-D1*. As regards endosperm texture or hardness, varieties of group 1 are classified as «mild», since 100% of these have this wild-type alleles *PinA-D1a* and *PinB-D1a*. These work together in determining grain texture, the presence of both loci determines softness, while the absence of either type determines hard endosperm (Morris *et al.*, 2001). Also be considered «soft» the groups 5, 9 and 11, since all varieties have *PinB-D1a* and 50, 40 and 70% respectively *PinA-D1a*. The remaining groups (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 and 12) have only this either *PinA-D1a* or *PinB-D1a*, so they can be classified as «hard» varieties. Turnbull and Rahman (2002) indicated that durum wheat flour are preferred for leavened bread baking, whereas soft wheat flours are preferred for making biscuits and cakes.

The utility of cluster analysis has been reported by several authors who suggest that allows partial or previous characterization of genotypes included in the groups and give information on their behaviour and potential usefulness (Ye *et al.*, 2001)

Conclusions

Of the 12 groups formed, varieties of group 6 are those with fewer favourable characteristics for a breeding program, of the 13 genes allowed, only presents 5. If obtaining early varieties is desired, consider the varieties groups 5, 9 and 10 as alleles donor sources for this feature. Varieties in groups 1, 3, 4, 5 and 12 are indicated to inherit all of *Lr68*, *Lr46*, *Lr34* and *Sr2* genes. If obtaining desired varieties with desirable characteristics for industry (quality), groups 3, 4, 7, 8 and 12 are to be chosen.

Overall groups 3, 4 and 12 have varieties with desirable characteristics (earliness, disease resistance and quality associated with industrial genes) for a breeding program.

End of the English version



Literatura citada

- Checa, C. M. A. 2007. Polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, Segunda Época. 20:213-221.
- Borlaug, N. E. 1968. Wheat breeding and its impact on world food supply. *In: proceedings 3th. International Wheat Genetics Symposium*. Finley, K. W. and Shephard, W. (Eds.). Canberra, Australia. 1-36 pp.
- Ellis, M. H. W.; Spielmeier, K. R.; Gale, G. J. and Rebetzke, R. A. 2002. "Perfect" markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theor. Appl. Gen.* 105:1038-1042.
- Gupta, P. K.; Varshney, R. K.; Sharma and P. C. and Ramesh, B. 1999. Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant Breed.* 118:369-390.
- Hanson, H. N. E. and Borlaug, Y. R. G. Anderson. 1982. Trigo en el tercer mundo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). México. El Batán.
- Herrera, F. S. A.; Singh, R. P.; Huerta, E. J.; Rosewarne, G. M.; Periyannan, S. K.; Viccar, L.; Calvo, S. V.; Lan, C. and Lagudah, E. S. 2012. Lr68: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. *Theor. Appl. Gen.* 124:1475-1486.
- Lillemo, M.; Singh, R. P.; William, M.; Herrera, F. S. A.; Huerta, E. J.; German, S.; Campos, P.; Chaves, M.; Madriaga, R.; Xia, X.; Liang, S.; Liu, D.; Li, Z. and Lagudah, E. 2011. Multiple rust resistance and gene additivity in wheat: lessons from multi-location case studies in the cultivars Parula and Saar. *In: Global Rust Initiative Meeting*. St. Paul. 111-120 pp.
- Liu, S.; S. Chao, J. and Anderson, A. 2008. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunit in wheat. *Theor. Appl. Gen.* 118:177-183.
- Manly, B. F. J. 1986. Multivariate statistical methods: a primer. Ed. Chapman and Hall. London. 160 p.
- Martínez, C. E.; Espitia, R. E.; Villaseñor, M. H. E. y Peña, B. R. J. 2012. Contribución de los loci *Glu-B1*, *Glu-D1* y *Glu-B3* a la calidad de la masa del trigo harinero. *Rev. Fitotec. Mex.* 35(2):135-142.
- McIntosh, R. A.; Devos, K. M.; Dubcovsky, J.; Rogers, W. J.; Morris, C. F.; Appels, D. J. Sommers, D. J. and Anderson, O. A. 2007. Catalogue of gene symbols for wheat (supplement). <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/maps.html>.
- Miura, H.; Tanii, S.; Nakamura, T. and Watanabe, N. 1994. Genetic control of amylose content in wheat endosperm starch and differential effects of three *Wx* genes. *Theor. Appl. Gen.* 89:276-280.
- Morris, C. F.; Lillemo, M.; Simeone, M. C.; Giroux, M. J.; Babb, S. L. and Kidwell, K. K. 2001. Prevalence of puroindolines grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats. *Crop Sci.* 41:218-228.
- Nakamura, H. 2000. Allelic variation at high-molecular-weight glutenin subunit Loci, Glu-A1, Glu-B1 and Glu-D1, in Japanese and Chinese hexaploid wheats. *Euphytica* 112:187-193.
- Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellites and machines. *Trends Genet.* 9:275-280.
- Tautz, D. and Renz, M. 1984. Simple DNA sequences of *Drosophila virilis* isolated by screening with RNA. *J. Mol. Biol.* 172:229-235.
- Turnbull, K. M. and Rahman, S. 2002. Endosperm texture in wheat. *J. Cereal Sci.* 36:327-337.
- Villarreal, R. L. 1995. Expanding the genetic base of CIMMYT bread wheat germplas. *In: wheat breeding at CIMMYT. Commemorating 50 years of research in Mexico for global wheat improvement*. Rajaram, S. and Hettel, G. P. (Eds.). Wheat Special Report No. 29. CIMMYT. Mexico, D. F. 16-21 pp.
- Villaseñor, H. E.; Huerta, E. J.; Espitia R. E.; Camacho C. M. y Solís, M. E. 2004. Contribuciones de la genotecnia en el cultivo de trigo en México. *In: Memoria Científica: XX Congreso Nacional Fitogenética. Simposium Aportaciones de la Genotecnia a la Agricultura*. Toluca, Estado de México. 58-86 pp.
- Ward, J. H. Jr. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association.* 58:236-244.
- Yang, F. P.; Zhang, X.; Xia, D.; Laurie, A.; Yang, W. and He, Z. H. 2009. Distribution of the photoperiod insensitive Ppd-D1a allele in Chinese wheat cultivars. *Euphytica.* 165:445-452.
- Ye, C. W.; Solís, H. D.; Lozano del R. A. J.; Zamora V. B. M.; y Ayala, O. B. M. 2001. Agrupamiento de germoplasma de triticales forrajero por rendimiento, ahijamiento y gustosidad. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México (INIFAP). *Téc. Pec. Méx.* 39:1:15-29.
- Zhang, J.; Wang, Y.; Wu, S.; Yang, J.; Liu, H. and Ahou, Y. 2012. A single nucleotide polymorphism at the *Vrn-D1* promoter region in common wheat is associated with vernalization response. *Theor. Appl. Gen.* 125:1697-1704.