



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO FISILOGIA VEGETAL



## TESIS DOCTORAL

“Análisis ecofisiológico y molecular del impacto de la mejora genética del trigo duro en ambiente mediterráneo sobre la formación del rendimiento y la acumulación de aminoácidos y proteínas ”

Julio Isidro Sánchez  
Granada, 2008



#



Universidad de Granada  
Facultad de Ciencias  
Dpto. Fisiología Vegetal



**“Análisis ecofisiológico y molecular del impacto de la mejora genética del trigo duro en ambiente mediterráneo sobre la formación del rendimiento y la acumulación de aminoácidos y proteínas”**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

**Julio Isidro Sánchez**

Para optar al grado de Doctor.

Tesis realizada bajo la dirección de:

**Dr. Luis F.García del Moral Garrido**

Dpto. Fisiología Vegetal, Universidad de Granada.

**Dra. Concepción Royo Calpe**

Mejora de Cereales, IRTA.



*“Cuando dios abandonaba a Antonio “*

*“Cuando de repente, a medianoche,  
se escuche pasar una comparsa invisible  
con músicas maravillosas, con vocerío  
-tu suerte que ya declina, tus obras que fracasaron,  
los planes de tu vida que resultaron todos ilusiones-  
no llores inútilmente.*

*Como preparado desde tiempo atrás, como valiente,  
di adiós a Alejandría que se aleja.  
Sobre todo no te engañes,  
no digas que fue un sueño,  
que se engañó tu oído:  
no aceptes tales vanas esperanzas.....”*

**Kostantino Kavafis**

*Sé que en algún lugar del mundo, existe una rosa única,  
distinta de todas las demás rosas, una cuya delicadeza,  
candor e inocencia, harán despertar de su letargo a mi alma,  
mi corazón y mis riñones.*

*A esa rosa, donde quiera que esté, dedico este trabajo,  
con la esperanza de hallarla algún día, o de dejarme hallar por ella.*

*Existe... rodeada de amapolas multicolores,  
filtrando todo lo bello a través de sus ojos aperlados,  
cristalinos y absolutamente hermosos.*

*“El principito”*

*¿A ti que te gustan rubias o morenas?  
Dicho popular.*



**A mis padres.  
A mis hermanos.  
A mis amigos.**





## Agradecimientos

Eran aproximadamente las 19.56 p.m. del 15 de Noviembre del 2002 cuando recibí una llamada de la Universidad de Granada. Estaba con mi amiga Mercedes y cuando terminé de hablar le dije “*No me acuerdo de enviar ese curriculum*”. En Abril del 2003, recibí otra llamada, me habían aceptado.

Cuando te embarcas en un proyecto tan largo, surgen las dudas. La duda metafísica del que pasará después de la tesis, eso fue lo primero que pensé. Sin embargo, la posibilidad de irme a otra ciudad, saber que ampliaría mis conocimientos en Biología, y quizás paradójicamente, la incertidumbre de un camino sin dirección, hicieron que me viniera para Granada.

Al terminar un trabajo tan largo en el tiempo y lleno de dificultades como es el desarrollo de una tesis, lo primero que haces es mirar hacia atrás y acordarte de todas esas personas e instituciones que sin su participación y ayuda, hubiera sido imposible finalizarla. Por ello, para mí es un placer poder utilizar este espacio para poder expresar mis agradecimientos.

En primer lugar, debo agradecer al Catedrático Luis F. García del Moral Garrido, por aceptarme (después de ver mi foto en el curriculum) no sólo para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección sino también en mi formación como investigador. A la Dra. Conxita Royo del IRTA de Lérida por el apoyo e interés que siempre me ha mostrado desde el principio y por el haberme suministrado las semillas durante todos estos años. A los dos me gustaría agradecerles sinceramente el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

También quiero agradecer la ayuda, formación y su labor al Dr. Ignacio Fernández-Fígares. Tus enseñanzas sobre el arduo mundo del HPLC me han servido de mucho. Gracias Ignacio, por tu amistad y por escucharme en momentos de debilidad.

Al Dr. John Clarke y al Dr. Ron Knox por permitirme realizar una estancia en el *Semiarid Prairie Agricultural Research Center* (SPARC) de Swift Current (Saskatchewan) en Canadá, donde pude aprender la técnica de microsátélites.

Al Dr. Daniel Miralles por aceptarme en su grupo de investigación de la Universidad de Buenos Aires, por enseñarme todo lo necesario sobre desarrollo apical y por su paciencia en mis correos.

He de agradecer también a D. Francisco Martínez y Antonio López de la empresa pública DAP de la Junta de Andalucía, por su disponibilidad, generosidad y paciencia durante todos estos años en lo que hemos sembrado en el Cortijo de Enmedio. Sin vuestra ayuda hubiera sido imposible poder tener resultados. Me gustaría extender mis agradecimientos a todo el equipo de Fali de Sevilla, por su ayuda en la siembra y recolección.

Quiero agradecer también la ayuda prestada por la Dra. Mariam Moralejo del IRTA de Lérida durante mis primeros pasos en la genética molecular. Agradecer enormemente a Eva, y David por hacerme sentir uno más en tan pocos días. A Marc Moragues, que siempre tuvo un sí para mis dudas y a Mónica Elías por ser un sol entre tantas nubes moleculares y como no, a mi compañera de tesis, Fanny Álvaro. A tod@s muchas gracias.

A la Dra. Ana Garrido de la Universidad de Córdoba, por su desinteresada y amable ayuda al aceptarme para aprender la técnica NIRs.

A la segunda familia que tengo en Canadá. Alison y Theresa, I love you. A mis padres canadienses Ken y Judy. En especial a ustedes Brad y Lis (Dani), por tu ayuda, amistad, ... no tengo palabras para expresarlo. Muchas Gracias.

A todos mis amigos de Buenos Aires (Negro, Flaca, Román, Ramiro, Ernesto, Walter, Tinguítela, Schalamuk, Abelleira, Javier, Pedro, Gaspar, Juanito, Gucho, Pedro, la Rubia, Ferraro, Karina y El Chino) con los que compartí muchos momentos, no sólo en el laboratorio sino también en el terrero de juego, el españolito os dio “pal pelo”. Muchas gracias.

A D. Francisco Ortiz Blázquez y a D. Antonio J. Ortiz por aquella llamada en el trayecto hacia Sevilla en la primavera del 2003.

A la Dra. Rosa Nieto, y Dr. Pepe Aguilera, por su amabilidad, generosidad y simpatía desde el principio. Y en extensión a Ana, Beatriz, Lucre, Irene, Julia, Alicia, Eva, Cristina, Arancha, Mamén, Eli, Rosa, Cantalapiedra, Angustia, José, Paco, Juanito y al alternativo (Rafa), por aguantarme con todas las letras. Al Dr. Manolo Lachica, por ser como es y por tener el único apellido que da error en Word.

A todos mis compañeros del Departamento de Fisiología Vegetal, a Yahia por el inicio y en especial a María, Drew, Inma, Cristina, Carmen y al Tomás, por su amistad y por todos los momentos vividos juntos. A ti también, Rafulio, por todo y por lo que queda, sin ustedes todo hubiera sido diferente.

A Sonsoles por el tiempo compartido y los buenos momentos. Si no fuimos parte de la solución es porque éramos parte del problema.

A todos mis amigos, a los Kalulas, Bolero, Moloni, Lukovit, Roterbo, Tini, Trato, y en especial al Oreja, el Mediano, la Flome, el “escombros”, y Eskinul por que sois una parte importante en mi vida y ser unos verdaderos bollakidos de breicon con mostaza. A mi Vaka, Cabeza, Trans y Lucia, y a sus respectiv@s. Todos sois el queso de mis macarrones.

A mi titi Juan por ser el abuelo que nunca tuve. A mi primo Juan por lo que me ha enseñado y a mi prima Aurora por dejarme haberla conocido. Para Monik los primeros versos de la canción “Piedra sobre piedra” del Último de la fila. A Adriana, Tanuki, la rubia y Heidi por lo bonito de las casualidades. A José Antonio Peña por enseñarme su mano “izquierda” y a Alberto “el niño de Linares” por los pasteles de su madre.

A mis amigos de batalla, Rosarillo y Shumaker (Gustavo) por que sé que me queréis, y no es fácil (con estas orejas).

Al chocolate y a los “helados de chocolate”, sin ellos no sé que hubiera sido de mí.

Asimismo, soy consciente de que otras personas (Nem, Antoñito, Laurita) y amigos (hay amigos que no son personas) han contribuido de una forma u otra a este trabajo, a ellos también mi sincera gratitud.

A mi familia; a mi padre Francisco Isidro Muñoz y a mi madre M<sup>a</sup> Gracia Sánchez Sánchez, por su ejemplo de lucha, cariño, amor y honestidad, sobre todo por enseñarme que lo esencial siempre es invisible a los ojos. Jefe y jefa, de grande quiero ser la mitad de lo que sois ustedes. Desde la perspectiva que da el tiempo, os digo que os quiero mucho más que nunca, igual que a mis hermanos Marikilla y Orgueta, que los llevo siempre conmigo.

Por último, tanto agradecer y agradecer, me gustaría agradecerme a mí mismo la tesis, por que sin mí, esto no hubiera sido posible. La vida son despedidas. Te despides de la juventud, de los amores, de los domingos... ahora me toca despedirme de mi tesis. Despedirse es la consecuencia de marcharse a alguna parte, una llegada. Y llegar está bien, sobre todo, porque sabes que puedes despedirte. Soy dudoso, ambiguo, extraño. Quiero cambiar constantemente. Dudo de mí cuando estoy despierto y cuando duermo

tengo pesadillas, en las que salgo yo. No necesito orbitar alrededor de un planeta—de ningún planeta—para recibir los rayos del sol. No sé adonde voy ni que haré una vez allí. No tengo ninguna vocación de satélite y puede que mi luz sea tenue, pero es propia. He perdido el hilo, el de mi vida; pero aún se mantiene cerquita, me bastaría con hacer un fácil esfuerzo con la mano.

Gracias a todos y a todas. Muchos besos y abrazos.

Nos vemos cuando nos miremos o cuando se nos reflejen las pupilas.

Esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido realizada en el marco de las actividades del Proyecto de investigación «Aproximación multidisciplinar al incremento de la eficacia en la mejora del trigo duro: Integración de técnicas ecofisiológicas y moleculares». Programa Nacional de I+D+I, CICYT, Proyecto nºAGL2002-04285- C03.

#

## Índice

<b>Índice</b> .....	vi
<b>Índice de tablas y figuras</b> .....	x
<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Introducción General</b> .....	7
Origen, características e importancia del trigo duro.....	9
Desarrollo de la planta de trigo.....	11
Desarrollo del meristemo apical.....	15
Fase Vegetativa.....	15
Período de diferenciación floral.....	15
Antesis.....	17
Formación del rendimiento y sus componentes.....	17
Análisis mediante coeficientes de sendero.....	21
Interceptación de radiación fotosintéticamente activa.....	23
Contenido de proteínas y aminoácidos en el grano.....	26
Mejora genética del trigo.....	27
Uso de series históricas de cultivares.....	28
Genes Rht de enanismo.....	28
Selección asistida por marcadores: Microsatélites.....	31
Perspectivas de futuro.....	32
Referencias.....	35
<b>Aspectos metodológicos</b> .....	51
Material Vegetal.....	53
Localización de los ensayos, condiciones de cultivo y diseño experimental.....	54
Rendimiento y componentes.....	55
Fenología.....	57
Análisis del desarrollo apical.....	57
Cálculo del tiempo térmico.....	58
Análisis de proteínas y aminoácidos durante el llenado del grano.....	58
Análisis del contenido en proteína bruta.....	59
Determinación aminoacídica de trigo duro mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa.....	59
Hidrólisis de la proteína.....	60
Oxidación Perfórmica.....	60
Reacción de derivación de los aminoácidos. Método Pico-Tag Waters.....	62
Separación y cuantificación cromatográfica.....	64
Análisis estadístico.....	67
Estudio por coeficientes de senderos.....	69

Determinación de microsatélites.....	70
Preparación del material vegetal.....	70
Extracción rápida mediante CTAB del DNA del material vegetal.....	70
Cuantificación del DNA obtenido.....	72
Amplificación de DNA mediante PCR.....	72
Secuenciación y visualización de los resultados mediante electroforesis en gel de azarosa.....	73
<b>Objetivos.....</b>	<b>75</b>
<b>Chapter 1. Dwarfing gene <i>Rht-B1b</i> affects the yield-formation strategy of Durum wheat as revealed by path-coefficient analysis.....</b>	<b>81</b>
Abstract.....	83
Introduction.....	84
Material and Methods.....	86
Results.....	90
Correlation analyses.....	91
Path Coefficients analysis.....	93
Discussion.....	97
Environmental effects.....	97
Direct and indirect effects on yield formation.....	100
Path Analysis vs. Correlation Analysis.....	102
Conclusions.....	102
References.....	103
<b>Chapter 2. Changes in apical development of durum wheat caused during the 20th century: Analysis by phases and its implications for yield formation.....</b>	<b>107</b>
Abstract.....	109
Introduction.....	110
Material and Methods.....	111
Experimental set-up.....	111
Measurements.....	112
Statistical analysis.....	115
Results.....	115
Environmental characterization.....	115
Duration of development.....	115
Floral development and abortion, grain setting, and yield components.....	116
Discussion.....	120
Duration of the developmental phases.....	120
Breeding effects on floral development, floral abortion, grain setting and yield components.....	123
Conclusions.....	125
References.....	127



<b>Chapter 3: <i>Rht-B1b</i> effects on canopy architecture and use of photosynthetically active radiation in durum wheat under Mediterranean conditions. I. Leaf and canopy characteristics.....</b>	<b>133</b>
Abstract.....	135
Introduction.....	136
Material and Methods.....	137
Experimental set-up.....	137
Data Recording.....	138
Statistical analysis.....	139
Results.....	140
Green area at anthesis and maturity.....	141
Biomass accumulation and chlorophyll content.....	143
Grain yield, kernel weight, LAD and GAD.....	144
Discussion.....	145
Conclusions.....	148
References.....	149
<b>Chapter 4: <i>Rht-B1b</i> effects on canopy architecture and use of photosynthetically active radiation in durum wheat under Mediterranean conditions. II. Absorption and use-efficiency of photosynthetic radiation .....</b>	<b>155</b>
Abstract.....	157
Introduction.....	158
Material and Methods.....	159
Field Experiments.....	159
Fraction of absorbed radiation and radiation-use efficiency.....	160
Growth indices.....	161
Statistical analyses.....	161
Results.....	162
Fractional radiation intercepted and extinction coefficient ( <i>k</i> ).....	162
Radiation-use efficiency (RUE), net assimilation rate (NAR), crop growth rate (CGR) and leaf: grain ratio (G).....	165
Discussion.....	165
Conclusions.....	169
References.....	170
<b>Chapter 5: Breeding effects on amino acid composition during kernel development of durum wheat grown under two different Mediterranean environments.....</b>	<b>177</b>
Abstract.....	179
Introduction.....	180
Material and Methods.....	182
Experimental design.....	182
Analytical methods.....	183
Rate and duration of protein content and amino acid accumulation.....	185
Statistical analyses.....	185

Results.....	186
Evolution of dry weight and protein content during grain filling.....	186
Pattern of amino acid accumulation along the grain filling.....	189
Amino acid accumulation in mature kernel and relative amino acid during the grain filling.....	192
Duration and rate of protein and amino acid accumulation.....	192
Amino acid evolution during grain filling.....	193
Discussion.....	196
Conclusions.....	204
References.....	206
<b>Chapter 6: Using of SSRs to the introduction of new molecular techniques to the laboratory.....</b>	<b>211</b>
Introduction.....	213
Material and Methods.....	214
Plant Material.....	214
DNA isolation.....	215
Microsatellites and PCR amplification.....	215
Data Analyses.....	216
Results and Discussion.....	216
References.....	222
<b>Discusión general.....</b>	<b>226</b>
Introducción.....	228
Influencia de los alelos Rht-B1b sobre la estrategia de formación del rendimiento mediante análisis por coeficientes de sendero.....	230
Cambios en el desarrollo apical de trigo duro causados por la mejora durante el siglo XX.....	231
Efecto de los genes de enanismo sobre la arquitectura del dosel foliar y el uso de la radiación fotosintéticamente activa en trigo duro bajo condiciones Mediterráneas.....	233
I. Características del dosel foliar.....	233
II. Interceptación y uso de la radiación.....	235
Efecto de la mejora sobre la acumulación de proteínas y aminoácidos a lo largo del llenado del grano.....	237
Uso de los marcadores SSRs para la introducción de una nueva técnica molecular en laboratorio.....	240
References.....	241
<b>Conclusiones.....</b>	<b>249</b>

## Índice de tablas y figuras

### Aspectos metodológicos

Table 1.	Características del material vegetal utilizado en la Memoria.....	54
Table 2.	Características generales de los ensayos.....	56
Table 3.	Condiciones cromatográficas.....	65
Table 4.	Modelo del análisis de varianza para el rendimiento y sus componentes.....	68
Table 5.	Condiciones de la PCR.....	72

### Chapter 1

Fig. 1	Path coefficients diagram showing the interrelationships between the duration of the vegetative and grain-filling periods and yield components during the ontogeny of yield formation in the set of durum wheat cultivars without (naked values) or with the Rht-B1b allele (values between brackets). The single-headed arrows indicate path coefficients and the double-headed arrows indicate simple correlation coefficients.....	90
Table 1.	Agronomic details, climatic conditions, and soil characteristics of the 12 experiments carried out at two Mediterranean environments (North and South) of Spain.....	88
Table 2.	Description of the 24 Italian and Spanish durum wheat cultivars used in the study.....	89
Table 3.	Means for grain yield, its components, and duration of vegetative and grain-filling periods for two sets of durum wheat cultivars with or without the dwarfing gene Rht-B1 grown for six years in two Mediterranean environments.....	92
Table 4.	Pearson correlation coefficients among the traits studied for two sets of durum wheat cultivars with or without the dwarfing gene Rht-B1 grown for six years in two Mediterranean environments.....	93
Table 5.	Path coefficient analysis of grain yield in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene Rht-B1 grown during six years in two Mediterranean environments.....	95
Table 6.	Path coefficient analysis of kernel weight in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene Rht-B1 grown during six years in two Mediterranean environments.....	96
Table 7.	Path coefficient analysis of kernels per spike in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene Rht-B1 grown during six years in two Mediterranean environments.....	98
Table 8.	Path coefficient analysis of grain filling period in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene Rht-B1 grown during six years in two Mediterranean environments.....	99

## Chapter 2

Fig.1	Weather conditions during the crop cycle in both environments. Rainfall (mm), daily global radiation (MJ m <sup>-2</sup> ) (...), maximum (—) and minimum (---) temperatures (°C) are represented. Water input includes rainfall plus irrigation. The duration of the most important phases of apical development: TS (terminal spikelet), BO (booting), ANT (anthesis) and MAT (maturity) are indicated for each experiment.....	114
Fig.2	Thermal time (GDD) from sowing to terminal spikelet (S-TS), terminal spikelet to booting (TS-BO), booting to anthesis (BO-ANT), sowing to anthesis (S-ANT) and anthesis to maturity (ANT-MAT) of 24 durum wheat cultivars released in different periods in Italy and Spain. Data are means of four experiments at each latitude. Arrows indicate anthesis (A) and maturity (M) occurrence. Means followed by the same letter in each column and figure do not significantly differ according to Tukey's Studentised Ranged test at 5% probability level. Percentages in parentheses represent the difference (+ or -) between old cultivars and the others.....	117
Fig.3	Relationship between the percentage of floral abortion from booting to anthesis and the duration of the BO-ANT phase. Each point represents the mean value across six experiments conducted in northern and southern Spain for old (Δ), intermediate (O), and modern (□) sets of durum wheat cultivars.....	121
Fig.4	Relationship between the number of grains per spike and grain setting. Each point represents the mean value across six experiments conducted in northern and southern Spain for old (Δ), intermediate (O), and modern (□) sets of durum wheat cultivars.....	124
Fig. 5	Relationship between grain setting and the mean temperature between anthesis and maturity. Each point represents the mean value across six experiments conducted in the northern (Δ) and in the southern (□) of Spain.....	125
Table 1.	Description of the cultivars used in the study.....	113
Table 2.	Number of fertile florets at booting and at anthesis for 24 durum wheat cultivars released in different periods in Italy and Spain determined on four experiments at each of two contrasting latitudes Means within a column and group followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to old cultivars appears in parentheses. NFB number of fertile florets per spike at booting, NFsB number of fertile florets per spikelet at booting, NFFA number of fertile florets per spike at anthesis, NFFsA number of fertile florets per spikelet at anthesis.....	119
Table 3.	Main spike components, floret abortion, and grain setting of 24 durum wheat cultivars released in different periods in Italy and Spain determined on six experiments at each of two contrasting latitudes. Means within a column and group followed by the same letter do not significantly differ according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to old cultivars appears in parentheses. NsS: number of spikelets per spike, NGS: number of grains per spike, NGs: number of grains per spikelet. BO-ANT: from booting to anthesis, ANT-MAT: anthesis to maturity, BO-MAT, booting to maturity SET: Grain setting.....	122

### Chapter 3

Fig. 1	Relationship between grain yield ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) and crop dry weight at anthesis ( $\text{g m}^{-2}$ ). Each point represents the mean value across five experiments conducted in the southern Spain for cultivars without Rht-B1b allele ( $\Delta$ ) (---), and for cultivars with Rht-B1b allele ( $\square$ ) (—).....	143
Fig.2	Relationship between grain yield ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) and the number of days from sowing to anthesis. Each point represents the mean value across five experiments conducted in the southern Spain for cultivars without Rht-B1b allele ( $\Delta$ ) (---), and for cultivars with Rht-B1b allele ( $\square$ ) (—).....	
Table 1.	Description of the experimental details.....	138
Table 2.	Description of the 24 Italian and Spanish durum wheat cultivars used in the study.....	140
Table 3.	Leaf area index (LAI), stem area index (SAI), ear area index (EAI), green area index (GAI) and crop dry weight (CDW) of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of Rht-B1b allele. Subscripts indicate growth stage: (a) anthesis, (m) physiological maturity. Means within a column and year followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation with cultivars without the Rht-B1b allele is between parentheses.....	142
Table 4.	Mean values of grain yield (Yha), single kernel weight (SKW), chlorophyll content (SPAD), leaf area duration (LAD), green area duration (GAD), days from sowing to anthesis (DSA) and days from anthesis maturity (DAM) of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of Rht-B1b allele. Means within a column and group followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to cultivars without Rht-B1b allele is between parentheses.....	144

### Chapter 4

Fig. 1	Relationship between the extinction coefficient based in LAI and the leaf-area index at anthesis. Each point represents the mean value across five experiments conducted in southern Spain for 12 cultivars without the Rht-B1b allele ( $\Delta$ ) (---), and 12 cultivars with the Rht-B1b allele ( $\square$ ) (—).....	164
Fig. 2	Relationship between the extinction coefficient based in LAI and SPAD values at anthesis. Each point represents the mean value across five experiments conducted in southern Spain for 12 cultivars without the Rht-B1b allele ( $\Delta$ ) (---), and 12 cultivars with the Rht-B1b allele ( $\square$ ) (—).....	164

Table 1.	Fraction of absorbed radiation (FRa) and extinction coefficient (K) of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of Rht-B1b allele. Means within a row group followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to cultivars without Rht-B1b allele is between parentheses. FRaL: Longitudinal fraction absorbed radiation, FRaT: Transversal fraction absorbed radiation, FRaM : Means of longitudinal and transversal fraction, KL GAI: longitudinal extinction coefficient on GAI basic, KT GAI: transversal extinction coefficient on GAI basic, KM GAI Means of longitudinal and transversal extinction coefficient on GAI basic, KL LAI: longitudinal extinction coefficient on LAI basic, KT LAI: transversal extinction coefficient on LAI basic, KM LAI: Means of longitudinal and transversal extinction coefficient on LAI basic.....	163
Table 2.	Mean of Extinction coefficient basic in LAI at different heights in the canopies at anthesis.....	163
Table 3.	Radiation use efficiency (RUE) at anthesis (a) and physiological maturity (m), net assimilation rate (NAR), crop growth rate (CGR) and assimilation efficiency (G) during grain filling period of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of the Rht-B1b allele. Means within a column and year followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to cultivars without Rht-B1b allele is between parentheses.....	166

## Chapter 5

Fig. 1	Dry weight kernel and grain protein content along the grain filling in two constraints environments during two years of study. Each point represents means of three replicates for old ( $\Delta$ ), intermediate (O) and modern ( $\square$ ) sets of cultivars growth in two environments. GDD represent growing degree days.....	188
Fig. 2	Amino acid accumulation along the grain filling in two constraints environments. Each point represents means of three replicates for old ( $\Delta$ ), intermediate (O) and modern ( $\square$ ) sets of cultivars growth in two environments.....	190
Table 1.	Agronomic details and soil characteristics of the experimental environments.....	184
Table 2.	Cultivars means for grain yield, single kernel weight, protein content, and amino acid composition (mg Aa/kernel) in mature grain of two contrasting regimes in the last century.....	194
Table 3.	Means of protein and amino acid curve coefficients (D, grain filling duration) during the grain filling. Data are means of four experiments. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level.....	195
Table 4.	Means of protein and amino acid curve coefficients (R, maximum rate of accumulation) during the grain filling. Data are means of four experiments. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level.....	198

Table 5.	Means and changes in total amino acid composition of wheat kernel during grain filling along two years of study in the south environment. Ala: alanine; Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Glu: glutamine; Gly: glycine; His: histidine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Pro: proline; Ser: serine; Thr: threonine; Tyr: tyrosine; Val: valine; S.E.: standard error of means. a Asx: aspartic acid + asparagine b Glx: glutamic acid + glutamine. GDD: Growing degree days. S: Sampling.....	199
Table 6.	Means and changes in total amino acid composition of wheat kernel during grain filling along two years of study in the north environment. Ala: alanine; Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Glu: glutamine; Gly: glycine; His: histidine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Pro: proline; Ser: serine; Thr: threonine; Tyr: tyrosine; Val: valine; S.E.: standard error of means. a Asx: aspartic acid + asparagine b Glx: glutamic acid + glutamine. GDD: Growing degree days. S: Sampling.....	200

## Chapter 6

Fig. 1	Dendrogram of 24 cultivars of durum wheat from Italy and Spain released in the last century based on 186 AFLP fragments. (1) Old Italian; (2) intermediate Italian; (3) modern Italian; (4) old Spanish; (5) intermediate Spanish; (6) modern Spanish.....	221
Table 1.	Description of the 24 Italian and Spanish durum wheat cultivar.....	217
Table 2.	Primer used in the SSRs analysis.....	218
Table 3.	Characterization of the degree of polymorphism generated with 31 primers SSRs.....	219

## Resumen

El trigo es actualmente el tercer cultivo más cultivado en el mundo y se cultiva mundialmente primeramente para consumo humano, aunque el uso industrial es también importante. No obstante, es necesario un aumento del rendimiento en los próximos años para alcanzar la demanda global de alimento. Por esto, es importante aumentar el rendimiento en aquellas regiones donde las condiciones de cultivo no son muy favorables. En este sentido, en el área mediterránea, el rendimiento del trigo se caracteriza por importantes fluctuaciones del rendimiento, debido normalmente a la duración, frecuencia e intensidad de estreses impredecibles de tipo abiótico (sequía, frío y calor).

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue aportar información útil sobre el impacto de la mejora genética en trigo duro (*Triticum turgidum L. var. durum*) sobre los caracteres fisiológicos en relación con el rendimiento en ambiente mediterráneo durante el último siglo. El material vegetal consistió en 12 cultivares italianos y españoles agrupados según su origen y año de liberación. Los experimentos se llevaron a cabo en dos ambientes españoles contrastantes localizados en diferente latitud durante varios años. Los caracteres medidos han sido el efecto directo e indirecto de los componentes del rendimiento; el contenido de proteínas y aminoácidos; el desarrollo apical a lo largo del crecimiento de la planta; radiación y uso eficiente de la radiación; acumulación de biomasa e índices de área verde.

Los resultados obtenidos demuestran que el análisis mediante coeficientes de sendero podría ser una herramienta útil para cuantificar la magnitud de los efectos indirectos que la presencia de los alelos *Rht-B1b* determina sobre los componentes del rendimiento y otros caracteres relacionados con el rendimiento.

La introducción de los genes de enanismo provocó cambios en la duración de las distintas fases durante la ontogenia del ciclo de vida del cultivo de trigo duro. La fase booting-antesis se encontró como la fase más determinante para un futuro aumento en el rendimiento, ya que es en esta etapa donde se produce la máxima competición entre tallo y espiga y porque fue la única etapa que aumentó durante el periodo de pre-anthesis. El ajuste fenológico provocado por la mejora quedó evidente en nuestro



estudio, ya que se produjo un acortamiento de las primeras etapas del ciclo del cultivo, que fue determinante a la hora de diferencias entre cultivares liberados en distintas épocas.

A su vez no se encontraron diferencias significativas en la interceptación de la radiación absorbida, ni en la arquitectura del dosel foliar en anthesis, como consecuencia de la incorporación del alelo *Rht-B1b*. No obstante, los alelos *Rht-B1b* podrían haber ejercido un fuerte efecto pleiotrópico sobre el uso eficiente de la radiación durante la fase vegetativa y el llenado del grano.

El aumento del rendimiento como consecuencia de la disminución en el índice de cosecha, ha provocado una disminución en el porcentaje de proteínas presentes en el grano. Nuestros resultados indican, que la mejora ha disminuido la tasa de acumulación de proteínas y aminoácidos durante el llenado del grano.

El último capítulo describe la introducción de una nueva técnica molecular en nuestro laboratorio. Aunque los resultados del último capítulo no han sido muy informativos, si se ha observado una reducción en la variabilidad del germoplasma italiano como consecuencia de una mejora mucho más reciente que en el caso del germoplasma español.

**Abstract**

Wheat is actually the third most widely grown crop in the world and is cultivated worldwide primarily as a human food, although animal feed and industrial uses are also important. However, a grain yield increase is necessary in the next years in order to reach the global food demand. For this, is important to increase the grain yield in those regions where the conditions to cultivars are not very favorable. In this sense, in the Mediterranean basin, durum wheat yields are characterized by important fluctuations, mainly due to the duration, frequency and intensity of unpredictable abiotic stresses (drought, cold and high temperatures).

The objective of this PhD was to generate useful information on the impact of the genetic improvement of durum wheat (*Triticum turgidum L.var.durum*) on the physiological traits, in relation to the grain yield in the Mediterranean environment during the last century. The plant material consisted of 12 Italian and 12 Spanish durum wheat cultivars grouped in accordance with its origin and period of release. Field experiments were conducted in two contrasting Spanish environments located in different latitudes during several years. The traits studied included the direct and indirect effect of the components of grain yield; the protein and amino acid contents; the apical development during the growth of the plant; radiation and efficient use of radiation; accumulation of biomass and green area index.

The results show that path coefficients could be a useful tool to quantify the magnitude of the indirect effects which the presence of the allele *Rht-B1b* determines on the yield components and on other traits related to the grain yield.

The introduction of the dwarfing genes caused changes in the duration of the phases during the ontogeny of the plant cycle. The booting-antesis phase was found as the most determinant phase for the future increase in the grain yield, as is in this phase where is produced the maximum competitions between the stem and ear and because was the only phase that increase during the pre-anthesis period. Our results, also indicate that it was produced a shortening in the first phases of the plant cycle before anthesis and this is an important factor to differentiate between cultivars release during different period.

In addition, our study did not show significant differences neither in the interception of the absorbed radiation, neither in the architecture of the crop at anthesis, as consequence of the incorporation of the *Rht-B1b* allele. The *Rht-B1b* allele could have exerted a strong pleiotropic effect on the radiation use efficiency during the vegetative and the grain filling phase.

The increase in grain yield as consequence of the diminution in the harvest index has induced a decrease in the percentage of the proteins present in the grain. Our results indicate that, the breeding has diminished the accumulation of proteins and amino acids during the grain filling

The last chapter describes the introduction of the microsatellites technique in our laboratory. Although the results of the last chapter have not been very informative, a reduction has been observed in the variability of the Italian germplasm as a result of a more recent breeding than in the case of the Spanish germplasm.



4



CICYT 04-05

# CAMACHO

SEED 1950

ESPAÑOL



## **Introducción General**

*En página anterior:  
Siembra CICYT 04-05*



## Introducción

Dado que esta Memoria de Tesis Doctoral se presenta en forma de artículos, cada uno de ellos con su introducción específica, a continuación se realiza una introducción general a los distintos capítulos que la componen.

### Origen, características e importancia del trigo duro

El inicio del cultivo de plantas fue originalmente descrito como la revolución neolítica. Para el trigo, es probable que su cultivo se iniciase alrededor del 12.000 antes de la actualidad (a.a.) y en algún lugar del creciente fértil (actual Mesopotamia). Estudios con marcadores moleculares han mostrado que todas las formas cultivadas tienen su origen en las montañas del suroeste de Turquía, desde donde se distribuyeron hacia el norte y el sur de Mesopotamia alrededor del 10.000 a.a. Posteriormente, se distribuyó a lo largo de toda la cuenca mediterránea, hasta llegar a Italia y España alrededor del año 7000 a.a.

El trigo pertenece a la división Magnoliophyta, clase Liliopsida, orden Poales (Graminales), familia Gramíneas (Poaceas), subfamilia Festucoideae, tribu Triticaceae (Hordeae), género *Triticum*. Éste comprende alrededor de 30 tipos de trigo que tienen suficientes diferencias genéticas como para ser consideradas especies distintas o subespecies (Mac Key, 2005).

Las especies del género *Triticum* pueden agruparse en tres secciones naturales distinguibles por su número básico de cromosomas (7, 14 ó 21), teniendo todas las especies un origen probablemente monofilético (Mac Key, 2005). Los trigos comerciales actuales pertenecen a las especies *Triticum turgidum* var. *durum* (tetraploide,  $2n=28$ , genoma AABB), trigo duro o trigo semolero, cuyo principal producto comercial es la pasta y sus derivados, y *T. aestivum* (hexaploide,  $2n=42$ , genoma AABBDD), trigo panadero, trigo harinero o trigo blando, por contraposición a los otros tipos de trigos, pero que puede llevar a confusión al traducir nombres comerciales internacionales, ya que dentro de esta especie se comercializan trigos “hard” (duros) y “soft” (blandos) (Carrillo y cols., 2006).

Los trigos tetraploides se originaron por la duplicación espontánea de los cromosomas procedentes del cruzamiento natural de un trigo diploide, *Triticum urartu*



con otra especie diploide próxima a *Aegilops speltoides* de la sección *Sitopsis* del género *Aegilops* (Mac Key, 2005).

El trigo duro es la especie más cultivada de trigo tetraploide. Actualmente la FAO estima que el área mundial cultivada con trigo duro comprende aproximadamente 13 millones de hectáreas, es decir alrededor del 24% de la superficie total del trigo, con una producción de 26 millones de toneladas para el año 2006 (FAO, 2007). El área de cultivo del trigo duro es típicamente mediterránea, ya que más del 60% de la producción mundial se localiza en dicha región, siendo la Unión Europea la principal productora mundial (Morancho, 2000). Le siguen Argelia, Marruecos, Siria, Túnez y Turquía, que en conjunto, cultivan cerca de un tercio de la superficie mundial, pero dado que también tienen una demanda interna bastante alta, figuran entre los principales países importadores (Morancho, 2000). En España, la superficie total de trigo duro cultivada en el año 2007 fue de 514.552 ha, concentradas principalmente en Andalucía (58,5%), Zaragoza (32%), Badajoz (4,5%), Toledo (3%), Navarra (1,4%) y Burgos (0,6%) (AETC, 2007).

Debido a las características de dureza, color, vitrosidad, contenido proteico y fuerza del gluten de su grano, el trigo duro se utiliza casi en su totalidad para el consumo humano, bajo la forma de diversos productos, tales como pasta, couscous, bulgur o las populares harinas semoleras de Andalucía para freír o hacer migas.

Como se describe más arriba, el 95% del trigo duro se produce en España en los secanos de Andalucía, Aragón y Extremadura. Como ocurre en toda el área Mediterránea, los secanos se caracterizan por importantes fluctuaciones del rendimiento, debido normalmente a la duración, frecuencia e intensidad de estreses impredecibles de tipo abiótico (sequía, frío y calor). En comparación con el trigo harinero, el trigo duro se adapta mejor a los ambientes con menor pluviosidad y temperaturas más altas, por lo que la mayor parte de los ambientes donde se produce trigo duro pueden definirse, en términos generales, como de tipo semi-árido, con pluviometría inferior o igual a 350 mm anuales.

Aunque el déficit hídrico puede afectar al trigo duro cultivado en ambiente mediterráneo durante todas las fases del desarrollo, suele hacerse más agudo a partir de la antesis, cuando además se suma la elevada radiación y temperatura típicas de este ambiente, lo que se conoce como sequía terminal (Loss y Siddique, 1994; Royo y cols 1998). Los daños causados por el estrés hídrico en la planta dependen de su intensidad, del momento en el que aparece, de su duración, del estado vegetativo de la planta y del

genotipo. La planta suele responder mediante una secuencia de cambios en su morfología y fisiología. La adaptación al estrés se manifiesta en la planta a cuatro niveles: desarrollo, morfológico, fisiológico y metabólico.

Desde un punto de vista morfológico la planta de trigo se caracteriza por presentar un sistema radical compuesto por raíces primarias o seminales (funcionales desde emergencia hasta comienzo de ahijado) y raíces secundarias que nacen del nudo de ahijamiento y que aparecen cuando la planta emite sus tallos.

El sistema aéreo está compuesto por tallos que surgen del nudo de ahijamiento que portan las hojas y finalizan en la inflorescencia final. Los tallos están formados por nudos y entrenudos. Los nudos son zonas meristemáticas a partir de las cuales se alargan los entrenudos y se diferencian las hojas, ya que cada nudo es el punto de unión de una hoja. Las hojas se disponen alternas y en dos filas a lo largo del tallo. Cada hoja tiene una zona inferior que envuelve el entrenudo (vainas) y una zona superior o limbo. En la unión entre limbo y vaina se encuentra una pequeña membrana no vascular, denominada lígula. A cada lado de ésta se encuentran dos estípulas pequeñas y vellosas. La inflorescencia del trigo es la espiga, y su unidad morfológica básica es la espiguilla. La espiguilla contiene varias flores envueltas por dos glumillas, inferior y superior, denominadas lema y pálea. Cada espiguilla está envuelta por dos brácteas o glumas. Cada flor contiene tres estambres, con anteras en forma de X, un ovario formado por un solo carpelo y un estigma bifido y plumoso. En la base del ovario hay dos pequeñas escamas llamadas glomélulas o lodículas.

La planta de trigo es una planta autógena y cleistógama, aunque a veces puede existir fecundación cruzada anemófila debido a la turgencia de las lodículas en el momento de la floración. En el trigo, dependiendo de la variedad, la fecundación cruzada puede suponer entre el 1 y el 4% (Acquaah, 2007). El fruto del trigo es un fruto con una sola semilla, seco e indehisciente denominada cariósipide (fruto pegado al pericarpio). El grano de trigo es un grano desnudo, es decir, las glumillas no se quedan adheridas al grano durante la trilla.

### **Desarrollo de la planta de trigo**

El desarrollo vegetal se puede definir como la secuencia de acontecimientos fenológicos, controlados por factores genéticos y ambientales, que determinan los cambios morfológicos y funcionales de la planta y que conducen a la acumulación de

biomasa y a la formación de los componentes del rendimiento. El desarrollo de la planta de trigo puede ser descrito en diferentes etapas o fases las cuales, a su vez, pueden estar definidas en términos de cambios morfológicos internos o externos. Para las plantas anuales, como el trigo, un desarrollo adecuado es necesario para conseguir una adaptación al ambiente que permita la formación de un elevado número de granos con la mayor cantidad posible de reservas en el endospermo.

Debido a que algunas fases del desarrollo son más importantes que otras para la formación del rendimiento el conocimiento del desarrollo de la planta puede ayudar a explicar los aspectos relacionados con la producción, así como a predecir el impacto de los estreses ambientales sobre la cosecha. Aunque el desarrollo del trigo es un proceso continuo, para estudiar su influencia sobre la génesis del rendimiento y sus componentes, suele dividirse en tres fases: vegetativa, reproductiva y de maduración, durante las cuales la planta inicia y desarrolla sus órganos, y completa su ciclo vital. La duración de cada fase y el número de primordios iniciados se determina por las interacciones entre factores ambientales y genéticos.

La **fase vegetativa** comprende desde la germinación (en realidad desde la imbibición del grano) hasta el estadio de doble arruga. La germinación desencadena un incremento de la actividad fisiológica del grano, que se traduce en un rápido crecimiento de los meristemos presentes en el embrión y en la movilización de las reservas del grano. Esta fase finaliza cuando se inicia el crecimiento de la plántula, que se manifiesta por la aparición de la coleorriza, bajo la forma de un punto blanco nacarado que perfora los tegumentos del grano, y por la aparición del coleóptilo. La germinación se produce entre 4-37°C, con un óptimo ubicado entre los 20-25 °C y una humedad mínima de 35-45% del peso seco del grano (Evans, Wardlaw y Fisher, 1983).

La luz no cumple un proceso importante en el control del proceso germinativo en el trigo, siendo la absorción de oxígeno el fenómeno fisiológico más evidente de la germinación. Cumplida la germinación, las raíces seminales se extienden en el suelo mientras que el coleóptilo se dirige a la superficie. La primera manifestación visible al exterior es la emergencia o aparición de la primera hoja por encima del suelo. Esta fase se caracteriza por la formación en el ápice de los primordios foliares y en ella se determina el tamaño potencial de la superficie fotosintética del cultivo. La siguiente etapa en el desarrollo del trigo es la fase reproductiva en la que se produce una modificación fundamental del comportamiento de la planta. El ápice modifica su función, pasando de una simple yema vegetativa que forma primordios foliares a ser el

esbozo de la inflorescencia en la que se van a diferenciar los distintos órganos de la espiga. **La fase reproductiva** empieza con la formación de los primeros primordios de espiguilla en el ápice meristemático y finaliza en la antesis, con la polinización de los ovarios en las espiguillas con flores fértiles. El proceso de ahijado (formación de tallos hijos) se produce durante esta etapa, siendo el principal proceso de autorregulación de la densidad de espigas en los cereales, reduciendo los efectos adversos del clima, las plagas y enfermedades y los problemas agronómicos durante el periodo de cultivo. Durante esta fase se determina el número de espigas por m<sup>2</sup> y el número de granos por espiga. La limitante para el establecimiento del número final de granos no es la cantidad de flores que se diferencian (que puede llegar a 8-12 por espiguilla) sino la supervivencia de las mismas hasta ser establecidas como flores fértiles. El producto del número de espigas y de granos fértiles por espiga constituye la capacidad potencial de almacenamiento del cultivo, es decir, el tamaño máximo del sumidero para acumular asimilados durante la última etapa del desarrollo o fase de maduración. Después de la fecundación tiene lugar un periodo corto de latencia donde se produce el cuaje de los granos, que es cuando el grano posee la capacidad efectiva de desarrollarse, es decir, cuando supera la posibilidad de aborto del ovario fecundado.

Posteriormente, el grano se desarrolla a lo largo de tres etapas. La primera es la denominada de multiplicación celular intensa, que comienza con la fertilización y se completa dentro de los 20 primeros días tras la misma. Es un periodo de alta actividad mitótica, durante el cual el ensanchamiento de las estructuras se debe a la absorción de agua. El grano crece rápidamente aumentando su volumen en agua y materia seca hasta alcanzar el tamaño definitivo definido por el número de células del endospermo. La segunda etapa denominada de acumulación de carbohidratos y proteínas (fase de engrosamiento del grano) se solapa con la primera etapa y en ella se almacenan en el endospermo las reservas hidrocarbonadas y proteicas. El incremento en el peso seco del grano es casi lineal y su contenido de humedad permanece estable. Durante esta etapa, la tasa de llenado del grano se mantiene constante y depende de las condiciones del crecimiento y del genotipo. La tercera etapa es la etapa de desecación y ocurre cuando finaliza la migración de reservas y el contenido de humedad desciende hasta aproximadamente el 12% donde se alcanza el estado de madurez, estando el grano óptimo para su recolección.

En esta fase, se determina el tercer y último componente del rendimiento, el peso medio de los granos, cuya magnitud refleja en qué medida la capacidad de

almacenamiento potencial se transforma en cosecha real. El peso final de los granos puede expresarse como producto de dos variables: la tasa de crecimiento del grano y la duración del llenado de los mismos. La primera indica cuanta materia seca se deposita en los granos en crecimiento por unidad de tiempo y la segunda el tiempo transcurrido entre antesis y madurez fisiológica.

Los procesos que regulan el desarrollo de un cultivo son complejos, debido a que la duración de cada fase y la total del ciclo, así como el número de primordios de hoja y de espiguilla que pueden iniciarse responden a factores tanto genéticos como ambientales, existiendo normalmente interacción entre ambos. Los principales factores ambientales que modifican el desarrollo del trigo son la temperatura, el fotoperiodo y la vernalización.

Otros factores tales como la disponibilidad de nutrientes, humedad, densidad del cultivo y radiación, pueden afectar al desarrollo, aunque en menor medida. Los distintos genotipos de trigo responden de forma muy diferente al fotoperiodo, encontrándose genotipos virtualmente insensibles, genotipos de respuesta más o menos cuantitativa y genotipos de respuesta cualitativa, aunque la mayoría de los genotipos presentan una respuesta de tipo cuantitativo (Slafer y Whitechurch, 2001), es decir a mayor duración de la longitud del día, su desarrollo es más rápido. Aunque la tasa de desarrollo puede responder marcadamente a la vernalización, fotoperiodo, y temperatura per se, la sensibilidad al fotoperiodo y a la vernalización se encuentran bajo un fuerte control genético. En trigo se han identificado genes de respuesta al fotoperiodo (Ppd), genes de respuesta a la vernalización (Vrn) y genes de precocidad per se (Eps). Estos últimos parecen independientes tanto de la longitud del día como de la temperatura, aunque su efecto suele estar enmascarado por los genes de vernalización y fotoperiodo (Slafer y Whitechurch, 2001; Snape y cols., 2001).

En general, los fotoperiodos largos reducen el tiempo hasta espigado y reducen el número de hojas, ejerce también un ligero efecto sobre la tasa de aparición de las mismas. Aunque las plantas no responden al fotoperiodo hasta que no emergen de la superficie del suelo, la respuesta a la temperatura y a la humedad comienza con la imbibición del grano y continúa hasta la madurez fisiológica. La temperatura tiene una influencia muy importante sobre el desarrollo de las plantas. En general cuanto más alta es la temperatura, más rápido es el desarrollo y en consecuencia menor el tiempo necesario para completar una fase de desarrollo (Slafer y Rawson, 1994; Slafer y Whitechurch, 2001).

El intervalo de tiempo entre la emergencia de dos hojas consecutivas (filocrono) depende de la temperatura, existiendo una relación lineal entre número de hojas y tiempo térmico, definido como la temperatura acumulada por encima de una temperatura base de 0°C. Las altas temperaturas estimulan el nivel de formación de primordios foliares en el ápice del tallo principal, lo que reduce en gran medida el número de tallos hijos que pueden formarse. Esto puede ser debido a una disminución en el suministro de asimilados a los ahijamientos, a causa del aumento de su demanda por el tallo principal. Las bajas temperaturas, por el contrario, retrasan el desarrollo de los tallos hijos, aunque favorecen el ahijamiento, ya que disminuyen el crecimiento de las hojas, limitando la competencia con los ahijamientos (Kirby y cols., 1987; García del Moral y García del Moral, 1995). Un aumento de la temperatura durante el llenado del grano disminuye el peso del mismo por acelerar la senescencia de las hojas, disminuir la duración del desarrollo del grano y aumentar las pérdidas de carbohidratos por la respiración.

### **Desarrollo del meristemo apical**

La siguiente descripción de los estadios de desarrollo del ápice se ha basado en los trabajos de Waddington y cols., (1983), Kirby y Appleyard (1984) y McMaster (1997).

#### *Fase vegetativa.*

Durante esta fase el meristemo apical procedente del embrión del grano sólo produce primordios foliares. A medida que crece el meristemo apical, aumenta la velocidad de formación de primordios siendo ésta mucho mayor que su capacidad para diferenciarse en hojas, por lo que se acumulan en el ápice. Sin embargo, pronto se inician algunas arrugas que constituirán primordios de espiguillas, comenzando de esta manera la diferenciación floral.

#### *Período de diferenciación floral.*

Comprende desde la doble arruga hasta la aparición de la espiguilla terminal. Durante este período se forma todo el conjunto de hojas y espiguillas de la planta. La

doble arruga marca la transición entre la fase vegetativa y la fase reproductiva, y viene indicado por la aparición de dobles esbozos meristemáticos, cuya parte inferior representa el vestigio del primordio foliar y la superior, más ancha, desarrolla primordios de espiguilla visibles. El estadio de espiguilla terminal es el final de la iniciación de espiguillas o momento en que se alcanza el máximo número de espiguillas. La joven espiga está ya casi completamente formada. En este estadio los últimos primordios iniciados por el domo del ápice no se desarrollan en espiguillas, sino que darán lugar a las glumas y flores de la espiguilla terminal. La diferenciación de los órganos florales comienza en las flores basales de las espiguillas centrales y después se extiende hacia la parte distal del ápice (diferenciación acrópeta).

La espiga de trigo tiene un gran potencial de diferenciar primordios de flores. Las espiguillas son indeterminadas, y en general se inician alrededor de 6-12 primordios de flores en cada espiguilla, dependiendo de la posición de la espiguilla a lo largo de la espiga. (McMaster, 1997). Así, las espiguillas de posiciones centrales suelen tener aproximadamente 7 flores en cada espiguilla, mientras que en la parte basal y distal solo se forman de 3 a 6 flores por espiguilla. La diferenciación en estas zonas ocurre de 1 a 5 días más tarde. Por ello, el desarrollo de las flores y la capacidad de éstas para formar granos en la parte basal de la espiga es menor que en el centro. El factor crucial que afecta la probabilidad de formación de granos es el estadio alcanzado por las flores en la emergencia de la espiga, aunque también depende de las condiciones ambientales, de la presencia de genes de enanismo, de la propia capacidad del genotipo y de la fertilización.

Desde la fase de espiguilla terminal hasta casi la emergencia de la espiga la tasa de formación de flores disminuye, probablemente debido al aumento de la competencia causado por el crecimiento de los tallos que empiezan a alargar sus entrenudos después de la diferenciación de la espiguilla terminal (Kirby, 1988). Aunque las flores que se inician después de este estadio constituyen aproximadamente la tercera parte del total de la espiga, sin embargo no llegan al estadio de anteras visibles y en madurez se presentan en forma rudimentaria o completamente senescentes. La iniciación de flores se detiene después de la emergencia de la espiga y, en este estadio, las flores de las 3 espiguillas basales y de las 4 distales están menos desarrolladas que las de la parte central.

*Antesis.*

La emergencia de la espiga comienza cuando la espiguilla terminal puede verse por encima de la hoja bandera y termina cuando la espiguilla basal sobrepasa dicha hoja (Zadoks y cols., 1974). La antesis tiene lugar tres o cuatro días después de la emergencia de la espiga, pudiendo reducirse a uno o dos días si el tiempo es cálido y húmedo. La antesis suele definirse como el momento en el que aparecen las anteras en las espiguillas centrales del 50% de las espigas de los tallos principales de la parcela (Zadoks y cols., 1974).

El estudio del desarrollo apical en variedades italianas y españolas antiguas, intermedias y modernas, cultivadas en condiciones más frías (Lérida) y más calurosas (Granada), es uno de los objetivos de esta Memoria de Tesis Doctoral (Cap. 1), con el propósito de averiguar si la mejora genética durante el siglo XX ha modificado significativamente la duración de los períodos del desarrollo apical y la formación y aborto de flores y granos.

**Formación del rendimiento y sus componentes.**

Los distintos componentes del rendimiento se establecen secuencialmente a lo largo del desarrollo de la planta, bien durante el periodo previo a la antesis (número de espigas), en la antesis (número de granos por espiga) o entre la antesis y la madurez (tamaño de los granos) (Hobbs y Sayre, 2001; García del Moral y cols., 2003, 2005a). Esta formación secuencial proporciona a los cereales la capacidad de compensar efectos adversos sobre los primeros componentes del rendimiento mediante la elevación de los siguientes, logrando de esta manera equilibrar la cosecha bajo una gran diversidad de ambientes y circunstancias, lo cual constituye una de las razones por la que los cereales fueron elegidos como cultivo desde tiempos ancestrales.

El número final de espigas depende de la combinación de dos variables, el número de tallos producidos y la proporción de estos que darán lugar a espiga (Simons, 1982; Hucl y Baker, 1989; García del Moral y cols., 2003, 2005a). Numerosos factores afectan a la iniciación y supervivencia de los tallos hijos, tales como el genotipo, el hábito de crecimiento del trigo (invierno o primavera), la presencia de genes de enanismo, la fecha de siembra, las prácticas agronómicas (especialmente la fertilización nitrogenada) y las condiciones ambientales durante el ahijamiento (Simons, 1982; Bos y



Neuteboom, 1998; Frederik y Bauer, 1999; Duggan y cols., 2000; García del Moral y cols., 2003, 2005a).

Un buen nivel de ahijamiento es un carácter deseable en ambientes secos, ya que aquellas variedades con escasa capacidad de producción de tallos no pueden compensar ocasionales disminuciones en la densidad de plantas, conduciendo a un bajo número de espigas por unidad de superficie y escasos rendimientos en grano (Sharma, 1995; García del Moral y cols., 2005a). No obstante, un elevado número de tallos hijos puede agravar la competencia por los factores nutritivos y por la luz siendo, por tanto, las condiciones ambientales y la densidad de población las que determinan el porcentaje de tallos que darán lugar a espiga y los que morirán sin hacerlo (Simons, 1982; Davidson y Chevalier, 1990; García del Moral y García del Moral, 1995; Evers y cols., 2005). Por el contrario, Lauer y Simmons (1989) sugieren que la mortalidad de los tallos no se debe a falta de luz, sino más bien viene determinada por una respuesta fotomorfogénica a la calidad de la luz filtrada por el dosel foliar (es decir, una baja relación rojo/rojo lejano), por lo que el sombreado no sería un factor primordial, sino que juega un papel adicional en la senescencia de los tallos. En general, sólo aquellos tallos hijos formados cuando el tallo principal cuenta con entre cuatro y seis hojas sobrevivirán, dando lugar a espiga (Frederik y Bauer, 1999). Aunque existe un alto grado de removilización de asimilados desde los tallos hijos que no sobreviven al tallo principal (Berry y cols., 2003; Duggan y cols., 2005), los tallos hijos que no producen espiga interceptan radiación y consumen agua que podría ser utilizada por los tallos principales (Duggan y cols., 2005).

En la situación agroclimática española, en condiciones de secano el número final de espigas por m<sup>2</sup> depende en mayor medida de la capacidad de ahijamiento de las plantas, mientras que bajo condiciones de regadío es la supervivencia de los tallos hijos el factor que más determina el número final de espigas (García del Moral y cols., 2005a). Asimismo, bajo las condiciones más cálidas y secas del sur de España, es el número de espigas por m<sup>2</sup> el componente del rendimiento que más discrimina las variaciones en la cosecha, mientras que con temperaturas más frías, como en el norte de España, es el peso medio por grano el factor más importante para la determinación del rendimiento (García del Moral y cols., 2003). Igualmente, bajo condiciones de buen suministro hídrico, la producción por ha y por planta depende en igual proporción del rendimiento de las espigas principales y de los tallos hijos, pero bajo condiciones de

secano depende en mucha mayor proporción del peso de grano producido por los tallos hijos (Elhani y cols., 2007).

El número de granos por espiga está muy influido por las condiciones ambientales durante la formación de la espiga y en la antesis. Las heladas tardías después de la emergencia de la espiga causan el aborto de muchas espiguillas, sobre todo las de la parte apical de la espiga. El aporte de nitrógeno incrementa el número de granos por espiga, principalmente a través de aumentos en el número de espiguillas formadas, en el tamaño y la actividad de la superficie fotosintética durante la formación de espigas, espiguillas y flores, y en la capacidad de transporte de los asimilados fotosintéticos hacia la espiga y los granos en crecimiento (Sibony y Pinthus, 1988; Reilly, 1990). Por otra parte, un aumento en el número final de espigas por planta generalmente se acompaña de una disminución en el número de granos por espiga y en el peso medio de los granos (García del Moral y cols., 2003) debido a efectos de compensación durante la ontogenia de los componentes del rendimiento, especialmente patentes en condiciones de secano (García del Moral y cols., 2005a).

El número de granos por espiguilla queda fijado en la antesis, cuando parte de las flores son fecundadas dando lugar a granos que inician su desarrollo. Durante el crecimiento de la espiga, se induce un gradiente nutritivo tanto en la espiga como en la propia inflorescencia, que obliga a competir entre sí a las espiguillas de la base y del ápice del meristemo, a la vez que a las flores de cada espiguilla, produciéndose la muerte por inanición de las espiguillas y flores menos competitivas, ya que la espiga ha de competir con hojas y tallos por el suministro de asimilados fotosintéticos (Slafer y cols., 1996; McMaster, 1997; Miralles y cols., 1998; Miralles y Slafer, 1999). Se ha encontrado que la retirada de un cierto número de ahijamientos conduce a un aumento en el número de granos en la espiga del tallo principal, debido a que la reducción en la competencia por los recursos disponibles permite que se inicien más espiguillas y que las flores sobrevivan en mayor proporción. Asimismo, aquellos genotipos que poseen mayor partición de asimilados hacia la espiga en detrimento de los tallos, como las variedades con genes de enanismo derivados de Norin 10, también suelen presentar mayor número de flores fértiles y de granos por espiga (Brooking y Kirby, 1981; Siddique y cols., 1989b; Slafer y Andrade, 1991; Calderini y cols., 1995; Miralles y Slafer, 1999).

Recientemente, Sinclair y Jamieson (2006), investigadores que han trabajado abundantemente sobre modelización del rendimiento potencial de los cereales bajo condiciones limitantes, han cuestionado que las variaciones en el número de granos por m<sup>2</sup> sean un factor determinante del rendimiento, arguyendo que se trata más bien de una consecuencia de la formación del propio rendimiento, el cual a su vez es el resultado de la capacidad del cultivo para obtener recursos más o menos limitados del ambiente (principalmente C y N) durante la ontogenia de los componentes del rendimiento. Para ilustrar su opinión utilizan la analogía de una fábrica de cerveza, donde el suministro de botellas representaría el número de granos, y donde no parece que la producción total de cerveza (la cosecha de grano) tenga que verse limitada porque el cervecero simplemente pida un mayor suministro de envases para ajustarlos a la producción de ese momento. Las implicaciones fisiológicas, agronómicas y para la mejora de los cereales son importantes, ya que asumen que la estrategia de incrementar el tamaño del sumidero para aumentar el rendimiento puede no ser la más adecuada en el futuro. El artículo ha sido contestado por Fischer (2007a), quien tras aportar una serie de evidencias que relacionan el incremento de rendimiento conseguido en los últimos 30 años con un aumento en el número de granos, concluye que al menos para condiciones de rendimiento potencial, los argumentos de Sinclair y Jamieson (2006) no invalidan la estrategia de mejora comúnmente aceptada. La polémica continúa, no obstante, ya que muy recientemente Sinclair y Jamieson (2007) han contestado a los argumentos de Fischer, manteniendo su hipótesis de que el rendimiento está fundamentalmente determinado por la acumulación de C y de N, siendo por tanto esencialmente independiente del número de granos.

El peso final de los granos es el último componente del rendimiento que se forma en el trigo. Es el resultado de los fenómenos de transporte y depósito de los asimilados desde las zonas de síntesis (principalmente la fotosíntesis de los tejidos verdes por encima del nudo de la hoja bandera) y de almacenamiento provisional (nudos del tallo y pedúnculo de la espiga, principalmente). En los cereales el peso final de los granos es un componente de la cosecha relativamente estable, estabilidad atribuida a la movilización de las reservas de carbohidratos almacenados en el tallo y otros órganos vegetativos, los cuales pueden compensar una disminución en la capacidad de fotosíntesis durante el llenado del grano, fenómeno frecuente en zonas secas y calurosas. En efecto, en un reciente estudio realizado en el norte y sur de España (Royo y cols., 2006) se ha encontrado que el peso medio por grano bajo condiciones secas y

calurosas se mantiene bastante estable, no presentando diferencias significativas entre condiciones de secano y regadío.

Las condiciones del periodo de preantesis también pueden influir en el peso final del grano. Así, la temperatura media entre el estadio de vainas engrosadas y la antesis, está relacionada con el peso final del grano, posiblemente por su influencia sobre el crecimiento del carpelo, y las altas temperaturas durante esta fase pueden dar lugar a una reducción del peso del grano (Calderini y cols., 1999a; 2001). Igualmente un elevado número de granos por espiga puede afectar negativamente al peso medio del grano, principalmente debido a que incrementan los granos situados en posición distal de la espiga y en las espigas de los ahijamientos, que son granos con un menor tamaño potencial (Acreche y Slafer, 2006).

Bajo condiciones normales de crecimiento, aproximadamente la mitad de los fotoasimilados que se acumulan en el grano, proceden de la fotosíntesis del limbo y vaina de la hoja bandera, de la espiga, y de la penúltima hoja (Gebbing y cols., 1999). No obstante, en condiciones limitantes, la contribución de las reservas acumuladas en preantesis aumenta considerablemente, llegando al 45% o más, muy posiblemente porque la fotosíntesis después de la emergencia de la espiga se encuentra muy limitada (Austin y cols., 1980; Gebbing y cols., 1999). Se ha comprobado que el estrés hídrico induce esta removilización de reservas (Yang y cols., 2001; Foulkes y cols., 2002; Blum, 2005), proceso en el cual, al parecer, el ácido abscísico (ABA) juega un papel regulador (Yang y cols., 2001). A menos que el llenado del grano se vea terminado por factores ambientales extremos, tal como sequía severa o un golpe de calor, la duración del período desde la antesis hasta la madurez fisiológica resulta bastante conservativo en términos de tiempo térmico (grados día), resultando casi exclusivamente influido por la temperatura del aire (Miralles y Slafer, 1999).

### **Análisis mediante coeficientes de sendero**

Cuando se analiza un sistema de variables interrelacionadas, como el constituido por la cosecha y sus componentes, el análisis por correlación resulta muy útil para identificar el componente más importante en la determinación de la cosecha, aunque generalmente no proporciona una adecuada representación de la magnitud relativa de cada una de las variables en estudio. El análisis mediante coeficientes de sendero (*Path-*

*coefficients analysis*), desarrollado por Wright (1921), ofrece una interpretación basada en relaciones de causa-efecto para cada variable, especificando la dirección en la que ejercen su influencia y valorando su importancia relativa dentro del sistema. Por ello, resulta especialmente útil para desentrañar las relaciones que existen entre las variables de un sistema múltiple cuando las variables independientes se encuentran, a su vez, estrechamente relacionadas entre sí. En los cereales el número de espigas, el número de granos por espiga y el peso medio por grano se determinan secuencialmente, por lo que pueden interactuar en forma compensatoria durante el desarrollo del cultivo y la magnitud alcanzada por cada uno de ellos condicionar en gran medida la de los siguientes. En este caso, el análisis mediante coeficientes de sendero considera la cosecha (la variable dependiente) como resultado de los efectos ejercidos por los componentes del rendimiento (las variables independientes), tanto de forma directa (es decir, la influencia que cada componente ejerce por sí mismo), como indirecta (a través de la modificación compensatoria que cada uno de ellos induce en los demás).

Un coeficiente de sendero es un coeficiente de regresión parcial tipificado, es decir el obtenido después de expresar todas las variables respecto de sus medias, en unidades de desviación típica. Por tratarse de un tipo de coeficientes de regresión parcial, los coeficientes de sendero son unidireccionales (a diferencia de los de correlación que son bidireccionales) y su valor puede ser positivo o negativo, así como mayor o menor que la unidad. Además, al haberse expresado por unidad de desviación típica resultan adimensionales (lo que los asemeja a los coeficientes de correlación) y, por ello, la magnitud de los coeficientes de sendero suministra una medida de la importancia relativa de las variables independientes que intervienen determinando a la dependiente. Este método permite dividir un coeficiente de correlación en sus componentes de efectos directos e indirectos, separando así la verdadera influencia de cada variable independiente sobre la dependiente (García del Moral y cols., 2003).

El análisis por senderos utiliza coeficientes de correlación, y para su empleo se requiere fijar una dirección al sistema de causas-efectos, establecida bien mediante una hipótesis que se desea comprobar o bien por la previa evidencia experimental (Wright, 1921). El método considera que cuando calculamos el coeficiente de correlación entre cada variable independiente (cada uno de los componentes del rendimiento) sobre la cosecha, en realidad obtenemos la suma de un efecto directo (debido al componente del rendimiento considerado aisladamente), y de un efecto indirecto (causado porque cada

componente del rendimiento modifica en forma compensatoria a los demás). Es decir, el análisis por senderos considera que un coeficiente de correlación en un sistema múltiple, es el resultado de la suma de efectos directos (medidos por los coeficientes de sendero) e indirectos (medidos por el producto entre un coeficiente de sendero y un coeficiente de correlación). Una explicación práctica del uso de los coeficientes de sendero puede consultarse en García del Moral y cols. (1991).

En el capítulo 1 de la presente Memoria de Tesis Doctoral el análisis mediante senderos se utiliza para investigar las modificaciones en la estrategia de formación del rendimiento causadas por la presencia del gen de enanismo *Rht-B1b* y sus efectos indirectos los componentes del rendimiento y la fenología del cultivo.

### **Interceptación de radiación fotosintéticamente activa.**

Monsi (1914-1997) y Saeki (1927-2004) expusieron en 1953 el primer modelo matemático de la fotosíntesis del dosel foliar, depurando la idea de Boyesen Jensen que fue el fundador de los estudios científicos sobre producción de materia seca en las plantas. Ellos cuantificaron la atenuación de la luz en el dosel foliar y modelaron la fotosíntesis del mismo como una integración de la fotosíntesis de la hoja expuesta a diferentes climas de luz en el dosel foliar (Hirose, 2005). Así, la cantidad de radiación absorbida ( $I$ ) depende del tamaño del dosel y del coeficiente de extinción lumínica ( $k$ ). La  $I$  está relacionada con el índice de área foliar (LAI) y con  $k$  mediante una modificación de la ecuación de Lambert-Beer (Monsi y Saeki, 1953):

$$I = I_0 e^{-KLAI}$$

La cantidad de energía potencialmente disponible para la fotosíntesis (radiación fotosintéticamente activa, PAR) que es capturada por el cultivo se define como la radiación fotosintéticamente activa absorbida (APAR). APAR está constituida por 4 componentes que representan el descenso y el ascenso del flujo de luz en el dosel.

$$APAR = (PAR_0 + RPAR_s) - (TPAR + RPAR_c)$$

La fracción de PAR incidente ( $PAR_0$ ) que es transmitida a través del dosel (TPAR) tendrá una proporción que será reflejada por el suelo  $RPAR_s$  y que vuelve al

dosel. El PAR medido con el sensor invertido también incluye la reflectancia del cultivo ( $RPAR_c$ ) (Gallo y Daughtry, 1986).

En esta ecuación, la radiación interceptada es la cantidad de PAR menos la proporción de radiación transmitida por el cultivo:

$$IPAR = PAR_0 - TPAR$$

Igualmente, la fracción de PAR incidente es igual a:

$$FRI = IPAR / PAR_0.$$

Por tanto, la fotosíntesis del dosel se determina por el porte de la planta (K y LAI), la fisiología de la hoja, las propiedades ópticas de la luz y el ambiente de luz que le llega al dosel (Hirose, 2005).

Un aspecto interesante relacionado con la disminución en la altura de la planta durante el proceso de mejora genética es su repercusión sobre la arquitectura del dosel foliar y la interceptación y uso de la radiación. En general, el aumento en el índice de cosecha ha ido acompañado por un menor peso de los tallos por unidad de superficie, pero con similar índice de área foliar (LAI) y peso de hojas por  $m^2$ . De esta forma, diversos estudios no encuentran diferencias significativas en el LAI de variedades antiguas y modernas de trigo harinero en el Reino Unido (Austin y cols., 1980 a), Estados Unidos (Deckerd y cols., 1985), Alemania (Feil y Geisler, 1988), o Argentina (Calderini y cols., 1997; Miralles y Slafer, 1997). En Australia, por el contrario, Siddique y cols. (1989a) y Yunusa y cols. (1993) concluyen que el LAI es menor en las variedades modernas durante el periodo desde espiguilla terminal hasta emergencia de las aristas. Entre la bibliografía consultada, solamente en el trabajo de Canevara y cols. (1994) aparece una débil tendencia hacia un mayor LAI en las variedades modernas de trigo harinero. Un reciente trabajo llevado a cabo en trigo duro ha demostrado que el LAI no se ha modificado durante el último siglo en variedades italianas y españolas (Álvaro et al., 2008).

En lo referente a la interceptación de la radiación, cuando ésta es analizada entre la emergencia de las plántulas y la antesis, diversos trabajos en trigo harinero indican que las variedades antiguas y modernas se comportan de forma similar en la eficiencia de interceptación de la radiación incidente (Deckerd y cols., 1985; Slafer y cols., 1990; Calderini y cols., 1997; Miralles y Slafer, 1997), aunque Siddique y cols. (1989a)

encuentran que las variedades australianas más modernas interceptan menos radiación durante el periodo de preantesis.

Existe controversia en cuanto a la eficiencia en el uso de la radiación (RUE) durante la preantesis, la cual parece que incrementó con la mejora genética en las variedades australianas (Siddique y cols., 1989a; Yunusa y cols., 1993), mientras que no se modificó en Argentina (Slafer y cols., 1990; Calderini y cols., 1997). La eficiencia en el uso de la radiación (RUE) durante la postantesis parece que se ha mantenido en valores semejantes a los de preantesis en las variedades modernas, mientras que en las antiguas existe un importante decrecimiento tras la antesis (Fischer, 1984; Calderini y cols., 1997). Parece ser que la capacidad de sumidero, mayor en variedades modernas portadoras de genes de enanismo, es el principal factor que regula la eficiencia en el uso de la radiación en postantesis (Miralles y Slafer, 1997), por lo que se ha propuesto que aumentando la capacidad de sumidero, podría incrementarse la eficiencia en el uso de la radiación (Richards, 2000; Reynolds y cols., 2000; Reynolds y Pfeiffer, 2000).

No obstante, los escasos trabajos sobre trigo duro señalan que a pesar de que en las nuevas variedades derivadas del CIMMYT no se ha producido una gran mejora en la capacidad fotosintética (Waddington y cols., 1987), ello no ha limitado el incremento en su rendimiento, lo que parece indicar que la fotosíntesis por unidad de superficie no es el factor limitante para aumentar la productividad del trigo duro (Richards, 1996). Sin embargo, Loomis y Amthor (1996) han estimado en trigo un valor potencial en el uso de la radiación de 3.8 g/MJ PAR (radiación fotosintéticamente activa), valor substancialmente mayor que el medido en variedades modernas y que sugiere, por tanto, que la eficiencia en el uso de la radiación es un carácter potencialmente mejorable en trigo, dado que se ha encontrado suficiente variación genotípica en la interceptación y uso de la radiación por la cubierta vegetal (Green, 1989).

La influencia de la mejora genética sobre la interceptación y uso de la radiación fotosintéticamente activa en ambiente mediterráneo se ha estudiado en el capítulo 3 y 4 de esta Memoria de Tesis Doctoral.



## **Contenido de proteínas y aminoácidos en el grano.**

Una documentada y moderna revisión sobre la calidad del grano de trigo duro, aunque sin incluir composición aminoacídica, puede consultarse en Flagella (2006). Realmente, en la bibliografía aparecen muy pocas referencias modernas que estudien la composición en aminoácidos del grano de trigo en general y de trigo duro en particular, y prácticamente ninguna en condiciones de campo en ambiente mediterráneo (García del Moral y cols., 2007).

El principal uso del trigo duro son los productos de la pasta, particularmente en Europa y los países del norte de América, mientras que en otras áreas como la mitad este y el norte de África se utiliza como couscous y para varios tipos de pan. La calidad de los productos de trigo depende de la calidad del grano de trigo, pero también del ambiente (clima y nutrición) y del manejo del cultivo. No se puede definir una calidad específica del mismo, porque depende del uso final que se le quiera dar y del agricultor (Troccoli y cols., 2000).

Las principales características que definen el valor nutricional y la calidad tecnológica del trigo son el contenido de proteínas del grano y su composición en aminoácidos (Troccoli y cols., 2000). Las proteínas del trigo presentan baja cantidad de algunos aminoácidos considerados como esenciales para el hombre, especialmente lisina (el aminoácido más deficiente) y treonina (el segundo aminoácido más escaso), pero son abundantes en glutamina y prolina (Bénétrix y Autran, 2001), los aminoácidos funcionales en la formación de la masa.

El contenido de proteínas del grano y su composición aminoacídica varían ampliamente con el genotipo y las condiciones ambientales de crecimiento, sobre todo con la dosis y época de aplicación del fertilizante nitrogenado, el nitrógeno residual del suelo, la disponibilidad de agua durante el cultivo y la temperatura durante el período de maduración de los granos (Bénétrix y Autran, 2001; López-Bellido y cols., 1998; Rharrabti y cols., 2001, 2003; Dupont y cols., 2006; Spiertz y cols., 2006; García del Moral y cols., 2007). La síntesis y acumulación de proteínas y, por tanto, de aminoácidos varía durante el desarrollo del grano, especialmente bajo condiciones que limiten la tasa y duración del llenado del grano, como ocurre en la mayor parte de los ambientes mediterráneos. Recientemente nuestro grupo de investigación ha establecido que el contenido de glutamina, fenilalanina y prolina incrementan a medida que

disminuye la duración de llenado del grano, mientras que el resto de aminoácidos disminuyen, presumiblemente porque la sequía y elevadas temperaturas durante la maduración favorecen la acumulación de gliadinas (abundantes en glutamina y prolina) en detrimento de albúminas y globulina (proteínas especialmente ricas en treonina, lisina, metionina, valina e histidina, como se ha comentado) (García del Moral y cols., 2007).

En el capítulo 5 de esta Memoria de Tesis Doctoral, se ha estudiado el efecto de la mejora genética a lo largo del siglo pasado sobre el patrón de acumulación de aminoácidos durante el desarrollo del grano.

### **Mejora genética del trigo.**

Hasta la actualidad la mejora genética del trigo se ha realizado de una forma bastante empírica, atendiendo casi exclusivamente al rendimiento de los genotipos a mejorar (Loss y Siddique, 1994; Royo y cols., 2005; García del Moral y cols., 2005b). Aunque esta aproximación empírica ha sido bastante eficaz para el aumento del rendimiento del trigo durante el siglo XX (Rajaram, 2001), la ganancia genética en la producción potencial de grano no ha sido homogénea en los distintos países y condiciones de cultivo (García del Moral y cols., 2005b), ni tampoco se ha producido de forma lineal a lo largo del pasado siglo (Sears y col., 2006; Royo y col. 2008), sino que ha sido notablemente más alta a partir de la segunda mitad del mismo. Igualmente, aunque el rendimiento de los cereales en ambientes no limitantes ha aumentado considerablemente en los últimos 50 años (Austin y cols., 1989), el incremento bajo condiciones de estrés ha sido mucho más limitado (Perry y D'Antuono, 1989; Siddique y cols., 1989a; Pecetti y Annicchiarico, 1998) e incluso ha disminuido en los últimos años (Braun y cols., 1998).

La mejora del rendimiento en trigo ha de mantenerse al mismo ritmo que hasta ahora o incluso aumentar, para poder satisfacer la demanda de alimentos de una población que se estima alcanzará los 8000 millones en el año 2025 (ESA, 2006). Se ha propuesto que para cubrir la demanda de trigo en ese año, el crecimiento anual debería situarse entre el 1,6% y el 2,6%, lo que representa pasar de un rendimiento medio de 2,5 t/ha a 3,8 t/ha (Braun y cols., 1998; Rajaram, 2001).

**Uso de series históricas de cultivares.**

Una de las aproximaciones más útiles para la valoración del impacto de la mejora genética sobre el rendimiento, consiste en comparar el comportamiento fisiológico y los atributos relacionados con el rendimiento de series históricas de cultivares obtenidos en distintas épocas (Slafer y cols., 1994; García del Moral y cols., 2005b; Foulkes y cols., 2007). Esta metodología encuentra su principal obstáculo en las limitaciones impuestas por el ambiente de cultivo, ya que la interacción genotipo  $\times$  ambiente suele ser frecuentemente alta y significativa. Estudios comparativos de este tipo se han realizado en varios cereales, incluyendo trigo harinero (Austin y cols., 1980, 1989; Hucl y Baker, 1987; Siddique y cols., 1989b; Slafer y Andrade, 1993; Canevara y cols., 1994; Calderini y cols., 1999b; Guarda y cols., 2004; Shearman y cols., 2005) y trigo duro. Entre estos últimos pueden citarse los realizados en Canadá (McCaig y Clarke, 1995), CIMMYT-México (Waddington y cols., 1987; Pfeiffer y cols., 2000), Italia (Pecetti y Annicchiarico, 1998; Giunta y cols., 2007; DeVita y cols., 2007) o los desarrollados en España por el IRTA en colaboración con nuestro grupo de investigación (Royo y cols., 2007, 2008; Álvaro y col., 2008).

Estos estudios demuestran que, en general, la ganancia genética en trigo duro ha progresado a un nivel comparable a la del trigo harinero, debiéndose también principalmente a un incremento en el número de granos por unidad de área y por espiga, así como a un mayor índice de cosecha resultado de un mejor reparto de asimilados entre la biomasa vegetativa y las espigas (García del Moral y cols., 2005b; Royo y cols., 2007), especialmente tras la introducción de los genes de enanismo *Rht* (*Reduced height*) que dio lugar a la llamada “Revolución Verde”. Paralelamente, el incremento en el índice de cosecha se ha acompañado de un mejor reparto del nitrógeno al grano, aunque sin cambios significativos en la absorción total de nitrógeno (Motzo y cols., 2004). Igualmente, al menos en Italia, la mejora genética del trigo duro ha repercutido en un notable incremento del índice de gluten y de la calidad de la pasta (Motzo y cols., 2004).

**Genes *Rht* de enanismo.**

Los genes de enanismo usados para la “Revolución Verde” proceden de Japón. A principios de la década de los años 20 del siglo pasado, algunos mejoradores japoneses cruzaron la variedad semienana de trigo Daruma, con una variedad americana

de alto rendimiento para producir la variedad Norin 10. Aunque de escasa importancia en Japón, Norin 10 fue utilizada posteriormente por Orville A. Vogel para el programa de mejora de trigos de la *Agricultural Research Station de Pullman* (Washington), obteniendo en 1946 la variedad Norin 10/Brevor 14. Esta variedad fue la enviada al Dr. Norman Borlaug (galardonado posteriormente con el Nobel de la Paz por este trabajo) al CIMMYT de México, quien la hibridó con trigos de primavera insensibles al fotoperíodo, adaptados por tanto a crecer en climas tropicales y subtropicales. Estas nuevas variedades semienanas de CIMMYT fueron rápidamente adoptadas en Hispanoamérica y sudeste de Asia, permitiendo utilizar elevadas cantidades de fertilizante nitrogenado sin acamarse y obtener así dos cosechas de elevado rendimiento al año, dando origen a la “Revolución Verde” (Cf. Hedden, 2003; Evenson y Gollin, 2003). Norin10/Brevor 14 fue también el origen de los genes de enanismo de otras muchas variedades de trigo de la zona templada, de forma que actualmente los genes de enanismo de Norin 10 están presentes en el 70% de las variedades comerciales de trigo cultivadas en el mundo (Evans, 1998).

Estos genes confieren una menor sensibilidad a las giberelinas, las hormonas responsables, entre otras acciones, del crecimiento en elongación de los tallos vegetales. De hecho, la respuesta de las plántulas a las giberelinas se usa como un test rutinario para saber si una variedad contiene o no genes *Rht* (Gale y Gregory, 1977). La base molecular de los genes de enanismo fue aclarada por Peng y cols. (1999) quienes caracterizaron los genes *Rht*, descubriendo que codifican para una proteína que interfiere con la acción de estas hormonas vegetales.

Los alelos *Rht1* y *Rht2* (ahora denominados como *Rht-B1b* y *Rht-D1b*, para indicar en los cromosomas en los que se localizan (Cf. Flintham y cols., 1997), están presentes en muchas de las variedades semienanas de alto rendimiento cultivadas actualmente, debido a que permiten un control genético muy simple para resistencia al acamado y elevado índice de cosecha (McClung y cols., 1986; Flintham y cols., 1997). El alelo *Rht3* (actualmente *Rht-1Bc*) es mucho menos utilizado en la mejora del trigo (Flintham y cols., 1997) por su efecto extremo de reducción en la altura de la planta. Debido a que el trigo duro no posee el genoma D, obviamente sólo presenta el gen de altura reducida *Rht-B1b*.

Los efectos genéticos, fisiológicos y pleiotrópicos de los genes *Rht* han sido revisados por Gale y Youssefian (1987), Youssefian y cols. (1992a,b) y Flintham y cols. (1997). Generalmente los trigos semienanos rinden más que las variedades de talla alta, principalmente debido a un mejor índice de cosecha –aunque sin cambios en la biomasa total–, y a un mayor número de granos por espiga y por m<sup>2</sup>, si bien con una ligera disminución en el tamaño de los granos (Gale y Youssefian, 1985; McClung y cols., 1986; Flintham y cols., 1997; Royo y cols., 2007).

Los genes de enanismo también condicionan un menor tamaño y número de las células, con hojas más pequeñas, aunque sin afectar significativamente a la interceptación de radiación (Gent, 1995; Calderini y cols., 1997), mientras que presentan mayores tasas de fotosíntesis por unidad de área foliar, por lo que la biomasa total no se ve disminuida en comparación con las variedades de talla alta (Kulshrestha y Tsunoda, 1981; Bishop y Bugbee, 1988; Morgan y cols., 1990). Asimismo, los genes de enanismo no parecen modificar la duración del desarrollo de la hoja, del tallo ni de la espiga (Youssefian y cols. 1992a), ni tampoco sus niveles de crecimiento relativo (Bush y Evans 1988; Youssefian y cols. 1992b), aunque existen evidencias de una mayor velocidad del desarrollo del meristemo apical en variedades con genes *Rht1-Rht2* en respuesta a las giberelinas (Evans y cols., 1995).

La superioridad relativa de los genotipos con genes de enanismo varía con el hábito de desarrollo (invierno o primavera), con el acervo genético de la variedad y con las condiciones ambientales (Butler y cols., 2005). Se ha señalado que los trigos semienanos están mejor adaptados a condiciones de crecimiento cercanas al óptimo, comportándose peor en ambientes menos favorables, con rendimientos medios inferiores a 2000 kg/ha (Keyes y Sorrells, 1989; Richards, 1992). Sin embargo, un reciente estudio (Mathews y cols., 2006) con seis líneas próximamente isógenicas de talla reducida, tanto de trigo harinero como duro, cultivadas en 81 localidades por todo el mundo, se concluye que las variedades con genes de enanismo son competitivas también en ambientes de rendimientos inferiores a 3000 kg/ha, confirmando resultados similares de Singh y cols. (2001), aunque con menor número de variedades y ambientes. Algunos investigadores, incluso, han sugerido que el rendimiento grano no depende de la presencia de genes de enanismo *per se*, sino más bien de un óptimo de altura para cada ambiente determinado (Richards, 1992; Miralles y Slafer, 1995; Flintham y cols., 1997).

### **Selección asistida por marcadores: Microsatélites.**

En los últimos años se ha avanzado notablemente en la utilización de técnicas moleculares para aumentar la efectividad de la mejora genética. El desarrollo de marcadores moleculares ligados a caracteres de interés permite su selección indirectamente sobre las plántulas de las primeras generaciones segregantes, y además es independiente del ambiente, por lo que resulta más efectiva, ahorrando tiempo y recursos, acelerando así el proceso de mejora (Nuez y Carrillo, 2000).

Entre los numerosos marcadores desarrollados en los últimos años, los microsatélites o SSR (*Simple Sequence Repeats*) en sus diversas variantes, se han revelado como uno de los más útiles, debido a su elevada reproducibilidad entre laboratorios (lo que facilita la integración de los distintos mapas genéticos de una misma especie), a su expresión alélica codominante (lo que permite discriminar estados de homo y heterocigosis en organismos diploides), a su alta fiabilidad, y al elevado grado de variabilidad encontrado con su utilización, lo que los convierte en muy útiles cuando se requiere un gran poder discriminante, como en el caso de la caracterización varietal (Gupta y Varshney, 2000).

Las repeticiones de secuencias simples (SSRs), también conocidas como regiones microsatélites, representan secuencias cortas, de 1 a 5 nucleótidos, repetidas en tandem (llamadas unidad de repetición) y cuya variación en el número de repeticiones entre individuos diferentes, las convierte en marcadores polimórficos, específicos de locus y altamente informativos. Dado que en una población existen generalmente varios alelos diferentes en cualquier locus (sitio genómico), cada alelo es identificable de acuerdo con el número de unidades de repetición. La existencia de alelos múltiples (alto nivel de polimorfismo) permite que los microsatélites se empleen como potentes marcadores en muchas especies diferentes. En Gupta y Varshney (2000) y Varshney y cols. (2005) se puede consultar una revisión de la aplicación de los microsatélites al trigo. En contraste con otros organismos, sobre la base de los mapas genéticos y físicos disponibles, parece que los microsatélites en el trigo no están agrupados en regiones específicas sino más bien distribuidos uniformemente a lo largo de los diferentes cromosomas (Gupta y Varshney, 2000).

Básicamente los microsatélites se utilizan para mapeo genómico y elaboración de mapas, análisis de diversidad, etiquetado de genes, selección asistida por marcadores

(MAS) en mejora vegetal, análisis de QTLs, DNA fingerprinting y estudios genéticos de poblaciones vegetales, caracterización de germoplasma, investigaciones citogenéticas y genómica funcional (Gupta y Varshney, 2000; Varshney y cols., 2005).

El sexto y último objetivo de esta Tesis Doctoral ha consistido precisamente en poner a punto y aplicar en nuestro laboratorio la técnica de microsatélites, cuyos resultados se exponen en el capítulo 6.

### **Perspectivas de futuro.**

Desde nuestra entrada en el tercer milenio, han aparecido una serie de revisiones que analizan los logros conseguidos hasta el presente en la mejora genética de los cultivos, la contribución de las herramientas biotecnológicas y moleculares a este proceso, y las posibilidades de progreso en el futuro, para conseguir alimentar a una población que aumenta exponencialmente (Vid. Miflin, 2000; Gepts, 2002; Sinclair y cols., 2004; McLaren, 2005; Swaminathan, 2007). En general, estas revisiones apuntan a que la mejora en el rendimiento de los cultivos provendrá principalmente del mejor conocimiento de los genomas de las plantas cultivadas, de la selección asistida por marcadores moleculares y del esfuerzo coordinado entre mejoradores, agrónomos, fisiólogos y biólogos moleculares, y en menor medida de la manipulación genética de las plantas para caracteres como tales fotosíntesis, respiración, resistencia a sequía, reguladores del crecimiento o asimilación del nitrógeno, cuya magnitud depende de factores muy complejos y que presentan una gran interacción con el ambiente.

En trigo, los principales aspectos a mejorar en el futuro incluyen aumento del potencial y de la estabilidad del rendimiento, adaptación a bajas temperaturas y fotoperíodo, resistencia a estreses bióticos (roya, caries, mildiu y mosca de Hess, principalmente) y abióticos (sequía, altas temperaturas y resistencia al aluminio) y factores de calidad tecnológica, como calidad panadera, rendimiento y calidad de la sémola, y contenido en proteínas y aminoácidos esenciales (Carrillo y cols., 2006; Acquaaah, 2007).

En un reciente estudio sobre las bases fisiológicas del rendimiento Fischer (2007b) concluye que en la mayoría de los trigos modernos el rendimiento está aún ampliamente limitado por la capacidad de sumidero, especialmente por el peso seco de

las espigas y el número de granos por unidad de peso de la espiga en la antesis. Asimismo, sugiere que el alargamiento del período de crecimiento de la espiga a través de la manipulación en la sensibilidad al fotoperíodo, el incremento en la cantidad de reservas vegetativas y en la capacidad fotosintética alrededor de la antesis, ofrecen también una buena oportunidad para incrementar el rendimiento potencial, especialmente a través del aumento del peso seco de los granos individuales.

En esta línea, también recientemente, Miralles y Slafer (2007) sugieren que el aumento del número de granos podría conseguirse mediante el alargamiento de la fase desde espiguilla terminal hasta antesis, pero sin modificación en la fecha de espigado, es decir por acortamiento del período vegetativo (desde la emergencia del cultivo hasta la espiguilla terminal). Esta estrategia conduciría a una menor competencia entre el crecimiento del tallo y de la espiga, permitiendo obtener espigas más pesadas y con mayor número de flores fértiles en la antesis. A efectos prácticos, según estos autores, este efecto podría conseguirse modificando la sensibilidad al fotoperíodo mediante manipulación de los diferentes genes *Ppd* presentes en el trigo. En efecto, de acuerdo con González y cols. (2005) parece que el gen *Ppd-D1* confiere sensibilidad al fotoperíodo durante la fase de preantesis, mientras que *Ppd-B1* parece regular la sensibilidad al fotoperíodo durante la fase más temprana del desarrollo (desde emergencia hasta espiguilla terminal), lo que sugiere fuertemente que las fases de desarrollo del trigo puedan estar reguladas independientemente, ofreciendo la oportunidad para su manipulación genética, bien a través de los genes de sensibilidad al fotoperíodo conocidos o por los que se supone que existen, pero que aún no han sido identificados (Snape y cols., 2001).

Actualmente, parece que está bien establecido que la altura de la planta para un óptimo rendimiento en trigo se sitúa entre 0.7 y 1 m (Fischer, 2007a), alcanzable básicamente a través de los genes de enanismo procedentes de Norin 10, que confieren también un mejor reparto de asimilados entre el tallo y la espiga y un mayor índice de cosecha. Realmente, la ganancia genética en rendimiento del trigo ha estado positivamente relacionada con un mayor índice de cosecha, con una mayor eficiencia en el uso de la radiación en la preantesis y con la introgresión de genes ajenos en el germoplasma del trigo, como la translocación 1BL.1RS desde el centeno o la translocación 7DL.7Ag desde *Agropyrum elongatum* (Foulkes y cols., 2007). Estudios recientes mediante coeficientes de sendero (Reynolds y cols., 2007; Vargas y cols.,



2007) indican que una mayor biomasa puede conseguirse también ajustando la fenología del cultivo a un ambiente específico, incrementando la capacidad de asimilación del cultivo hasta poco después de la antesis y mejorando el reparto de asimilados hacia la espiga inmediatamente después de la fecundación.

A su vez la calidad de la proteína ha tenido siempre una importante consideración en la nutrición humana y animal. Ya que todos los animales tienen deficiencias en la maquinaria enzimática para sintetizar *de novo* algunos de los aminoácidos imprescindibles para ensamblar las proteínas necesarias para su propio crecimiento y función, esos aminoácidos esenciales (AaE) deben ser suministrados con la dieta. Existen varias estrategias que consiguen mejorar el valor nutricional de las proteínas como bien exponen Beauregard y Hefford (2006). Para ellos sería necesario aumentar la síntesis de AaE mediante ingeniería genética, aumentar los niveles de las proteínas de alta calidad en las plantas y aumentar la calidad nutricional de la planta mejorando la calidad nutricional de la proteína. Esto a su vez debe complementarse con el aumento de los requerimientos de nitrógeno para los cultivares, que puede darse mejorando la absorción de nitrógeno del suelo, reduciendo la pérdida de nitrógeno por la planta o mejorando la eficiencia en la partición del nitrógeno entre órganos vegetativos y reproductores (Feil, 1997).

## Referencias

- AACC, American association of Cereal Chemist, *Approved Methods AACC*. 2000. 10<sup>a</sup> ed., St, Paul, MN, USA.
- Acquaah, G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. Chapter 27: *Breeding wheat*, Blackwell Pub. Inc., Malden, USA, pp. 472-484.
- Acreche MM, Slafer GA. 2006. Grain weight response to increases in number of grains in wheat in a Mediterranean area. *Field Crops Res.* 98: 52-59.
- AETC. 2007. Encuesta de calidad de los trigos españoles. *Asociación Española de Técnicos Cerealistas*.
- Álvaro F, Isidro J, Villegas D, Garcia del Moral LF, Royo C. 2008. Old and modern durum wheat varieties from Italy and Spain differ in main spike components. *Field Crops Res* , 106: 86-93.
- Austin, R.B., M.A. Ford and C.L. Morgan. 1989. Genetic improvement in the yield of winter wheat: a further evaluation. *J. Agric. Sci.* 112: 295-301.
- Beauregard, M y Hefford, M.A. 2006. Enhancement of essential amino acid contents in crops by genetic engineering and protein design. *Plant. Biotech. J.* 4: 561-574.
- Bénétrix, F.; Autran, J.C. 2001. Protein synthesis in grains and seeds. En: Nitrogen Assimilation by Plants. Physiological, Biochemical and Molecular Aspects, J.F. Morot-Gaudry. (Ed), *Science Publishers Inc.*, Enfield, NH, pp 343-360.
- Berry, P.M., Spink, J.H., Foulkes, M.J., Wade, A. 2003. Quantifying the contributions and losses of dry matter from non-surviving shoots in four cultivars of winter wheat. *Field Crops. Res.* 80: 111–121.
- Bidlingmeyer, B.A.; Cohen, S.A.; Tarvin, T.L. 1984. Rapid analysis of amino acids using pre-column derivation. *J. Chromatogra.* 336: 93-104.
- Bishop, D.L., Bugbee, B.G. 1998. Photosynthetic capacity and dry mass partitioning in dwarf and semi-dwarf wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Plant Physiol.* 153: 558-565.
- Blum, A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Aust. J. Agric. Res.* 56: 1159–1168.

- Bos, H.J., Neuteboom, J.H. 1998. Morphological analysis of leaf and tiller number dynamics of wheat (*Triticum aestivum* L.): Responses to temperature and light intensity. *Ann. Bot.* 81: 131-139.
- Braun, H.J.; Payne, T.S.; Morgounov, A.I.; Van Ginkel, M.; Rajaram, S. 1998. The challenge one billion tons of wheat by 2020. *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium*. A.E. Slinkard (ed.), University Extension Press. Vol.1. Saskatchewan, Canada, 33-40.
- Brooking I.R. and Kirby E.J.M. 1981. Interrelationships between stem and ear development in winter wheat: the effects of a Norin 10 dwarfing gene *Gai/Rht2*. *J. Agric. Sci.* 97: 373-381.
- Bush, M.G. & Evans, L. T. 1988. Growth and development in tall and dwarf isogenic lines of spring wheat. *Field Crops Res.* 18: 243-270.
- Butler, J.D., Byrne, P.F., Mohammadi, V., Chapman, P.L., Haley, S.D. 2005. Agronomic performance of *Rht* alleles in a spring wheat population across a range of moisture levels. *Crop Sci.* 45: 939-947.
- Calderini D.F., Dreccer M.F. and Slafer G.A. 1995. Genetic Improvement in Wheat Yield and Associated Traits. A Re-Examination of Previous Results and Latest Trends. *Plant Breed.* 11: 108-112.
- Calderini, D.F.; Dreccer, M.F.; Slafer, G.A. 1997. Consequences of Breeding on Biomass, Radiation Interception and Radiation-Use Efficiency in Wheat. *Field Crops Res.* 52: 271-281.
- Calderini, D.F.; Abeledo, L.G.; Savin, R.; Slafer, G.A. 1999a. Effect of temperature and carpel size during pre-anthesis on potential grain weight in wheat. *J. Agric. Sci.* 132: 453-459.
- Calderini, D.F.; Reynolds, M.P.; Slafer, G.A. 1999b. Genetic gains in wheat yield and main physiological changes associated with them during the 20th century. En: *Wheat. Ecology and Physiology of Yield Determination*, E.H. Satorre and G.A. Slafer, (eds.), New York: Food Product Press, pp. 351-377.
- Calderini, D.F.; Savin, R.; Abeledo, R.G.; Reynolds, M.P.; Slafer, G.A. 2001. The importance of the period immediately preceding anthesis for grain weight determination in wheat. *Euphytica* 119: 199-204.
- Canevara, M.G.; Romani, M.; Corbellini, M.; Perenzin, M.; Borghi, B. 1994. Evolutionary trends in morphological, physiological, agronomical and

- qualitative traits of *Triticum aestivum* L. cultivars bred in Italy since 1900. *Eur. J. Agron.* 3: 175-185.
- Carrillo, J.M.; Vázquez, J.F.; Rodríguez de Quijano, Marta; Ruzi, M. 2006. Mejora de la calidad del trigo. En: *Mejora genética de la calidad en plantas*, G. Yacer, M.J. Díez, J.M. Carrillo y M.L. Badenes (eds.), Universidad Politécnica de Valencia, 129-164.
- Cohen, S.A., Meys, M, and Tarvin, T.L. 1989. The Pico-Tag Method. A manual of advanced techniques for amino acids analysis, *Millipore Corporation, Bedford, MA*.
- Davidson, D.J.; Chevalier, P.M. 1990. Preanthesis tiller mortality in spring wheat. *Crop Sci.* 30: 832-836.
- Deckerd, E.L.; Busch, R.H.; Kofoid, K.D. 1985. Physiological aspects of spring wheat improvement. En: *Exploitation of Physiological and Genetic Variability to Enhance Crop Productivity*. J.E. Harper, L.E. Schrader, and R.W. Howell (eds.), *Am. Soc. Plant Physiol.*, Rockland, Maryland 45-54.
- De Vita P, Li Destri Nicosia O, Nigro F, Platani C, Riefolo C, Di Fonzo N, Cattivelli L. 2007. Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. *Eur. J. Agron.* 26: 39-53.
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation Procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15.
- Duggan, B.L., Domitruk, D.R., Fowler, D.B., 2000. Yield component variation in winter wheat grown under drought stress. *Can. J. Plant Sci.* 80: 739-745.
- Duggan, B.L., Richards, R.A., van Herwaarden, A.F. 2005. Agronomic evaluation of the tiller inhibition gene (*tin*) in wheat. II. Growth and partitioning of assimilate. *Aust. J. Agric. Res.* 56: 179-186.
- DuPont, F.M.; Hurkman, W.J.; Vensel, W.H.; Chan, R.; Lopez, R.; Tanaka, C.K.; Altenbach, S.B. 2006. Differential accumulation of sulphur-rich and sulphur-poor wheat flour proteins is affected by temperature and mineral nutrition during grain development. *J. Cereal Sci.* 44: 101-112.
- Edman, P. 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4:283-293
- Elhani, S.; Martos, V.; Rharrabti, Y.; Royo, C.; García del Moral, L.F. 2007. Contributions of main stem and tillers to durum wheat (*Triticum turgidum*

- L. var durum) grain yield and its components grown in Mediterranean environments. *Field Crops Res.* 103: 25-35.
- ESA UN 2006. World Population Prospects: The 2006 Revision. <http://esa.un.org/unpp>.
- Evans, L.T., Wardlaw, I.F., Fischer, R.A. 1983. Trigo. En: *Fisiología de los cultivos*. Evans, L.T. (ed.), Hemisferio sur S.A. pp. 23-164.
- Evans, L.T. (1998) Feeding the Ten Billion. *Plant and population growth*, Cambridge University Press.
- Evans, L. T., Blundell, C. & King, R. W. 1995. Developmental responses by tall and dwarf isogenic lines of spring wheat to applied gibberellins. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 365-371.
- Evenson, E.E. and Gollin, D. 2003. Assessing the Impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science* 300: 758-762.
- Evers, J.B. ; Vos, J. ; Fournier, C., Andrieu, B., Chelle, M., Struik, P.C. 2005. Towards a generic architectural model of tillering in Gramineae, as exemplified by spring wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytol.* 166: 801-812.
- FAO 2007. FAO Statistical databases. <http://faostat.fao.org/default.aspx>
- Feil, B. 1997. The inverse yield-protein relationship in cereals: possibilities and limitations for genetically improving the grain protein yield. *Trends in Agro.* 1: 103-119.
- Feil, B., Geisler, G. 1988. Accumulation and distribution of dry-matter in old and new german summer wheat-cultivars. *J. Agron. Crop Sci.* 161: 148-156.
- Fischer, R.A. 1984. Wheat. En: *Potential Productivity of Field Crops Under Different Environments*. W.H. Smith; S.J. Banta (eds.). IRRI, Los Baños, Philippines, 129-153.
- Fischer, R.A. 2007a. The importance of grain or kernel number in wheat: A reply to Sinclair and Jamieson. *Field Crops Res.* doi:10.1016/j.fcr.2007.04.002,
- Fischer, R.A. 2007b. Understanding the physiological basis of yield potential in wheat. *J. Agric. Sci.* 145: 99-113.
- Flintham, J.F., Börner, A., Worland, A.J., Gale, M.D., 1997. Optimizing wheat grain yield: Effects of Rht (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J. Agric. Sci.* 128: 11-25.
- Flagella, Z. 2006. Qualità nutrizionale e tecnologica del frumento duro. *Ital. J. Agron. Riv. Agron.* 1: 203-239.

- Foulkes, M.J.; Scott, R.K.; Sylvester-Bradley, R. 2002. The ability of wheat cultivars to withstand drought in UK conditions. Formation of grain yield. *J. Agric. Sci.*, 138: 153-169.
- Foulkes, M.J.; Snape, J.W.; Shearman, V.J.; Reynolds, M.P.; Gaju, O.; Sylvester-Bradley, R. 2007. Genetic progress in yield potential in wheat: recent advances and future prospects. *J. Agric. Sci.* 145: 17–29.
- Frederik, J.R.; Bauer, P.J. 1999. Physiological and Numerical Components of Wheat Yield. En: *Wheat. Ecology and Physiology of Yield Determination*, E.H. Satorre, G.A. Slafer (eds.), Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. 45-65.
- Gale, M.D., Gregory, R.S. 1977. A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica* 26:733–738.
- Gale, M.D., Youssefian, S., 1985. Dwarfing genes of wheat. In: *Progress in Plant Breeding*, Russell, G.E. (ed.), Butterworth, London, pp. 1-35.
- Gallo, K.P.; Daughtry, C.S.T. 1986. Techniques for measuring intercepted and absorbed photosynthetically active radiation in corn canopies. *Agron. J.* 78: 752-756.
- García del Moral L.F., Ramos J.M. y García del Moral M.B. 1991a: El análisis por coeficientes de sendero y su aplicación al estudio de las relaciones entre el rendimiento y sus componentes en la cebada. *Invest Agr: Prod Prot Veg* 6: 305-317 y corrigenda en *Ibid.* 7: 451 (1992).
- García del Moral, M.B.; García del Moral, L.F. 1995. Tiller production and survival in relation to grain yield in spring and winter barley. *Field Crops Res.* 44: 85-93.
- García del Moral, L.F., Rharrabti, Y., Villegas, D., Royo, C., 2003. Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions: an ontogenic approach. *Agron. J.* 95: 266–274.
- García del Moral, L.F., Rharrabti, Y., Elhani, S., Martos, V., Royo, C., 2005a. Yield Formation in Mediterranean durum wheats under two contrasting water regimes based on path-coefficient analysis. *Euphytica* 146: 213–222.
- García del Moral, L.F.; Royo, C.; Slafer, G.A. 2005b. Genetic improvement effects on durum wheat yield physiology. In: *Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies*, C. Royo, M.M. Nachit, N. DiFonzo, J.L. Araus, W.H. Pfeiffer, G.A. Slafer (eds.), vol. 1, The Haworth Press, Inc., New York, pp. 379-396.

- García del Moral, L.F.; Rharrabti, Y.; Martos, V.; Royo, C. 2007. Environmentally induced changes in amino acid composition in the grain of durum wheat grown under different water and temperature regimes in a Mediterranean environment. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8144–8151.
- Gebbing, T.; Schnyder, H.; Kuhbauch w. 1999. The utilization of pre-anthesis reserves in grain filling of wheat. Assessment by steady-state (CO<sub>2</sub>)-C-13/(CO<sub>2</sub>)-C-12 labelling. *Plant Cell and Envirom.* 22: 851-858.
- Gehrke, C.W.; Wall, L.L.; Absheer, J.S.; Kaiser, F.E.; Zumwalt, R.W. 1985. Sample preparation for chromatography of amino acids: acid hydrolysis of protein. *J. Assoc. Off. Annal. Chem.* 68:811-821.
- Gent, M.P.N. 1995. Canopy Light, gas exchange, and biomass in reduced height isolines of winter wheat. *Crop Sci.* 35: 1636-1642.
- Gepts, P. 2002. A Comparison between Crop Domestication, Classical *Plant Breeding*, and Genetic Engineering. *Crop Sci.* 42:1780–1790.
- Giunta, F.; Motzo, R.; Pruneddu, G. 2007. Trends since 1900 in the yield potential of Italian-bred durum wheat cultivars. *Eur. J. Agron.* 27: 12-24.
- Gonzalez, F. G., Slafer, G.A. & Miralles, D.J. 2005. Pre-anthesis development and number of fertile florets in wheat as affected by photoperiod sensitivity genes Ppd-D1 and Ppd-B1. *Euphytica* 146: 253–269.
- Green, C.F. 1989. Genotypic differences in the growth of *Triticum aestivum* in relation to absorbed solar radiation. *Field Crops Res.* 19: 285-295.
- Guarda, G.; Padovan, S.; Delogu, G. 2004. Grain yield, nitrogen-use efficiency and baking quality of old and modern Italian bread-wheat cultivars grown at different nitrogen levels. *Eur. J. Agron.* 21: 181–192.
- Gupta, P.K.; Varshney, R.K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and *Plant Breeding* with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163–185.
- Hedden, P. 2003. The genes of the Green Revolution Trends in genetics 19, 5-9.
- Heinrikson, R.L.; Meredith, S.C. 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolum derivation with phenylisothiocyanate. *Annal. Biochem.* 136:65-74.
- Hirose, T. 2005. Development of the Monsi-Saeki theory on canopy structure and Function. *Ann. Bot.* 95: 483-494

- Hobbs, P.R.; Sayre, K.D. 2001. Managing experimental breeding trials. En: *Application of physiology in wheat breeding*. M.P. Reynolds, J.I. Ortiz-Monasterio, A. McNab (eds.), CIMMYT, México, 48-58.
- Hucl, P.; Baker, R.J. 1987. A study of ancestral and modern Canadian spring wheats. *Can. J. Plant Sci.* 67: 87-97.
- Keyes, G.; Sorrells, M.E. 1989. Rht1 and Rht2 semidwarf genes effect on hybrid vigor and agronomic traits of wheat. *Crop Sci.* 29: 1142-1147.
- Kirby, E.J.M.; Appleyard, M. 1984. *Cereal Development Guide*. N.A.C., Stoneleigh, 95 p.
- Kirby, E.J.M. 1988. Analysis of leaf stem and ear growth in wheat from terminal spikelet stage at anthesis. *Field Crops Res.* 18: 127-140.
- Kirby, E.J.M.; Porter, J.R.; Day, W.; Adam, J.S.; Appleyard, M.; Ayling, S.; Baker, C.K.; Belford, R.K.; Biscoe, P.V.; Chapman, A.; Fuller, M.P.; Hampson, J.; Hay, R.K.M.; Matthews, S.; Thompson, N.J.; Weir, A.H.; Willington, V.B.A.; Wood, D.W. 1987. An analysis of primordium initiation in Avalon winter wheat crops with different sowing dates in England and Scotland. *J. Agric. Sci. Camb.*, 109: 123-134.
- Kulshrestha, V.P.; Tsunoda, S. 1981. The Role of 'Norin 10' Dwarfing Genes in Photosynthetic and Respiratory Activity of Wheat Leaves. *Theor. Appl. Genet.* 60: 81-84.
- Lauer, J.G. y S, S.R. 1989. Canopy light and tiller mortality in spring barley. *Crop Sci.* 29: 420-424.
- Loomis, R.S.; Amthor, J.S. 1996. Limits to yield revisited. En: *Increasing Yield Potential in Wheat. Breaking the Barriers*, M. Reynolds (ed.), CIMMYT, Int. Symp, CIANO, Cd. Obregon, Mexico. CIMMYT, Mexico, D.F. 76-89.
- López-Bellido, L.; Fuentes, M.; Castillo, J.E.; López-Garrido, F.J. 1998. Effects of tillage, crop rotation and nitrogen fertilization on wheat-grain quality grown under rainfed Mediterranean conditions. *Field Crops Res.* 57: 265-276.
- Loss SP, Siddique KHM. 1994. Morphological and physiological traits associated with wheat yield increases in Mediterranean environments. *Adv. Agron.* 52: 229-276.
- Martin, A.J.P.; Syngé, R.L.M. 1945. Analytical chemistry of the proteins. En: *Advances in protein chemistry*, M.L. Anson, J.I. Edsall (eds), Academic Press Inc. Publishers, New York. 2:1-83.



- McCaig, T.N. and J.M. Clarke (1995). Breeding durum wheat in western Canada: Historical trends in yield and related variables. *Can. J. Plant Sci.* 75: 55-60.
- McLaren, J.S. 2005. Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. *Trends Biotechnol.* 23: 339-342.
- McClung, A.M., R.G. Cantrell, J. S. Quick; R. S. Gregory, 1986. Influence of Rht1 semidwarf gene on yield, yield components, and grain protein in Durum wheat. *Crop Sci.* 26:1095-1099.
- Mac Key, J. 2005. Wheat: Its concept, evolution, and taxonomy. En: Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies, C. Royo, M.M. Nachit, N. DiFonzo, J.L. Araus, W.H. Pfeiffer, G.A. Slafer (eds.), vol. 1, The Haworth Press, Inc., New York, pp. 3-61.
- Mathews, L.; Chapman, S.C.; Trethowan, R.; Singh, R.P.; Crossa, J.; Pfeiffer, W.; van Ginkel, M.; DeLaci. I. 2006. Global adaptation of spring bread and durum wheat lines near-isogenic for major reduced height genes. *Crop Sci.*, 46: 603-613.
- McMaster, G.S. 1997. Phenology, Development and Growth of the Wheat (*Triticum aestivum* L.) Shoot Apex. A review. *Adv. Agron.* 59: 63-118.
- Mifflin, B. 2000. Crop improvement in the 21st century. *J. Exp. Bot.* 51, 1-8.
- Miralles, D.J.; Slafer, G.A., 1995. Yield, biomass and yield components in dwarf, semidwarf and tall isogenic lines of spring wheat under recommended and late sowing dates. *Plant Breed.* 114: 392-396.
- Miralles, D.J.; Slafer, G.A. 1997. Radiation interception and radiation use efficiency of near-isogenic wheat lines with different height. *Euphytica* 97. 201-208.
- Miralles, D.J., Katz, S.D., Colloca, A., Slafer, G.A. 1998. Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height. *Field Crops Res.* 59: 21-30.
- Miralles, D.J.; Slafer, G.A. 1999. Wheat Development. En: *Wheat. Ecology and Physiology of Yield Determination*, E.H. Satorre, G.A. Slafer (eds.), Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. 2: 13-43.45-65.
- Miralles, D.J.; Slafer, G.A. 2007. Sink limitations to yield in wheat: how could it be reduced?. *J. Agric. Sci.* 145: 139-149.
- Molina Quirós, S. 2000. Histología y análisis del crecimiento en plantas de trigo duro (*Triticum durum* Desf.) en relación con su resistencia a la sequía. *Tesis de Licenciatura*, Universidad de Granada.

- Monsi, M., Saeki, T. 1953. Ubre den Lichtfaktor in den Pflanzengesellschaften und Seine Bedeutung für die Stoffproduktion. *Jap. J. Bot.* 15: 22-52 (Existe traducción moderna al inglés en *Ann. Bot.* 95: 549-567, 2005).
- Moore, S.; Stein, W.H. 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment. En: *Methods in Enzymology*. S.P. Colowick, N.O. Kaplan (eds.), Academic Press, New York. 6:819-831.
- Morancho, J. 2000. Production et commercialisation du blé dur dans le monde. In: *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region*. New challenges. Di Fonzo, N.; Kaan, F.; Nachit, M. (eds), CIHEAM, Zaragoza, 2000. Options Méditerranéennes, Series A, 40: 19-34.
- Morgan, J. A.; LeCain, D.R.; Wells, R. 1990. Semidwarfing genes concentrate photosynthetic machinery and affect leaf gas exchange of wheat. *Crop Sci.* 30: 602-608.
- Motzo, R.; Fois, S.; Giunta, F. 2004. Relationship between grain yield and quality of durum wheats from different eras of breeding. *Euphytica* 140: 147-154.
- Nuez, F.; Carrillo, J.M. (eds). 2000. *Los marcadores genéticos en la Mejora Vegetal*. Sociedad Española de Genética. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Ed. de la Universidad Politécnica de Valencia.
- Pecceti, L.; Annicchiarico, P. 1998. Agronomic value and plant type of Italian durum wheat cultivars from different eras of breeding. *Euphytica* 99: 9-15.
- Peng, J.; Richards, D.E.; Hartley, N.M.; Murphy, G.P.; Devos, K.M.; Flintam, J.E.; Beales, J.; Fish, L.-J.; Worland, A.J.; Pelica, F.; Sudhakar, D.; Christou, P.; Snape, J.W.; Gale, M.D.; Harber, N.P. 1999. Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-261.
- Perry, M.W.; D'Antuono, M.F. 1989. Yield improvement and associated characteristics of some Australian spring wheat cultivars introduced between 1860 and 1982. *Austr. J. Agric. Res.* 40. 457-472.
- Pfeiffer, W.H., K.D. Sayre and M.P. Reynolds (2000). Enhancing genetic grain yield potential and yield stability in durum wheat. In *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: New Challenges*, ed. C. Royo, M.M. Nachit, N. Di Fonzo and J.L. Araus, Zaragoza: CIHEAM, pp. 83-93.
- Rajaram, S. (2001). Prospects and promise of wheat breeding in the 21 st century. *Euphytica* 119: 3-15.

- Reilly, M.L. 1990. Nitrate assimilation and grain yield. En: *Nitrogen in higher plants*. Y.P. Abrol (ed.). Wiley & Sons, Gran Bretaña, 335-366.
- Reynolds, M.P.; Pfeiffer, W.H. 2000. Applying physiological strategies to improve yield potential. En: *Wheat Improvement in the Mediterranean Region*. New Challenges, Zaragoza, Spain, Options Méditerranéennes. Serie A. Séminaires Méditerranéens, No. 40. 95-103C. Royo, M.M. Nachit, N. di Fonzo, J.L. Araus (Eds.), pp. 95-104.
- Reynolds, M.P.; Van Ginkel, M.; Ribaut, J.M. 2000. Avenues for genetic modification of radiation use efficiency in wheat. *J. Exp. Botany* 15: 459-473.
- Reynolds, M.; Calderini, D.; Condon, A.; Vargas, M. 2007. Association of source/sink traits with yield, biomass and radiation use efficiency among random sister lines from three wheat crosses in a high-yield environment. *J. Agric. Sci.* 145: 3-16.
- Rharrabti, Y.; Villegas, D.; García del Moral, L.F.; Aparicio, N.; Elhani, S.; Royo, C. 2001. Environmental and genetic determination of protein content and grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Plant Breed.* 120: 381-388.
- Rharrabti, Y.; Royo, C.; Villegas, D.; Aparicio, N.; García del Moral, L.F. 2003. Durum wheat quality in Mediterranean environments. I. Quality expression under different zones, latitudes and water regimes across Spain. *Field Crops Res.* 80: 123-131.
- Richards, R.A. 1992. The effect of dwarfing genes in spring wheat in dry environments. I. Agronomic characteristics. *Aust. J. Agric. Res.* 43: 517-527.
- Richards, R.A. 1996. Defining selection criteria to improve yield during drought. *Plant Growth Regul.* 20: 157-166.
- Richards, R.A. 2000. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* 51: 447-448.
- Roder, M.S.; Plaschke, J.; König, S.U.; Börner, A.; Sorrells, M.E.; Tanksley, S.D.; Ganai, M.W. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Genet. Genomics* 246: 327-333.
- Royo, C.; Michelena, A.; Carrillo, J.M.; García, P.; Juan-Aracil, J.; Soler, C. 1998. *Spanish durum breeding program*. En: "SEWANA (South Europe, West Asia and North Africa) Durum Research Network". Proceedings of the SEWANA Durum Network.

- Royo, C.; García del Moral, L.F.; Slafer, G.A.; Nachit, M.N.; Araus, J.L. 2005. Selection tools for improving yield-associated physiological traits. En: *Durum Wheat Breeding. Current Approaches and Future Strategies*. Royo, C.; Nachit, M.N.; Di Fonzo, N.; Araus, J.L.; Pfeiffer, W.H. and Slafer, G.A. (Eds.). Ed. Haworth Press (New York). Pp. 563-598.
- Royo, C.; Villegas, D.; Rharrabti, Y.; Blanco, R.; Martos, V.; García del Moral, L.F. 2006. Grain growth and yield formation of durum wheat grown at contrasting latitudes and water regimes in a Mediterranean environment. *Cereal Res. Comm.* 34: 1021-1028.
- Royo, C.; Álvaro, F.; Martos, V.; Ramdani, A.; Isidro, J.; Villegas, D.; García del Moral, L.F. 2007. Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica* 155: 259-270.
- Royo, C.; Martos, V.; Ramdani, A.; Villegas, D.; Rharrabti, Y.; García del Moral, L.F. 2008. Changes in yield and carbon isotope discrimination of Italian and Spanish durum wheat during the 20th century. *Agron J.* 100: 352-360
- Schram, E.; Moore, S.; Bigwood, E.J. 1954. Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.* 57: 33-37.
- Sears, R.G. 2006. New challenges in wheat breeding: increasing yields in sub-optimal environments. *International Symposium on Wheat Yield Potential: Challenges to International Wheat Breeding*. Ciudad Obregón. México. CIMMYT. Pag. 3.
- Sharma, R.C., 1995. Tiller mortality and its relationship to grain yield in spring wheat. *Field Crops. Res.* 41: 55-60.
- Shearman, V.J.; Sylvester-Bradley, R.; Scott, R.K.; Foulkes MJ. 2005. Physiological Processes Associated with Wheat Yield Progress in the UK. *Crop Sci.* 45: 175-185.
- Sibony, M.; Pinthus, M.J. 1988. Floret initiation and development in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann. Bot.* 61: 473-479.
- Siddique, K.H.M.; Beldford, R.K.; Perry, M.W.; Tennant, D. 1989a. Growth, development and light interception of old and modern wheat cultivars in a Mediterranean environment. *Aust. J. Agric. Res.* 40: 473-487.

- Siddique, K.H.M.; Kirby, E.J.M.; Perry, M.W. (1989b). Ear-to-stem ratio in old and modern wheats; relationship with improvement in number of grains per ear and yield. *Field Crops Res.* 21: 59-78.
- Simons R. G. 1982. Tiller and ear production of winter wheat. *Field Crop Abstract* 35: 857-870.
- Sinclair, T.R.; Purcell, L.C.; Sneller, C.H., 2004. Crop transformation and the challenge to increase yield potential. *Trends Plant Sci.* 9: 70-75.
- Sinclair, T.R.; Jamieson, P.D. 2006. Grain number, wheat yield, and bottling beer: An analysis. *Field Crops Res.* 98: 60-67.
- Sinclair, T.R., Jamieson, P.D. 2007. Yield and grain number of wheat: A correlation or causal relationship? Authors' response to "The importance of grain or kernel number in wheat: A reply to Sinclair and Jamieson" by R.A. Fischer. *Field Crops Res.* 105: 22-26.
- Singh, R.P.; Huerta-Espino, J.; Rajaram, S.; Crossa, J. 2001. Grain yield and other traits of tall and dwarf isolines of modern bread and durum wheat. *Euphytica* 119: 41-244.
- Slafer, G.A.; Andrade F.H. 1991. Changes in physiological attributes of the dry matter economy of bread wheat (*Triticum aestivum*) through genetic improvement of grain yield potential at different regions of the world. A review. *Euphytica* 58: 37-49.
- Slafer GA, Andrade FH. 1993. Physiological attributes related to the generation of grain yield in bread wheat cultivars released at different eras. *Field Crops Res.* 31: 351-367.
- Slafer, G. A.; Rawson, H.M. 1994. Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors. A re-examination of some assumptions made by physiologist and modellers. *Aust. J. Plant Physiol.* 21: 393-426..
- Slafer, G.A.; Whitechurch, E.M. 2001. Manipulating wheat development to improve adaptation. En: *Application of physiology in wheat breeding*. Reynolds, M.P.; Ortiz-Monasterio, J.I.; McNab, A.(Eds.) CIMMYT. México, pp. 160-169.
- Slafer, G.A.; Andrade, F.H.; Satorre, E.H. 1990. Genetic improvements effects on pre-anthesis physiological attributes related to wheat grain yield. *Field Crops Res.* 23: 255-263.

- Slafer, G.A.; Calderini, D.F.; Miralles, D.J. 1996. Generation of yield components and compensation in wheat. opportunities for further increasing yield potential. En: *Increasing yield potential in wheat: Breaking the barriers*, M.P. Reynolds, S. Rajaram, S., A. McNab (eds.). CIMMYT, México, 101-133.
- Snape, J.W.; Butterworth, K.; Whitechurch, E.; Worland, A.J. 2001. Waiting for the fine times. Genetics of flowering time in wheat. *Euphytica*, 119: 185-190.
- Spiertz, J.H.J.; Hamer, R.J.; Xu, H.; Primo-Martin, C.; Don, C.; van der Putten, P.E.L. 2006. Heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.): Effects on grain growth and quality traits. *Eur. J. Agron.* 25: 89-95.
- Swaminathan, M.S. 2007. Can *Science* and technology feed the world in 2025? *Field Crops Res.* 104: 3-9.
- Trocchi, A.; Borrelli, G.M.; De Vita, P.; Fares, C.; Di Fonzo, N. 2000. Durum wheat quality: A multidisciplinary concept. *J. Cereal Sci.* 32: 99-113.
- Vargas, M.; Crossa, J.; Reynolds, M. P.; Dhungana, P.; Eskridge, K. M. 2007. Structural equation modelling for studying genotypeenvironment interactions of physiological traits affecting yield in wheat. *J.Agr.Sci*, Cambridge 145: 151-161.
- Varshney, R.K.; Graner, A.; Sorrells, M.E. 2005. Genic microsatellite markers: features and applications. *Trends Biotechnol.* 23: 48-55.
- Waddington, S.R.; Cartwright, P.M.; Wall, P.C. 1983. A quantitative scale of spike initial and pistil development in barley and wheat. *Ann. Bot.* 51: 119-130.
- Waddington, S.R.; Osmanzai, M.; Yoshida, M.; Ransom, J.K. 1987. The yield of durum wheats released in Mexico between 1960 and 1984. *J. Agric. Sci.* 108: 469-477.
- Wright, S. 1921. Correlation and causation. *J. Agric. Res.* 20: 557-585.
- Yang, J.C.; Zhang, J.H.; Wang, Z.Q.; Zhu, Q.S. 2001. Water deficit-induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. *Agron. J.* 93: 196-206.
- Yoritaka, T.; Ono, T. 1954. Determination of methionine in proteins and peptides. *Nagasaki Igakkai Zasshi.* 29:400.
- Youssefian, S.; Kirby, E. J.M.; Gale, M. D. 1992a. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 1. Effects on development of the ear, stem and leaves. *Field Crops Res.* 28: 179-190.

- Youssefian, S.; Kirby, E. J.M.; Gale, M. D. 1992b. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth. *Field Crops Res.* 28: 191-210.
- Yunusa, I.A.M.; Siddique, K.H.M.; Belford, R.K.; Karimi, M.M. 1993. Effect of canopy structure on efficiency of radiation interception and use in spring wheat cultivars during the pre-anthesis period in a Mediterranean-type environment. *Field Crops Res.*, 35: 113-122.
- Zadoks, J.C.; Chang, T.T. y Konzak, C.F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14: 415-421.







## ASPECTOS METODOLÓGICOS

*En página anterior:  
Espiga de variedad Mexa:*



## Aspectos metodológicos

### Material vegetal.

Para este estudio se ha utilizado una serie histórica de 12 cultivares italianos y 12 españoles obtenidos en tres épocas del siglo pasado, agrupados en antiguos (anteriores a 1945), intermedios (registrados entre 1950 y 1985) y modernos (registrados entre 1988 y 2000).

Al objeto de comprobar la presencia del gen de enanismo *Rht-B1b* se realizó un ensayo de respuesta a las giberelinas siguiendo la metodología descrita por Gale y Gregory (1977). Para ello se utilizaron dos lotes de 12 semillas de cada variedad que se cultivaron en cámara de cultivo en pequeñas macetas con vermiculita y solución nutritiva completa. A uno de los lotes se le añadió además una solución de 4 ppm de ácido giberélico. Las condiciones de crecimiento consistieron en fotoperiodo de 12h luz/12h oscuridad, termoperíodo de 25°C día/15°C noche y humedad relativa entre 70 y 90%. Para evitar que se produjeran gradientes dentro de la cámara de cultivo, cada dos días se rotaron las bandejas en diagonal. En el momento de la emergencia de la segunda hoja (estadio 2 de la escala de Zadoks, Zadoks y cols., 1974) se midió la distancia entre la semilla y la lígula de la segunda hoja en todas las plántulas de los tratamientos control y con giberelinas. Los datos se sometieron a un análisis de varianza para detectar la existencia de diferencias significativas. Los resultados indicaron que todas las variedades españolas e italianas antiguas y los genotipos Adamello, Capeiti 8, Trinakria y Bidi 17, fueron sensibles a las giberelinas, por lo que se consideró que no contenían el alelo *Rht-B1b*.

Las características del material vegetal, su origen, el año de obtención y la presencia o no del gen *Rht-B1b* se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características del material vegetal utilizado en la Memoria.

Presencia del alelo <i>Rht-B1b</i>	Variety	Año de obtención	País de obtención	Altura de la planta (cm)	Índice de cosecha (%)
No	Balilla Falso	<1930	Italia	110.3	31.2
	Razza 208	<1930	Italia	110.9	28.8
	Blanco Verdeal	<1930	España	127.4	21.3
	Clarofino	<1930	España	126.7	26.7
	Pinet	<1930	España	119.5	24.3
	Rubio de Belalcázar	<1930	España	128.9	25.4
	Senatore Cappelli	1930	Italia	121.1	25.2
	Carlojucci	1945	Italia	106.1	30.7
	Bidi17	1950	España	99.7	28.1
	Capeiti 8	1955	Italia	92.1	38.5
	Trinakria	1970	Italia	98.4	34.3
	Adamello	1985	Italia	70.5	38.1
	<i>Media</i>			<i>109.3</i>	<i>29.4</i>
	Sí	Creso	1974	Italia	70.0
Camacho		1975	España	77.7	35.1
Esquilache		1976	España	69.7	39.2
Mexa		1980	España	77.8	39.3
Simeto		1988	Italia	74.3	41.8
Cirillo		1992	Italia	77.3	37.3
Flavio		1992	Italia	61.1	37.8
Zenit		1992	Italia	71.0	40.1
Ariesol		1992	España	72.5	40.3
Senadur		1995	España	76.1	41.8
Astigi		1999	España	78.9	40.5
Boabdil		2000	España	73.6	39.3
<i>Media</i>				<i>73.3</i>	<i>39.1</i>

### Localización de los ensayos, condiciones de cultivo y diseño experimental.

Los ensayos se realizaron durante los años 2003, 2004 y 2005 en la localidad granadina de Olivares, en la finca «Cortijo de Enmedio» propiedad de la Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero, dependiente de la Junta de Andalucía y situada a 35 km de Granada capital. En todos los casos los ensayos se llevaron a cabo

bajo condiciones de secano, con riego de apoyo cuando el déficit hídrico lo hizo necesario para garantizar un adecuado desarrollo del cultivo.

El diseño experimental en las tres campañas agrícolas fue de bloques al azar con tres repeticiones y parcelas de  $10 \times 1.2$  m, con 6 surcos. La siembra se realizó con una sembradora de ensayos, a una densidad ajustada en función del peso medio del grano a 350 plantas por  $m^2$ . La fertilización fue la usual en la zona. En la Tabla 2 se recogen los datos experimentales más significativos durante los años de estudio.

### **Rendimiento y componentes.**

El rendimiento en grano se obtuvo mediante recolección con una cosechadora de ensayos de cada una de las parcelas sembradas. Se expresó en kilogramos por hectárea a un nivel de humedad del 12%. Los componentes del rendimiento se obtuvieron a partir de las plantas contenidas en un metro lineal de un surco central de cada parcela, recogidas previamente a la recolección, donde se contó el número de tallos con espiga y sin espiga, para determinar el número de espigas por metro cuadrado de cada parcela. Del total de la muestra se seleccionaron 10 plantas homogéneas y representativas de la parcela, sobre las cuales se determinaron la longitud de los tallos principales, medida desde el suelo hasta el collar de la espiga, la longitud de las espigas, peso de las mismas, peso de la paja, número de espiguillas por espiga, número de espigas por planta, número de granos por espiga y peso de éstos. A partir de muestras de los granos cosechados, se calculó el peso de mil granos, mediante tres pesadas de 100 granos. Para el recuento de granos se empleó un contador fotoeléctrico de la firma Pfeuffer.

El índice de cosecha representa la fracción del peso seco total de la planta que se encuentra en forma de grano y constituye una medida de la eficiencia en el reparto de asimilados entre paja y grano. Se calculó dividiendo el peso de los granos de las 10 plantas seleccionadas de cada parcela, entre la suma del peso de las espigas y peso de la paja.

Tabla 2.- Características generales de los ensayos.

Datos generales			
Coordenadas	37°08'N, 3°49'W		
Altitud, m	684		
Clasificación del suelo	Loamy Calcixerolic Xerochrept		
Textura	Arcilloso- limoso		
Fertilización, Kg/ha			
N	80		
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	45		
K	45		
Densidad de siembra, plantas/m <sup>2</sup>	350		
Año	2003	2004	2005
Pluviometría durante el ciclo, mm	250	419	96
Temperaturas durante el ciclo, °C			
Tmax	32.3	28.9	34.0
Tmean	23.3	20.6	24.5
Tmin	14.6	13.3	15.3
Riego de apoyo, mm	40	40	120
Fecha de siembra	23/12/2002	13/11/2003	10/12/2004

**Fenología.**

La fecha de antesis se estimó como aquella en la que el 50% de las espigas de la parcela presentaban anteras amarillas visibles (la floración puede ser abierta o cerrada, cuando las anteras estaban amarillas es cuando considerábamos antesis) en sus flores centrales (estadío 69 de la escala de Zadoks). El período vegetativo, entendido como el tiempo transcurrido entre la siembra y la antesis, se expresó en días. La madurez fisiológica, se estimó como el momento en que el 50% de los pedúnculos de las espigas de la parcela cambiaban al color amarillo (estadio 91 de la escala de Zadoks).

**Análisis del desarrollo apical.**

Para caracterizar la duración de las diferentes fases del desarrollo del meristemo apical del tallo principal y la formación de primordios, se observaron 5 ápices del tallo principal de otras tantas plantas de trigo a lo largo de todo el ciclo de vida del cultivo, desde el estadio vegetativo (4-8 hojas en tallo principal) hasta la antesis, a intervalos de aproximadamente 3-4 días. Para los ensayos realizados en Lérida, las muestras de tallos fueron conservadas en fijador AFA (5% de ácido acético glacial, 5% de aldehído fórmico del 40% y 90% de alcohol etílico del 70%) de acuerdo a la metodología descrita en Molina Quirós (2000) y posteriormente enviadas a Granada para su análisis.

Para poder examinar el ápice del tallo es necesario retirar las hojas que lo envuelven, ya que durante el desarrollo vegetativo se encuentra situado en la base de los pseudotallos, a escasos milímetros por encima del nudo de ahijamiento. Una vez retiradas las hojas maduras, se procedió con cuidado desenvolviendo las vainas de las hojas más jóvenes a partir de la base, donde se sitúa la zona de crecimiento. Cuando la hoja visible era de unos 30 mm de longitud se continuó la disección bajo una lupa binocular con micrómetro incorporado, marca Nikon, hasta descubrir el meristemo apical. Como fuente luminosa artificial se utilizó un equipo de luz fría marca Volpi, modelo Intralux 4000, aconsejable para la observación y disección de material vegetal por ocasionar menores pérdidas de agua en los tejidos.

Una vez descubierto el ápice, este presenta dos posibles visiones: de perfil, cuando se contempla en sentido perpendicular al plano de las hojas, lo que permite observar simultáneamente las hileras de primordios a ambos lados del meristemo; y de



frente, cuando se gira 90° con respecto a la posición anterior. Los estadios de desarrollo del ápice se han registrado utilizando como referencia la «Guía de desarrollo de los cereales» de Kirby y Appleyard (1984).

### **Cálculo del tiempo térmico.**

La universalidad de las respuestas a la temperatura permite considerar la duración del ciclo de los cultivos (y de sus etapas) en unidades que ponderan el tiempo calendario por la temperatura a la que las plantas han estado creciendo. Estas unidades se conocen como tiempo térmico (TT) y tiene unidades de grados-día (°Cd).

Esta metodología permite que la duración de cualquier etapa medida en °Cd resulte independiente de la temperatura durante la cual transcurre las distintas etapas del desarrollo. Así para el cálculo del tiempo térmico acumulado, para una determinada etapa del ciclo ontogénico, es posible utilizar la fórmula

$TT \text{ (°Cd)} = \Sigma (T_m - T_b)$  donde TT es el tiempo térmico acumulado para una etapa determinada de la ontogenia del cultivo,  $T_m$  la temperatura media diaria y  $T_b$  la temperatura base (normalmente 0 grados).

Las temperaturas por debajo de la temperatura base no permiten el desarrollo de las plantas, por lo tanto se le considera valor 0 a todas aquellas temperaturas que se encuentran por debajo de esta temperatura a la hora de calcular el tiempo térmico.

### **Análisis de proteínas y de aminoácidos durante el llenado del grano.**

Debido a la complejidad de la determinación de aminoácidos y a que se ha determinado el contenido de los aminoácidos del grano en 8 momentos del desarrollo durante dos años, se han analizado únicamente 6 variedades españolas, seleccionando las que presentaban mayor y menor contenido de proteína (Blanco Verdeal, Pinet, Camacho, Mexa, Senadur y Ariesol).

Cada 4-5 días aproximadamente desde la antesis hasta la madurez fisiológica, se muestrearon, desgranaron y molieron cuatro espigas de tallos principales de cada parcela (3 rep x 3 variedades), para obtener la harina necesaria para los análisis de aminoácidos y proteínas.

### **Análisis del contenido en proteína bruta.**

El contenido de proteína bruta del grano se determinó mediante el método Kjeldhal en los laboratorios de Atarfe de la Conserjería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. El contenido de nitrógeno determinado por este método (g de N por g de muestra) se multiplicó por 5,7 (factor de conversión del nitrógeno a proteína en grano de cereales, AACC, 2000) para determinar el porcentaje de proteína en sustancia fresca, que después de corregirse mediante el porcentaje de humedad de la muestra, se expresó finalmente en sustancia seca.

### **Determinación aminoacídica de trigo duro mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase inversa.**

El método de cromatografía líquida empleado para el análisis y cuantificación de aminoácidos fue el método Pico-Tag (Cohen y col., 1989) aplicado a hidrolizados de proteína. El análisis de los aminoácidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (fase estacionaria no polar y fase móvil polar), mediante un equipo HPLC Waters Separation Module 2695 equipado con un detector de absorbancia Waters 2487 Dual  $\lambda$ .

El análisis de aminoácidos de proteínas conlleva tres etapas bien diferenciadas:

- 1- Hidrólisis de la proteína (hidrólisis ácida y oxidación perfórmica (previa a la hidrólisis ácida).
- 2- Reacción de derivación precolumna de los aminoácidos.
- 3- Separación y cuantificación cromatográfica.

El principio del método de análisis de aminoácidos se basa en la formación de un derivado aminoacídico y su posterior separación y detección (mediante detector espectrofotométrico) en HPLC.

La hidrólisis ácida destruye la cisteína y el triptófano y, parcialmente, la metionina; por este motivo se han desarrollado otros reactivos de hidrólisis o pretratamientos de la muestra que permiten una cuantificación de todos los

aminoácidos. Así, la oxidación perfórmica previa de las muestras permite cuantificar la metionina y la cisteína como metionina sulfona y ácido cisteico respectivamente.

#### *Hidrólisis de la proteína.*

La determinación de la composición aminoacídica de una proteína requiere su hidrólisis previa, (Moore y Stein, 1963), un proceso mediante el cual se rompen los enlaces peptídicos y se liberan los aminoácidos que la componen. La metodología utilizada para este proceso se describe a continuación:

1. Se pesa en tubo PYREX<sup>R</sup> de tapón roscado aproximadamente 100 mg de muestra de harina tamizada previamente desecada durante 24 horas a 72 °C en estufa.
2. Se le añade a cada muestra 5 ml de HCl 6N, preparado mediante ebullición constante al que se le añade fenol (1 % p/v).
3. Se deja 40 minutos en bloque calefactor a 110°C con los tubos semicerrados (para expulsar el aire del líquido). Una vez transcurridos este tiempo se cierran y se dejan 24 horas a esa temperatura.
4. Posteriormente se filtra el hidrolizado con filtro MillexR-HV no estéril de 0,45 µm de poro y 13 mm de longitud y se diluye 1:4 con agua miliQ (resistividad mayor a 18 MΩ/cm).
5. El filtrado se guarda a -20 °C hasta su utilización.

#### *Oxidación Perfórmica*

La inestabilidad de los aminoácidos que contienen azufre fue comprobada por Martin y Synge (1945) y Yoritaka y Ono (1954) quienes demostraron que la cisteína se altera y origina alanina, serina y glicina durante la hidrólisis ácida. Para resolver este problema Schram y cols., (1954) propusieron la oxidación previa de la cisteína y cistina a ácido cisteico con ácido perfórmico, que se elimina por evaporación a vacío o liofilización (igualmente en presencia de ácido perfórmico la metionina se transforma a metionina sulfona). Estos autores consiguieron un rendimiento del 90% en la oxidación de metionina y cisteína. En 1963 Moore y Stein

mejoraron el método, añadiendo HBr como agente reductor para eliminar el exceso de reactivo per fórmico y adaptar el procedimiento al análisis en serie.

El proceso de oxidación comprende los siguientes estadios consecutivamente:

1. Se pesan 100 mg de muestra en tubo Pirex de tapón roscado.
2. Se prepara reactivo per fórmico en campana 9:1 (9 partes de ácido fórmico [HCOOH] al 88% y 1 parte de agua oxigenada [al 30% Volumen] [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] (El agua oxigenada deber guardarse en frigorífico). Esta mezcla tiene que estar en agitación 30 minutos antes de añadirse a los tubos y 5 minutos en hielo.
3. Se le añade 1ml de reactivo per fórmico a cada muestra, se agita en “vortex”, se tapa con parafilm y se deja en hielo durante 16 horas.
4. Transcurrido este tiempo se detiene la reacción añadiendo 0,4 ml de HBr al 48 a cada tubo.
5. El exceso de reactivo se elimina mediante el sistema de evaporación en vacío utilizando una centrifuga evaporadora-concentradora (gyrovap) durante 3 horas.
6. Una vez oxidadas las muestras se someten al proceso de hidrólisis ácida estándar de 24 horas a 110°C.

La mayor crítica que cabe realizar a la práctica generalidad de los procedimientos de hidrólisis es que son complejos y costosos. Por lo tanto sería muy ventajoso determinar todos los aminoácidos en un solo hidrolizado, realizado con la menor cantidad de ácido. Esta hidrólisis única habría que llevarla a cabo sobre muestras preoxidadas para así poder analizar metionina y cisteína. El triptófano habría que determinarlo separadamente, mediante una hidrólisis alcalina. El fenol del HCl sirve para proteger a los aminoácidos lábiles aromáticos (por ej., la tirosina forma 3 cloro tirosina, pero si se le añade fenol o mercaptoetanol al reactivo de hidrólisis, se evitan sus pérdidas ya que son secuestradores de halógenos). Es decir, proporciona una calidad de reactivo constante para evitar posibles fuentes de variabilidad en el proceso de hidrólisis.

La principal fuente de variación en el contenido en aminoácidos generada por la hidrólisis clorhídrica de proteínas, se debe a causas tales como la baja recuperación de isoleucina y valina; destrucción progresiva de treonina y serina; destrucción parcial de

cisteína y metionina; posible destrucción de tirosina o transformación de ésta en derivados halogenados y destrucción del triptófano (Gehrke y col., 1985).

Una de las dificultades que se presentan para la determinación correcta de la composición en aminoácidos es la presencia de sustancias que causan interferencias durante la hidrólisis ácida de la proteína: carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, iones metálicos y sales inorgánicas. La naturaleza de la interacción aminoácido-azúcar provoca la destrucción parcial de los aminoácidos liberados. Muchos azúcares son transformados por acción de los ácidos fuertes a hidroximetilfurfural y otros furfuraldehidos, que pueden seguir transformándose en productos de degradación que reaccionan lentamente con los aminoácidos.

Un aspecto importante en la interacción aminoácido-carbohidratos es el efecto de la relación carbohidratos/proteína en la muestra. La destrucción de las moléculas libres de aminoácido es proporcional al número de colisiones entre éstas y las del producto de degradación de los carbohidratos; por lo tanto dependerá de la concentración de productos degradados y ésta, a su vez, de la concentración de azúcares en la muestra.

En conclusión podemos decir que el porcentaje de aminoácidos libres degradados durante la hidrólisis es proporcional a la cantidad de carbohidratos por unidad de volumen de ácido. Una forma de minimizar esta interferencia es reducir la concentración de carbohidratos durante la hidrólisis empleando un gran exceso de ácido.

#### *Reacción de derivación de los aminoácidos. Método Pico-Tag Waters.*

La derivación con fenilisotiocianato (*PITC*, también conocido como reactivo de *Edman*) es un método muy utilizado para la cuantificación de aminoácidos (aas). Los feniltiocarbamilaminoácidos (PTC-aa) pueden ser detectados con gran sensibilidad a 254 nm, previa separación mediante cromatografía líquida en fase inversa. La formación de las PTC aas es el paso fundamental de la reacción de Edman para la determinación de la secuencia aminoacídica de péptidos y proteínas (Edman, 1950). En 1984 investigadores de Waters Chromatography, división de millipore (Bidlingmeyer y cols., 1984) y de la Universidad de Chicago (Heinrikson y Colm, 1984) publicaron detalladamente métodos que hacen uso de este reactivo. En su trabajo describen el modo operatorio para pequeñas muestras y demuestran que la derivación con PITC es un método fiable para la cuantificación de los aminoácidos en ellas.

La detección se realiza en la región del UV a 254 nm. Aunque no se alcanza la sensibilidad de los derivados fluorescentes, ésta es suficiente para determinar con precisión la composición de hidrolizados de proteínas en las condiciones habituales de trabajo.

El proceso de derivación es complejo. La reacción se lleva a cabo en medio básico con piridina o trietilamina. El rendimiento de la reacción es óptimo para la mayoría de los aminoácidos a excepción de la cisteína. Consta de 3 etapas:

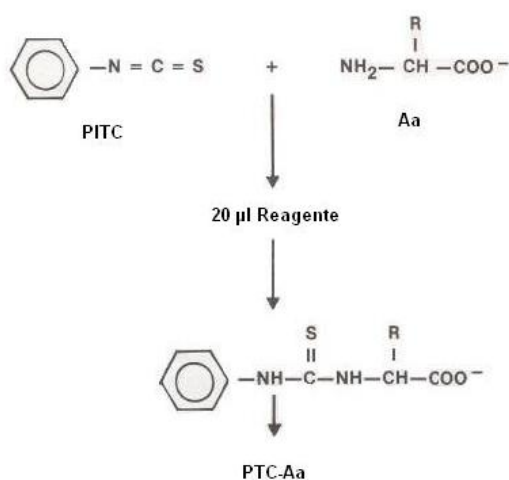
– Secado: Se toman 25 µl de muestra filtrada problema en un microvial de 6 mm de Ø y se le adicionan 25 µl de disolución de patrón interno 0.4 mM ( $\alpha$ -amino-adípico). El vial se somete a evaporación en Gyrovap 1 hora a 45 °C. Con el secado se eliminan disolventes y componentes volátiles.

– Resecado: Una vez que la muestra está totalmente seca se adicionan 25 µl de reactivo de ressecado: metanol (calidad HPLC), agua (mQ) y trietilamina (TEA), en proporción 2:2:1 (estable 30 días a -20°C) y se vuelve a someter a evaporación (Gyrovap) 2 horas a temperatura ambiente. La TEA debe gasearse con N<sub>2</sub> para desplazar el aire y así evitar su oxidación. El ressecado neutraliza cualquier residuo que pudiera quedar adherido al tubo.

– Derivación: La reacción se lleva a cabo en medio básico con trietilamina. A las muestras ressecadas se le añade 20 µl de reactivo de derivación, (metanol (calidad HPLC), agua (mQ), TEA y fenilisotiocianato [PITC]), en proporción 7:1:1:1. Debe agitarse en “vortex” y estar a temperatura ambiente 5 minutos antes de añadir el reactivo a las muestras y 10 minutos una vez añadido para que tenga lugar la reacción. Los tubos deben estar sin tapar. Los reactivos deben añadirse en el orden indicado para que la solución sea clara y homogénea. Es importante agitar en vortex antes de esperar el tiempo indicado. El metanol minimiza el efecto de las sales que pueden influir en el rendimiento de la reacción de derivación. El uso de metanol en vez de etanol se debe a que se recupera mucho mejor Asp y Glu en presencia de sales o detergentes. Posteriormente se elimina el exceso de reactivo mediante Gyrovap durante 3 horas a temperatura ambiente (es importante alcanzar un vacío alto).

El PITC debe estar a temperatura ambiente antes de poder añadirse al reactivo, para evitar la condensación (la humedad degrada el PITC), y una vez utilizado debe

gasearse con nitrógeno para evitar su oxidación y conservarlo en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  no más de 3 semanas. Una vez obtenidos los fenil-tiocarbamil-aminoácidos, se disuelven con  $150\ \mu\text{l}$  de eluyente de muestras (fosfato (pH 7,40) y 5% (V/V) de acetonitrilo), se agita con “vórtex” y se transfieren a los insertos especiales para el HPLC, quedando así las muestras preparadas para su inyección en el cromatógrafo. La reacción de derivación es la siguiente:



#### *Separación y cuantificación cromatográfica.*

– Instrumentación: Cromatógrafo líquido de alta resolución en fase inversa modelo HPLC Waters Separation Module 2695 equipado con un detector de absorbancia Waters 2487 Dual  $\lambda$ . Se utilizó la columna Pico-Tag (NovaPak C-18) de 15 cm específica para el análisis de los feniltiocarbamil-aminoácidos.

– Condiciones cromatográficas: Se emplea un gradiente binario de fase móvil formado por eluyentes A y B, cuya preparación se describe a continuación.

– Eluyente A: Para dos litros se prepara una disolución de 38 gramos de acetato de sodio trihidrato y dos litros de agua mili Q, a ésta se le adiciona 1 ml de TEA y 0,4 ml de EDTA (1g/l). Se ajusta el pH (6,29 para hidrólisis ácida y 5,95 para oxidación perfórmica) por adición de ácido acético glacial y se filtra a través de una membrana de

0,45  $\mu\text{m}$  (HATF MF Millipore). A esta disolución se le añade un 6% del volumen total de acetonitrilo de grado HPLC, es decir, 120 ml de acetonitrilo y 1880 ml de la disolución. Los volúmenes se miden por separado en probetas diferentes. Para evitar que se produzcan burbujas en la columna que interfieran los resultados, se desgasifica con ultrasonidos durante 20 segundos. Un exceso de sonicación disminuye la concentración de acetonitrilo. Se utiliza NaOH 1N en el caso en el que nos excedamos al corregir el pH.

- Eluyente B: Es una disolución que contiene un 60% en volumen de acetonitrilo (grado de pureza HPLC) en agua de grado mili-Q, al que se le añade 0,2 ml de EDTA (1 g/l). Es importante que el EDTA esté en perfecto estado (máximo 30 días en frigorífico); si no se produce deriva de la línea base en los aminogramas. Se desgasifica con ultrasonidos durante 20 segundos.

El gradiente formado permite la separación de los aminoácidos de hidrolizados de proteínas en 11 minutos con un flujo de 1ml/minuto. Seguidamente se procede a la regeneración de la columna con 100% de eluyente B y posteriormente para reestablecer las condiciones iniciales se pasa eluyente A. En total, se emplean 27 minutos por vial (11 minutos de separación + 16 minutos de reestablecimiento de la columna).

- Condiciones cromatográficas (Table 3).

Tiempo	Flujo	%A	%B	Curva
	1.00	100.0	0.0	6
15.00	1.00	54.0	46.0	5
15.20	1.00	0	100	5
16.70	1	0	100	5
17.00	1.50	0	100	5
17.20	1.50	0	100	5
17.50	1.50	100	0	5
26.00	1	100	0	5
27.00	1	100	0	5



El volumen de inyección se mantuvo constante en 10µl por muestra para todos los análisis. La temperatura de la columna fue de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  y la longitud de onda del detector fue 254 nanómetros.

– Preparación del estándar externo

Se preparó una disolución patrón de aminoácidos a partir de 1 ml de una disolución madre (Pierce Ockford IL-61105 USA) que contiene 17 aminoácidos de 2,5 µmoles/ml, excepto cisteína que está en concentración de 1,25 µmoles/ml. Los aminoácidos presentes en esta disolución madre eran L-alanina, L-arginina, L-aspártico, L-cistina, ácido L-glutámico, L-histidina, L-glicina, L-isoleucina, l-Leucina, L-Lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-Treonina, L-tirosina y L-valina.

En un matraz aforado de 25 ml se añade la ampolla de los 17 aminoácidos (en concentración de 2'5mM) y se completa hasta enrasar con ácido clorhídrico 0.1N de grado HPLC.

Para el patrón de 19 aminoácidos, utilizado para la oxidación perfórmica, a los 17 aminoácidos se le añade además la cantidad correspondiente de ácido cisteico (CYA) y metionina sulfona (METSO) para que la concentración final de estos aminoácidos resulte 0,2 mM aproximadamente.

– Identificación y cuantificación

Antes de realizar los cálculos es muy importante verificar que los picos están correctamente identificados, que la línea base sea satisfactoria y que la integración se ha realizado de forma apropiada.

El principio de la cuantificación se basa en que el área de pico de cada componente es proporcional a la cantidad de aminoácidos en la muestra. Se compara con el área de una cantidad conocida del mismo compuesto en el patrón de calibrado (la cuantificación por altura de pico es menos fiable para el análisis de aminoácidos). La comparación de áreas se hace de forma indirecta, mediante el uso de un factor de respuesta (FR) calculado a partir del área de una cantidad conocida de cada componente cuando se pincha el patrón, según la expresión:

$$FR = \frac{\text{Concentración del aminoácido en el patrón}}{\text{área del aminoácido}}$$

Si la cuantificación es con estándar externo, el FR de cada compuesto en el patrón se usa para calcular la concentración del mismo en la muestra:

$$\text{Concentración del aminoácido 1} = \text{Área del aminoácido 1 en la muestra} \times FR1.$$

La cuantificación con estándar interno se emplea para mejorar la exactitud cuando los errores de pipeteo o volumen de inyección pueden ser significativos y es muy recomendable siempre que se desee una cuantificación absoluta.

$$\text{Concentración compuesto 1} = \frac{\text{área del pico 1} \times FR1 \times \text{área estándar interno en el patrón}}{\text{área del estándar interno en la muestra}}$$

Si la concentración de estándar interno es igual en la muestra y el patrón con sólo con sólo considerar los factores de dilución y las cantidades de partida de la muestra desde la sustancia original, se obtienen las cantidades absolutas de aminoácidos de las muestras en las unidades que correspondan.

Para la cuantificación de los aminoácidos se utiliza un programa específico desarrollado por Waters denominado Millenium v.3.2.

### **Análisis estadístico.**

En función de los objetivos de cada uno de los capítulos de la tesis, los resultados se han analizado mediante análisis de la varianza y comparación de medias por el test de rango múltiple de Duncan regresiones, correlaciones y análisis mediante coeficientes de sendero. Dependiendo del número y complejidad de los datos, los grados de libertad y la complejidad del modelo han sido diferentes, lo que se recoge en el apartado de material y métodos de cada capítulo. En el caso de mayor complejidad, como en el análisis de la duración de las fases del desarrollo apical o el rendimiento y

sus componentes, en el modelo utilizado se ha considerado el año y la repetición como factores aleatorios y la época y el origen como factores fijos. Para el análisis de la varianza se han considerado como factores principales el año, la latitud (Lérida y Granada), el origen (Italia y España), la época de obtención de las variedades (antiguas, intermedias y modernas) y la repetición anidada al año. Se consideraron todas las interacciones con excepción de las correspondientes a las repeticiones (tabla 3). Ya que el modelo elegido era aleatorio, el análisis de varianza se efectuó mediante el procedimiento GLM (General Lineal Model) del paquete estadístico STATGRAPHICS v.5.1.

Tabla 4. Modelo del análisis de varianza para el rendimiento y sus componentes.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Gl</b>
Año	2
Latitud	1
Año × Latitud	2
Origen	1
Origen × Año	32
Origen × Latitud	1
Origen × Año × Latitud	2
Bloque (Año × Latitud)	16
Época	2
Época × Año	6
Época × Latitud	2
Época × Origen	2
Época × Año × Latitud	6
Época × Año × Origen	6
Época × Latitud × Origen	2
Época × Año × Latitud × Origen	6
Error	512
Total	575

### Estudio por coeficientes de sendero.

Dado que el objetivo principal de este estudio fue averiguar si la presencia del gen de enanismo *Rht-B1b* condiciona una diferente estrategia en la formación del rendimiento bajo ambiente mediterráneo, los coeficientes de sendero se calcularon a partir de la matriz de coeficientes de correlación generada entre el rendimiento y sus componentes (número de espigas por m<sup>2</sup>, número de granos por espiga y peso medio por grano), y la duración de los períodos vegetativo y de llenado del grano, agrupando los genotipos en dos lotes con y sin el alelo *Rht-B1b*. Con objeto de aumentar la fiabilidad del estudio, se han usado los datos de Lérica y Granada de los años 2000 al 2005. El diagrama ontogénico y los cálculos de efectos directos e indirectos se han basado en el método descrito en García del Moral y cols., 2003 y que consiste en resolver los 4 sistemas de ecuaciones siguientes:

$$\begin{aligned} r_{26} &= P_{26} + r_{24} P_{46} + r_{25} P_{56} \\ r_{46} &= r_{24} P_{26} + P_{46} + r_{45} P_{56} \\ r_{56} &= r_{25} P_{26} + r_{45} P_{46} + P_{56} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r_{25} &= P_{25} + r_{23} P_{35} + r_{24} P_{45} \\ r_{35} &= r_{23} P_{25} + P_{35} + r_{34} P_{45} \\ r_{45} &= r_{24} P_{25} + r_{34} P_{35} + P_{45} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r_{14} &= P_{14} + r_{12} P_{24} + r_{13} P_{34} \\ r_{24} &= r_{12} P_{14} + P_{24} + r_{23} P_{34} \\ r_{34} &= r_{13} P_{14} + r_{23} P_{24} + P_{34} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r_{13} &= P_{13} + r_{12} P_{23} \\ r_{23} &= r_{12} P_{13} + P_{23} \end{aligned}$$

En la ecuación  $r_{13} = P_{13} + r_{12} P_{23}$ ,  $P_{13}$  es el efecto directo del carácter 1 sobre 3 (el coeficiente de sendero), mientras que  $r_{12} P_{23}$  es el efecto indirecto del carácter 1 sobre el 3 vía 2. Definiciones similares pueden aplicarse a las otras ecuaciones. El diagrama ontogénico utilizado se presenta en el capítulo 2 de esta Memoria de Tesis Doctoral.

## **Determinación de microsatélites.**

La determinación de los microsatélites conlleva 5 puntos bien diferenciados.

Preparación del material vegetal.

Extracción rápida mediante CTAB del DNA del material vegetal.

Cuantificación del DNA obtenido.

Amplificación de DNA mediante PCR.

Secuenciación y visualización de los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa.

### *Preparación del material vegetal.*

Previo al proceso de extracción en sí, hay que tener suficiente material vegetal para que la técnica tenga éxito. Para ello se colocan entre 3-4 semillas en placas de petri con papel de filtro humedecido en  $\text{KNO}_3$  durante uno o dos días dependiendo de la capacidad germinativa de las semillas. Las semillas se colocan con el pliegue (crease) en contacto con la solución nutritiva. Las placas de petri deben estar cerradas con parafina.

Para el proceso de extracción se necesitan 10 cm de tejido, con lo que es necesario un transplante de las semillas a las cámaras de cultivo durante aproximadamente 2-3 días. Una vez alcanzado dicho tamaño comienza el proceso de extracción.

### *Extracción rápida mediante CTAB del DNA del material vegetal.*

El protocolo utilizado para la extracción ha sido el desarrollado por Doyle y Doyle (1987). Previa a la extracción del DNA debe estar preparado el CTAB y precalentado a 65°C. El procedimiento llevado a cabo se describe a continuación.

1. Cortar 10 cm de hoja de la planta germinada, con ayuda de escalpelo y pinzas. Las pinzas deben estar secas y esterilizadas con etanol para cada genotipo.

2. Se coloca el tejido en tubos eppendorf y se sumergen literalmente en nitrógeno líquido. Con la ayuda de un mortero se procede a la molienda de la muestra hasta obtener un polvo fino.
3. En campana de gases añadir 600µl de CTAB precalentado a 65°C (no olvidarse añadirle mercaptoetanol) a cada muestra. Agitar bien y dejar incubando 1 hora a 65°C.
4. Centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos.
5. Pasar los sobrenadantes a eppendorf limpios, etiquetar previamente los tubos.
6. Añadir 5µl de RNAasa, agitar e incubar a 37°C entre 30-60 minutos.
7. Añadir 500µl de cloroformo:isoamilalcohol en proporción 24:1 y agitar en termomixer o a mano a temperatura ambiente.
8. Repetir el paso 4.
9. Transferir el sobrenadante a nuevos eppendorfs (sin arrastrar pelet).
10. Añadir 500 µl de isopropanol (debe estar preparado previamente y a -20° C). Se invierten los tubos y podremos ver como precipita el DNA. Dejar durante 5 minutos a -20° C (invertir varias veces antes de centrifugar)
11. Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm.
12. Decantar el isopropanol en un vaso de precipitados y dejar boca abajo sobre papel para que se seque lo más posible.
13. Añadir 1 ml de Etanol 70% guardado a -20°C.
14. Centrifugar 5 minutos a 14.000rpm.
15. Decantar.
16. Repetir los pasos 13, 14 y 15.
17. Invertir todos los tubos y dejar a temperatura ambiente hasta que todo el etanol se haya evaporado.
18. Resuspender las muestras añadiendo 30 µl de TE. Dejar en baño maría durante 15 minutos y guardar a 4 grados (si la cuantificación se hace en el mismo día) o a -20°C si la cuantificación se hace en días posteriores.

*Cuantificación del DNA obtenido.*

La cuantificación se realizó en espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 260 nm. El procedimiento se describe a continuación.

1. Tomar 1µl de las muestras guardadas de la extracción y añadir 69 µl de agua nucleasa, especial para cuantificación.
2. Medir Absorbancia a 260 nm.
3. La concentración es la absorbancia por 50 (constante) por el factor de dilución. El factor de dilución se calcula dividiendo el volumen total de la medida entre la cantidad de DNA que se le añade.
4. Una vez calculada la concentración de DNA hay que diluir la muestra. La concentración stock para el análisis de microsatélites es de 1ng/µl o 500ng/µl. Para trabajar la concentración debe ser de 20ng/µl.

*Amplificación de DNA mediante PCR.*

La PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica que permite duplicar un número ilimitado de veces un fragmento de DNA en un tubo de ensayo. Mediante esta técnica se pueden generar millones de moléculas idénticas, a partir de una molécula de DNA. La técnica fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1983. La amplificación estándar llevada a cabo se describe en la siguiente tabla (Table 5).

Table 5: Condiciones de la PCR.

Muestras			Programa:			<u>Gel Agarosa</u>		
	48		94°C	WMS	3 min			
PCR Cocktail	1X	53.00	94°C		60 sec	3% 2:1 Metaphor:LE Agarosa		
DNA (20ng/uL)	2.5	2.50	Anneal		60 sec			
H2O (Promega)	15.9	842.70	72°C		60 sec	8g Metaphor		
10X Buffer -Mg	2.5	132.50	<u>44 veces</u>			4g LE		
MgCl 50mM (Invitrogen)	0.75	39.75	72°C	10 min		400 ml 0.5X TBE		
F.PRIMER 100ng/ul	0.5	26.50	4°C	hold		2.30@240V		
R.PRIMER 100ng/ul	0.5	26.50	Temperatura Annealing: 55					
Taq 5U/uL (in house)	0.35	18.55						
dNTP's (10mM)	2	106.00						
Total (w/o DNA)	22.5	1,192.50						

Una vez amplificado se le añade un tampón (loading buffer) y se conserva a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El tampón se une a las cadenas de DNA ayudando a mantener el DNA óptimo para su visualización en gel de agarosa.

*Secuenciación y visualización de los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa.*

Después de sacar las muestras del congelador hay que agitar muy bien los eppendorfs para llegar a una homogenización completa. Media hora antes de secuenciar las muestras se prepara el gel de agarosa a un 3% de 2:1 metaphor-agarosa. Es decir para 400 ml, necesitaríamos añadir 12 gramos de metaphor y agarosa; como la proporción es 2:1, sería 8 gramos de metaphor y 4 gramos de agarosa.

Los pasos se resumen a continuación.

1. A 400 ml de TBE 0.5X agitado con mosca se le añaden las cantidades calculadas. Se deja mezclar 1-2 minutos y se calienta en microondas a 800 W.
2. Cuando llegue al punto de ebullición sacar del microondas, agitar mientras que se deja enfriar hasta 55-65 grados (sumergir el termómetro en la solución).
3. Preparar los soportes para correr el gel de agarosa.
4. Añadir el bromuro de etidio, 1ml por cada 100 ml de disolución. Elevar la velocidad de la agitación para que se distribuya homogéneamente.
5. Verter la solución en los soportes, empezando por una esquina y de forma suave. Es importante que no se formen burbujas que impidan la electroforesis correcta. Colocar los carriles (peines) de electroforesis.
6. Se espera entre 15-30 minutos hasta que el gel polimerice.
7. Correr el gel en electroforesis con 0.5X TBE.
8. Cargar las muestras amplificadas en la PCR. El primer carril es para el marcador de peso molecular.
9. Esperar 2h 30min a 240 voltios. El electrodo positivo tiene que estar en el sentido contrario donde se carga el DNA.
10. Para la visualización se utiliza una cámara ultravioleta. Importante la utilización de gafas especiales.





## **Objetivos**

*En página anterior:  
Máquina cosechando.*



## Objetivos

El trabajo recogido en esta Memoria de tesis Doctoral se enmarca dentro del proyecto de investigación: «Aproximación multidisciplinar al incremento de la eficacia en la mejora del trigo duro: Integración de técnicas ecofisiológicas y moleculares» del programa Nacional de I+D+I de la CICYT (AGL2002-04285-C03-02), desarrollado por nuestro grupo de investigación desde los años 2003 a 2005. El objetivo general del proyecto consistía en estudiar y caracterizar en condiciones de campo, diversos procesos fisiológicos que ayudasen a incrementar la eficacia de la selección del trigo duro para ambiente mediterráneo, especialmente en lo relacionado con la formación y utilización de la capacidad potencial de almacenamiento de la planta de trigo, con la eficiencia en el uso de la radiación interceptada desde la antesis y con la acumulación de proteínas y aminoácidos en el grano. Una de las estrategias para llevar a cabo estos objetivos consiste en estudiar como estos caracteres se han modificado a lo largo del proceso de selección, usando una serie histórica de cultivares obtenidos en diferentes épocas antes y después de la introducción de genes de enanismo, tratando de relacionar la magnitud de la variación en caracteres ecofisiológicos con la ganancia genética obtenida en el rendimiento.

Dentro de este objetivo general, los objetivos específicos de esta Memoria de Tesis doctoral han consistido en:

1.- Analizar la formación del rendimiento mediante análisis por coeficientes de sendero en genotipos con y sin el gen de enanismo *Rht-B1b*, para averiguar los efectos que la reducción en la altura de la planta ha ejercido sobre la estrategia en la determinación del rendimiento, así como los posibles efectos indirectos inducidos por dichos genes durante la ontogenia de los componentes. Es de indicar que en la bibliografía consultada en las bases de datos del *ISI Web of Science* no se ha localizado ninguna referencia anterior que utilice el análisis por senderos para investigar el efecto de los genes *Rht* sobre la formación del rendimiento en trigo.

2.- Averiguar si la mejora genética durante el siglo XX ha modificado significativamente la duración de los distintos períodos del desarrollo del trigo y la formación y aborto de flores y granos. Aunque es conocido que la mejora genética ha acortado la duración del período vegetativo y alargado la fase de diferenciación floral, especialmente tras la introducción de los genes de enanismo, en la bibliografía consultada no se han encontrado referencias que analicen cuantitativamente la duración de los distintos períodos del desarrollo en relación con la formación de flores y granos en trigo duro.

3 y 4.- Investigar la influencia que la mejora genética tradicional y el cambio en la arquitectura de la planta causado por la reducción en altura, han ejercido sobre una serie de parámetros relacionados con la interceptación y eficiencia en el uso de la radiación fotosintéticamente activa durante la antesis. Precisamente uno de los objetivos de la mejora futura en trigo consiste en incrementar la eficiencia en el uso de la radiación alrededor de la antesis, con el propósito de disminuir el aborto de granos tras la fecundación y aumentar así el tamaño del sumidero y el rendimiento potencial del cultivo.

5.- Averiguar si la mejora genética a lo largo del siglo pasado ha modificado el patrón de acumulación de proteínas y aminoácidos durante el desarrollo del grano en dos ambientes con distintas condiciones ambientales durante la maduración (Lérida y Granada).

6.- Desarrollar y aplicar en nuestro laboratorio la técnica de análisis de microsatélites (SSRs) como marcador molecular para trabajos futuros en trigo duro. De hecho, esta técnica se va a aplicar en el proyecto de investigación «Nuevas vías para mejorar la adaptación del trigo duro, *Triticum turgidum* L. var. *durum*, a ambientes mediterráneos» concedido a nuestro grupo en el Programa Nacional de I+D, CICYT, (AGL2006-09226-C02-02/AGR) para el trienio 2007-2009.





**Dwarfing gene *Rht-B1b* affects the yield-formation strategy of durum wheat as revealed by path-coefficient analysis <sup>1</sup>**

Luis F. García del Moral <sup>a\*</sup>, Julio Isidro <sup>a</sup>, Fanny Álvaro<sup>b</sup>, Vanesa Martos <sup>a</sup>, Dolors Villegas<sup>b</sup> and Conxita Royo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Dpto. Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, 18071–Granada, Spain.

<sup>b</sup> IRTA, Cereal Breeding, Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain

\* Corresponding author; email: lfgm@ugr.es

<sup>1</sup> Primera revisión enviada a *Agronomy Journal* 21 de enero 2008.

*En página anterior:  
Ensayo de campo de la serie histórica  
en estadio cercano en antesis.  
Se observan diferencias en el desarrollo.*





## Dwarfing gene *Rht-B1b* affects the yield-formation strategy of durum wheat as revealed by path-coefficient analysis

### Abstract

This work assesses the influence that semi-dwarfing *Rht-B1b* allele exerts on yield formation in Mediterranean durum wheat by using an ontogenetic diagram based on path-coefficient analysis. Two sets of 12 Italian and Spanish durum wheat cultivars, classified as carrying or not carrying the *Rht-B1b* dwarfing gene according to its response to gibberellins, were tested in two contrasting environments of Spain for 6 years. Cultivars carrying the *Rht-B1b* dwarf allele (semi-dwarf) gave 25.7% higher grain yield, due mainly to a higher number of spikes  $\text{m}^{-2}$  (13.1%), kernels  $\text{spike}^{-1}$  (14.7%) and grain-filling duration (8.3%), whereas the effects of dwarfing gene *Rht-B1b* on the duration of the vegetative period and kernel weight were negative and non-significant. Path analysis revealed that in the absence of the semi-dwarfing *Rht-B1b* allele, grain yield depended primarily on the number of spikes  $\text{m}^{-2}$  (48.8%) followed by the number of kernels  $\text{spike}^{-1}$  (27.4%) and kernel weight (23.8%), whereas in the cultivars carrying the *Rht-B1b* allele the highest influence on grain yield was caused by the number of kernels  $\text{spike}^{-1}$  (40.1%), followed by the number of spikes  $\text{m}^{-2}$  (34.7%) and kernel weight (25.2%). In the set of cultivars without the *Rht-B1b* allele, the number of kernels  $\text{spike}^{-1}$  depended positively on the grain-filling period (51.0% of total variation), but in semi-dwarf cultivars both vegetative and grain-filling durations exerted a strong and negative influence (42.4 and 37.2%, respectively) on the number of kernels  $\text{spike}^{-1}$ . The study of the indirect effects revealed that the duration of the vegetative and grain-filling periods and the number of spikes  $\text{m}^{-2}$  are interrelated in complex ways, exerting important indirect effects that mask the true direct effect of these traits on the final number of kernels  $\text{spike}^{-1}$ .

## Introduction

The major factor that contributed to the success of the ‘Green Revolution’ after the 1960s was the introduction of high-yielding semi-dwarf cultivars of wheat and rice, in combination with the application of increased amounts of nitrogen fertilizer. In the majority of durum wheat cultivars dwarfness is controlled by one height-reducing allele, called *Rht-B1b* (formerly *Rht1*), introduced from the Japanese dwarf wheat cv. ‘Norin 10’ (Hedden, 2003), which encodes for a protein that reduces sensitivity to gibberelic acid (GA) required for stem elongation (Flintham et al., 1997). Currently, the response of seedlings to gibberellins is routinely used to test whether a variety contains or not GA insensitive *Rht* genes (Gale and Gregory, 1977).

The high-yield potential of semi-dwarf cultivars has been attributed to both improved lodging resistance and the consequent ability to respond to higher nitrogen applications without lodging, thus increasing harvest index and grain-yielding capacity in relation to tall cultivars (Flintham et al., 1997). The relative yield advantage of semi-dwarf cultivars, however, varies with spring or winter habit, genetic background, and environmental conditions (Butler et al., 2005). More than 50% of the grain yield in durum wheat is produced under arid and semiarid conditions in the Mediterranean basin, where semi-dwarf cultivars are widely grown although together with landraces or improved tall cultivars where drought is severe most years (Singh et al., 2001).

The development of semi-dwarf cultivars occurred with little understanding of the pleiotropic effects of *Rht* genes on traits other than plant height (Allan, 1989). According to Gale and Youssefian (1985) traits pleiotropic to, or closely related to, *Rht* alleles include, in addition to gibberelic acid insensitivity, cell size and number, root weight, coleoptile length, leaf size, grain yield, yield components, total biomass, harvest index, protein content, and disease susceptibility.

Although genetic background and environment may alter their expression, *Rht* alleles usually increase grain yield, kernels per spike, tiller number, and harvest index, while usually reducing single-kernel weight, plant biomass, coleoptile length, stand establishment potential, and protein content, in comparison to their non-semidwarf alleles (Gale and Youssefian, 1985; Youssefian et al., 1992b; Flintham et al., 1997). On the contrary, it seems that there are no consistent effects of *Rht* alleles on the duration of the different phases of wheat development (Youssefian et al., 1992a; Miralles et al., 1998).

The pleiotropic increase in the number of kernels per spike, frequently observed as a consequence of genetic reduction in plant height, has been associated with a greater number of kernels per spikelet (Youssefian et al., 1992b; Miralles et al., 1998; Royo et al., 2007; Álvaro et al., 2008a), rather than with more spikelets spike<sup>-1</sup>, as was postulated initially. In favourable environments, reduction in plant height seems to diminish competition between the developing ear and stem, giving a more favourable partitioning of assimilates to growing reproductive organs during preanthesis, thereby increasing floret fertility and hence giving more but smaller kernels per spike (Youssefian et al., 1992b; Miralles et al., 1998; Rebetzke and Richards, 2000; Álvaro et al., 2008a).

The relationship between grain yield and yield components in wheat has been investigated in many studies, mainly by means of correlation and regression methods. Although these are helpful in determining the principal trait influencing final grain yield, they provide incomplete information on the relative importance of the direct and indirect effects caused by pleiotropic interactions between traits during plant development. Path-coefficient analysis divides a correlation coefficient into direct and indirect effects (Garcia del Moral et al., 2003), thus permitting the separation of the direct influence of each variable from the indirect effects caused by pleiotropic relationships among them.

Although the literature is relatively abundant on the use of path-coefficient analysis to evaluate yield relationships in wheat, no information is available on applying such analysis to determine the effect of dwarfing *Rht-B1b* gene on yield components and grain-yield formation in durum wheat. Therefore, the objectives of our study were (i) to investigate the influence that dwarfing allele *Rht-B1b* exerts on strategy for grain-yield formation in durum wheat by using an ontogenetic diagram; and (ii) to evaluate the usefulness of path-coefficient analysis to elucidate the indirect effects that the presence of *Rht-B1b* induces on plant phenology and yield components during grain-yield formation.

## Materials and Methods

Twelve field experiments were conducted for six years (from 2000 to 2005) at two Spanish latitudes: the Ebro Valley in the north and eastern Andalusia in the south. These environments are two representative zones of durum wheat cultivation within the western Mediterranean region (Table 1). The southern environment has a Mediterranean climate, with mild winters and hot, dry summers, whereas the northern one has a more continental climate, with lower temperatures during winter and spring and less evenly distributed precipitation.

The plant material consisted of 12 Italian and 12 Spanish durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) cultivars selected to represent the germplasm grown in Italy and Spain before and after the use of *Rht-B1b* dwarfing gene derived from the ‘Green Revolution’. The presence of *Rht-B1b* dwarfing gene in the plant material was tested in 12 seedlings of each cultivar following the methodology described by Gale & Gregory (1977), and using a gibberellic acid concentration of 4 ppm. All the varieties released until 1945 as well as Adamello, Capeiti 8, Trinakria and Bidi 17 were sensitive to GA (Table 2), and so they are assumed not to carry the dwarfing gene *Rht-Bb1*. Data on pedigrees and phylogenetic relationships of the two sets of cultivars may be found in Martos et al. (2005).

Each experiment consisted of a randomized complete-block design with 3 replications and plots of 12 m<sup>2</sup> (8 rows 0.15 m apart). Sowing was between 17 November and 16 December in all cases. Plots were fertilized following the recommendations in each environment, to prevent lodging and diseases. The length of the vegetative period was measured as days from sowing to anthesis (growth stage 65 according to Zadoks et al., 1974). The grain-filling duration was considered to be the number of days from anthesis to physiological maturity (Zadoks growth stage 91). The number of spikes m<sup>-2</sup> was calculated by counting the spikes contained in 1 m of one of the central rows in each plot.

The number of kernels per spike was determined by counting kernels on every spike from a sub-sample of 10 plants selected from 1 m of row taken completely at random in each plot before harvest. Mean kernel weight was calculated by counting the number of grains in 10 grams drawn randomly from the mechanically harvested grains of each plot. Grain yield was determined on the basis of the harvested plot in all experiments and corrected to a 120 g kg<sup>-1</sup> moisture basis.

Combined ANOVA for grain yield and related traits were performed over experiments with the SAS-STAT statistical package (SAS Institute Inc., 2000). Means were compared by Duncan's test at  $P = 0.05$ . Year and block were considered as random factors and the other effects fixed.

Pearson correlation coefficients were computed from the mean values over years, blocks and environments for all the traits studied: (1) duration of vegetative period, (2) number of spikes  $m^{-2}$ , (3) duration of grain filling period, (4) number of kernels spike<sup>-1</sup>, (5) single-kernel weight, and (6) grain yield. Path-coefficient analysis was carried out to partition the correlation coefficient,  $r_{ij}$ , into direct and indirect effects. The following four sets of simultaneous equations were solved to determine the path coefficients,  $P_{ij}$  (with subscripts indicating the six traits):

$$\begin{aligned} r_{26} &= P_{26} + r_{24} P_{46} + r_{25} P_{56} \\ r_{46} &= r_{24} P_{26} + P_{46} + r_{45} P_{56} \\ r_{56} &= r_{25} P_{26} + r_{45} P_{46} + P_{56} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r_{25} &= P_{25} + r_{23} P_{35} + r_{24} P_{45} \\ r_{35} &= r_{23} P_{25} + P_{35} + r_{34} P_{45} \\ r_{45} &= r_{24} P_{25} + r_{34} P_{35} + P_{45} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r_{14} &= P_{14} + r_{12} P_{24} + r_{13} P_{34} \\ r_{24} &= r_{12} P_{14} + P_{24} + r_{23} P_{34} \\ r_{34} &= r_{13} P_{14} + r_{23} P_{24} + P_{34} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r_{13} &= P_{13} + r_{12} P_{23} \\ r_{23} &= r_{12} P_{13} + P_{23} \end{aligned}$$

In the equation  $r_{13} = P_{13} + r_{12} P_{23}$ ,  $P_{13}$  is the direct effect of trait 1 on 3 (the path coefficient), while  $r_{12} P_{23}$  is the indirect effect of trait 1 on 3 via 2. Similar definitions apply to the other equations. The causal system assumed (as described in Garcia del Moral et al., 2003) was based on the ontogeny of the wheat plant and it is shown in Figure 1.

Table 1. Agronomic details, climatic conditions, and soil characteristics of the 12 experiments carried out at two Mediterranean environments (North and South) of Spain.

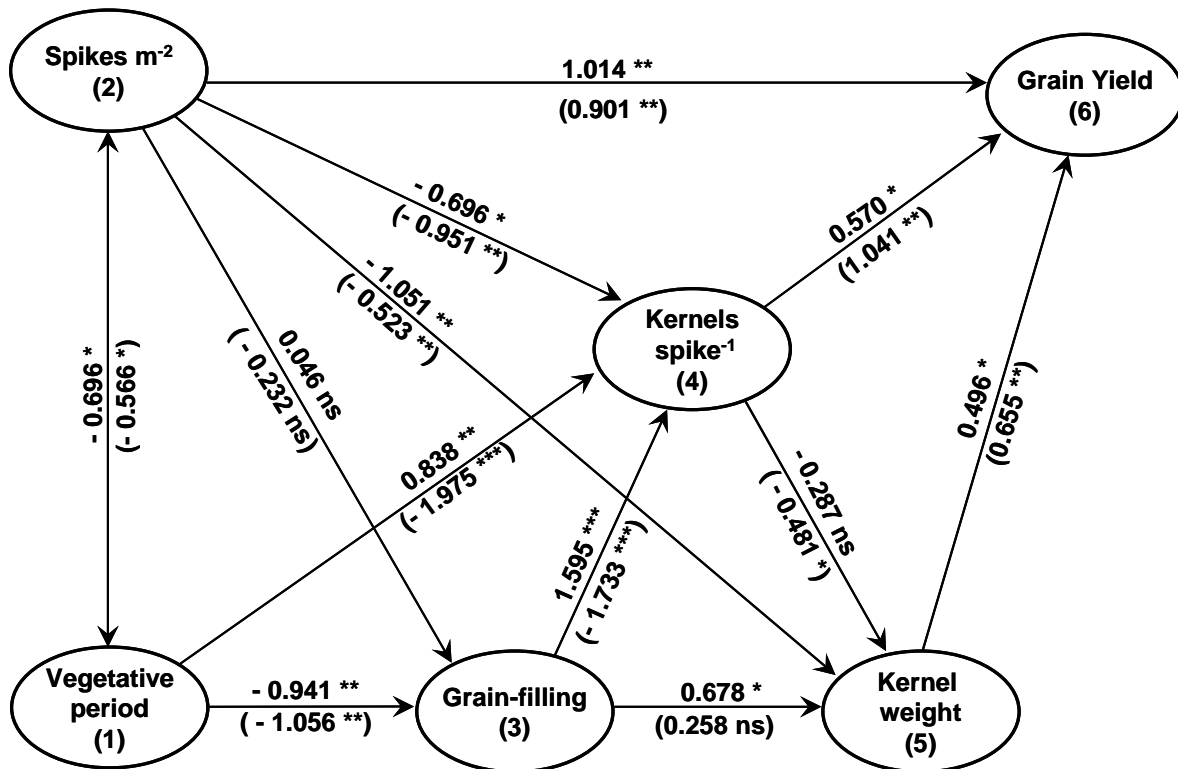
Site	North-Lleida	South-Granada
Coordinates	41°40'N, 0°20'E	37°08'N, 3°49'W
Altitude, m	200	684
Soil characteristics		
Classification	Mesic Calcixerolic Xerochrept	Loamy Calcixerolic Xerochrept
Texture	Fine-loamy	Silty-clay
<i>Long-term weather data (1989-2001)</i>		
Seasonal rainfall, mm	321	276
<i>Average temperatures during growth cycle, °C</i>		
Tmax	16.3	19.7
Tmean	10.6	12.9
Tmin	5.2	5.9
Irrigation, mm	150	40 <sup>a</sup> ,40 <sup>b</sup> ,120 <sup>c</sup>

Table 2. Description of the 24 Italian and Spanish durum wheat cultivars used in the study.

<i>Rht-B1b</i> allele	Variety	Year of release	Country of release	Plant height (cm)	Harvest index (%)
Absent	Balilla Falso	<1930	Italy	110.3	31.2
	Razza 208	<1930	Italy	110.9	28.8
	Blanco Verdeal	<1930	Spain	127.4	21.3
	Clarofino	<1930	Spain	126.7	26.7
	Pinet	<1930	Spain	119.5	24.3
	Rubio de Belalcázar	<1930	Spain	128.9	25.4
	Senatore Cappelli	1930	Italy	121.1	25.2
	Carlojucci	1945	Italy	106.1	30.7
	Bidi17	1950	Spain	99.7	28.1
	Capeiti 8	1955	Italy	92.1	38.5
	Trinakria	1970	Italy	98.4	34.3
	Adamello	1985	Italy	70.5	38.1
	<i>Mean</i>			<i>109.3</i>	<i>29.4</i>
	Present	Creso	1974	Italy	70.0
Camacho		1975	Spain	77.7	35.1
Esquilache		1976	Spain	69.7	39.2
Mexa		1980	Spain	77.8	39.3
Simeto		1988	Italy	74.3	41.8
Cirillo		1992	Italy	77.3	37.3
Flavio		1992	Italy	61.1	37.8
Zenit		1992	Italy	71.0	40.1
Ariesol		1992	Spain	72.5	40.3
Senadur		1995	Spain	76.1	41.8
Astigi		1999	Spain	78.9	40.5
Boabdil		2000	Spain	73.6	39.3
<i>Mean</i>				<i>73.3</i>	<i>39.1</i>



Figure 1. Path coefficients diagram showing the interrelationships between the duration of the vegetative and grain-filling periods and yield components during the ontogeny of yield formation in the set of durum wheat cultivars without (naked values) or with the *Rht-B1b* allele (values between brackets). The single-headed arrows indicate path coefficients and the double-headed arrows indicate simple correlation coefficients.



## Results

In this study, the 24 cultivars released over the 20th century were clustered in two groups, those carrying or those not carrying the *Rht-B1b* allele, on the basis of their reaction to gibberellins, instead of attending their reduced height, the trait considered to be the primary effect of Rht alleles.

Analyses of variance for grain yield, yield components, and the duration of the vegetative and grain filling periods revealed that these traits were affected mainly by the environment and by the presence/absence of *Rht-B1b* allele. Environment significantly affected grain yield, spikes m<sup>-2</sup>, and single-kernel weight, but it had no significant effect on kernels spike<sup>-1</sup> nor vegetative period or grain-filling duration (data not shown). The influence of *Rht-B1b* allele was significant for grain yield, spikes m<sup>-2</sup>, kernels spike<sup>-1</sup>, duration of vegetative and grain filling periods, but it was not significant for single-

kernel weight. Among interaction effects, year  $\times$  environment was significant for all traits, as expected, particularly for the duration of the vegetative period. On the contrary, year  $\times$  *Rht-B1b* and environment  $\times$  *Rht-B1b* interactions, were not significant for any trait and none of them accounted for more than 1% of the observed variation. The year  $\times$  environment  $\times$  *Rht-B1b* interaction was significant for all traits, particularly for grain yield.

The effects of the environment and the presence/absence of *Rht-B1b* allele on grain yield and related traits are displayed in Table 3. On average, grain yield doubled in the cooler vs. the warmer environment as consequence of more spikes  $\text{m}^{-2}$  (89 %), heavier kernels (22%), and a longer grain-filling period (14%). Kernels  $\text{spike}^{-1}$  suffered a non-significant reduction of only 11% in the warmer and drier environments, whereas duration of vegetative period this was a stable trait, with only a 3.8% variation between environments (Table 3).

Cultivars carrying the *Rht-B1b* dwarf allele outyielded the other cultivars by 25.7%, mainly due to a greater number of spikes  $\text{m}^{-2}$  (13.1%), kernels  $\text{spike}^{-1}$  (14.7%) and grain filling duration (8.3%) (Table 3). *Rht-B1b* slightly reduced the duration of the vegetative period (3.7 days), but it did not significantly affect kernel weight.

### *Correlation Analyses*

Correlation analyses for cultivars carrying or not carrying the *Rht-B1b* allele pooled by year and environment are shown in Table 4. In the set of cultivars without the *Rht-B1b* allele, grain yield appears significantly and positively related to spikes  $\text{m}^{-2}$  and grain-filling period duration, and negatively related to the duration of vegetative period (Table 4). In turn, spikes  $\text{m}^{-2}$  shows a significant relationship with grain-filling duration but a negative relationship with the duration of the vegetative period, whereas these two last traits appeared strongly and negatively correlated (Table 4). The rest of the correlations were not significant. In the set of cultivars carrying the *Rht-B1b* allele, none of the correlation coefficients were significant, with the exception of the strong negative relationship between the duration of vegetative and grain-filling periods (Table 4). The lack of significance between the traits studied was, in a great part, due to the presence of strong indirect relationships caused by *Rht-B1b* on the traits studied throughout the plant ontogeny, as shown by the path-coefficient analysis presented below.

Table 3. Means for grain yield, its components, and duration of vegetative and grain-filling periods for two sets of durum wheat cultivars with or without the dwarfing gene *Rht-B1* grown for six years in two Mediterranean environments.

	Grain yield (kg ha <sup>-1</sup> )	Duration of vegetative period (days)	Spikes m <sup>-2</sup>	Kernels spike <sup>-1</sup>	Kernel weight (mg)	Duration of grain filling period (days)
<i>Environment</i>						
North (cooler and humid)	5296 <sup>a</sup>	157.1 <sup>a</sup>	400.2 <sup>a</sup>	34.7 <sup>a</sup>	48.8 <sup>a</sup>	35.9 <sup>a</sup>
South (warmer and drier)	2634 <sup>b</sup>	151.2 <sup>a</sup>	212.2 <sup>b</sup>	30.9 <sup>a</sup>	40.0 <sup>b</sup>	31.5 <sup>a</sup>
<i>Difference (south vs north, %)</i>	-50.3	-3.8	-47.0	-11.0	-18.0	-12.3
<i>Cultivar</i>						
Without <i>Rht-B1</i> gene	3512 <sup>b</sup>	156.3 <sup>a</sup>	287.0 <sup>b</sup>	30.5 <sup>b</sup>	45.0 <sup>a</sup>	32.4 <sup>b</sup>
With <i>Rht-Bb1</i> gene	4414 <sup>a</sup>	152.0 <sup>b</sup>	324.6 <sup>a</sup>	35.0 <sup>a</sup>	43.7 <sup>a</sup>	35.1 <sup>a</sup>
<i>Difference (with vs without, %)</i>	+25.7	-2.8	+13.1	+14.7	-2.9	+8.3

<sup>a-b</sup> Means followed by the same letter in a column within the same group do not differ at the 0.05 probability level according to multiple Duncan test.

*Table 4.* Pearson correlation coefficients among the traits studied for two sets of durum wheat cultivars with or without the dwarfing gene *Rht-B1* grown for six years in two Mediterranean environments.

	Spikes m <sup>-2</sup>	Kernels spike <sup>-1</sup>	Kernel weight	Duration of vegetative period	Duration of grain filling period
<b>Without <i>Rht-B1</i> gene, n=12</b>					
Kernels spike <sup>-1</sup>	-0.161				
Kernel weight	-0.530	0.081			
Duration of vegetative period	-0.696*	-0.229	0.018		
Duration of grain filling period	0.701*	0.292	-0.142	-0.973***	
Grain yield	0.660*	0.447	0.005	-0.885***	0.873***
<b>With <i>Rht-B1</i> gene, n=12</b>					
Kernels spike <sup>-1</sup>	-0.467				
Kernel weight	-0.204	-0.303			
Duration of vegetative period	-0.566	0.166	-0.102		
Duration of grain filling period	0.366	-0.256	0.189	-0.924***	
Grain yield	0.281	0.422	0.156	-0.232	0.019

\*, \*\*, \*\*\* significant at 0.05, 0.01, and 0.001 probability level, respectively.

#### *Path-Coefficient Analysis*

Path-coefficient analysis was performed to gain further information on the interrelationships among traits and their indirect effects on grain-yield formation. For this purpose, a cause-effect system (as shown in Fig. 1) was constructed based on the ontogeny of the durum wheat plant (García del Moral et al., 2003). Hence, the number of spikes m<sup>-2</sup> and the length of vegetative period are shown to have a mutual relationship (double-headed arrow), because both traits could have a reciprocal influence at early stages of wheat growth. The duration of the vegetative period was

believed to affect both kernels spike<sup>-1</sup> and the duration of grain-filling period. Tiller production is known to be the first developmental process in cereals and thus may exert a direct influence on all other traits that develop later. The duration of the grain-filling period could alter the number of kernels spike<sup>-1</sup> by reducing the abortion rate of pollinated florets after anthesis (García del Moral et al., 2003).

In the absence of the semi-dwarfing *Rht-B1b* allele, grain yield depended mainly on the number of spikes m<sup>-2</sup> followed (with approximately the same importance) by the number of kernels spike<sup>-1</sup> and single-kernel weight (Fig. 1). Given that path coefficients are expressed by unit of standard deviation, the magnitude of each direct effect measures the percentage of influence of yield component on grain yield. Thus, the spikes m<sup>-2</sup> explain the 48.8% of variation in grain yield, whereas kernels spike<sup>-1</sup> and single-kernel weight account for 27.4 and 23.8 % of grain yield variation, respectively. In the set of cultivars carrying the *Rht-B1b* allele (Fig. 1), however, the highest influence on grain yield was caused by the number of kernels spike<sup>-1</sup> (40.1%), followed by the number of spikes m<sup>-2</sup> (34.7%) and mean kernel weight (25.2%). The analysis of direct and indirect effects reveals that the presence of the *Rht-B1b* allele causes two strong and negative indirect effects of the number spikes m<sup>-2</sup> on grain yield via indirect modifications in the number of kernels spike<sup>-1</sup> as well as of the kernels spike<sup>-1</sup> via number of spikes m<sup>-2</sup> (Table 5). Actually, these negative effects appear to be responsible for the low correlation coefficients found between the numbers of spikes m<sup>-2</sup> or kernels spike<sup>-1</sup> and grain yield in the correlation study conducted in the set of cultivars carrying the semi-dwarfing gene (Table 4).

In both sets of cultivars single-kernel weight appeared to be positively influenced by grain-filling duration and negatively by the number of spikes m<sup>-2</sup> and kernels spike<sup>-1</sup> (Fig. 1), the magnitude of these effects being influenced by the presence or absence of the *Rht-B1b* allele. The analysis of the indirect effects (Table 6) revealed only two important indirect effects in the set of cultivars without the dwarfing gene, being caused via the reciprocal interaction between the number of spikes m<sup>-2</sup> and grain-filling duration. Indirect effects on single-kernel weight in the set of cultivars carrying the *Rht-B1b* allele were of less magnitude (Table 6).

Table 5. Path coefficient analysis of grain yield in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene *Rht-B1b* grown during six years in two Mediterranean environments.

Pathway	Without <i>Rht-B1b</i> gene	With <i>Rht-B1b</i> gene
Spikes m <sup>-2</sup> vs grain yield		
Direct effect, P <sub>26</sub>	1.014**	0.901**
Indirect effect <i>via</i>		
Kernels spike <sup>-1</sup> , r <sub>24</sub> P <sub>46</sub>	-0.091	-0.486
kernel weight, r <sub>25</sub> P <sub>56</sub>	-0.263	-0.134
correlation, r <sub>26</sub>	0.660**	0.281
Kernels spike <sup>-1</sup> vs grain yield		
Direct effect, P <sub>46</sub>	0.570*	1.041**
Indirect effect <i>via</i>		
Spike m <sup>-2</sup> , r <sub>24</sub> P <sub>26</sub>	-0.163	-0.421
kernel weight, r <sub>45</sub> P <sub>56</sub>	0.040	-0.198
correlation, r <sub>46</sub>	0.447	0.422
Kernel weight vs grain yield		
Direct effect, P <sub>56</sub>	0.496*	0.655*
Indirect effect <i>via</i>		
Spike m <sup>-2</sup> , r <sub>25</sub> P <sub>26</sub>	-0.537	-0.184
Kernel spike <sup>-1</sup> , r <sub>45</sub> P <sub>46</sub>	0.046	-0.315
correlation, r <sub>56</sub>	0.005	0.156
Residual, U	0.272	0.454

Table 6. Path coefficient analysis of kernel weight in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene *Rht-B1* grown during six years in two Mediterranean environments.

Pathway	Without <i>Rht-B1b</i> gene	With <i>Rht-B1b</i> gene
Spikes m <sup>-2</sup> vs kernel weight		
Direct effect, P <sub>25</sub>	-1.051**	-0.523*
Indirect effect <i>via</i>		
grain filling period, r <sub>23</sub> P <sub>35</sub>	0.475	0.094
Kernels spike <sup>-1</sup> , r <sub>24</sub> P <sub>45</sub>	0.046	0.225
Correlation, r <sub>25</sub>	-0.530	-0.204
Grain filling period vs kernel weight		
Direct effect, P <sub>35</sub>	0.678*	0.258
Indirect effect <i>via</i>		
spikes m <sup>-2</sup> , r <sub>23</sub> P <sub>45</sub>	-0.736	-0.192
Kernels spike <sup>-1</sup> , r <sub>34</sub> P <sub>45</sub>	-0.084	0.123
correlation, r <sub>35</sub>	-0.142	0.189
Kernel spike <sup>-1</sup> vs kernel weight		
Direct effect, P <sub>45</sub>	-0.287	-0.481*
Indirect effect <i>via</i>		
spikes m <sup>-2</sup> , r <sub>24</sub> P <sub>25</sub>	0.170	0.244
grain filling period, r <sub>34</sub> P <sub>35</sub>	0.198	-0.066
correlation, r <sub>45</sub>	0.081	-0.303
Residual, U		
	0.750	0.836

In the set of cultivars without the *Rht-B1b* allele, the number of kernels spike<sup>-1</sup> (Fig. 1) depended mainly of the grain-filling period (51.0% of total variation), followed by the duration of vegetative period (26.8%), whereas the direct effect of the number spikes m<sup>-2</sup> on kernels spike<sup>-1</sup> was negative and slightly lower (22.2%). On the contrary, when the *Rht-B1b* allele was present (Fig. 1), both vegetative and grain-filling durations

exerted a strong, negative influence (42.4 and 37.2%, respectively) on the number of kernels spike<sup>-1</sup>. Again the influence of spikes m<sup>-2</sup> was negative (Fig. 1) and of lesser magnitude (20.4%). The study of the direct and indirect effects (Table 7) revealed that the length of the vegetative period, grain-filling duration, and spikes m<sup>-2</sup> are inter-related in complex ways, exerting strong indirect effects that mask the true direct effect of each trait on kernels spike<sup>-1</sup>, thus diminishing the magnitude of the corresponding correlation coefficients between them (Table 4). In absence of the *Rht-B1b* allele, the duration of vegetative period exerted an important and negative indirect effect on kernels spike<sup>-1</sup> by changing the duration of grain filling, whereas when the dwarfing gene was present, the same indirect effect was again high but positive (Table 7). Reciprocally, the same indirect influences were found for the grain-filling period via the duration of the vegetative period (Table 7). Moreover, the indirect effects caused by the number of spikes m<sup>-2</sup> via the vegetative period or grain-filling duration proved negative or positive depending on the presence or absence of the dwarfing *Rht-B1b* allele, respectively (Table 7).

In both sets of cultivars, the grain-filling duration was directly and negatively influenced by the vegetative period (Fig. 1), confirming in this case the results found in the correlation study (Table 4). The examination of indirect effects (Table 8) revealed that in both sets of cultivars, the number of spikes m<sup>-2</sup> exerted a strong, positive effect on grain-filling duration via changes in the length of the vegetative period.

## Discussion

### *Environmental effects*

The results of the present study show that the lower temperatures and greater water availability under the northern conditions both during vegetative and grain-filling periods, encouraged the development of a greater number of spikes m<sup>-2</sup> and heavier kernels, leading to a superior yield than under the warmer and drier conditions of the south. Several studies have shown that tiller production in cereals is associated with air temperature during the tillering phase (Simons, 1982; Garcia del Moral and Garcia del Moral, 1995; Moragues et al., 2006).



Table 7. Path coefficient analysis of kernels per spike in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene *Rht-B1* grown during six years in two Mediterranean environments.

Pathway	Without <i>Rht-B1b</i> gene	With <i>Rht-B1b</i> gene
Vegetative period vs kernels spike <sup>-1</sup>		
Direct effect, P <sub>14</sub>	0.838**	-1.975***
Indirect effect <i>via</i>		
spikes m <sup>-2</sup> , r <sub>12</sub> P <sub>24</sub>	0.485	0.538
grain filling period, r <sub>13</sub> P <sub>34</sub>	-1.552	1.603
correlation, r <sub>14</sub>	-0.229	0.166
Spikes m <sup>-2</sup> vs kernels spike <sup>-1</sup>		
Direct effect, P <sub>24</sub>	-0.696*	-0.951**
Indirect effect <i>via</i>		
Vegetative period, r <sub>12</sub> P <sub>14</sub>	-0.583	1.118
Grain filling period, r <sub>23</sub> P <sub>34</sub>	1.118	-0.634
correlation, r <sub>24</sub>	-0.161	-0.467
Grain filling period vs kernels spike <sup>-1</sup>		
Direct effect, P <sub>34</sub>	1.595***	-1.733***
Indirect effect <i>via</i>		
Vegetative period, r <sub>13</sub> P <sub>14</sub>	-0.815	1.826
Spikes m <sup>-2</sup> , r <sub>23</sub> P <sub>24</sub>	-0.488	-0.348
correlation, r <sub>34</sub>	0.292	-0.256
Residual, U	0.784	0.663

Table 8. Path coefficient analysis of grain filling period in two sets of durum wheat cultivars with or without dwarfing gene *Rht-B1* grown during six years in two Mediterranean environments.

	Without <i>Rht-B1b</i> gene	With <i>Rht-B1b</i> gene
Pathway		
Vegetative period vs grain filling period		
Direct effect, $P_{13}$	-0.941**	-1.056**
Indirect effect <i>via</i>		
spikes $m^{-2}$ , $r_{12}P_{23}$	-0.032	0.132
correlation, $r_{13}$	-0.973***	-0.924***
Spikes $m^{-2}$ vs grain filling period		
Direct effect, $P_{23}$	0.046	-0.232
Indirect effect <i>via</i>		
Vegetative period, $r_{12}P_{13}$	0.655	0.598
correlation, $r_{23}$	0.701*	0.366
Residual, U	0.229	0.33

That is, low temperatures stimulate tiller production presumably by slowing the growth of leaves, tillers, and inflorescences, thereby reducing competition for a limited supply of resources (mainly nitrogen, carbohydrates and water) and permitting the development of a larger number of tiller buds, as occurred under the northern conditions in our experiments. Similarly, the lower mean temperatures and higher water availability during grain growth in the north (17°C and 82 ml against 25.6°C and 30 ml in the south) lengthened the duration of grain filling, augmenting grain weight. These results agree with previous findings under similar conditions (Simane et al., 1993; Garcia del Moral et al., 2003, 2005) which show that variations in grain yield between moisture and temperature regimes under Mediterranean conditions were associated predominantly with variations in spikes  $m^{-2}$  and mean kernel weight. In the present study, the number of kernels spike<sup>-1</sup>, however, was not significantly altered by the different temperature and moisture regimes between environments, although under the

warmer and drier conditions of the south, the number of kernels spike<sup>-1</sup> was 11% lower, probably reflecting the higher drought and temperatures around anthesis under south conditions, which tends to reduce grain set (Shpiler and Blum, 1991; Giunta et al., 1993; Garcia del Moral et al., 2005), particularly in the most distal spikelets within the spike (Álvaro et al., 2008a).

#### *Direct and indirect effects on yield formation*

As established by genetic studies, the main, direct effect of the *Rht-B1b* allele has been on the stem-elongation rate and final plant height, whereas the other effects on yield, duration of developmental periods, and yield components proved to be indirect (pleiotropic). In general, it is well established that semi-dwarf wheats carrying *Rht-B1b* allele have high spikelet fertility with more but smaller kernels per spike and per m<sup>2</sup> (Gale and Youssefian, 1985; Youssefian et al., 1992a,b; Flintham et al., 1997; Álvaro et al., 2008a). This higher floral fertility seems to derive from increased partitioning of assimilates to the developing spike as a consequence of reduced demand for stem elongation (Álvaro et al., 2008 b,c). This could reduce pre-anthesis abortion of distal florets in each spikelet and boost the total number of viable florets at anthesis (Youssefian et al. 1992a, b; Miralles et al., 1998; Álvaro et al., 2008a). Similarly, reduced stem growth could leave more assimilates for developing tillers, favouring tiller survival and thus giving a higher number of spikes per m<sup>2</sup>, as found in the present study and elsewhere (Allan, 1989; Fischer and Stockman, 1986).

In the present study, path analysis revealed that in absence of the *Rht-B1b* allele, grain yield was dependent mainly on variations in spikes m<sup>-2</sup>, whereas in the semi-dwarf cultivars the highest influence on grain yield was caused by the number of kernels per spike. In both sets of cultivars, with or without the *Rht-B1b* allele, spikes m<sup>-2</sup> exerted strongly negative, direct influences on kernel spike<sup>-1</sup> and single-kernel weight, confirming the compensation effects between yield components during the ontogeny of grain yields found in other studies under Mediterranean conditions (Garcia del Moral et al., 2003, 2005).

In the cultivars without the *Rht-B1b* allele, kernels spike<sup>-1</sup> were directly and positively influenced by the duration of both vegetative and grain-filling periods, whereas in the cultivars carrying the semi-dwarf allele these direct relationships proved

strongly negative. These results imply that the higher number of kernels spike<sup>-1</sup> found in this and other studies for semi-dwarf durum wheats under Mediterranean conditions were due to the shortening in some developmental phases of the spike and therefore reducing the total period from sowing to anthesis. Our results agree with the negative genetic correlation reported for semi-dwarf durum wheats between yield and the number of days from sowing to anthesis (Royo et al., 2008). Several studies (Brooking and Kirby, 1981; Kirby, 1988; Miralles et al., 1998; Álvaro et al., 2008a) have found that the greater number of kernels per spike at anthesis in semi-dwarf wheat cultivars in comparison with tall cultivars, was due principally to lower abortion of florets between the flag leaf appearance and anthesis, the period when competition for assimilates between spikes and internodes is presumed to be greatest.

In the experiments presented here, in both set of cultivars, single-kernel weight appears to have been positively influenced by grain-filling duration and negatively by the number of spikes m<sup>-2</sup> and kernels spike<sup>-1</sup>, although the magnitude of these influences varies with the presence or absence of the *Rht-B1b* allele. One of the best documented effects of dwarfing genes is the reduction in the size of the individual kernels as the number of kernels per spike increases (Gale and Youssefian, 1985; Flintham et al., 1997; Royo et al., 2007).

This negative correlation has been explained well as due to increased competition among a higher number of growing kernels for a limited source of assimilates during the grain-filling period or (alternatively but not excluding) due to a higher proportion of kernels of lower potential size situated in distal positions within the spike and in secondary tiller spikes (Acreche and Slafer, 2006; Miralles and Slafer, 2007; Álvaro et al., 2008a).

Given that in the present study, single-kernel weight appears negatively related to the number of kernels spike<sup>-1</sup> independently of the indirect increase in kernel number caused by dwarfing genes, the conclusion is that under Mediterranean conditions, decreases in single-kernel weight appears to be caused largely by the increased competition between kernel growth.

## *Path Analysis vs. Correlation Analysis*

It bears noting that when the effects of the presence of the *Rht-B1b* allele on the associations between the different traits were studied, path analyses gave a different picture than did simple correlations. Thus, correlation coefficients provide the misleading impression that the number of spikes  $\text{m}^{-2}$  or kernels  $\text{spike}^{-1}$  did not significantly affect grain yield in the set of cultivars carrying the *Rht-B1b* allele, whereas path analysis showed a very high dependency of variations in grain yield on these two yield components. Moreover, path analysis reveals a high and significant negative influence of both vegetative and grain-filling period durations on kernels  $\text{spike}^{-1}$ , relationships that were not evident in the correlation analysis. In addition, the comparison of the indirect effects between the two sets of cultivars allowed us to identify and quantify the magnitude of several strong indirect influences of different sign in each set of cultivars between vegetative and grain-filling periods in determining kernels  $\text{spike}^{-1}$ , effects that could not be detected in the simple correlation analysis.

## **Conclusions**

From the results presented here it can be concluded that whereas in absence of the *Rht-B1b* allele, grain yield depended mainly on variations in the number of spikes  $\text{m}^{-2}$ , in those cultivars carrying the *Rht-B1b* allele the highest influence on grain yield was caused by an increase in the number of kernels  $\text{spike}^{-1}$ , probably due to a reduction in the duration of some phases of spike development, as revealed by the path analysis. In addition, path analysis appears to be useful not only for investigating the direct influences between traits in determining yield formation, but also for quantifying the magnitude of the indirect effects that the presence of *Rht-B1b* allele determines on yield components and other traits related with yield.

## **Acknowledgements**

The authors acknowledge Dr. J. Marinetto (CIFA) and F. Martínez (Empresa Pública DAP de Andalucía) for management of field trials at Granada, and Drs. L.F. Roca, Y. Rharrabti, A. Ramdani and the staff of Cereal Breeding of IRTA for their skilled technical assistance.

## References

- Acreche, M.M. and G.A. Slafer. 2006. Grain weight response to increases in number of grains in wheat in a Mediterranean area. *Field Crops Res.* 98, 52–59.
- Allan, R.E. 1989. Agronomic comparisons between Rht1 and Rht2 semidwarf genes in winter wheat. *Crop Sci.* 29, 1103-1108.
- Álvaro, F., J. Isidro, D. Villegas, L.F. García del Moral and C. Royo. 2008a. Old and modern durum wheat varieties from Italy and Spain differ in main spike components. *Field Crops Res.* 106, 86-93.
- Álvaro, F., J. Isidro, D. Villegas, L.F. García del Moral and C. Royo. 2008b. Breeding effect on grain filling, biomass partitioning and remobilization in Mediterranean durum wheat. *Agron. J.* 100,361-370.
- Álvaro, F.; C. Royo, L.F. García del Moral and D. Villegas. 2008c. Grain filling and dry matter translocation responses to source-sink modifications in a historical series of durum wheat. *Crop Sci.* 106, 86-93.
- Brooking, I.R. and E.J.M. Kirby. 1981. Interrelationship between stem and ear development in winter wheat. The effects of a Norin 10 dwarfing gene, Gai/Rht2. *J. Agric. Sci.* 97, 373-381.
- Butler, J.D., P.F. Byrne, V. Mohammadi, P.L.Chapman and S.D. Haley. 2005. Agronomic performance of Rht alleles in a spring wheat population across a range of moisture levels. *Crop Sci.* 45, 939-947.
- Fischer, R. A. and Y.M. Stockman. 1986. Increased kernel number in Norin 10-derived dwarf wheat, evaluation of the cause. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 767-784.
- Flintham, J.F., A. Börner, A.J. Worland, and M.D. Gale. 1997. Optimizing wheat grain yield, Effects of Rht (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J. Agric. Sci.*, 128, 11-25.
- Gale, M.D. and R.S. Gregory. 1977. A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica* 26, 733–738.
- Gale, M.D. and S. Youssefian. 1985. Dwarfing genes of wheat. In G.E Russell (ed). *Progress in Plant Breeding, Butterworth, London.* p. 1-35.
- García del Moral, M.B. and L.F. García del Moral. 1995. Tiller production and survival in relation to grain yield in spring and winter barley. *Field Crops Res.* 44, 85-93.

- García del Moral, L.F., Y. Rharrabti, D. Villegas and C. Royo. 2003. Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions, An ontogenic approach. *Agron. J.* 95, 266-274.
- García del Moral, L.F., Y. Rharrabti, S. Elhani, V. Martos and C. Royo. 2005. Yield Formation in Mediterranean durum wheats under two contrasting water regimes based on path-coefficient analysis. *Euphytica* 146, 213-222.
- Giunta, F., R. Motzo and M. Deidda. 1993. Effect of drought on yield and yield components of durum wheat and triticale in a Mediterranean environment. *Field Crops Res.* 33,399–409.
- Hedden, P. 2003. The genes of the Green Revolution. *Trends Gen.* 19, 5-9.
- Kirby, E.J.M., 1988. Analyses of leaf stem and ear growth in wheat from terminal spikelet stage at anthesis. *Field Crops Res.* 18, 127-140.
- Martos, V., C. Royo, Y. Rharrabti and L.F. García del Moral. 2005. Using AFLPs to determine phylogenetic relationships and genetic erosion in durum wheat cultivars released in Italy and Spain throughout the 20th century. *Field Crops Res.* 91, 107-116.
- Miralles, D.J. and G.A. Slafer. 2007. Sink limitations to yield in wheat, how could it be reduced?. *J. Agric. Sci.* 145, 139-149.
- Miralles, D.J., S.D. Katz, A. Colloca and G.A. Slafer. 1998. Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height. *Field Crops Res.* 59, 21-30.
- Moragues, M., L.F. García del Moral, M. Moraleja and C. Royo. 2006. Yield formation strategies of durum wheat landraces with distinct pattern of dispersal within the Mediterranean basin, II. Biomass production and allocation. *Field Crops Res.* 95, 182-193.
- Rebetzke, G.J. and R.A. Richards. 2000. Gibberelic acid-sensitive dwarfing genes reduced plant height to increase kernel number and grain yield of wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 51, 235-245.
- Royo, C., F. Álvaro, V. Martos, A. Ramdani, J. Isidro, D. Villegas and L.F. García del Moral. 2007. Genetic changes in durum wheat yield components and associates traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica* 155, 259-270.
- Royo, C., V. Martos, A. Ramdani, D. Villegas, Y. Rharrabti and L.F. García del Moral. 2008. Changes in yield and carbon isotope discrimination of Italian and Spanish durum wheat during the 20th century. *Agron. J.* 100,352-360.

- SAS Institute Inc., 2000. SAS/STAT Software, Changes and Enhancements through Release 6.12. Cary, NC.
- Shpiler, L. and A. Blum. 1991. Heat tolerance to yield and its components in different wheat cultivars. *Euphytica* 51, 257–263.
- Simane, B., P.C. Struik, M.M. Nachit, and J.M. Peacock. 1993. Ontogenic analysis of field components and yield stability of durum wheat in water-limited environments. *Euphytica* 71, 211–219.
- Simons R. G. 1982. Tiller and ear production of winter wheat. *Field Crop Abst.* 35, 857-870.
- Singh, R.P., J. Huerta-Espino, S. Rajaram, J. Crossa. 2001. Grain yield and other traits of tall and dwarf isolines of modern bread and durum wheat. *Euphytica* 119, 241-244.
- Youssefian, S., E.J.M. Kirby and M.D. Gale. 1992a. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 1. Effects on development of the ear, stem and leaves. *Field Crops Res.* 28, 171-190.
- Youssefian, S., E.J.M. Kirby and M.D. Gale. 1992b. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth, *Field Crops Res.* 28, 191-210.
- Zadoks, J.C., T.T. Chang, and C.F. Konzak. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14,415–421.





**Changes in apical development of durum wheat caused  
by breeding during the 20th century: Analysis by  
phases and its implications for yield formation<sup>1</sup>**

Julio Isidro<sup>1</sup>, Fanny Álvaro<sup>2</sup>, Conxita Royo<sup>2</sup>, Dolors Villegas<sup>2</sup>, Daniel J. Miralles<sup>3</sup> and  
Luis F. García del Moral<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología,  
Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.

<sup>2</sup>IRTA, Cereal Breeding, Centre UdL-IRTA. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain.

<sup>3</sup>Cátedra de Cerealicultura, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires,  
Avda. San Martín 4453 (C 1417 DSE), Buenos Aires, Argentina.

\* Corresponding author; email: lfgm@ugr.es

<sup>1</sup> Primera revisión enviada a *Annal of Botany*. 1 Mayo 2008

*Página anterior:*

*Ápice de trigo en estadio de espiguilla terminal.*

*Arriba: Ovarios en distintos estadios.*



## Changes in apical development of durum wheat caused by breeding during the 20th century: Analysis by phases and its implications for yield formation

### Abstract

• **Background and Aims** Although the apical development of wheat has been amply described, studies analysing how genetic breeding over the 20th century influenced the developmental phases and evaluating the consequences for yield generation are lacking, especially for durum wheat under field conditions in Mediterranean environments. To study the effect of breeding during the last century in apical development and ascertain whether the duration of the developmental phases between sowing and maturity have been changed.

• **Methods** Eight field experiments were carried out during 4 years in two contrasting Spanish latitudes (warm and cool). Plant material consisted on 24 durum wheat cultivars grown throughout the 20th century in Spain and Italy.

• **Key Results** Breeding during the last century reduced the duration of the period from sowing to anthesis (S-ANT) and from sowing to terminal spikelet formation, whereas it enlarged the duration of the period from booting to anthesis. In addition, breeding did not affect the total number of spikelets per spike or the number of fertile florets per spikelet at booting. The number of grains per spike increased by 23.3% from old to modern cultivars, since there was a major change in the number of grains per spikelet. Floral abortion from anthesis to maturity did not show changes over the 20th century, whereas floral abortion from booting to anthesis diminished a 24% from old to modern cultivars. Grain setting increased by 13.2%.

• **Conclusions** The results suggest that future increases in grains per spike could be achieved mainly by extending the duration of the phase from booting to anthesis, which would cause a less degeneration of distal flowers within the growing spike, probably due to less competition between stem elongation and spike growth for limited resources.

Key words: apical development, durum wheat, grain and floret number, grain setting, breeding.

## Introduction

Approximately three-quarters of the worldwide area cultivated with durum wheat are concentrated in the Mediterranean region, Italy and Spain being the largest durum wheat growers in the Mediterranean basin (Royo, 2005). In this environment, rain falls mostly during autumn and winter, and the water deficit rises in spring, coinciding with flowering and the grain-filling period. Thus, drought and heat stress usually reduce yield potential during the period of grain formation (Simane et al., 1993). Under Mediterranean conditions, water stress is one of the main production constraints since the frequency, timing, and amount of rainfall during the growing season strongly fluctuate from one year to the next. In a recent work, Royo et al. (2007) reported that the 51% of the increases in the number of grains per unit area in durum wheat during the 20<sup>th</sup> century were due to improvements in the number of grains per spike, a percentage greater than that of the number of spikes per plant or the number of plants per unit area. The number of grains produced per ground area depends mainly on the number of fertile florets per m<sup>2</sup>, which in turn is closely correlated with spike dry weight per m<sup>2</sup> at anthesis (Fischer, 1985; Miralles and Slafer, 1995; Abbate et al., 1995). Reductions in plant height, the main feature altered by wheat breeding during the 20<sup>th</sup> century, by the introduction of *Rht* dwarfing-genes, diminished the competition between the developing ear and stem, giving a more favourable partitioning of assimilates to growing reproductive organs during preanthesis, thus increasing floret fertility and thereby giving more, but smaller, grains per spike (Youssefian et al., 1992b; Miralles et al., 1998; Rebetzke and Richards, 2000). In addition, floret degeneration or mortality usually coincides with the period when the stem and spike are growing at their maximum rate (Langer and Hanif, 1973; Kirby, 1988; Siddique et al., 1989; Youssefian et al., 1992 a). The increased survival of florets observed with the introduction of the *Rht* genes was associated with heavier spikes at anthesis (Siddique et al., 1989; Youssefian et al., 1992 a; Miralles et al., 1998), suggesting that floral abortion results mainly from a limitation in the translocation of resources to the growing spike due to competition with the elongating stem. It has been reported recently that the higher number of fertile florets at anthesis gained by modern breeding in Mediterranean environments accounts for more than 70% of the increase in the number of grains per spike of Spanish durum wheat cultivars, while grain setting was much more important within Italian germplasm (Álvaro et al., 2008b).

It is well known that particular developmental phases are associated with some yield components (e.g. Rawson 1970, 1971; Rawson and Bagga, 1979), thus suggesting that certain developmental phases are more critical than others in terms of yield generation (Kirby and Appleyard, 1984; Landes and Porter, 1989). In fact, it has been recently found that cycle length until anthesis was reduced in Italian and Spanish durum wheat as a consequence of the breeding during the 20<sup>th</sup> century (Álvaro et al., 2008b).

The objectives of the present work were: i) to analyse the effects of breeding on apical development during the last century; ii) to ascertain whether breeding significantly altered the developmental phases between sowing and maturity; and iii) to evaluate the importance of each phase in the determination of the number of grains per spike in a wide range of durum wheat cultivars selected to represent the germplasm grown throughout the 20<sup>th</sup> century in Spain and Italy. Although the apical development of wheat has been amply described, studies analysing how genetic breeding over the 20<sup>th</sup> century influenced the developmental phases and evaluating the consequences for yield generation are lacking, especially for durum wheat under field conditions in Mediterranean environments.

## Material and Methods

### *Experimental set-up*

Twenty-four durum wheat cultivars, 12 Italian and 12 Spanish, were used to investigate the changes caused by breeding over the last century in durum wheat from two Mediterranean countries (Italy and Spain). Cultivars were grouped in three classes: old (grown before 1945); intermediate (released between 1950 and 1985) and modern (released between 1988 and 2000) (**Table 1**). Eight field experiments were carried out during four harvesting seasons, 2002, 2003, 2004 and 2005 in two Spanish latitudes, northern (hereafter North, with cool conditions) and southern (hereafter South, with warm conditions), representing contrasting environmental conditions within the Mediterranean area.

In each experiment, cultivars were sown in a randomized complete-block design with three replications in plots of 12m<sup>2</sup> (6 rows 20 cm apart), on a mesic calcixerolic xerochrept soil with a fine-loamy texture in the South and on a loamy calcixerolic xerochrept soil with silty-clay texture in the North. All experiments were sown between

26 of November and 16 of December at a rate of 350 seeds  $m^{-2}$  in the warmer environment and 400  $m^{-2}$  in the cooler environment, respectively, and managed as usual in each region. Plots received the amount of fertilizer normally used in each latitude (in kg/ha): 80 N, 45  $P_2O_5$ , 45  $K_2O$  in the south experiments and 96 N, 124  $P_2O_5$ , 120  $K_2O$  in the north ones. Crops were protected during the cycle to prevent lodging and diseases.

Details of the meteorological conditions in both environments are presented in **Fig. 1**. The duration of phases in thermal time units was calculated as the sum of daily average temperature considering a base temperature of 0°C (Gallagher, 1979; Baker et al., 1980; Kernich and Halloran, 1996) between sowing and anthesis, and 9°C from anthesis to maturity (Angus et al., 1981).

### *Measurements*

Main shoots were monitored regularly to determine the duration of different phenological phases from emergence to flowering and to evaluate the dynamics of spike initiation and its development. For this, three plants per plot were randomly sampled and dissected under a binocular stereoscopic microscope once or twice weekly, depending on rate of development. Main-shoot apices were examined to detect the most important stages during the ontogeny of spike (vegetative, double ridge, terminal spikelet, green anthers, yellow anther, and anthesis) according to Kirby and Appleyard (1984). From these observations, the duration of the following phases was determined: sowing to terminal spikelet (S-TS), terminal spikelet to booting (TS-BO), booting to anthesis (BO-ANT), sowing to anthesis (S-ANT) and anthesis to maturity (ANT-MAT). Anthesis was recorded when 50% of main-shoot spikes had visible anthers. Physiological maturity was recorded when the peduncle of the main spike had turned yellow in 50% of the plants.

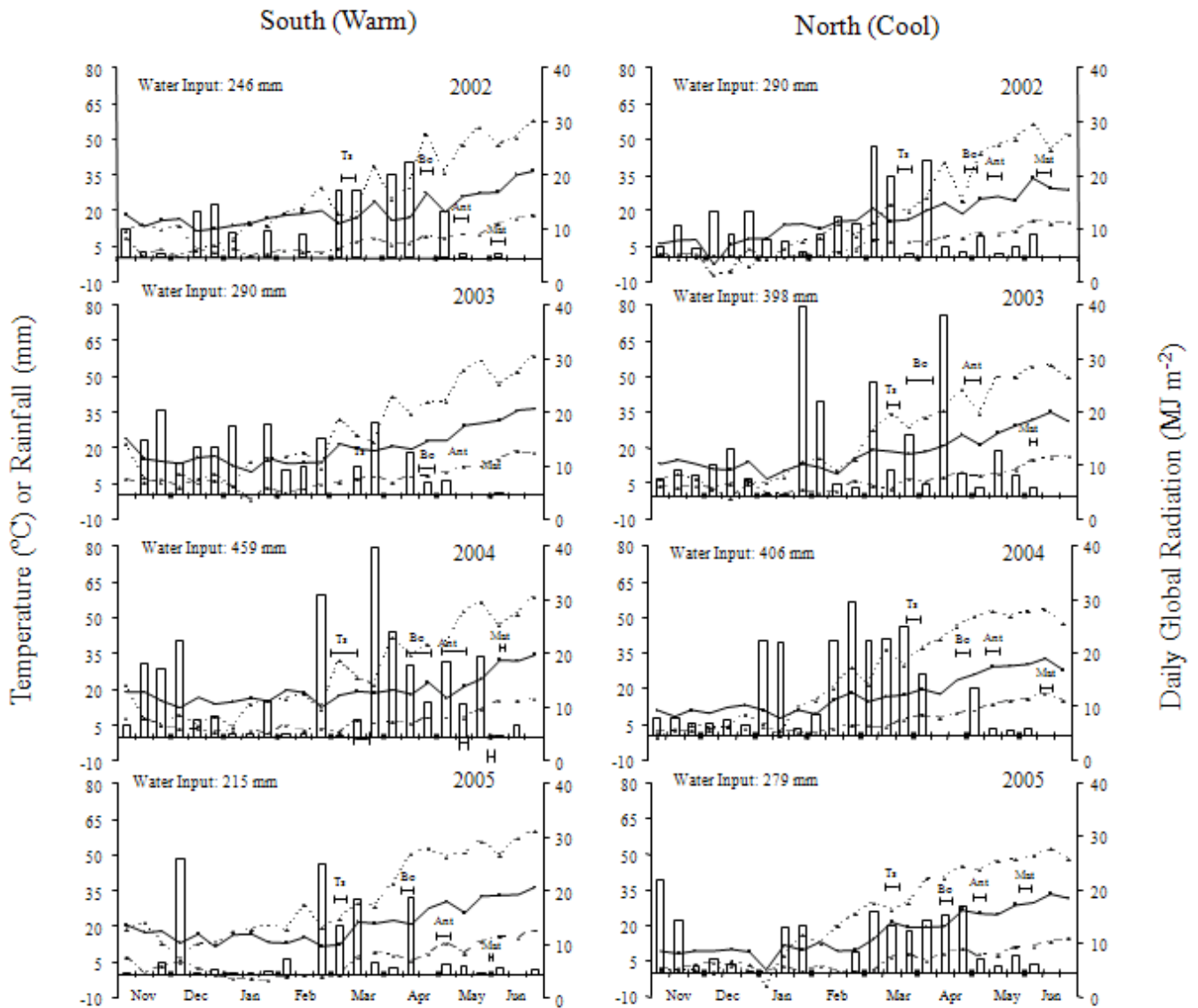
Table 1. Description of the cultivars used in the study.

Italian	Year of release	<i>Rht-B1</i> presence	Plant height (cm)*	Spanish	Year of release	<i>Rht-B1</i> presence	Plant height (cm)*
<i>Old</i>							
Balilla Falso	<1930	-	115	Blanco Verdeal	<1930	-	141
Carlojucci	1945	-	115	Clarofino	<1930	-	139
Razza 208	1930	-	118	Pinet	<1930	-	127
Senatore Capelli	1930	-	134	Rubio de Belalcázar	<1930	-	139
<i>Intermediate</i>							
Adamello	1985	-	72	Bidi 17	1950	-	100
Capeiti 8	1955	-	98	Camacho	1975	+	79
Creso	1974	+	70	Esquilache	1976	+	75
Trinakria	1970	-	104	Mexa	1980	+	82
<i>Modern</i>							
Cirillo	1992	+	83	Ariesol	1992	+	75
Flavio	1992	+	62	Astigi	1999	+	80
Simeto	1988	+	73	Boabdil	2000	+	75
Zenit	1992	+	76	Senadur	1995	+	76

\* Average of four experiments at each of two Spanish latitudes in 2002, 2003, 2004 and 2005.

Floral development, floral abortion and grain setting were determined in 2003, 2004 and 2005. The dynamics of floret development were described from five main spikes per plot, randomly chosen from a central row at booting and anthesis. The number of spikelets per spike and fertile florets per spikelet were counted in all the spikelets of the spike at both booting (sSBO) and anthesis (sSANT). In booting stage, all florets that presented green anthers were considered potentially fertile, whereas at anthesis only florets that had developed green anthers and bifidum stigma were considered actually fertile (Waddington and Cartwright, 1983). The percentage of floret abortion between booting and maturity (FLA BO-MAT %) was calculated as the quotient between the number of fertile florets per spike at booting and the number of grains per spike.





*Figure 1* - Weather conditions during the crop cycle in both environments. Rainfall (mm), daily global radiation ( $\text{MJ m}^{-2}$ ) (...), maximum (—) and minimum (---) temperatures ( $^{\circ}\text{C}$ ) are represented. Water input includes rainfall plus irrigation. The duration of the most important phases of apical development: TS (terminal spikelet), BO (booting), ANT (anthesis) and MAT (maturity) are indicated for each experiment.

The percentage of floral abortion between booting and anthesis (FLA BOT-ANT %) was calculated as the quotient between the number of fertile florets at booting and the number of fertile florets at anthesis. Finally, the percentage of floret abortion between anthesis and maturity (FLA ANT-MAT %) was calculated as the difference

between the total floral abortion (FLO BOT-MAT %) and floral abortion between booting and anthesis (FLO BO-ANT %).

The percentage of grain setting (GS) was calculated as the number of grains per spike at maturity over the number of fertile florets per spike at anthesis. The number of grains per spike (NGS), the number of grains per spikelet (NGs), and the number of spikelets per spike (NsS) were measured from a sub-sample of 10 plants randomly collected from 1-m-long segment of a central row at ripening during the years 2003, 2004, and 2005.

### *Statistical analysis*

Analyses of variance were performed across years and latitudes. All factors were regarded as fixed effects except the blocks, which were nested to year and latitude. Adjusted means were compared by Tukey's Studentised Range test at  $P = 0.05$ . All the analyses were performed with the Statgraphics plus 5.1 package.

## **Results**

### *Environmental characterization*

The maximum, minimum, and mean temperatures, global radiation and rainfall during crop growth are shown in Figure 1. An overview of the prevailing weather conditions during the growing season indicates that the northern environment was cooler, more humid and with lower daily global radiation than the southern one. The most important differences between years were the amount and the distribution of rainfall and radiation. For instance, during the 2005 growing season, the crop in the warmer environment was exposed to high levels of irradiance during April and May with low rainfall, compared to other years.

### *Duration of development*

The progress of apical development is illustrated in Fig. 2. The analyses of variance for the duration of the developmental phases revealed that, with the exception of ANT-MAT phase, the period of release significantly influenced the duration of all

apical phases in both North and South (Fig. 2). Cycle length from sowing to anthesis showed similar trends in both latitudes, being longer in the old than in the modern cultivars. However, this situation was evident only in the Spanish cultivars, as the length of the crop cycle remained unaltered in the Italian cultivars independently of the year of release (Fig. 2).

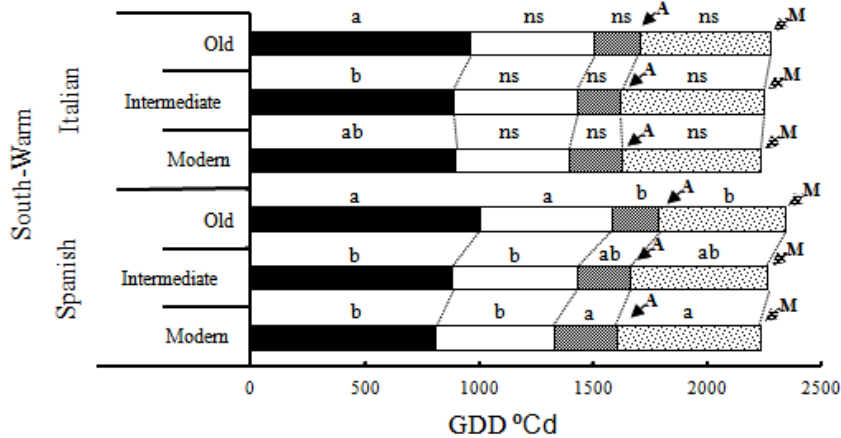
Consistently, in both latitudes, the old Spanish cultivars showed a longer S-ANT phase than in the intermediate and modern ones (+ 6.5%, deduced from Fig.2). The earliness of anthesis observed in the modern Spanish germplasm in both latitudes was due to changes in two phases prior to anthesis, i.e. S-TS and TS-BO. Variations in the S-TS phase explained most of the differences between old and modern cultivars accounting from 56% to 54% of the duration of S-ANT, whereas TS-BO represented from 32% to 30% when considering South and North, respectively. While old cultivars had longer durations of the phases S-TS and TS-BO than modern ones, the duration of the BO-ANT phase showed an opposite trend. Thus, this phase lengthened from old to modern cultivars, with some differences between North and South. In the warmer experiments, the duration of the BO-ANT phase was greater than in the cooler ones, with increases of 3.9% and 26.2% from old to intermediate and modern cultivars, respectively. In cooler environments, the increases in the BO-ANT phase from old to intermediate and modern cultivars were 10.9% and 16%, respectively. No significant differences among cultivars were found in the duration of the phase from terminal spikelet to anthesis (TS-ANT, Fig. 2). The shortest cycle duration until anthesis was recorded in intermediate Italian cultivars in both environments. The grain-filling duration, i.e from anthesis to physiological maturity, accounted from 23% to 28% of the duration from sowing to maturity for old and modern cultivars in both latitudes, respectively. No significant differences were found between cultivars and environments in the duration of the grain-filling phase.

#### *Floral development and abortion, grain setting, and yield components*

The number of fertile floret per spike (FFB) and per spikelet (FFsB) at booting did not show any change between environments or period of release of cultivars (Table 2). Conversely, at booting, the total number of fertile florets per spike (FFA) and per spikelet (FFsA) at anthesis significantly increased from old to modern cultivars (Table 2). Thus, modern cultivars showed increases of 11.5% and 15.8% in FFA and FFsA,

respectively, over the old cultivars. Regarding country of origin, Spanish cultivars consistently showed the higher values for both traits in both latitudes.

	S-TS	TS-BO	BO-ANT	S-ANT A	ANT-MAT	S-MAT M
Old	982.2 a (100%)	563.0 a (100%)	200.0 b (100%)	1745 a (100%)	580.0 a (100%)	2304 a (100%)
Intermediate	878.0 b (-10.6%)	551.3 ab (-2.1%)	208.0 b (-3.9%)	1637 b (-6.1%)	617.0 a (-10.1%)	2253 b (-2.2%)
Modern	854.0 c (-13.1%)	505.5 b (-10.2%)	252.2 a (-26.2%)	1608 b (-7.8%)	621.0 a (-10.9%)	2229 b (-3.2%)
Spain	897.5 b (100%)	550.1 a (100%)	235.0 a (100%)	1680 a (100%)	594.1 a (100%)	2274 a (100%)
Italy	912.0 a (-1.6%)	530.0 b (-3.6%)	205.0 a (-12.8%)	1645 b (-2.0%)	604.2 a (-1.9%)	2250 a (-1.1%)



	S-TS	TS-BO	BO-ANT	S-ANT A	ANT-MAT	S-MAT M
Old	749.0 a (100%)	442.4 a (100%)	175.4 b (100%)	1366 a (100%)	385.0 a (100%)	1980 a (100%)
Intermediate	704.4 b (-5.9%)	393.0 b (-11.2%)	194.5 ab (-10.9%)	1291 b (-5.4%)	389.4 a (-1.1%)	1955 a (-1.2%)
Modern	714.0 b (-4.7%)	378.1 c (-14.5%)	203.5 a (-16%)	1295 b (-5.2%)	395.2 a (-2.6%)	1956 b (-1.2%)
Spain	730.0 a (100%)	420.2 a (100%)	189.5 a (100%)	1339 a (100%)	390.5 a (100%)	1978 a (100%)
Italy	715.3 b (-2.0%)	389.0 b (-7.4%)	192.2 a (-1.4%)	1296 b (-3.2%)	394.0 a (-0.8%)	1949 a (-1.5%)

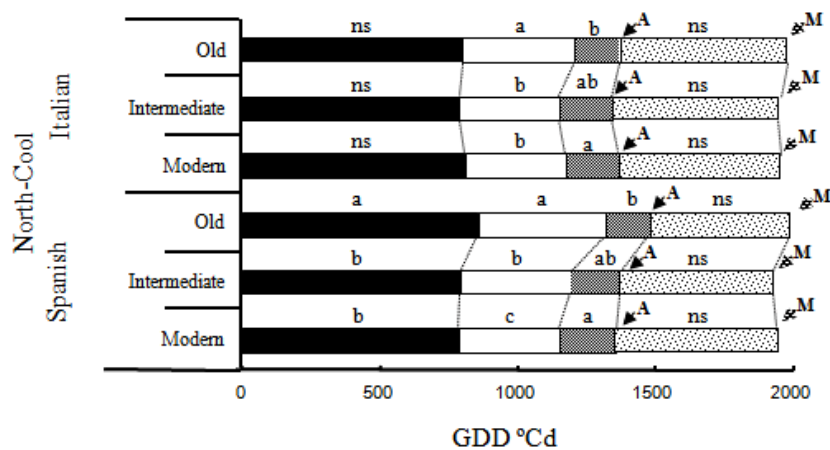


Figure 2 - Thermal time (GDD) from sowing to terminal spikelet (S-TS), terminal spikelet to booting (TS-BO), booting to anthesis (BO-ANT), sowing to anthesis (S-ANT) and anthesis to maturity (ANT-MAT) of 24 durum wheat cultivars released in different periods in Italy and Spain. Data are means of four experiments at each latitude. Arrows indicate anthesis (A) and maturity (M) occurrence. Means followed by the same letter in each column and figure do not significantly differ according to Tukey's Studentised Ranged test at 5% probability level. Percentages in parentheses represent the difference (+ or -) between old cultivars and the others.

Floral abortion (FLA) was reduced by 24% from old to modern cultivars from booting to anthesis (deduced from Table 3) but did not change from anthesis to maturity. Thus, the reduction of the floral abortion from booting to maturity in the modern cultivars was explained by the changes that occurred before anthesis. In fact, FLA during the BO-ANT phase was negatively and exponentially related to the duration of that phase (Fig. 3) suggesting that the longer the duration of the BO-ANT phase the lower the FLA and the greater the number of florets capable of fertility at anthesis. The duration of the BO-ANT phase was shorter in old cultivars than in the modern ones, and it appears to be related to the greater floral abortion of old cultivars compared with the modern ones.

In accordance to the changes observed in FLA during the BO-ANT phase, the final number of grains per spike was significantly ( $P < 0.001$ ) related to the percentage of grain setting (Fig. 4). Grain setting explained more than 77% of the observed variation in the number of grains per spike, being greater in modern cultivars than in the old ones (Table 3 and Fig. 4). Between environments, grain setting was 5.2% and 15.5% higher for the intermediate and modern cultivars, respectively, than the old ones in the warmer conditions, and 8.4% and 11% under cooler conditions, respectively (Table 3). Most of the differences observed in grain setting were explained by changes in mean temperature during grain filling ( $r = -0.78$ , Fig. 5), and therefore the lower the temperatures the higher the grain setting. In accordance with the effect of the temperature during grain setting, the cooler experiments showed higher percentages of grain setting than in the warmer experiments.

As in the NFFA, the number of grains per spike proved higher in the modern than in the old cultivars in both latitudes. Thus, Spanish cultivars in each latitude had significantly more grains per spike (5%) in both environments than did Italian cultivars.

*Table 2:* Number of fertile florets at booting and at anthesis for 24 durum wheat cultivars released in different periods in Italy and Spain determined on four experiments at each of two contrasting latitudes. Means within a column and group followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to old cultivars appears in parentheses. NFB number of fertile florets per spike at booting, NFsB number of fertile florets per spikelet at booting, NFFA number of fertile florets per spike at anthesis, NFFsA number of fertile florets per spikelet at anthesis.

Environment		FFB	FFsB	FFA	FFsA
South- Warm			<i>Period</i>		
	Old	101.1 a (100%)	4.96 a (100%)	54.1 b (100%)	3.10 b (100%)
	Intermediate	99.0 a (-2.1%)	5.25 a (+5.8%)	57.7 ab (+6.6%)	3.30 ab (+6.4%)
	Modern	98.8 a (-2.3%)	5.25 a (+5.8%)	61.4 a (+13.5%)	3.53 a (+13.9%)
			<i>Country</i>		
	Spain	100.5 a (100%)	5.12 a (100%)	58.7 a (100%)	3.35 a (100%)
	Italy	98.8 a (-1.7%)	5.19 a (+1.4%)	56.7 a (+3.4%)	3.26 a (-2.7%)
			<i>Period</i>		
	Old	107.6 a (100%)	5.46 a (100%)	55.5 b (100%)	2.75 a (100%)
	Intermediate	100.2 a (-6.8%)	5.52 a (+1.1%)	56.6 b (+2.0%)	3.05 ab (+10.9%)
Modern	96.2 a (-10.6%)	5.33 a (-2.3%)	60.4 a (+8.8%)	3.24 b (+17.8%)	
		<i>Country</i>			
Spain	104.1 a (100%)	5.51 a (100%)	60.1 a (100%)	3.11 a (100%)	
Italy	98.6 a (-5.3%)	5.36 a (-2.7%)	54.9 a (-8.6%)	2.91 a (-6.4%)	

In addition, the cooler environments registered higher numbers of grains per spike than did the warmer ones (Table 3). No significant differences were found between Spanish and Italian cultivars in the number of spikelets per spike at anthesis among cultivars released at different times (Table 3). The number of grains per spikelet significantly increased from old to modern cultivars, with mean values of 39.0% and 32.2% under warm and cool environments, respectively (Table 3).

## Discussion

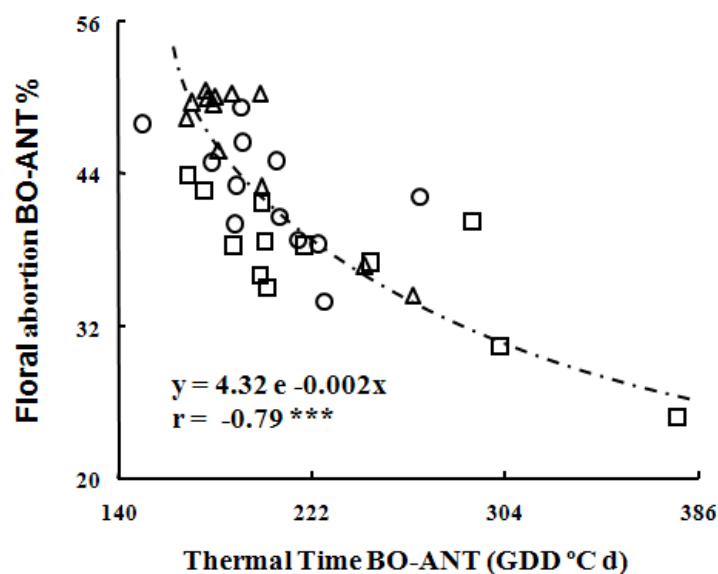
### *Duration of the developmental phases*

The results reported here indicate that breeding during the last century reduced the duration of the entire biological cycle of durum wheat. The shortening of the developmental phases affected the period between sowing and anthesis. Possibly the reduction of the period up to anthesis made by breeding places the modern crops under better environmental conditions (less water restriction) with respect to the old cultivars, thereby avoiding, (though partially) the negative effect of water deficiency during the grain-filling period as usually occurs under Mediterranean conditions (Royo et al., 2006).

Our results showed that the BO-ANT phase increased in modern cultivars compared to the old ones, which is particularly relevant given that most of the floret mortality occurs during this phase (Kirby, 1988; Miralles et al., 2002). Our results support the assumption that the longer the duration between booting and anthesis, the larger the floret survival to form the spikes (Halloran and Pennell, 1982; Miralles et al., 2000).

Our results indicate that durum wheat breeding during the last century shortened the time to flowering at the expense of the vegetative and early reproductive phases. In fact, S-TS and TS-BO phases decreased significantly throughout the breeding process (Fig.2). However, the period when the number of fertile florets is set was lengthened, allowing more floret primordia to become fertile at anthesis and to promote a greater grain setting.

The result of this strategy was that modern cultivars developed more grains per unit area (Royo et al., 2007) and had superior yields (Royo et al., 2008) than did the durum wheat cultivars grown at the beginning of the century. Although it is well established that not all developmental phases are equally important for yield formation, our results clearly show that the period between terminal spikelet initiation and anthesis, and more specifically the BO-ANT phase, have been the most relevant for yield gains in the past. Despite that it has been pointed out that floret survival could be enhanced by increasing the duration from terminal spikelet initiation to anthesis (Slafer et al., 2001), our results go further in specifying that the lengthening of the phase between booting and anthesis was the one most closely related to the reduction in floral abortion.



*Figure 3* - Relationship between the percentage of floral abortion from booting to anthesis and the duration of the BO-ANT phase. Each point represents the mean value across six experiments conducted in northern and southern Spain for old ( $\Delta$ ), intermediate (O), and modern ( $\square$ ) sets of durum wheat cultivars.

Differences between the cycle length of old and modern cultivars were far greater within Spanish germplasm than within the Italian. It may be attributed to the different breeding strategies followed in both countries over the 20th century (Royo et al., 2007; Alvaro et al., 2008a). Italian breeders probably did not face the need of reducing the cycle length of their varieties as even the old Italian cultivars had an optimum crop phenology, as a consequence of past breeding efforts.



*Table 3:* Main spike components, floret abortion, and grain setting of 24 durum wheat cultivars released in different periods in Italy and Spain determined on six experiments at each of two contrasting latitudes. Means within a column and group followed by the same letter do not significantly differ according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to old cultivars appears in parentheses. NsS: number of spikelets per spike, NGS: number of grains per spike, NGs: number of grains per spikelet. BO-ANT: from booting to anthesis, ANT-MAT: anthesis to maturity, BO-MAT, booting to maturity SET: Grain setting.

Environment	Floral Abortion						
	NsS	NGS	NGs	BO-ANT (%)	ANT-MAT (%)	BO-MAT (%)	SET (%)
<b>South-Warm</b>							
	<i>Period</i>						
Old	18.2 a (100%)	27.6 c (100%)	1.46 b (100%)	45.1 a (100%)	27.4 a (100%)	72.6 a (100%)	51.6 b (100%)
Intermediate	17.7 a (-2.7%)	30.8 b (+11.6%)	1.70 ab (+16.4%)	40.2 b (-10.8%)	28.3 a (+3.3%)	68.6 ab (-5.5%)	54.3 ab (+5.2%)
Modern	17.2 a (-5.4%)	35.5 a (+28.6%)	2.03 a (+39.0%)	36.5 c (-19.0%)	26.6 a (-2.9%)	63.2 b (-12.9%)	59.6 a (+15.5%)
	<i>Country</i>						
Spain	18.0 a (100%)	32.0 a (100%)	1.76 a (100%)	40.0 a (100%)	27.3 a (100%)	67.4 a (100%)	55.6 a (100%)
Italy	17.6 a (-2.2%)	30.6 b (-4.4%)	1.70 a (-3.4%)	41.1 a (+2.7%)	27.6 a (+1.1%)	68.8 a (+2.1%)	54.9 a (-1.2%)
<b>North-Cool</b>							
	<i>Period</i>						
Old	17.2 a (100%)	29.9 b (100%)	1.52 b (100%)	48.2 a (100%)	23.5 a (100%)	71.6 a (100%)	54.9 b (100%)
Intermediate	17.0 a (-1.2%)	32.8 ab (+9.7%)	1.80 ab (+18.4%)	41.4 b (-14.1%)	22.1 a (-5.9%)	66.5 ab (-7.1%)	59.5 ab (+8.4%)
Modern	16.9 a (-1.7%)	35.3 a (+18.0%)	2.01 a (+32.2%)	34.2 c (-29.0%)	22.8 a (-3.0%)	62.2 b (-13.1%)	60.9 a (+11.0%)
	<i>Country</i>						
Spain	17.2 a (100%)	33.4 a (100%)	1.74 a (100%)	38.7 a (100%)	22.6 a (100%)	66.6 a (100%)	57.7 a (100%)
Italy	16.2 a (-5.8%)	32.0 a (-4.2%)	1.78 a (+2.3%)	44.0 a (+13,7%)	23.1 a (-2.2%)	67.0 a (+0.6%)	59.1 a (+2.4%)

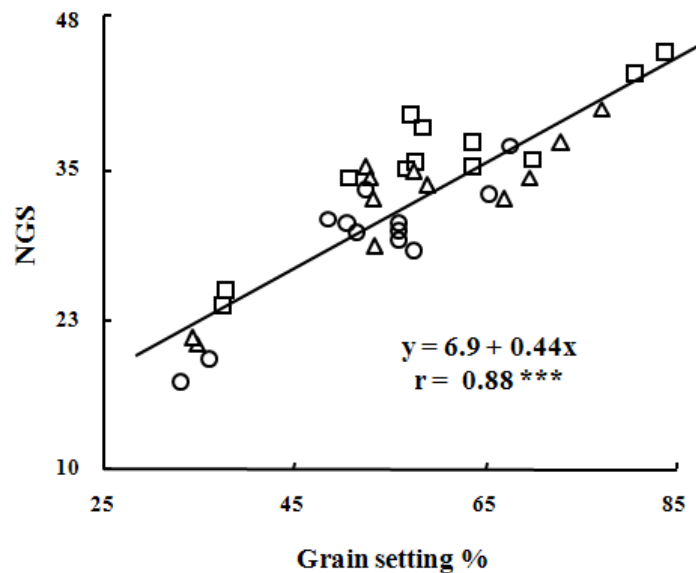
Conversely, the length of the cycle of the old Spanish cultivars was too long compared to the modern cultivars, forcing the BO-ANT phase and grain filling to occur under unfavorable climatic conditions (i.e. higher air temperature and drought conditions). Thus, breeding in Spain tended to reduce the length of the cycle so that the critical phases for grain number determination would be exposed to better environmental conditions and thus lead to improved grain yield.

*Breeding effects on floral development, floral abortion, grain setting and yield components*

The introduction of dwarfing genes and the selection of shorter cultivars with a longer BO-ANT phase probably decreased the competition between spike and stem elongation before anthesis, thus improving the allocation of assimilates to the spike (Álvaro et al., 2008c), and allowing a higher proportion of flowers to survive and set grain. Our results suggest that floret survival will depend not only on the assimilates available to the spike, but also on the duration of spike growth.

The larger duration of the BO-ANT phase reduced floret abortion. Thus, more fertile florets per spikelet at anthesis, due to the breeding process, resulted from a higher number of relatively distal primordia that reached the stage of fertile floret at anthesis (González et al., 2005; Álvaro et al., 2008a). The number of potential florets per spike at booting and the number of spikelets per spike did not change over periods, thus reinforcing the assumption that the longer duration of the BO-ANT phase observed in the modern cultivars was responsible of their reduced floral abortion.

The slightly higher values achieved by NGS and NGs in the cooler than in the warmer environments could be due, as pointed previously (García del Moral et al., 2003), to the fact that the cooler and wetter environment enabled the genotypes better expression of their yield potential.



*Figure 4*-Relationship between the number of grains per spike and grain setting. Each point represents the mean value across six experiments conducted in northern and southern Spain for old ( $\Delta$ ), intermediate (O), and modern ( $\square$ ) sets of durum wheat cultivars.

Our study also shows that the number of spikelets per spike remained unchanged during the last century and that the rise in the number of grains per m<sup>2</sup> was due to a higher number of fertile florets and grain setting, in concordance with other studies (Miralles and Slafer, 1998.; Royo et al., 2007; Álvaro et al., 2008a). In addition, the percentage of grain setting was significantly correlated with the number of grains per spike. Our results indicate that, although grain setting was higher in modern than old cultivars in both latitudes, this was because the number of fertile florets that reached anthesis was also higher in modern cultivars. As the floret abortion between anthesis and maturity did not show significant differences between periods, the attainment of a high number of grains per spike depended in greater proportion on the number of fertile florets that reached anthesis than on the grain-setting percentage from anthesis to maturity. However, the temperature also played an important role in determining the florets that effectively set grains, as shown by the negative and significant relationship existing between the mean temperature during grain filling and the percentage of grain setting.

Temperature was abnormally low during grain filling in the warmer experiments in 2004 (Fig. 1), resulting in the highest grain-setting values. Our results agree with previous ones (Youssefian et al., 1992b; Miralles and Slafer 1995; Alvaro et al., 2008a) indicating that an increase in the number of grains per spike

was associated with a greater number of grains per spikelet rather than with more spikelets per spike, as first postulated (Fisher, 1973; Holmes, 1973).

Future yield improvement, therefore, should be reached by increasing the capacity of setting grains after anthesis (Álvaro et al., 2008a), as the percentage of grain setting of modern durum cultivars are still far from those of modern bread wheat. This could be achieved by selecting cultivars with fast nascence and emergence in order to reduce the duration until anthesis, by shortening the duration of S-TS phase and by increasing the BO-ANT duration. This strategy would likely augment the number of fertile florets per spike, resulting in a greater number of them setting grains.

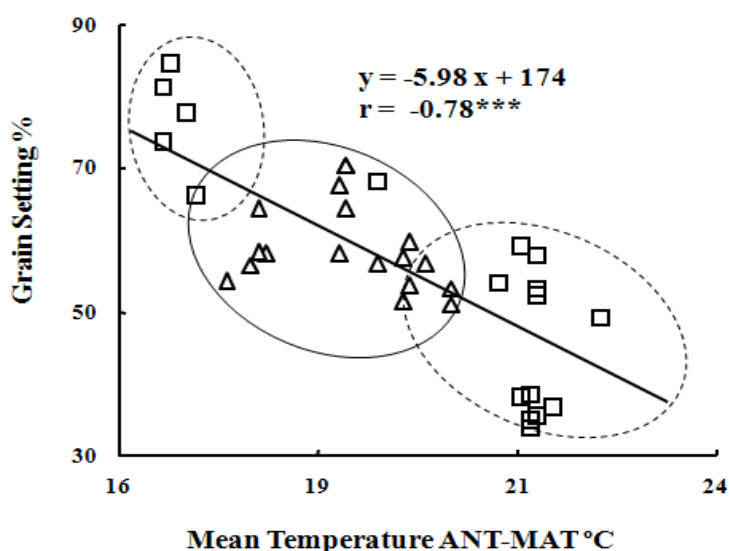


Figure 5 - Relationship between grain setting and the mean temperature between anthesis and maturity. Each point represents the mean value across six experiments conducted in the northern ( $\Delta$ ) and in the southern ( $\square$ ) of Spain.

## Conclusions

Breeding during the 20th century reduced mainly the time from sowing to anthesis, both in Italian and Spanish cultivars. This reduction was caused principally by the shortening of the S-TS and TS-BO phases, although the BO-ANT phase was significantly lengthened. This suggests that future increases in grains per spike could be achieved primarily by extending the BO-ANT phase, given that competition between stem elongation and spike growth for limited resources becomes maximum during this

developmental stage. This strategy would cause less degeneration of distal flowers within the spike. The total floral abortion was better explained by floral abortion from booting to anthesis than from anthesis to maturity and so less floral abortion would result in more fertile florets at anthesis and a superior grain setting. The detailed analysis of floret development and abortion from booting to anthesis made in this study revealed that the higher the number of fertile florets at anthesis the higher grain setting, suggesting therefore that the final number of grains per spike depends on a higher proportion of the number of fertile florets that reach the anthesis than of the grain abortion after anthesis. In addition, this study complements previous works conducted under similar conditions in which the different strategies of breeding during the last century were studied.

### **Acknowledgements**

This study was partially funded by CICYT under projects AGL-2002-04285 and AGL-2006-09226. Julio Isidro and Fanny Álvaro were recipients of PhD grants from CICYT and IRTA, respectively. The authors thank the staff of the DAP (Empresa pública de Andalucía) and F. Martínez for management of field trials at Granada, and Dr. Y.Raharrabti, Dr L.F. Roca and Rafael Rodriguez for their skilled technical assistance. The skilled technical assistance of the staff of Cereal Breeding of IRTA is greatly acknowledged.

---

**References**

- Abbate PE, Andrade, FH, Culot JP. 1995. The effects of radiation and nitrogen on number of grains in wheat. *Journal of Agriculture of Science, Cambridge* 14: 351-360.
- Álvaro F, Isidro J, Villegas D, Garcia del Moral LF, Royo C. 2008a. Old and modern durum wheat varieties from Italy and Spain differ in main spike components. *Field Crops Research* 106: 86-93.
- Álvaro F, Isidro J, Villegas D, Garcia del Moral LF, Royo C. 2008b. Breeding effect on grain filling, biomass partitioning and remobilization in Mediterranean durum wheat. *Agronomy Journal* 100: 361-370.
- Álvaro F, Royo C, García del Moral LF, Villegas D. 2008c. Grain filling and dry matter translocation responses to source-sink modifications in a historical series of durum wheat. *Crop Science* (in press).
- Angus JF, MacKenzie DH, Morton R, Schafer CA. 1981. Phasic development in field crops. II. Thermal and photoperiodic responses of spring wheat. *Field Crops Research* 4: 269-283.
- Baker CK, Gallagher JN, Monteith JL. 1980. Daylength change and leaf appearance in winter wheat. *Plant Cell Environment* 3: 285-287.
- Fischer RA. 1985. Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 105: 447-461.
- Fisher JE. 1973. Developmental morphology of inflorescence in hexaploid wheat cultivars with and without cultivar Norin 10 in their ancestry. *Canadian Journal of Plant Science* 53: 7-15.
- Gallagher JN. 1979. Field studies of cereal leaf growth. I. Initiation and expansion in relation to temperature and ontogeny. *Journal of Experimental Botany* 30: 625-636.
- García del Moral LF, Rharrabti Y, Villegas D, Royo C. 2003. Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions: an ontogenic approach. *Agronomy Journal* 95: 266-274.
- González FG, Slafer GA, Miralles DJ. 2005. Floret development and survival in wheat plants exposed to contrasting photoperiod and radiation environments during stem elongation. *Functional Plant of Biology* 32:189-197.

- Halloran GM, Pennel AL. 1982. Duration and rate of development phases in wheat in two environments. *Ann. Bot.* 49: 115-121.
- Holmes DP. 1973. Inflorescence development of semidwarf and standard height wheat cultivars in different photoperiod and nitrogen treatments. *Canadian Journal of Botany* 51: 941-956.
- Kernich GC, Halloran GM. 1996. Temperature effects of the duration of the spikelet growth phase and spikelet abortion in barley. *Journal of Agriculture of Crop Science* 176: 23–29.
- Kirby EJM. 1988. Analysis of leaf stem and ear growth in wheat from terminal spikelet stage at anthesis. *Field Crops Research* 18:127-140.
- Kirby EJM, Appleyard M. 1984. *Cereal Development Guide*. N.A.C., Stoneleigh, 95.
- Landes A, Porter JR. 1989. Comparison of scales used for categorizing the development of wheat, barley, rye and oats. *Annual of Applied Biology* 115: 343-360.
- Langer RHM, Hanif M. 1973. A study of floret development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann. Bot.* 37:743-751.
- Miralles DJ, Slafer GA. 1995. Yield, biomass and yield components in dwarf, semidwarf and tall isogenic lines of spring wheat under recommended and late sowing dates. *Plant Breeding* 14: 392–396.
- Miralles DJ, Katz SD, Colloca A, Slafer GA. 1998. Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height. *Field Crops Research* 59: 21-30.
- Miralles DJ, Richards RA, Slafer GA. 2000. Duration of the stem elongation period influences the number of fertile florets in wheat and barley. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 931–940
- Miralles DJ, Rharrabti Y, Royo C, Villegas D, García del Moral LF. 2002. Grain setting strategies of Mediterranean durum wheat cultivars released in different periods (1900–2000). In: Association of applied biologists (eds) *Genotype to phenotype: narrowing the gap*. The Royal Agricultural College, Cirencester, UK. December 16–18.
- Rawson HM. 1970. Spikelet number, its control and relation to yield per ear. *Australian Journal of Biology Science* 23:1-5.
- Rawson HM. 1971. An upper limit for spikelet number in wheat, as controlled by photoperiod. *Australian Journal of Agriculture Research* 22: 537-546.

- Rawson HM, Bagga AK. 1979. Influence of temperature between floral initiation and flag leaf emergence on grain number in wheat. *Australian Journal of Plant Physiology* 6: 391-400.
- Rebetzke GJ, Richards RA. 2000. Gibberellic acid-sensitive dwarfing genes reduce plant height to increase kernel number and grain yield of wheat. *Australian Journal of Agriculture Research* 51: 235-245
- Royo C. 2005. Durum Wheat Improvement in Spain. In: C. Royo, M.N. Nachit, N. Di Fonzo, J.L. Araus, W.H. Pfeiffer & G.A. Slafer (Eds). *Durum Wheat Breeding: Current Approaches and Future Strategies* pp. 883-906. Food Products Press, New York.
- Royo C, Villegas D, Rharrabti Y, Blanco R, Martos V, Garcia del Moral LF. 2006. Grain growth and yield formation of durum wheat grown at contracting latitudes and water regimes in a Mediterranean environment. *Cereal Research Communication* 34: 1021-1028.
- Royo C, Álvaro F, Martos V, Ramdani A, Isidro J, Villegas D, Garcia del Moral LF. 2007. Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica* 155: 259-270.
- Royo C, Martos V, Ramdani A, Villegas D, Rharrabti Y, García del Moral LF. 2008. Genetic improvements in yield and carbon isotope discrimination in Italian and Spanish durum wheat during the 20th century. *Agronomy Journal* 100: 352-360.
- Siddique KHM, Kirby EJM, Perry MW. 1989. Ear stem ratio in old and modern wheat varieties: Relationship with improvement in number of grains per ear and yield. *Field Crops Research* 21: 59-78.
- Simane B, Peacock JM, Struik PC. 1993. Differences in developmental plasticity and growth rate among drought-resistant and susceptible cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Plant Soil* 157: 155-166.
- Slafer GA, Abeledo LG, Miralles DJ, González FG, Whitechurch EM. 2001. Photoperiod sensitivity during stem elongation as an avenue to raise potential yield in wheat. *Euphytica* 119: 191-197.
- Waddington SR, Cartwright PM, Wall PC, 1983. A quantitative scale of spike initial and pistil development in barley and wheat. *Ann. Bot.*any 51:119-130.



Youssefian S, Kirby EJM, Gale MD. 1992a. Pleiotropic effects of the G.A. insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 1. Effects on development of the ear, stem and leave. *Field Crops Research* 28:179-190.

Youssefian S, Kirby EJM, Gale MD. 1992b. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth. *Field Crops Research* 28:191- 210.





***Rht-B1b* effects on canopy architecture and use of photosynthetically active radiation in durum wheat under Mediterranean conditions. I. Leaf and canopy characteristics.<sup>1</sup>**

Julio Isidro<sup>1</sup>, Conxita Royo<sup>2</sup>, Rafael Rodríguez<sup>1</sup>, Yahia Rharrabti<sup>1</sup>, Dolors Villegas<sup>2</sup>, Vanesa Martos<sup>1</sup>, and Luís F. García del Moral<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.  
<sup>2</sup>IRTA, Cereal Breeding, Centre UdL-IRTA. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain.  
Corresponding author; email: lfgm@ugr.es

<sup>1</sup> Primera revisión enviada a *Field Crops Research*, 6 Mayo 2008.

*Página anterior:*  
*Hojas de trigo con gotas*  
*de rocío. Granada 04*



***Rht-B1b* effects on canopy architecture and use of photosynthetically active radiation in durum wheat under Mediterranean conditions. I. Leaf and canopy characteristics**

**Abstract**

To identify the effect of durum wheat breeding on canopy architecture and crop-biomass production under Mediterranean conditions, 5 fields experiments were conducted for 5 years (from 2001 to 2005) in southern Spain. Twenty-four durum wheat cultivars were selected to represent the germplasm grown during the 20<sup>th</sup> century before and after the use of *Rht-B1b* dwarfing gene developed during the “Green Revolution”. The presence of *Rht-B1b* did not cause a significant change (+5.1%) in leaf-area index (LAI) at anthesis, although it reduced LAI at physiological maturity by 15.4%. Stem-area index (SAI) at anthesis and physiological maturity decreased by 23.2% and 38.9 %, respectively, in cultivars carrying the *Rht-B1b* dwarfing gene. However, ear-area index (EAI) increased by 27.7 % and 27.0 % at anthesis and physiological maturity, respectively. Leaf-area duration and green-area duration remained unchanged, while chlorophyll content in flag leaves at anthesis, measured as SPAD values, augmented by 1.8% in cultivars with the *Rht-B1b* allele. The total green-area index at anthesis did not change, possibly because the shortening in plant height caused by the *Rht-B1b* allele and consequently the lower SAI, was compensated for by an increased EAI, although without significant changes in LAI. The greater crop dry weight at anthesis in those cultivars without the *Rht-B1b* allele was probably due to a higher SAI, as well as to a longer period until anthesis, which allowed greater absorption of radiation and biomass accumulation. Crop biomass at maturity did not change with the introduction of the *Rht-B1b* allele. These results suggest that future efforts to raise grain yield in durum wheat should concentrate on augmenting biomass production while maintaining the rates of biomass partitioning and harvest index.

**Key words:** Durum wheat, Leaf-area index, green-area index, dwarfing genes, leaf-area duration, and SPAD.

## Introduction

Durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) grown in Mediterranean conditions undergoes large climatic variability, particularly in the timing, amount, and distribution of rainfall and temperature from one year to the next. The main cause of the increase in wheat grain yield has been a better partitioning of biomass towards the reproductive organs, but without major changes in total biomass production at maturity (Deckerd., 1985; Royo et al., 2007), while a reduction in plant biomass at anthesis has been reported in durum wheat (Álvarez et al., 2008).

Since the harvest index in modern cultivars is very close to its theoretical upper limit (Austin et al., 1980), further increases could be achieved mainly by improving the biomass production, but maintaining the present values of biomass partitioning (Austin et al., 1980). These changes in cereals have been associated mainly with the presence of the dwarfing genes *Rht-B1b* and *Rht-D1b*, which confer a reduced response to gibberellin (Richards, 1992; Youssefian et al., 1992a; Peng et al., 1999). Reynolds et al. (1999) reported that biomass partitioning is the main physiological trait accounting for yield changes in bread wheat, while above-ground dry matter has remained unchanged or only slightly increased (Perry and D'Antuono, 1989).

However, recent studies both in bread (Shearman et al., 2005) and in durum wheat (Pefeiffer et al., 2000) have indicated that increases in grain-yield potential in the last 20 years have resulted from higher biomass. Crop growth and biomass accumulation are dependent on the ability of the canopy to intercept incoming radiation, which depends on leaf-area index, canopy architecture, and the efficiency for converting the radiation into new biomass (Gifford et al., 1984). Decreases in plant height caused by the introduction of dwarfing genes affected leaf architecture and the interception and use of radiation (Miralles and Slafer, 1997; Muurinen and Peltonen-Sainio, 2006).

Several studies failed to find significant differences in LAI at anthesis among old and modern bread-wheat cultivars in the United Kingdom (Austin et al., 1980), USA (Deckerd et al., 1985), Germany (Feil and Geisler, 1988), or Argentina (Calderini et al., 1997). However, Siddique et al. (1989) and Yunusa et al. (1993) reported that in Australia, LAI from terminal spikelet to awn emergence was lower in the modern cultivars than in old cultivars. Similarly, it has been reported that LAI at anthesis was not affected by breeding during the 20<sup>th</sup> century in Italian and Spanish durum wheats

(Álvaro et al., 2008). On the other hand, Canevara et al. (1994) indicated a slight tendency towards higher LAI values in modern bread-wheat cultivars.

Although several works have emphasised the progress made by breeders in improving the ability of wheat crops to intercept radiation (Calderini et al., 1995; Miralles and Slafer, 1997), little information is available on durum wheat under Mediterranean conditions for indices quantifying other photosynthetic parameters apart from LAI. For this reason, the present study aimed to i) study the effects that the introduction of the *Rht-B1b* allele has caused in the crop architecture of durum wheat under rainfed Mediterranean conditions, and ii) to analyse the effects that these changes has induced on leaf- and green-area duration and its repercussion on grain yield.

## Material and Methods

### *Experimental set-up*

Field experiments were conducted for 5 years (from 2001 to 2005) in southern Spain (37° 15' 46" N, 03° 46' 19" W, alt. 594 m a.s.l.). Experimental details and environmental conditions are described in Table 1. The environment has a Mediterranean climate, with mild winters and hot dry summers, with drought and high temperatures being common sources of stress during grain filling. Twenty-four durum wheat cultivars, 12 Italian and 12 Spanish, were selected to represent the germplasm grown during the last century before and after the introgression of the *Rht-B1b* dwarfing gene into durum wheat. The presence of *Rht-B1b* dwarfing gene was tested in 12 seedlings per cultivar following the methodology described by Gale and Gregory (1977) and using a GA concentration of 4 ppm. Plant material was then grouped into two sets of 12 cultivars carrying or not the dwarfing gene *Rht-B1b* according to their sensitivity to gibberellins (Table 2). Field experiments consisted of a randomized complete-block design with 3 replications and plots of 12 m<sup>2</sup> (6 rows 0.20 m apart). Experiments were sown to obtain a rate of 350 plants m<sup>-2</sup>. Plots were fertilized and fungicides and insecticides were sprayed to prevent diseases and insect damage. Weeds were removed by hand throughout the growing season.



Table 1: Description of the experimental details.

Year	2001	2002	2003	2004	2005
<i>Soil characteristics:</i>					
Classification	Loamy Calcixerolic Xerochrept				
Texture	Silty clay				
pH	8.0	7.9	8.0	8.1	8.1
P (ppm)	32	29	27	33	25
K (ppm)	225	212	210	240	232
Organic matter (%)	1.98	1.92	1.86	2.1	2.0
<i>Agronomic practices:</i>					
Fertilizers (kg ha <sup>-1</sup> )N (seed bed + top dressing)	80	80	80	80	80
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	45	45	45	45	45
K <sub>2</sub> O	45	45	45	45	45
<i>Climatic conditions during vegetative growth</i>					
Seasonal water input (rainfall+irrigation) <sup>a</sup> (mm)	293	299	290	459	216
Maximum temperature (°C) <sup>a</sup>	17.8	17.1	17.5	17.0	17.6
Minimum temperature (°C) <sup>a</sup>	5.1	3.8	4.9	4.3	2.5
Mean temperature (°C) <sup>a</sup>	11.4	10.5	11.2	10.6	10.1
Radiation	2025	2004	2112	2236	2391
Evotranspiration (mm)	296	268	309	293	343
<i>Climatic conditions during grain filling</i>					
Rainfall (mm) <sup>b</sup>	42.8	21.4	1.8	81.4	7.6
Maximum Temperatures (°C) <sup>b</sup>	26.3	25.1	32.3	28.9	34.0
Minimum temperature (°C) <sup>b</sup>	10.7	9.6	14.6	13.3	15.3
Mean Temperature (°C) <sup>b</sup>	18.5	17.4	23.3	20.6	24.5
Radiation	777	847	687	643	903
Evotranspiration (mm)	156	154	349	326	537
Sowing date	28 Nov 2000	27 Nov 2001	23 Dec 2002	13 Nov 2003	10 Dec 2004

<sup>a</sup> i.e., Mean values from sowing to anthesis.

<sup>b</sup> i.e., Mean values from anthesis to physiological maturity.

### Data recording

Aboveground biomass was determined from plants randomly harvested at ground level in a 0.5 m length section of a central row of each plot both at anthesis and physiological maturity. Plants were separated into leaves, stems, and spikes, discarding the roots. Leaf area (one side laminae), stem projections including leaf-sheaths and spike-peduncles, and spike projections were measured separately using an area meter (LI3000, Licor Inc, Lincoln NE, USA), excluding yellow and senescent tissues from the measurement. The five most uniform plants of each sample were used to determine leaf-area index (LAI), stem-area index (SAI), and ear-area index (EAI). The leaf-area index was calculated as the product between the leaf area per plant and the number of plants per m<sup>2</sup> (NPm<sup>2</sup>). The stem-area index was calculated as the projected area by 3.14 in accordance with Květ and Marshall (1971) and EAI was calculated as the ear projected area by 2. Green-area index was computed by adding together LAI, SAI, and EAI. The leaf-area duration (LAD) and green-area duration (GAD) were determined as the

integral of leaf- and green-area index with respect to time approximated to the area of a trapezium, as suggested by Watson (1947):

$$LAD = \frac{LAI_{ant} + LAI_{mat}}{2} \times (t_2 - t_1)$$

$$GAD = \frac{GAI_{ant} + GAI_{mat}}{2} \times (t_2 - t_1)$$

Samples were dried in a fan-forced oven at 70°C for 48h and weighed to determine crop dry weight, which was calculated as CDW (g m<sup>2</sup>) = N × W, where N is the number of plants m<sup>-2</sup> and W is the weight per plant (g plant<sup>-1</sup>).

Minimum and maximum air temperatures, rainfall, evapotranspiration, and incident total solar radiation was recorded daily in an automatic weather station. Chlorophyll content was measured at anthesis and two weeks later on 15 healthy flag leaves per plot with a portable Soil Plant Analysis Development (SPAD-502, Minolta Camera Co) device which generates a measure predictive of chlorophyll concentration (Yadava, 1986). Single kernel weight was determined by counting the number of grains in 10 g randomly selected from harvested grain.

#### *Statistical analyses*

All data were analysed with an ANOVA using the Statgraphics plus a 5.1 software package. Adjusted means were compared by Tukey's Studentized Range test at P = 0.05. Correlation and regression methods were used to determine relationships between variables.

Table 2: Description of the 24 Italian and Spanish durum wheat cultivars used in the study

<i>Rht-B1b</i> allele	Variety	Year of release	Country of release	Plant height (cm)	Harvest index (%)	
Absent	Balilla Falso	<1930	Italy	115.4	31.2	
	Razza 208	<1930	Italy	118.3	28.8	
	Blanco Verdeal	<1930	Spain	139.9	21.3	
	Claro fino	<1930	Spain	137.6	26.7	
	Pinet	<1930	Spain	127.2	24.3	
	Rubio de Belalcázar	<1930	Spain	138.8	25.4	
	Senatore Cappelli	1930	Italy	133.7	25.2	
	Carlojucci	1945	Italy	116.0	30.7	
	Bidi17	1950	Spain	102.6	28.1	
	Capeiti 8	1955	Italy	98.3	38.5	
	Trinakria	1970	Italy	104.7	34.3	
	Adamello	1985	Italy	72.4	38.1	
	<i>Mean</i>			<i>117.1</i>	<i>29.4</i>	
	Present	Creso	1974	Italy	70.0	37.1
		Camacho	1975	Spain	77.7	35.1
Esquilache		1976	Spain	72.8	39.2	
Mexa		1980	Spain	79.9	39.3	
Simeto		1988	Italy	74.3	41.8	
Cirillo		1992	Italy	83.2	37.3	
Flavio		1992	Italy	63.2	37.8	
Zenit		1992	Italy	73.2	40.1	
Ariesol		1992	Spain	72.5	40.3	
Senadur		1995	Spain	76.1	41.8	
Astigi		1999	Spain	81.7	40.5	
Boabdil		2000	Spain	75.7	39.3	
<i>Mean</i>				<i>75.3</i>	<i>39.1</i>	

## Results

Table 1 reflects the yearly weather variations characteristic of Mediterranean climates. The largest differences in water availability and temperature occurred between 2004 and 2005, since 2004 was the year with greater rainfall and mild temperatures during both vegetative-growth and a grain-filling period, while 2005 was characterized by high temperatures and severe drought, particularly during grain filling.

Analyses of variance for grain yield, single-kernel weight, green area and biomass at anthesis and maturity, green-area duration, chlorophyll content, and the duration of the vegetative and grain-filling periods revealed that these traits were affected mainly by the year and by the interaction between the presence/absence of *Rht-B1b* allele and year (data not shown). Whereas year significantly affected all traits, the interaction between year and the *Rht-B1b* allele exerted a significant influence over all traits excepting LAIa, GAIa, LAIm, SPAD15 DSA. The influence of *Rht-B1b* allele was significant for grain yield, SPAD values at anthesis, duration of vegetative period, SAI and EAI at anthesis and maturity, and CDWa. The remaining traits showed no significant variation caused by the presence of the *Rht-B1b* allele, although cultivars within the two groups with or without the *Rht-B1b* allele showed statistical differences (data not shown).

#### *Green area at anthesis and maturity*

The presence of *Rht-B1b* slightly increased the leaf-area index at anthesis, although the differences were not significant in any of the years studied, with a mean difference of only 5.1% (Table 3). The lowest mean values of all the growth indices were recorded in 2005, when severe drought stress during the ontogeny of the crop dramatically constrained the growth and expansion of the leaves. However, at maturity, significant differences in LAI were observed between cultivars carrying or not the *Rht-B1b* allele, being the latter a 15.4 % higher. The stem-area index (SAI) decreased dramatically as a consequence of the stem shortening caused by the introduction of the dwarfing gene. Thus, cultivars responsive to GA showed 23.2 % and 38.9 % higher SAI at anthesis and physiological maturity, respectively, than did cultivars carrying the *Rht-B1b* dwarfing gene (Table 3). The ear-area index (EAI) showed an opposite trend to that of SAI, as cultivars with the *Rht-B1b* allele presented the highest values both at anthesis (27.7 %) and maturity (27.0 %). Although GAI showed a decrease in those cultivars carrying the *Rht-B1b* allele at anthesis, these differences were not significant (3.9%). However, at physiological maturity a significant reduction of 18.1% in GAI was found in cultivars with the *Rht-B1b* allele.

*Table 3:* Leaf area index (LAI), stem area index (SAI), ear area index (EAI), green area index (GAI) and crop dry weight (CDW) of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of *Rht-B1b* allele. Subscripts indicate growth stage: (a) anthesis, (m) physiological maturity. Means within a column and year followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation with cultivars without the *Rht-B1b* allele is between parentheses.

Year	Genotype	LAI <sub>a</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	SAI <sub>a</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	EAI <sub>a</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	GAI <sub>a</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	CDW <sub>a</sub> (g m <sup>-2</sup> )	LAI <sub>m</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	SAI <sub>m</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	EAI <sub>m</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	GAI <sub>m</sub> (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> )	CDW <sub>m</sub> (g m <sup>-2</sup> )
2001	Without- <i>RhtB1b</i>	1.86 a	1.53 a	0.65 b	4.12 a	416 a	0.35 a	0.40 a	0.41 b	1.17 a	611 a
	With- <i>RhtB1b</i>	1.94 a	1.28 b	0.93 a	4.16 a	377 b	0.30 b	0.31 b	0.59 a	1.20 a	605 a
2002	Without- <i>RhtB1b</i>	2.26 a	3.33 a	0.79 b	6.38 a	801 a	0.68 a	0.61 a	0.54 b	1.92 a	1040 a
	With- <i>RhtB1b</i>	2.34 a	2.58 b	0.99 a	5.91 a	657 b	0.51 a	0.38 b	0.76 a	1.64 a	989 a
2003	Without- <i>RhtB1b</i>	2.35 a	2.53 a	0.71 b	5.67 a	766 a	0.45 a	0.93 a	0.39 b	1.77 a	969 a
	With- <i>RhtB1b</i>	2.39 a	1.78 b	0.92 a	5.09 b	579 b	0.25 b	0.46 b	0.50 a	1.22 b	823 b
2004	Without- <i>RhtB1b</i>	3.45 a	3.73 a	0.94 b	7.92 a	952 a	0.77 a	1.12 a	0.65 b	2.39 a	1318 b
	With- <i>RhtB1b</i>	3.64 a	2.73 b	1.15 a	7.67 a	873 a	0.62 a	0.76 b	0.86 a	2.19 a	1493 a
2005	Without- <i>RhtB1b</i>	1.76 a	1.59 a	0.50 b	3.87 a	338 a	0.49 a	0.79 a	0.40 a	1.60 a	440 a
	With- <i>RhtB1b</i>	1.98 a	1.39 b	0.63 a	3.98 a	283 b	0.24 b	0.42 b	0.34 a	1.00 b	408 a
Mean	Without- <i>RhtB1b</i>	2.34 a	2.54 a	0.72 b	5.58 a	655 a	0.57 a	0.77 a	0.48 b	1.77 a	876 a
	With- <i>RhtB1b</i>	2.46 a	1.95 b	0.92 a	5.35 a	554 b	0.39 b	0.47 b	0.61 a	1.45 a	863 a
Difference (%)		(+5.1 %)	(-23.2 %)	(+27.7 %)	(-3.9 %)	(-15.4%)	(-15.4 %)	(-38.9 %)	(+27.0 %)	(-18.1 %)	(-1.5 %)

### Biomass accumulation and chlorophyll content

The presence of the *Rht-B1b* allele caused a significant decrease of 15.4% in CDW at anthesis (Table 3). In addition, CDW at anthesis was negatively related to grain yield with  $r = -0.70$  ( $P < 0.001$ ) and  $r = -0.83$  ( $P < 0.001$ ) for cultivars with or without the *Rht-B1b*, respectively (Fig. 1). On the contrary, at physiological maturity, CDW<sub>m</sub> showed no significant differences between years, with the exception of the years 2003 and 2004 the two years in which grain filling showed the shortest and longest duration, respectively. Despite the lack of significant differences in CDW at maturity, cultivars without the *Rht-B1b* allele tended to accumulate less biomass during the post-anthesis period. Chlorophyll content in the flag leaves (Table 4), measured in SPAD units, showed significant differences at anthesis (1.8%) between cultivars carrying the *Rht-B1b* allele or not but not 15 days after anthesis (1.1%).

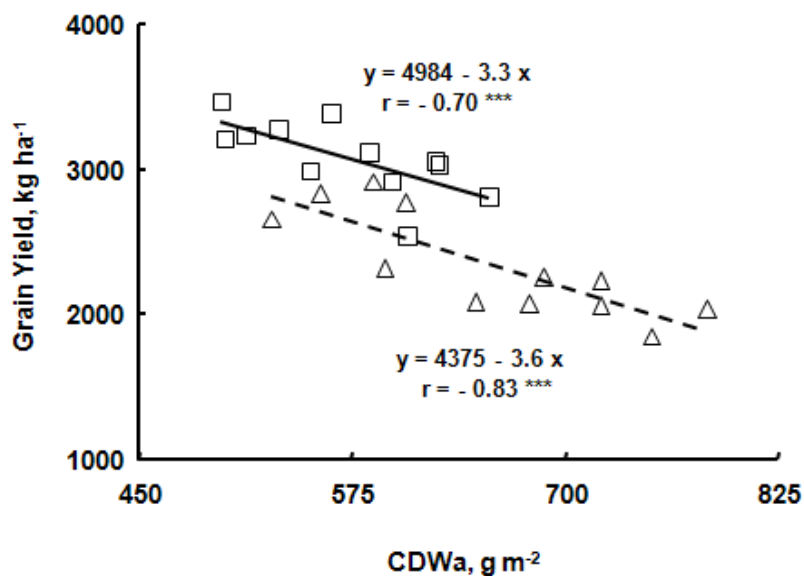


Figure 1, Relationship between grain yield (kg ha<sup>-1</sup>) and crop dry weight at anthesis (g m<sup>-2</sup>). Each point represents the mean value across five experiments conducted in the southern Spain for cultivars without *Rht-B1b* allele (Δ) (---), and for cultivars with *Rht-B1b* allele (□) (—).

*Table 4:* Mean values of grain yield (Yha), single kernel weight (SKW), chlorophyll content (SPAD), leaf area duration (LAD), green area duration (GAD), days from sowing to anthesis (DSA) and days from anthesis maturity (DAM) of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of *Rht-B1b* allele. Means within a column and group followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to cultivars without *Rht-B1b* allele is between parentheses.

Year	Genotype	Yha (Kgha <sup>-1</sup> )	SKW (mg)	SPAD <sub>a</sub> Relative units	SPAD <sub>15</sub> Relative units	LAD (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> w)	GAD (m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> w)	DSA (days)	DAM (days)
2001	Without- <i>RhtB1b</i>	1916 b	40.9 a	47.8 a	43.7 b	5.45 a	12.8 a	151 a	34.3 a
	With- <i>RhtB1b</i>	2308 a	37.5 b	47.3 a	44.8 a	5.16 a	12.3 a	148 b	32.1 b
2002	Without- <i>RhtB1b</i>	2912 a	44.5 a	51.2 a	43.0 b	6.57 a	18.3 a	159 a	31.2 b
	With- <i>RhtB1b</i>	3348 a	41.8 b	52.5 a	44.2 a	6.69 a	17.7 a	156 b	33.1 a
2003	Without- <i>RhtB1b</i>	2138 b	35.4 a	50.9 b	46.7 a	4.27 a	11.3 a	143 a	21.4 b
	With- <i>RhtB1b</i>	3002 a	32.8 b	52.0 a	47.3 a	4.43 a	10.4 b	139 b	23.5 a
2004	Without- <i>RhtB1b</i>	3472 b	46.0 b	52.5 a	46.0 a	10.2 b	24.8 b	171 a	33.7 b
	With- <i>RhtB1b</i>	5181 a	50.1 a	53.0 a	46.8 a	12.3 a	28.7 a	166 b	40.8 a
2005	Without- <i>RhtB1b</i>	1275 b	31.7 a	50.5 b	47.5 a	4.89 a	11.9 a	147 a	30.5 b
	With- <i>RhtB1b</i>	1568 a	29.5 b	52.2 a	46.9 a	5.24 a	11.8 a	146 a	33.1 a
Mean	Without- <i>RhtB1b</i>	2343 b	39.7 a	50.4 b	45.4 a	6.27 a	15.8 a	154 a	30.2 a
	With- <i>RhtB1b</i>	3081 a	38.3 a	51.3 a	45.9 a	6.78 a	16.2 a	151 b	32.5 a
Difference (%)		(+31.5 %)	(-3.5 %)	(+1.8 %)	(+1.1 %)	(+8.1 %)	(+2.5 %)	(-1.9 %)	(+7.6 %)

#### *Grain yield, kernel weight, LAD and GAD*

The average cultivars carrying the *Rht-B1b* allele outyielded cultivars without the *Rht-B1b* allele by 31.5%, while single-kernel weight (SKW) did not show any significant difference between cultivars with or without *Rht-B1b* (Table 4). Yearly variations affected the two types of germplasm differently, since the cultivars without the *Rht-B1b* allele produced heavier grains all years excepting in 2004, the year with the highest water availability and grain yield (Table 4). Leaf- and green-area durations were not affected by the *Rht-B1b* allele. In fact, LAD and GAD showed an increase of only 8.1 % and 2.5 % between groups of cultivars, respectively. Table 4 shows that whereas no significant differences were found among cultivars in days from anthesis to maturity (7.6%), there was a significant increase in the duration of period from sowing to anthesis, so that, cultivars without *Rht-B1b* allele increased 1.9% with respect to cultivars carrying the *Rht-B1b* allele. In addition, the duration of sowing to anthesis

appeared to be negatively related to yield in both groups of cultivars carrying the *Rht-B1b* allele ( $r = -0.47$  n.s.) or not ( $r = -0.53$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig.2).

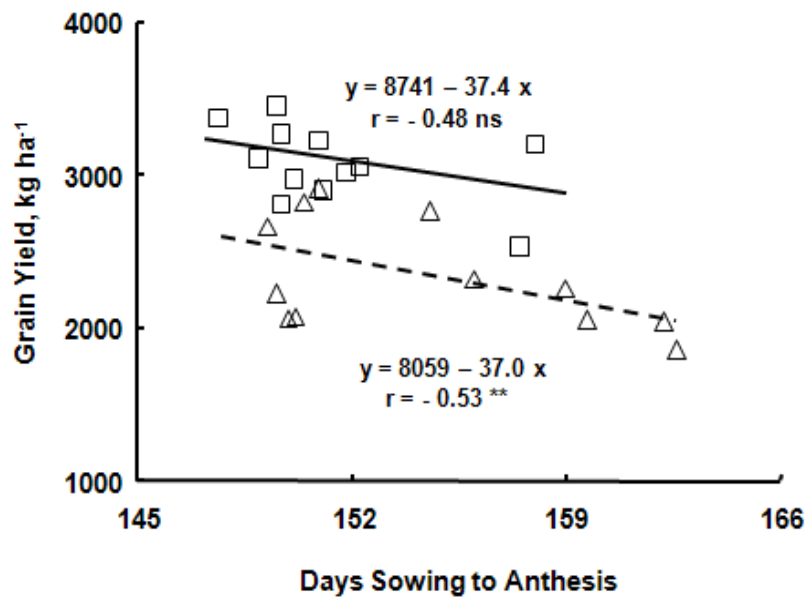


Figure 2, Relationship between grain yield ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) and the number of days from sowing to anthesis. Each point represents the mean value across five experiments conducted in the southern Spain for cultivars without *Rht-B1b* allele ( $\Delta$ ) (---), and for cultivars with *Rht-B1b* allele ( $\square$ ) (—).

## Discussion

Several studies have found no significant differences in LAI at anthesis between cultivars released in different periods during the last century in bread wheat (Austin et al., 1980; Feil and Geisler, 1988; Calderini et al., 1997; Miralles and Slafer, 1997) and durum wheat (Álvarez et al., 2008). However, Siddique et al. (1989) and Yunusa et al. (1993) reported that LAI was lower in cultivars released after the Green Revolution, whereas Canevara et al. (1994) observed a slight tendency to a higher LAI in modern cultivars of bread wheat. In our work, LAI did not show significant changes with the introduction of dwarfing genes after the Green Revolution, as found in other studies (Royo et al., 2007; Álvarez et al., 2008).

Our results showed that GAI followed the same trend as LAI, probably because the reduction in SAI caused by the decrease in plant height was offset by the increase in EAI owing to a greater number of spikes per  $\text{m}^2$  in cultivars with the *Rht-B1b* allele. In addition, although cultivars with *Rht-B1b* allele have smaller leaves (Miralles and



Slafer, 1997) this could have been compensated for by the increased photosynthetic rates per unit of leaf surface, as suggested by several authors (Le Cain et al., 1989; Morgan et al., 1990; Flinthman et al., 1997), leading to similar biomass in cultivars bearing *Rht-B1b* allele or not. In addition, in 2001, 2003 and 2005, the most unfavourable years, significant differences between cultivars were noted in the size of LAI at maturity. On the contrary, in 2002 and 2004 when the environmental conditions were more appropriate for plant growth, LAIm did not significantly differ between cultivars, suggesting that under moderate temperature and drought during grain filling, the rate of leaf senescence is not significantly influenced by the presence of dwarfing genes, as confirmed by the lack of statistical differences also in SPAD15. In addition, GAIa tended to be more affected by high temperatures and drought stress during the vegetative period than was LAI, suggesting a greater effect of drought on the development and growth of stems and ears than on the growth and expansion of the leaves in Mediterranean environments, as reported by Royo et al. (2004).

The decrease in LAI from anthesis to maturity was more pronounced in cultivars carrying the *Rht-B1b* allele than in the cultivars without this allele, apparently indicating a higher ability to extract water from the soil in cultivars without the *Rht-B1b* allele, probably due to a high early vigour that contribute to maintain higher moisture in the soil until anthesis (Slafer et al., 2005). In fact, drought stress tends to reduce grain weight to a greater extent in cultivars without *Rht-B1b* allele than in those carrying the allele, these effects being attributable to reduced water-use efficiency during grain growth of shorter cultivars (Nizam Uddin and Marshall, 1989; Shou-Chen Ma et al., 2008).

Leaf- and green-area duration, which represents the total opportunity for the assimilation during grain filling, were not significantly altered by the introduction of dwarfing genes. However, except in 2001, cultivars with the *Rht-B1b* allele tended to present greater LAD values probably due to their earlier anthesis, since they reached maturity at the same time as the cultivars without *Rht-B1b* allele. As grain dry matter originates mainly from post-anthesis photosynthesis, when the leaf area declines very rapidly, further increases in post-anthesis photosynthesis may be achieved by selecting cultivars in which anthesis is closer to the time of maximum LAI (Austin et al., 1980).

One of the strategies of adapting cereals to the semiarid environment is the mechanism named escape. This strategy, based on the fit of the plant cycle, normally due to a reduction of the vegetative growth period to avoid terminal drought, has also

been found in the present paper, in which the lowest values in days from sowing to anthesis were recorded in cultivars that had *Rht-B1b* allele whereas they did not present significant changes in grain-filling duration..

Our results indicate that cultivars with *Rht-B1b* presented the highest SPAD values during vegetative growth and grain-filling period. A plausible explanation could be that the flag leaves of cultivars with *Rht-B1b* allele tend to have smaller and thicker leaves with more Rubisco per unit area than in the flag leaves of cultivars without *Rht-B1b* allele (Pyke and Leech, 1985). It may be speculated that after anthesis, as a consequence of its greater sink strength, cultivars carrying *Rht-B1b* allele mobilize protein to the grain faster than do other cultivars, since it has been demonstrated that they use the accumulated reserves more efficiently during pre-anthesis than do the cultivars without *Rht-B1b* allele (Álvaro et al., 2008; Isidro et al., 2008, submitted).

During pre-anthesis, cultivars without the *Rht-B1b* allele showed the highest CDW values at anthesis in all the experiments, presumably because they reached anthesis later and also had higher net photosynthetic rates during stem elongation (Koc et al., 2003; Gent, 1995; Youssefian et al., 1992 b). However, neither kind of germplasm showed significant differences in CDW at physiological maturity, indicating that above-ground biomass at ripening remained unchanged with the introduction of dwarfing genes. These results confirm that the *Rht-B1b* allele has not changed the architecture of the crop, but rather has been responsible for a change in biomass distribution within the plant without changing the total biomass at ripening (Royo et al., 2007; Koc et al., 2003; Álvaro et al., 2008).

Furthermore, cultivars with *Rht-B1b* allele tended to translocate more pre-anthesis assimilates to fill the grains and, due to the reduction in main stem biomass, they were much more efficient in translocation than were other cultivars (Álvaro et al., 2008). In fact, several authors (LeCain et al., 1989; Morgan et al., 1990; Richards, 2000) indicated that the greater sink demand during grain filling associated with *Rht-B1b* alleles led to increased rates of net photosynthesis, suggesting that the photosynthesis rate decline when sinks are reduced (i.e. leaves of the cultivars with *Rht-B1b* allele may be reduced in size) but compensate for this with increased photosynthetic rates so that the overall biomass is similar to cultivars without *Rht-B1b* allele (Foulkes et al., 2007, Koc et al., 2003). On the other hand, during post-anthesis period cultivars without *Rht-B1b* allele tended to accumulate significantly less biomass (Calderini et al., 1997).

## Conclusions

Under Mediterranean conditions, year to year variation markedly affected both the magnitude of total green area at anthesis and leaf-area duration from anthesis to maturity of durum wheat. The introduction of the *Rht-B1b* allele during the 20th century did not change the total GAI, probably because plant-height reduction caused by the *Rht-B1b* allele and consequently in SAI, was offset by an increase in EAI, although without significant changes in LAI. The greater crop dry weight at anthesis in cultivars without *Rht-B1b* allele was due to a higher SAI, as well as to a longer period until anthesis, traits that probably permitted a greater absorption of radiation during the pre-anthesis period and consequently a higher accumulation of vegetative biomass. However, during the post-anthesis period the higher sink capacity of the cultivars with the *Rht-B1b* allele due to its higher number of grains per m<sup>2</sup> (Royo et al., 2007) determines a greater biomass accumulation, explaining the fact that the total biomass did not change with the introduction of the *Rht-B1b* allele. Results in the present paper support the idea that future efforts for genetic gain in durum wheat should concentrate on increasing biomass production, but maintaining the values of biomass partitioning and harvest index.

## Acknowledgements

This study was funded by CICYT under projects AGL-2002-04285 and AGL-2006-09226.. Julio Isidro was recipient of a PhD grant from CICYT. The authors thank the staff of the DAP (Empresa pública de Andalucía) and F. Martínez for management of field trials at Granada.

## References

- Álvarez, F., Isidro, J., Villegas, D., García del Moral, L.F., Royo, C., 2008. Breeding effect on grain filling, biomass partitioning and remobilization in Mediterranean durum wheat. *Agron. J.* 100, 361-370.
- Austin, R.B., Morgan, C.L., Ford, M.A., Blackwell, R.D., 1980. Contributions to grain yield from pre-anthesis assimilation in tall and dwarf barley phenotypes in two contrasting seasons. *Ann. Bot.* 45, 309-319.
- Calderini, D.F., Dreccer, M.F., Slafer, G.A., 1995. Genetic-improvement in wheat yield and associated traits. A reexamination of previous results and the latest trends. *Plant. Breed.* 114, 108-112.
- Calderini, D.F., Dreccer, M.F., Slafer, G.A., 1997. Consequences of breeding on biomass, radiation interception and radiation use efficiency in wheat. *Field Crops Res.* 52, 271-281.
- Canevara, M.G., Romani, M., Corbellini, M., Perenzin, M., Borgui, B., 1994. Evolutionary trends in morphological, physiological, agronomical and qualitative traits of *Triticum aestivum* L. cultivars bred in Italy since 1900. *Eur. J. Agron.* 3, 175-185.
- Deckerd, E.L., Bush, R.H., Kofoid, K.D., 1985. Physiological aspects of spring wheat improvement. In, J.Hasper, L.Schrader and R.Howell (Eds.), *Exploitation of Physiological and Genetic Variability to enhance crop productivity. American Society of Plant Physiologists*, Rockland, MD, pp. 45-54.
- Feil, B., Geisler, G., 1988. Untersuchungen zur Bildung und Verteilung der Biomasse bei altern und neuen deutschen sommerweizensorten. *J. Agro. Crop. Sci.* 161, 148-156.
- Flintham, J.E., Borner, A., Worland, A.J., Gale, M.D., 1997. Optimizing wheat grain yield, effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J. Agri. Sci.* 128, 11-25.
- Foulkes, M.J., Snape, J.W., Shearman, V.J., Reynolds, M.P., Gaju, O., Sylvester-Bradley, R., 2007. Genetic progress in yield potential in wheat, recent advances and future prospects. *J. Agric. Sci.* 145, 17-29.
- Gale, M.D., Gregory, R.S., 1977 A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica* 26, 733-738.

- Gent, M.P.N., 1995. Canopy light interception, gas exchange and biomass in reduced height isolines of winter wheat. *Crop Sci.* 35, 1636-1642.
- Gifford, R.M., Thorne J.H., Witz, W.D., Giaquinta, R.T., 1984. Crop productivity and photoassimilate partitioning. *Science.* 225, 801-808.
- Isidro, J., Álvaro, F., Royo, C., Fernández-Fígares, I., García del Moral, L.F., 2008.. Breeding effects on amino acid composition during kernel development of durum wheat grown under two different Mediterranean environments. *J. Exp. Bot.* (Submitted).
- Koc , M., Barutcular, C., Genc, I., 2003. Photosynthesis and productivity of old and modern durum wheats in a Mediterranean environment. *Crop Sci.* 43, 2089–2098.
- Květ,J., and J.K. Marshall.,1971. Assessment of leaf area and other assimilating plant surfaces. In Z. Šesták et al. (Eds). *Plant photosynthetic production. Manual of methods.* Dr. W. Junk N.V., Publ., The Hague, Chapter 14, pp. 517-555.
- LeCain, D.R., Morgan, J.A., Zerbi, G., 1989. Leaf anatomy and gas Exchange in nearly isogenic semi-dwarf and tall winter wheat. *Crop Sci.* 29, 1246-1251.
- Miralles, D.J., and Slafer, G.A., 1997. Radiation interception and radiation use efficiency of near-isogenic wheat lines with different height. *Euphytica.* 97, 201-208.
- Morgan, J.A., LeCain, D.R., Wells, R., 1990. Semi-dwarfing genes concentrate photosynthetic machinery and affect leaf gas exchange of wheat. *Crop Sci.* 30, 602-608.
- Muurinen, S., Peltonen-Sainio, P., 2006. Radiation-use efficiency of modern and old spring cereal cultivars and its response to nitrogen in northern growing conditions. *Field Crops Res.* 96, 363-373.
- Nizam Uddin, M and Marshall, D.R., 1989. Effects of dwarfing genes on yield and yield components under irrigated and rainfed conditions in wheat (*Triticum aestivum L.*). *Euphytica.* 42, 127-134.
- Peng, J.R., D.E. Richards., N.M. Hartley., G.P. Murphy, K.M., Devos, J.E., Flintham, J., Beales, L.J., Fish, A.J., Worland, F., Pelica, D., Sudhakar, P., Christou, J.W., Snape, M.D., Gale, N.P., Harberd., 1999. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 400, 256-261.

- Perry, M.W., and D'Antuono, M.F., 1989. Yield improvement and associated characteristics of some Australian spring wheat cultivars introduced between 1860 and 1982. *Aust. J. Agric. Res.* 40, 457-472.
- Pfeiffer, W.H., K.D., Sayre, M.P. Reynolds., 2000. Enhancing genetic gain yield potential and yield stability in durum wheat. In, C. Royo, M.M. Nachit, N. Di Fonzo & J.L. Araus (Eds.). *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region*, New challenges. Zaragoza, IAMZ. Options méditerranéennes. 40, 88-93.
- Pyke, K.A., Leecie, R.M., 1985. Variation in ribulose-1,5-biphosphate carboxylase content in a range of winter wheat genotypes. *J. Exp. Bot.* 36, 1523-1529.
- Reynolds, M.P., Sayre, K.D., Rajaram, S., 1999. Physiological and genetic changes of irrigated wheat in the post green revolution period and approaches for meeting projected global demand. *Crop Sci.* 39, 1611-1621.
- Richards, R.A., 1992. The effect of dwarfing genes in spring wheat in dry environments. I. Agronomic Characteristics. *Aust. J. Agric. Res.* 43, 517-527.
- Richards, R.A., 2000. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* 51, 447-458.
- Royo, C., Aparicio, N., Blanco, R., Villegas, D., 2004. Leaf and green area development of durum wheat genotypes grown under Mediterranean conditions. *Europ. J. Agr.* 10, 419-430.
- Royo, C., Álvaro, F., Martos, V., Ramdani, A., Isidro, J., Villegas, D., Garcia del Moral, L.F., 2007. Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica.* 155, 259-270.
- Shearman, V.J., Sylvester-Bradley, R., Scout, R.K., Foulkes, M.J., 2005. Physiological processes associated with wheat yield progress in the UK. *Crop Sci.* 45, 175-185.
- Shou-Chen, Ma., Bing Cheng, Xu., Feng-Min, Li., Web-Zhao, Liu., Zhan-Bin, Huang., 2008. Effects of root pruning on competitive ability and water use efficiency in winter wheat. *Field Crops Res.* 105, 56-63.
- Siddique, K.H.M., Beldford, R.K., Perry, M.W., Tennant, D., 1989. Growth, development and light interception of old and modern wheat cultivars in a Mediterranean environments. *Aust. J. Agric. Res.* 40, 473-487.

- 
- Slafer, G.A., Araus, J.L., Royo, C., Garcia del Moral, L.F., 2005. Promising eco-physiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments. *Ann. App. Botany*. 146, 61-70.
- Yadava, U.L., 1986. A rapid non-destructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *Hortscience*. 21, 169–1450.
- Yunusa, I.A.M., Siddique, K.H.M., Belford, R.K., Karimi, M.M., 1993. Effect of canopy structure on efficiency of radiation interception and use in spring wheat cultivars during the pre-anthesis period in a Mediterranean type environment. *Field Crops Res.* 35, 113-122.
- Youssefian, S., Kirby, E.J.M., Gale, M.D., 1992 a. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 1. Effects on development of the ear, stem and leaves. *Field Crops Res.* 28, 179-190.
- Youssefian, S., Kirby, E.J.M., Gale, M.D., 1992 b. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth. *Field Crops Res.* 28, 191-200.
- Watson, D.J., 1947. Comparative physiological studies on the growth of field crops. II. The effect of varying nutrient supply on net assimilation rate and leaf area. *Ann. Bot. N. S.* 11, 375-407.







***Rht-B1b* effects on canopy architecture and use of photosynthetically active radiation in durum wheat under Mediterranean conditions. II. Absorption and use-efficiency of photosynthetic radiation<sup>1</sup>**

Julio Isidro<sup>1</sup>, Conxita Royo<sup>2</sup>, Rafael Rodríguez<sup>1</sup>, Yahia Rharrabti<sup>1</sup>, Fanny Álvaro<sup>2</sup>,  
Vanessa Martos<sup>1</sup> and Luís F. García del Moral<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain.

<sup>2</sup>IRTA, Cereal Breeding, Centre UdL-IRTA. Rovira Roure, 191, 25198 Lleida, Spain.

<sup>3</sup>Cátedra de Cerealicultura, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Avda. San Martín 4453 (C 1417 DSE), Buenos Aires, Argentina.

\* Corresponding author; email: lfgm@ugr.es

<sup>1</sup> Primera revisión enviada a *Field Crops Research*, 6 Mayo 2008

*En página anterior:*

*Hojas banderas de cultivares antiguos*



---

***Rht-B1b* effects on canopy architecture and use of photosynthetically active radiation in durum wheat under Mediterranean conditions. II. Absorption and use-efficiency of photosynthetic radiation**

**Abstract**

The second paper in this series seeks to identify the effect of durum wheat breeding on the fractional absorbed radiation (FRa), canopy-extinction coefficient ( $k$ ) and radiation-use efficiency (RUE) under Mediterranean conditions. A total of 5 field experiments were conducted during the growing seasons from 2001 to 2005 in southern Spain, including 24 cultivars selected to represent the germplasm grown during the 20th century before and after the introgression of the *Rht-B1b* dwarfing gene into the genetic background of durum wheat. FRa and  $k$  did not significantly differ between cultivars carrying *Rht-B1b* allele or not, while the crop growth rate (CGR), net assimilation rate (NAR) and leaf:grain ratio (G) during the grain-filling period registered higher values in the cultivars carrying the *Rht-B1b* allele. Whereas RUE before anthesis was greater in cultivars without the *Rht-B1b* allele, after anthesis it was significantly greater in the cultivars with the *Rht-B1b* allele, possibly due to their greater sink capacity, suggesting the existence of a photosynthetic feedback mechanism in those cultivars with higher sink capacity. The chlorophyll content at anthesis measured on flag leaves in SPAD units appears to be a reliable predictor of  $k$  under Mediterranean conditions.

Key words: Radiation-use efficiency, extinction coefficient, durum wheat, crop growth rate, SPAD.

## Introduction

Total dry matter produced by a crop depends on the amount of solar radiation intercepted by the canopy and the efficiency by which this radiation is converted into dry matter. The quantity of energy potentially available for photosynthesis that is captured by a crop canopy is called “absorbed photosynthetically active radiation” or the irradiance in the 400 to 700 nm waveband. The efficiency of this transformation may be assessed by the radiation-use efficiency (RUE), usually defined as the ratio between the biomass produced and the energy intercepted (Monteith, 1977). Reported RUE values for wheat, based on photosynthetically active radiation (PAR) measurements under non-stress conditions, ranged from 1.46 to 2.93 gDM MJ<sup>-1</sup> (Gregory et al., 1992; Yunusa et al., 1993; Singer et al., 2007) and for barley from 1.79 to 2.33 gDM MJ<sup>-1</sup> (Gregory et al., 1992; Jamieson et al., 1995) depending on the site and genotype. The efficiency of conversion of the intercepted radiation into dry matter in cereals differs between the pre- and post-anthesis period (Gregory et al., 1992; Calderini et al., 1997). It is due mainly to the fact that both the leaf disposition along the stem and the angle of leaf inclination change during the plant development, thus altering the pattern of light distribution in the canopy, the photosynthetic rate, and the production of dry matter (Duncan, 1971; Trenbath and Angus, 1975). Both the interception and the absorption efficiencies of a crop in each growth stage depend largely on its leaf development, defined by the leaf-area index (LAI), as well as the optical properties, chlorophyll content, and geometry of the leaves (Bonhomme, 2000).

The amount of dry mass produced is linearly related to the amount of photosynthetically active radiation intercepted (PAR<sub>i</sub>) by the crop (Gallagher and Biscoe, 1978; Russell et al., 1989). Therefore, the radiation interception by the crop can be described in terms of total amount of incident radiation and the fraction of it that is absorbed by the canopy. Dwarfing genes such as Rht1 and Rht 2 derived from “Norin 10” have substantially increased the harvest index and lodging resistance, thus boosting wheat yields (Royo et al., 2007, 2008). The greatest harvest index and grain yield of modern cultivars reduced the competition between the developing ears and stem, and this was the main cause for genetic yield gains during the last century (Austin et al., 1980; Deckerd et al., 1985; Abbate et al., 1997; Slafer and Andrade, 1989). In durum wheat, biomass reductions of between 9 and 21% at anthesis have been reported to be associated to drastic increases in dry-matter translocation efficiency and the contribution

of pre-anthesis assimilates to grain filling (Álvarez et al., 2008; Agron J; Isidro et al., 2008.) Stress during crop growth under Mediterranean conditions limits grain yield, and the effects of drought stress on the growth and phenology of wheat depend on its timing, duration

and intensity. Understanding the changes that occurred during the last century in the photosynthetic area and its influence in the fraction of radiation absorbed by the leaves could be of value for improving grain yield in cereals (Reynolds et al., 2000; Araus et al., 2002).

Although some papers in the literature (Calderini et al., 1997; Miralles and Slafer, 1997; Reynolds et al., 2000; O'Connell et al., 2004) have studied the interrelationships between canopy growth, radiation interception and radiation-use efficiency, information is lacking on the effect of the introduction of dwarfing genes in Mediterranean durum wheat. The first paper of this series (Isidro et al., 2008) studied the effect of the introduction of the *Rht-B1b* allele on the size of photosynthetic area and biomass in relation with grain yield. The objectives of the present paper are: i) to analyse the changes that breeding caused on the physiological determinants of radiation absorption and radiation use efficiency, and ii) to evaluate the relationship between radiation absorption and RUE with several growth indices describing net assimilation during the grain-filling period.

## **Material and Methods**

### *Field Experiments*

Plant material and field-experiment details were presented in the first paper of this series (Isidro et al., 2008). Five field experiments were carried out under rainfed conditions from 2001 to 2005 in Granada (southern Spain). In each experiment, 24 durum wheat cultivars were grown in a randomised complete block design with three replications. Seed rate was adjusted for a density of 350 seeds m<sup>-2</sup> in plots of 12 m<sup>2</sup> (six rows, 0.2 m apart). Anthesis was recorded when 50% of main-shoot spikes had visible anthers (GS 65 of the Zadoks scale, Zadoks et al., 1974). Physiological maturity was recorded when the peduncle of the main spike had turned yellow in 50% of the plants (GS 92 of the same scale). The presence of *Rht-B1b* dwarfing gene was tested in

12 seedlings of each cultivar following the methodology described by Gale and Gregory (1977) and using a gibberellic acid concentration of 4 ppm.

*Fraction of absorbed radiation and radiation-use efficiency.*

Radiation absorption was determined at anthesis by measuring the PAR aboveground and at ground level below the canopy by using a 1-m-long linear ceptometer (Accupar DECAGON Inc. USA). Transmitted radiation was measured inserting the line sensor in the two central inter-rows of each plot in order to minimize canopy disturbance. PAR-transmitted measurements were made above the lowest layer of senescing leaves when necessary in order to avoid the amount of radiation absorbed by dead and dying leaves and foliage that does not participate in photosynthesis,. The reflected radiation was measured with the sensor inverted and levelled 0.35 m above the crop. On each inter-row, the sensor was placed at noon ( $\pm 1$ h) on totally sunny days (Gallo and Daughtry, 1986) in three positions and two directions along the plot. (i) On the top of the crop, (ii) close to the soil surface and iii) on the top of the crop with the ceptometer inverted. In addition, measurements were taken in both extremes and in the middle of the plot at two positions, lengthwise and transversely, respectively. Hence, measurements were taken 18 times per plot and the averages of these values were taken as incident, transmitted, and reflected radiation. Thus, the fraction of radiation absorbed (FRI) was calculated as:

$$FRa = \frac{I_0 - I - I_r}{I_0} \times 100$$

where  $I_0$  is the incident radiation,  $I$  is the transmitted radiation through the canopy to the soil surface and  $I_r$  is the light reflected by the crop. The extinction coefficient ( $k$ ) was calculated as the value of the slope of the regression of  $\ln(1-FRa)$  on LAI and GAI. The regression was not forced to pass through the origin.

Radiation-use efficiency (RUE) at anthesis (RUEpre) was calculated as the ratio between total crop biomass at anthesis and the sum of the fraction of the daily global radiation absorbed until anthesis. RUE at maturity (RUEpost) was calculated as the ratio between differences in biomass between maturity and anthesis and the fraction of the global radiation absorbed during the same period. Daily global radiation (MJ m<sup>-2</sup> per day) was determined from continuous measurements of the daily global provided by an

automatic weather station located at 5 km from the experimental site. The PAR fraction was assumed to account for the 45 % of the global incoming radiation (Cooper, 1970; Meek et al., 1984).

### *Growth indices*

Crop growth rate (CGR), which measures in relative terms the increase of biomass per unit of land area and time, was calculated for the period between anthesis and maturity, according to Evans (1972):

$$CGR = \frac{W_2 - W_1}{(t_2 - t_1)} \times P$$

where W is the total above-ground dry matter, P is the soil area and t is the time.

Net assimilate rate (NAR) measures the efficiency of the photosynthetic surfaces for the production of dry matter per unit of time and was also calculated between anthesis and maturity as (Evans, 1972):

$$NAR = \int \frac{1}{A} \times \frac{dW}{dt} = \frac{W_2 - W_1}{A_2 - A_1} \times \frac{\ln A_2 - \ln A_1}{(t_2 - t_1)}$$

where A represents the green leaf area.

The assimilation efficiency during grain filling (leaf:grain ratio, G ) was calculated as (Welbank et al., 1966):

$$G = \frac{Y}{LAD}$$

where Y is grain yield at ripening and LAD is leaf area duration from anthesis to physiological maturity.

### *Statistical analyses*

Analyses of variance were conducted on all data by using the Statgraphics plus 5.1 software package. Adjusted means were compared by Tukey's Studentized Range test at P = 0.05. Correlation and regression methods were used to determine relationships between variables.



## Results

Analyses of variance (data not shown) indicated that radiation absorbed, extinction coefficients, radiation-use efficiency, net assimilation rate, crop growth, and grain leaf grain:ratio were affected mainly by the year. The influence of *Rht-B1b* allele and the interaction between the presence/absence of *Rht-B1b* allele and year were significant only for RUEpre, RUEpost, NAR, CGR, and G (data not shown).

### *Fractional radiation intercepted and extinction coefficient (k)*

Table 1 indicate that the fractional radiation absorbed by the crop, measured as the percentage of difference between incident radiations and transmitted and reflected, showed no statistical differences among cultivars whether or not carrying the *Rht-B1b* allele, for both longitudinal and transversal measurements (difference 0.9 %). The extinction coefficient, which measures the attenuation of light when passing through the canopy, did not differ significantly between cultivars with or without dwarfing genes either in k calculated on the basis of GAI (difference of 2.5 %) or when calculated on the basis of LAI (difference of 1.5%).

Our results also showed that the highest values of k were obtained in those cultivars with a height of 73-115 cm (Table 2), although without presenting statistical differences with taller or shorter cultivars. In addition, k values were slightly higher for cultivars with *Rht-B1b* allele, but these did not reveal any clear trend with the year of release of the cultivars ( $r = 0.21$  n.s and  $r = 0.25$  n.s for k based on LAI and GAI, respectively).

The extinction coefficient strongly depended on the LAI values at anthesis though with a slight difference between cultivars with or without the *Rht-B1b* allele (Fig. 1). Furthermore, the results showed a significant and positive relationship between the chlorophyll content of flag leaves measured at anthesis in SPAD units and the extinction coefficient (Fig. 2). It is worth noting that after a test of homogeneity of regression coefficients (Gomez and Gomez, 1984) the slope of the regression line was significantly higher in cultivars without the *Rht-B1b* allele—that is, the presence of the dwarfing *Rht-B1b* allele determined a lower rate of increase in extinction coefficient per the same incremental change in chlorophyll content.

*Table 1:* Fraction of absorbed radiation (FRa) and extinction coefficient (K) of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of *Rht-B1b* allele. Means within a row group followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to cultivars without *Rht-B1b* allele is between parentheses. FRaL: Longitudinal fraction absorbed radiation, FRaT: Transversal fraction absorbed radiation, FRaM : Means of longitudinal and transversal fraction, KL GAI: longitudinal extinction coefficient on GAI basic, KT GAI: transversal extinction coefficient on GAI basic, KM GAI Means of longitudinal and transversal extinction coefficient on GAI basic, KL LAI: longitudinal extinction coefficient on LAI basic, KT LAI: transversal extinction coefficient on LAI basic, KM LAI: Means of longitudinal and transversal extinction coefficient on LAI basic.

Variable	Genotype		Differences (%)
	Without <i>Rht-B1b</i>	With <i>Rht-B1b</i>	
FRaL (%)	76.5 a	77.2 a	(+0.9 %)
FRaT (%)	77.2 a	77.9 a	(+0.9 %)
FRaM (%)	76.8 a	77.6 a	(+1.0 %)
KL GAI	0.197 a	0.202 a	(+2.5 %)
KT GAI	0.201 a	0.205 a	(+2.0 %)
KM GAI	0.199 a	0.204 a	(+2.5 %)
KL LAI	0.611 a	0.619 a	(+1.3 %)
KT LAI	0.613 a	0.622 a	(+1.5 %)
KM LAI	0.612 a	0.621 a	(+1.5%)

*Table 2:* Mean of Extinction coefficient basic in LAI at different heights in the canopies at anthesis.

Crop Height (cm)	Km <sub>LAI</sub>
>115	0.612
73-115	0.619
0-76	0.618
Whole canopy	0.611

Consequently, at SPAD values of less than 51.7 the extinction coefficient of cultivars with *Rht-B1b* allele was greater than that of cultivars without *Rht-B1b* allele,

whereas beyond this value the latter cultivars presented the highest values of  $k$  on a LAI basis (Fig. 2).

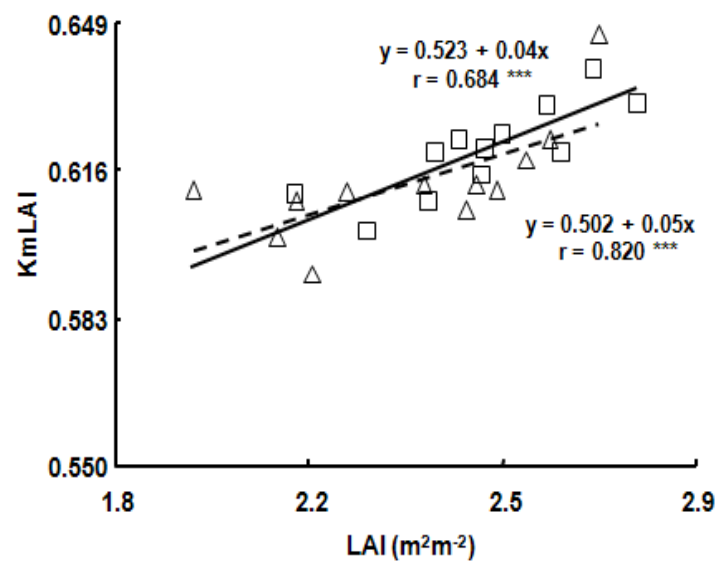


Figure 1: Relationship between the extinction coefficient based in LAI and the leaf-area index at anthesis. Each point represents the mean value across five experiments conducted in southern Spain for 12 cultivars without the *Rht-B1b* allele ( $\Delta$ ) (---), and 12 cultivars with the *Rht-B1b* allele ( $\square$ ) (—).

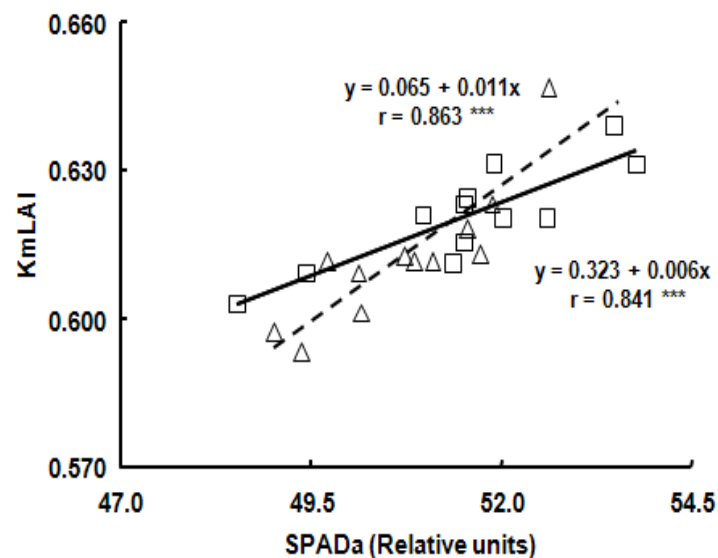


Figure 2, Relationship between the extinction coefficients based in LAI and SPAD values at anthesis. Each point represents the mean value across five experiments conducted in southern Spain for 12 cultivars without the *Rht-B1b* allele ( $\Delta$ ) (---), and 12 cultivars with the *Rht-B1b* allele ( $\square$ ) (—).

*Radiation-use efficiency (RUE), net assimilation rate (NAR), crop growth rate (CGR) and leaf:grain ratio (G)*

Our results showed that radiation-use efficiency both during vegetative growth (RUEpre) and the grain-filling period (RUEpost) differed between the two groups of germplasm (Table 3). Thus, RUE before anthesis showed the highest values in cultivars without the *Rht-B1b* allele, with a mean value across years of 11.2% greater than that of cultivars with *Rht-B1b* allele. However, RUEpost had an opposite behaviour, being 28.8% higher in cultivars with *Rht-B1b* allele than in cultivars without *Rht-B1b* allele.

Both sets of germplasm also differed in NAR, CGR and G. Cultivars carrying the *Rht-B1b* allele showed an increase of 28.0 %, 24.2 %, and 19.3 % in NAR, CGR and G, respectively in comparison with the cultivars without *Rht-B1b* allele. That is, the efficiency of the photosynthetic surfaces for the production of dry matter over the grain-filling period was higher in cultivars carrying the *Rht-B1b* allele than in the other cultivars.

## **Discussion**

In the previous paper of this series, it was concluded that the *Rht-B1b* allele did not affect the green-area index (GAI) in durum wheat under Mediterranean conditions, because there was a compensative effect of the ear-area index (EAI) over both the leaf-area index (LAI) and the stem-area index (SAI). Results of the present study indicate that the introduction of the *Rht-B1b* allele did not cause significant differences in the fraction of radiation absorbed by the crop, either in longitudinal or transversal measurements, probably as a consequence of the compensatory effect in the green surfaces mentioned above.

Our results also show that the extinction coefficient was similar in cultivars carrying the *Rht-B1b* or not, suggesting that under Mediterranean conditions reductions in plant height as consequence of durum wheat breeding did not change the pattern of light attenuation inside the canopy. These results support previous findings in bread wheat grown in Argentina (Calderini et al., 1997) and Australia (O'Connell et al., 2004). Differences in  $k$  between cultivars are attributed to variations in the distribution and orientation of leaves (Bonhomme, 2000) and also to leaf-chlorophyll content, as

confirmed in the present study. Our results indicate that SPAD values in the flag leaf could be a good predictor of  $k$  values in durum wheat at anthesis (Fig. 2). In addition, it appears to be a tendency to increase  $k$  values as a consequence of the introduction of the *Rht-B1b* allele, as postulated Miralles and Slafer (1997).

*Table 3:* Radiation use efficiency (RUE) at anthesis (a) and physiological maturity (m), net assimilation rate (NAR), crop growth rate (CGR) and assimilation efficiency (G) during grain filling period of 24 durum wheat cultivars grouped according to the presence or absence of the *Rht-B1b* allele. Means within a column and year followed by the same letter are not significantly different according to Tukey's Studentised Ranged test. The percentage of change in relation to cultivars without *Rht-B1b* allele is between parentheses.

Year	Genotype	RUE <sub>pre</sub> (g MJ <sup>-1</sup> )	RUE <sub>post</sub> (g MJ <sup>-1</sup> )	NAR (g m <sup>-2</sup> m <sup>2</sup> w)	CGR (g m <sup>-2</sup> w <sup>-1</sup> )	G (Kg ha <sup>-1</sup> w <sup>-1</sup> )
2001	Without- <i>Rht</i>	0.787 a	0.543 b	44.7 b	40.1 b	360 b
	With <i>Rht</i>	0.746 a	0.709 a	57.8 a	50.2 a	458 a
2002	Without- <i>Rht</i>	1.177 a	0.660 b	48.1 b	54.1 b	484 a
	With <i>Rht</i>	1.012 b	0.897 a	60.1 a	66.8 a	543 a
2003	Without- <i>Rht</i>	1.070 a	0.779 a	63.3 b	66.6 b	538 b
	With <i>Rht</i>	0.857 b	0.795 a	81.7 a	75.0 a	693 a
2004	Without- <i>Rht</i>	1.365 a	1.113 b	48.9 b	77.3 b	374 b
	With <i>Rht</i>	1.303 a	1.627 a	65.9 a	107 a	426 a
2005	Without- <i>Rht</i>	0.470 a	0.265 b	29.0 a	23.9 b	286 a
	With <i>Rht</i>	0.407 b	0.301 a	33.9 a	26.7 a	314 a
Mean	Without- <i>Rht</i>	0.974 a	0.672 b	46.8 b	52.4 b	408 b
	With <i>Rht</i>	0.865 b	0.866 a	59.9 a	65.1 a	487 a
Differences (%)		(-11.2 %)	(+28.8 %)	(+28.0 %)	(+24.2 %)	(+19.4 %)

Differences in RUE have been documented among cereal species (see a review in Sinclair and Muchow, 1999 and references quoted therein), although there are several contradictory reports in RUE values and their influence on biomass accumulation before anthesis. Siddique et al. (1989) and Yunusa et al. (1993) showed that RUE before anthesis seemed to have augmented in Australian cultivars as a consequence of breeding, and so modern cultivars have more biomass in the pre-anthesis period than do old ones. However, old Argentinean cultivars have proved to be much more efficient

than modern ones in the use of the intercepted radiation for biomass production (Slafer et al., 1990; Calderini et al., 1997; Reynolds et al., 2005). Our results agree with these authors, not only for RUE values before anthesis, but also for RUE values during grain filling.

The presence of the *Rht-B1b* dwarfing gene significantly affected RUE both in pre- and post-anthesis periods. While different cultivars absorbed similar amounts of PAR, the efficiency with which the absorbed radiation was converted into dry-matter was higher in cultivars with lower extinction coefficients at anthesis, i.e. cultivars without the *Rht-B1b* allele. However, during the post-anthesis period, the efficiency for producing dry-matter increased in cultivars with high  $k$ , i.e. cultivars with *Rht-B1b* allele. It is possible that cultivars without the *Rht-B1b* allele had greater RUE because they could intercept a larger fraction of diffuse radiation inside the canopy due to their larger leaves in comparison with cultivars with *Rht-B1b*, and therefore could intercept less scattered radiation in deep layers of leaves (Sinclair et al., 1992; Choudhury, 2000). According to this, the higher fraction of radiation transmitted through the spike layer to the leaves in cultivars with the *Rht-B1b* allele after anthesis, could explain the highest efficiency of this cultivars for biomass accumulation (Kemanian et al., 2004; Álvaro et al., 2008).

Moreover, the highest RUE of cultivars with the *Rht-B1b* allele during grain filling might be due not only to their superior sink capacity, as already postulated Calderini et al. (1997) and Muurinen and Peltonen-Sainio (2006), but also to their highest PAR interception by the spike, which contributes markedly to whole-plant photosynthesis. Therefore, it would be important to augment the sink capacity to also increase the RUE (Reynolds et al., 2000; Reynolds and Pfeiffer, 2000; Pfeiffer et al., 2000). However, the few works on durum wheat indicate that despite the new cultivars released from CIMMYT germplasm, the photosynthetic capacity of modern wheats has not appreciably increased (Waddington et al., 1987). Given that this fact has not limited yield increases in the past, we can conclude that photosynthesis per unit of leaf area is not the main limiting factor for further increases in grain yield of durum wheat as previously stated by Richards (1996). The lowest values of RUE in the pre-anthesis period for cultivars with the *Rht-B1b* allele could be due to the poor canopy architecture determined by the reduction in the length of the internodes (Calderini et al., 1996, Foulkes et al., 2001). Loomis and Amthor (1996) estimated a potential value of RUE in wheat of 3.8 g/MJ PAR. Since this value is still far from that reached by modern

cultivars, there is still room to increase grain yield by improving RUE, especially when enough genetic variability for the interception and use of radiation has been demonstrated (Green, 1989; Reynolds et al., 2000).

Our results also show that terminal drought tended to reduce RUE by preventing the utilisation of photosynthates for grain growth, as indicated by Wilson and Jamieson (1985), limiting final grain growth (Royo et al., 2006). The lowest RUE showed in this study during 2005 in comparison with the remaining years may be attributed to the higher mean temperature, radiation levels, and vapour-pressure deficit during grain filling this year (Goyné et al., 1993), since RUE appears to be strongly influenced by high atmospheric vapour-pressure deficit, which causes stomatal closure and a depressed photosynthetic rate (Muurinen and Peltonen-Sainio, 2006).

Even though RUE values before anthesis could have been under estimated due to the exclusion of roots from total biomass in this work, they appear to be as high as during grain filling. This agrees with Green (1989), who already postulated that the efficiency by which absorbed radiation could be converted into dry matter before anthesis is higher in cultivars with lower extinction coefficients.

Although previous work by Calderini et al. (1997) has indicated the great stability of CGR during the pre-anthesis period in cultivars released in different eras in Argentina, our results, however, show that cultivars without *Rht-B1b* alleles showed a major decrease in CGR and RUE after anthesis, probably associated with its reduced sink size (Calderini et al., 1997). Cultivars with *Rht-B1b* showed 24% higher CGR values during grain filling than cultivars without *Rht-B1b*. This result supports the hypothesis that sink strength could play an important role in maintaining green area in cereals during ripening caused by the demand for assimilates from a higher number of growing grains (Evans, 1993). In our work, grain yield of all cultivars was closely and linearly related to NAR during grain filling ( $r = 0.79$ ,  $P < 0.001$ ,  $n = 24$ ), suggesting the presence of a strong photosynthetic feedback mechanism in cultivars with a high sink capacity.

## Conclusions

The introduction of the *Rht-B1b* dwarfing gene during the 20th century in Mediterranean durum wheat did not change the fraction of absorbed radiation nor the extinction coefficient at anthesis, probably due to a compensatory effect within the green surfaces that did not greatly change the architecture of the crop. On the contrary, the introduction of the *Rht-B1b* dwarfing gene exerted a strong pleiotropic effect on radiation-use efficiency during both the vegetative and grain-filling periods. Thus, there has been a significant improvement in the efficiency of converting solar energy into biomass after anthesis for cultivars with *Rht-B1b* allele, possibly related to the higher sink capacity of those cultivars. This suggests a regulatory effect of the sink size on the efficiency of the green area to convert radiation into biomass during grain filling. Moreover, total chlorophyll content of flag leaf at anthesis (measured in SPAD units) is suggested as a good predictor of  $k$  under Mediterranean conditions

## Acknowledgements

This study was partially funded by CICYT under projects AGL-2002-04285 and AGL-2006-09226. Julio Isidro was recipient of a PhD grants from CICYT. The authors thank the staff of the DAP (Empresa pública de Andalucía) and F. Martínez for the management of field experiments.



## References

- Abbate, P.E., Andrade, F.H., Culot, J.P., Bindraban, P.S., 1997. Grain yield in wheat, effects of radiation during spike growth period. *Field Crops Res.* 54, 245-257.
- Álvaro, F., Isidro, J., Villegas, D., García del Moral, L.F., Royo, C., 2008. Breeding effect on grain filling, biomass partitioning and remobilization in Mediterranean durum wheat. *Agron. J.* 100, 361-370.
- Araus, J.L., Slafer, G.A., Reynolds, M.P., Royo, C., 2002. *Plant Breeding* and water relations in C3 cereals, What to breed for? *Ann. Bot.* 89, 925-940.
- Austin, R.B., Morgan, C.L., Ford, M.A., Blackwell, R.D., 1980. Contributions to grain yield from pre-anthesis assimilation in tall and dwarf barley phenotypes in two contrasting seasons. *Ann. Bot.* 45, 309-319.
- Bonhomme, R., 2000. Beware of comparing RUE values calculated from PAR vs solar radiation or absorbed vs. intercepted radiation. *Field Crops Res.* 68, 247-252.
- Calderini, D.F., Miralles, D.J., Sadras, V.O., 1996. Appearance and growth of individual leaves as affected by semidwarfism in isogenic lines of wheat. *Ann. Bot.* 77, 583-589.
- Calderini, D.F., Dreccer, M.F., Slafer, G.A., 1997. Consequences of breeding on biomass, radiation interception and radiation use efficiency in wheat. *Field Crops Res.* 52, 271-281.
- Choudhury, B.J. 2000. A sensitivity analysis of the radiation use efficiency for gross photosynthesis and net carbon accumulation wheat. *Agric. Forest Meteorol.* 101, 217-234.
- Cooper, J.P., 1970. Potential production and energy conversion in temperate and tropical grasses. *Hernage. Abstr.* 40, 1-13.
- Deckerd, E.L., Bush, R.H., Kofoid, K.D., 1985. Physiological aspects of spring wheat improvement. In, J.Hasper, L.Schrader and R.Howell (Editors), *Exploitation of Physiological and Genetic Variability to enhance crop productivity. American Society of Plant Physiologists, Rockland, MD, 45-54.*
- Duncan, W.G., 1971. Leaf angles, leaf area and canopy photosynthesis. *Crop Sci.* 11, 482-485.

- Evans, G.C., 1972. The quantitative analysis of plant growth. *Blackwell Scientific publications*. pp. 754-755.
- Evans, L.T., 1993. Crop, evolution, adaptation and Yield. *Cambridge Univ. Press*. Cambridge.
- Foulkes, M.J., Scott, R.K., Sylvester-Bradley, R., 2001. The ability of wheat cultivars to withstand drought in UK conditions, resource capture. *J. Agric. Sci., Camb.* 137, 1–16.
- Gale, M.D., Gregory, R.S., 1977. A rapid method for early generation selection of dwarf genotypes in wheat. *Euphytica*. 26, 733–738.
- Gallagher, J.N., and Biscoe, P.V., 1978. Radiation absorption, growth and yield of cereals. *J. Agric. Sci.* 91, 47-60.
- Gallo, K.P., Daughtry, C.S.T., 1986. Techniques for measuring intercepted and absorbed photosynthetically active radiation in corn canopies. *Agron. J.* 78, 752–756.
- Goyne, P.J., Milroy, S.P., Lilley, J.M., Hare, J.M., 1993. Radiation interception, radiation use efficiency and growth of barley cultivars. *Aust. J. Agric. Res.* 1351, 1366.
- Green, C.F., 1989. Genotypic differences in the growth of *Triticum aestivum* in relation to absorbed solar radiation. *Field Crops Res.* 19, 285-295.
- Gregory, P.J., Tennant, D., Belford, R.K., 1992. Root and shoot growth in relation to absorbed radiation. *Agric. Forest Meteorol.* 41, 207-248.
- Isidro, J., Royo, C., Rodríguez, R., Rharrabti, Y., Martos, V., Garcia del Moral, L.F., 2008. *Rht-B1b* effects on canopy architecture and use of photosynthetic active radiation in durum wheat under Mediterranean conditions. I. Leaf and canopy characteristics. (submitted).
- Jamieson, P.D., Martin, R.J., Francis, G.S., Wilson, D.R., 1995. Drought effect on biomass production and radiation-use efficiency in barley. *Field Crops Res.* 43, 77–86.
- Kemalian, A.R., Stöckle, C.O., Huggins, D.R., 2004. Variability of Barley radiation-use efficiency. *Crop Sci.* 44, 1662-1672.
- Loomis, R.S., Amthor, J.S., 1996. Limits to yield revisited. En, M. Reynolds (Eds.), *Increasing yield potential in wheat. Breaking the barriers*. CIMMYT Int.Symp. Ciano.Cd. Obregón, Mexico. CIMMYT, Mexico. D.F. 76-89.

- Meek, D.W., Hatfield, J.L., Howell, T.A., Idso, S.B., and Reginato, R.J., 1984. A generalized relationship between photosynthetically active radiation and solar radiation. *Agron. J.* 76, 939-945.
- Miralles, D.J., and Slafer, G.A., 1997. Radiation interception and radiation use efficiency of near-isogenic wheat lines with different height. *Euphytica.* 97, 201-208.
- Monteith, J.L., 1977. Climate and efficiency of crop production in Britain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B.* 281, 277-294.
- Muurinen, S., Peltonen-Sainio, P., 2006. Radiation-use efficiency of modern and old spring cereal cultivars and its response to nitrogen in northern growing conditions. *Field Crops Res.* 96, 366-373.
- O'Connell, M.G., O'Leary, G.J., Whitfield, D.M., Connor, D.J., 2004. Interception of photosynthetically active radiation and radiation-use efficiency of wheat, field pea and mustard in a semi-arid environment. *Field Crops Res.* 85, 111-124.
- Pfeiffer, W.H., Sayre, K.D., Reynolds, M.P., 2000. Enhancing genetic grain yield potential and yield stability in durum wheat. En, C.Royo, M.M. Nachit, N. di Fonzo, J.L.Araus (Eds). *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region.* New Challenges, Zaragoza, Spain, Options Mediterranéennes. Serie A. Séminaires Méditerranéens, No. 40, 83-93.
- Reynolds, M.P., Van Ginkel, M., Ribaut, J.M., 2000. Avenues for genetic modification of radiation use efficiency in wheat. *J. Exp. Botany.* 15, 459-473.
- Reynolds, M.P., Pfeiffer, W.H., 2000. Applying physiological strategies to improve yield potential. En, C.Royo, M.M Nachit, N. di Fonzo, J.L Araus (Eds.), *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region.* New challenges, Zaragoza, Spain, Options Mediterranéennes. Serie A. Séminaires Méditerranéens, No. 40, 95-103.
- Reynolds, M.P., Pellegrinesch, A., Skovmand, B., 2005. Sink-limitation to yield and biomass, a summary of some investigations in spring wheat. *Ann. Appl. Biol.* 146, 39-49.
- Richards, R.A., 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regul.* 20, 157-166.
- Royo, C., Villegas, D., Rharrabti, Y., Blanco, R., Martos, V., Garcia del Moral, L.F., 2006. Grain growth and yield formation of durum wheat grown at

- contracting latitudes and water regimes in a Mediterranean environment. *Cereal Res. Commun.* 34, 1021-1028.
- Royo, C., Álvaro, F., Martos, V., Ramdani, A., Isidro, J., Villegas, D., Garcia del Moral, L.F., 2007. Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica* .155, 259-270.
- Royo, C., Martos, V., Ramdani, A., Villegas, D., Rharrabti, Y., García del Moral, L.F., 2008. Changes in Yield and Carbon Isotope Discrimination of Italian and Spanish Durum Wheat during the 20th Century. *Agron. J.* 100, 352–360.
- Russell, G., Jarvis, P. G., Montheith, J.L., 1989. Absorption of radiation by canopies and stand growth In, Russell, G., Marshall, B., Jarvis, P.G. (Eds.), *Plant Canopies, Their Growth, Form and Function*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 21-40.
- Siddique, K.H.M., Beldford, R.K., Perry, M.W., Tennant, D., 1989. Growth, development and light interception of old and modern wheat cultivars in a Mediterranean environments. *Aust. J. Agric. Res.* 40, 473-487.
- Sinclair, T.R., Muchow, R.C., 1999. Radiation use efficiency. *Adv. Agron.* 65, 215–265.
- Sinclair, T.R., Shiraiwa, T., Hammer, L.G., 1992. Variation in crop radiation-use efficiency with increased diffuse radiation. *Crop Sci.* 32, 1281-1284.
- Singer, J.W., Sauer, T.J., Blaser, B.C., Meek, D.W., 2007. Radiation use efficiency in dual winter cereal-Forage Production Systems. *Agron. J.* 99, 1175-1179.
- Slafer, G.A., Andrade, F.H., 1989. Genetic improvement in bread wheat (*Triticum aestivum*) yield in Argentina. *Field Crops Res.* 21, 289-296.
- Slafer, G.A., Andrade, F.H., Satorre, E.H., 1990. Genetic improvements effects on pre-anthesis physiological attributes related to wheat grain yield. *Field Crops Res.* 23, 255-263.
- Trenbath, B.R., Angus, J.F., 1975. Leaf inclination and crop production. *Field Crop Abstr.* 28, 231-244.
- Yunusa, I.A.M., Siddique, K.H.M., Belford, R.K., Karimi, M.M., 1993. Effect of canopy structure on efficiency of radiation interception and use in spring wheat cultivars during the pre-anthesis period in a Mediterranean type environment. *Field Crops Res.* 35, 113-122.

- Waddington, S.R., Ransom, J.K., Yoshida, M., Ransom, J.K., 1987. The yield of durum wheats released in Mexico between 1960 and 1984. *J. Agric. Sci., Camb.* 108, 469-477.
- Wilson, D.R., Jamieson, P.D., 1985. Models of growth and water use of wheat in New Zealand. In, Day, W., Atkin, R.K. (Eds.), *Wheat Growth and Modelling*. Plenum Press London, pp. 139-151.
- Welbank, P.J., French, S.A.W, Witts, K.J., 1966. Dependence of yields of wheat varieties on their leaf area durations. *Ann. Bot.* 118, 291-299.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T., Konzak, C.F., 1974. A decimal code for the growth stage of cereals. *Weed Res.* 14, 415-421.





**Breeding effects on amino acid composition during kernel development of durum wheat grown under two different Mediterranean environments.**

Julio Isidro†, Fanny Álvaro §, Conxita Royo§, Ignacio Fernandez-Figares‡ and Luís F.

García del Moral \*,†

\* To whom correspondence should be addressed. Email: lfgm@ugr.es

† Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Granada.

§ IRTA, Cereal Breeding.

‡ CSIC, Spanish National Research Council.

*En página anterior:*

*Viales de aminoácidos en SpeedVac.*

*Arriba: Bloque calefactor en hidrólisis acida.*





---

**Breeding effects on amino acid composition during kernel development of durum wheat grown under two different Mediterranean environments.**

**Abstract**

Six cultivars representing the breeding efforts made in Spain during the 20<sup>th</sup> century were evaluated for accumulation of protein and amino acids during the grain filling in two Mediterranean contrasting environments (warmer and cooler). Breeding have reduced the protein and amino acid content in the kernel. The pattern of accumulation of amino acid was different between environments, showing a maximum threshold in Mediterranean conditions of 500 growing degree days to the amino acid accumulation, beyond of this point the amount of amino acid diminished as a result of those specific conditions (drought and water stresses). The rate of protein accumulation during the grain filling was a 25.2 % and 33.3 % higher in old than modern cultivars, in the southern and northern environment respectively. In general, there were not significant changes in the protein and amino acid duration during the grain filling, although modern cultivars showed the higher values. Future improvements should be leaded to augment nitrogen levels in the vegetative tissues will enlarge the protein reservoir available for translocation to the grain. The changes in the total composition of amino acids of the kernel as development progressed were consistent with an increase in the proportion of the fractions of the protein (metabolic and storage proteins).

Key words: Wheat, protein, amino acids, HPLC, kernel development,

## Introduccion

Cereals belong to the most important elements in the history of mankind. From the beginning of agriculture, cereals have been one the most important staple food in the world. In this sense, wheat is actually the third most widely grown crop in the world (<http://faostat.fao.org/default.aspx>) and is cultivated worldwide primarily as a human food, although animal feed and industrial uses are also important. In fact, rising concern about energy availability and the contribution of fossil fuel use to greenhouse gas emissions, has promoted an interest in plant-derived bio-fuels, and there is an increasing demand of wheat for production of bio ethanol (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

Grain-protein content and amino acid composition are the most important characteristics in determining the nutritional value of durum wheat for human and animal diets (Simmonds., 1989; Garcia del Moral et al., 2007). Protein nutritional quality is determined by the profile of essential amino acids, which cannot be synthesized by animals and hence must be provided by the diet. If only one of these amino acids is limiting, the others will be broken down and excreted resulting in poor growth of livestock and humans and loss of nitrogen in the diet. Lysine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tyrosine, threonine, tryptophan, valine, histidine and methionine, are essential amino acid where cysteine is often considered as essential amino acid as can only be synthesized from methionine (which is essential).

Wheat proteins are deficient in some essential amino acids, mainly in lysine (the first limiting), threonine, methionine and tryptophan, but they are rich in amino acids important in dough formation, i.e. glutamine and proline (Bénétrix and Autran., 2001). The environment (climate, soil, agronomic practices) exerts a strong influence on the quantity of protein content and amino acids composition in the kernel of wheat. This

effect is particularly marked under Mediterranean conditions, characterized by increased water deficit and thermal stress during grain filling, that could cause large fluctuations not only in grain yield but also in grain protein content and composition (García del Moral et al., 2007), with important effects on the rheological properties of dough (Ciuffi et al., 1995; Borghi et al., 1997) and on the quality of the end-product (Troccoli et al., 2000).

Grain proteins can be classified into three groups according to their function: storage proteins, metabolic proteins and structural proteins. Storage proteins are formed by gliadins and glutenins, whereas metabolic/structural proteins are compound by albumins and globulins according to Osborne (1907) classification. Wheat storage proteins are the main components of gluten, which is the main contributor to the rheological and breadmaking properties of wheat flour. Gluten proteins give dough its unique viscoelastic properties (Branlard et al., 2001).

The albumins and globulins have higher contents of basic amino acids, whereas the gliadins (prolamins) and glutenins have higher contents of proline and glutamine (Martín del Molino et al., 1988). During the first stages of wheat development, the proteins that are synthesized are first synthesized but from 12-15 days after anthesis the synthesis of gliadins and glutenins predominates (Martín del Molino et al., 1988; Bénétrix and Autran., 2001; Triboui et al., 2003). Therefore, the amino acid composition of wheat grain will vary during its development especially under conditions that limit both the rate and duration of grain filling, as it occurs in most Mediterranean environments (García del Moral et al., 2007).

The importance of providing humans and animals with quality proteins is reflected in the growing scientific and industrial interest in augmenting the nutritive value of the world protein sources (Beauregard and Hefford, 2006). In this sense,

improved methods such as high-performance liquid chromatography (HPLC) permit more rapid and sensitive, quantitative analysis of protein and prediction of quality (Triboi et al 2000).

The superiority of the modern wheat cultivars in terms of grain yield has been attributed largely to changes in the harvest index, with small or negligible increases in total biomass production (Brancout-Hulmel et al., 2003; Royo et al., 2007). Modern cultivars frequently present lower grain protein concentration than their predecessors (Ortiz-Monasterio et al., 1997; DeVita et al., 2007) suggesting a not desired reduction in grain quality because of a breeding for high yields, since normally the increase of grain yield is accompanied by the decrease of protein content by dilution effects (Triboi and Triboi-Blondel 2002; Martre et al., 2003).

Although the amino acid composition in the grain of bread wheat has been described in classical works, no information is available (that we are aware of) on the effects of breeding on amino acid composition of the grain of durum wheat grown under field conditions in Mediterranean environments. Therefore, the aim of this research was i) to study the effect that breeding caused on the composition of amino acid and its pattern of accumulation along the grain development in six durum wheat released at different periods during the 20<sup>th</sup> century in Mediterranean conditions and ii) to ascertain the differences in grain protein and amino acid composition in the grain caused by two different temperature and moisture conditions during grain filling.

## **Material and Methods**

*Experimental design.* During growing seasons 2004 and 2005, a total of 4 trials were conducted in two contrasting zones of Spain, Granada in the South, with mild winters and hot, dry summers, and Lleida in the North, which has a more continental

climate, with lower temperatures during winter and spring. Six Spanish durum wheat cultivars (*Triticum turgidum* L. var. durum), classified according to its period of release as old (Blanco Verdeal and Pinet, released before 1945), intermediate (Camacho and Mexa from 1950 to 1985) and modern (Ariesol and Senadur from 1988 to 2000), were selected to represent the germplasm released in Spain over the last century. Site description and agronomic details are shown in **Table 1**. Cultivars were sown at an adjusted rate of 350 and 400 germinable seeds m<sup>2</sup> in the southern and in the northern experiments respectively, in plots 10 m long by 1.2 m wide, with six rows 20 cm apart and managed as usual in each region to prevent lodging and diseases. The duration of grain filling was expressed in thermal time units and was calculated as the sum of daily average temperature [(maximum temperature + minimum temperature)/2] considering a temperature base of 9°C (Angus et al, 1981). Data have been represented as amino acid per milligram of dry matter, since much more important than the concentration of some amino acid in protein is the amino acid concentration in kernel dry weight, as the nutritional quality of cereal kernel improves with increasing concentrations of grain protein.

*Analytical methods.* Kernels from 3-4 main spikes were removed every 4-5 days, from five days after anthesis until physiological maturity and homogenized by grinding to obtain sufficient amount of sample for analysis. Total grain nitrogen was measured by means of the standard Kjeldhal method (AACC method 46-12). Percentage of protein was calculated after multiplying Kjeldhal nitrogen by 5.7 and was expressed on a dry weight basis. Amino acids were quantitatively analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC) using Waters Pico-Tag Method, which involves pre-column derivatization with phenylisothiocyanate (Cohen, et. al., 1989).

Table 1: Agronomic details and soil characteristics of the experimental environments.

Water Regime	South Granada 2004	South Granada 2005	North Lérida 2004	North Lérida 2005
<i>Soil characteristics:</i>				
Classification	Loamy Calcixerolic Xerochrept	Loamy Calcixerolic Xerochrept	Mesi Calcixerolic Xerochrept	Mesi Calcixerolic Xerochrept
Texture	Silty clay	Silty clay	Fine-loamy	Fine-loamy
pH	8.1	8.1	8.2	8.2
P (ppm)	33	25	40	40
K (ppm)	240	232	155	155
Organic matter (%)	2.1	2.0	2.50	2.50
<i>Agronomic practices:</i>				
Fertilizers (kg ha <sup>-1</sup> )N (seed bed + top dressing)	80	80	66+0 §	64+33
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	45	45	124	120
K <sub>2</sub> O	45	45	124	120
<i>Climatic conditions during vegetative growth</i>				
Seasonal rainfall+irrigation <sup>a</sup> (mm)	419+40	96+120	256+150	129+150
Maximum temperature (°C) <sup>a</sup>	17.0	17.6	13.5	13.5
Minimum temperature (°C) <sup>a</sup>	4.3	2.5	3.6	2.1
Mean temperature (°C) <sup>a</sup>	10.6	10.1	8.6	7.8
<i>Climatic conditions during grain filling</i>				
Rainfall (mm) <sup>b</sup>	81.4	7.6	64	53
Maximum Temperatures (°C) <sup>b</sup>	28.9	34.0	28.9	29.1
Minimum temperature (°C) <sup>b</sup>	13.3	15.3	13.8	13.6
Mean Temperature (°C) <sup>b</sup>	21.1	24.6	21.1	21.0

<sup>a</sup> i.e., Mean values from sowing to anthesis.

<sup>b</sup> i.e., Mean values from anthesis to physiological maturity.

§ no top dressing was applied in 2004 in Lleida.

Protein was hydrolyzed in 6 N hydrochloric acid + 1% phenol in sealed evacuated tubes at 110 °C for 24 hr. In order to prevent for losses of cysteine and methionine during hydrolysis, these sulphur-containing amino acids were converted into

cysteic acid and methionine sulfone by peroxidation with performic acid. Tryptopahn was not determined.  $\alpha$ -Aminoadipic acid was used as an internal standard. The amino acid composition was expressed as milligram of amino acid per kernel. As most of the glutamine and asparagine in the flour protein is converted into glutamic acid and aspartic acid respectively during hydrolysis, the data for glutamic plus glutamic acid and for asparagine and aspartic acid in all hydrolyzed samples have been reported as glutamine and aspartic acid, respectively. Average single kernel weight for mature grain was determined as mean weight of three sets of 100 kernels per plot. Although we analyzed and give information for 17 amino acids, only 10 of them, including six essential amino acids were selected for a more detailed study of duration and rate of accumulation during grain filling.

*Rate and duration of protein content and amino acid accumulation.* The coefficients of the protein content and amino acid accumulation curves were determined for each plot and were fitted to the logistic curve proposed by Darroch and Baker (1990) for grain dry matter accumulation during grain filling, using the Statgraphics plus 5.1 package. Duration of amino acid accumulation was considered to be the time in accumulated growing degree-days (GDD) required to reach 0.95 of final protein and amino acid accumulation, using a temperature of 9°C (Angus et al., 1981) and was derived for the curve parameters. The maximum rate of amino acid accumulation (AAR) was mathematically determined form the curve parameters, as described in Royo and Blanco (1999) for grain dry matter, and was expressed as mg of amino acid 100 GDD<sup>1</sup>.

*Statistical analyses.* Analyses of variance were calculated for amino acid content, grain yield, protein content, single kernel weight, and coefficients of amino



acid accumulation, and were performed across the two years. Except blocks that were nested to year, all factors were regarded as fixed effects. Adjusted means were compared by Tukey's Studentized Range test at  $P = 0.05$ . All the analyses were performed with the Statgraphic plus 5.1 package.

## Results

The environment conditions presented in **Table 1** show the characteristics of both environments. Thus, the warm climate conditions were dryer and warmer than the cool ones, especially during 2005, in which the maximum temperature during grain filling was in average 4.9°C higher than in the cooler ones. Rain between anthesis and physiological maturity was only 7.6 mm in the warmer environment in comparison with the 53 mm of the cooler one (**Table 1**). Thus, all traits studied were significantly influenced by water availability and temperatures during grain filling.

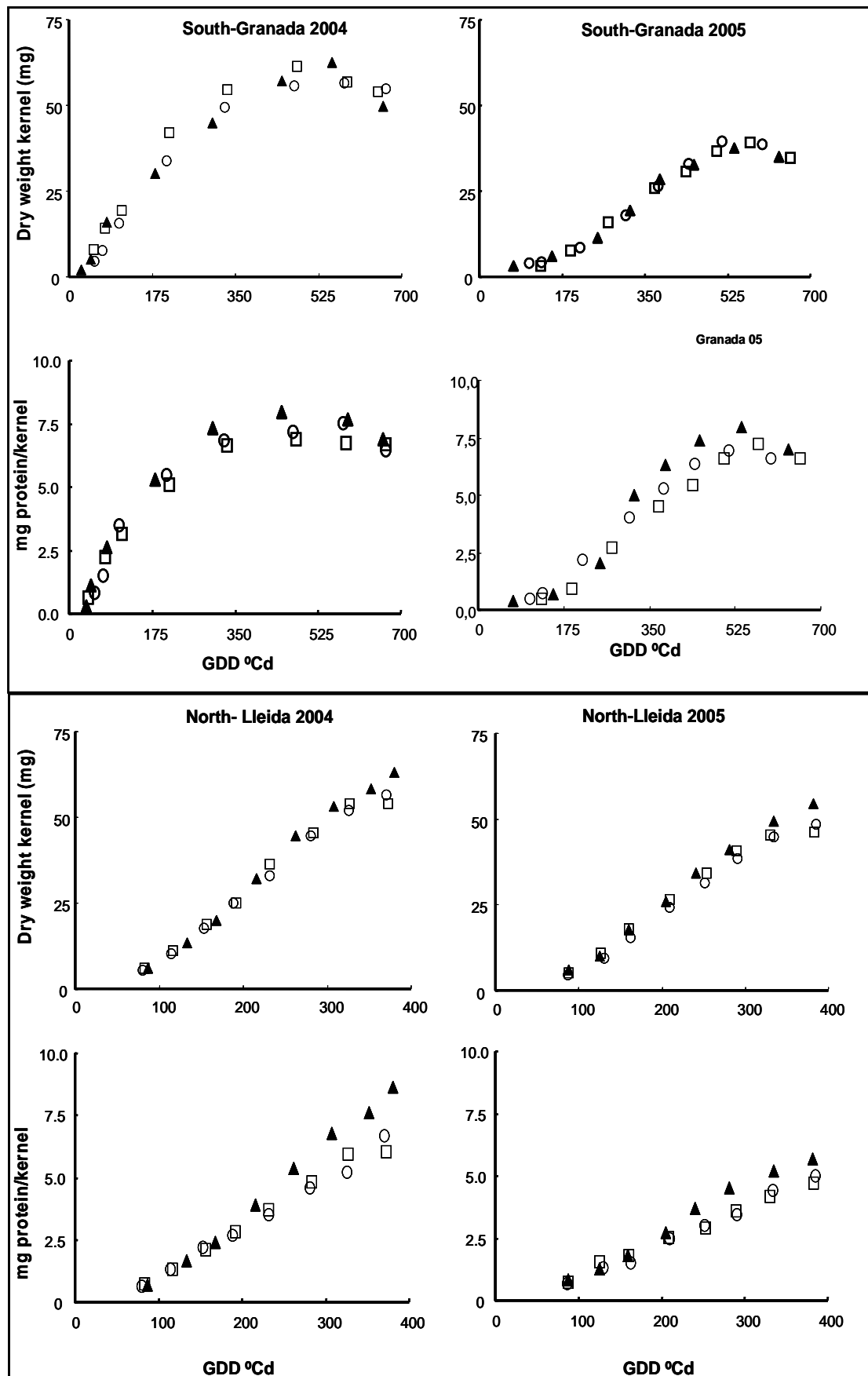
Analyses of variance for the duration and the rate of accumulation of amino acids during the grain filling period revealed that these traits were affected mainly by the year, site, period of cultivar release and the interaction between year and site (data not shown). Whereas year, site and the interaction year  $\times$  site affected significantly both traits, the latter did not show significant differences for the duration of proline, arginine and lysine and the rate of accumulation of protein.

*Evolution of dry weight and protein content during grain filling.* The evolution of the grain dry weight and protein content during the grain filling is presented in **Figure 1**. Our results showed a different pattern of grain filling, dry weight and protein content in each environment. Thus, in the warmer experiments the thermal time needed

to reach physiological maturity was 260 GDD higher than in the cooler. In addition, the pattern of accumulation of dry weight and protein content between environments was different. Under warmer and drier conditions dry weight and protein accumulation in the kernel augmented during the first 500 GDD approximately, diminishing later until the physiological maturity. Nevertheless, under cooler and wetter conditions during grain filling, both dry weight and protein accumulation were lineal until physiological maturity, which was reached approximately at 400 GDD. The highest values for all traits were obtained in 2004 for both environments, probably because of a greater rainfall along the whole growth of the crop (**Table 1**).

A similar pattern in the evolution of protein accumulation was observed for both environments and all cultivars. Thus, old cultivars presented a higher quantity of protein per kernel with respect to the others cultivars. These differences were more remarkable after 200 GDD and 350 GDD for the cooler and warmer environments, respectively. In addition, in both years, in the warmer experiments from 500 GDD to the end of grain filling the dry matter and protein accumulation decreased. Moreover, the pattern of dry matter accumulation did not show differences during the grain filling.

Figure 1- Dry weight kernel and grain protein content along the grain filling in two constraints environments during two years of study. Each point represents means of three replicates for old ( $\Delta$ ), intermediate (O) and modern ( $\square$ ) sets of cultivars growth in two environments. GDD represent growing degree days.



*Pattern of amino acid accumulation during the grain filling.* The pattern of amino acid accumulation in both environments (**Figure 2**) followed the same profile than protein. That is the accumulation of amino acid during grain filling augmented with thermal time until 500 GDD approximately, in the warmer experiment and subsequently showed an inflexion point in the accumulation curve. In cooler environment, there was a linear relationship for amino acid accumulation with thermal time during the grain filling and the results not showed any reduction, probably due to the fact that thermal time did not exceed the threshold of 400 GDD in any years of study in this environment.

Our results showed an increase in the amino acid content during the grain filling in both environments and differences among periods of release were noted. Thus, the modern and intermediate cultivars showed higher values than old ones during the first 200 GDD and 350 GDD in cooler and warmer experiments respectively. After these GDD, both in the north and south experiments an opposite tendency was observed, and the old cultivars had the highest amino acid content from these GDD to maturity. Amino acid concentration augmented in parallel with the protein content in the kernel. Thus, in general, glutamic acid, proline, aspartic acid, leucine, alanine and arginine were the amino acid that presented higher concentration during the grain filling, followed by valine, serine, phenylalanine, lysine, isoleucine, glycine, threonine, tyrosine, histidine, methionine and cysteine.

Figure 1- Amino acid accumulation along the grain filling in two constraints environments. Each point represents means of three replicates for old ( $\Delta$ ), intermediate (O) and modern ( $\square$ ) sets of cultivars growth in two environments.

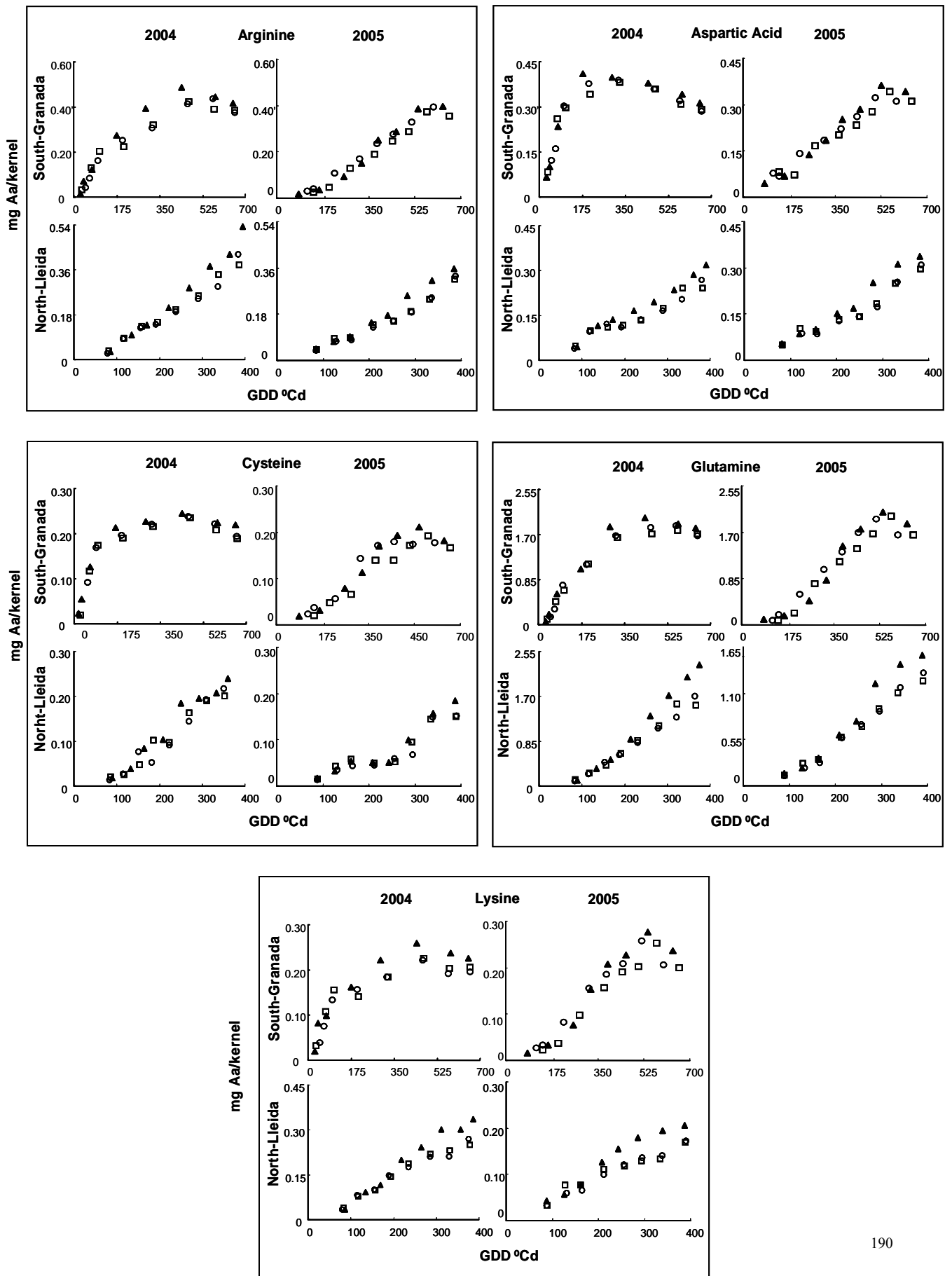
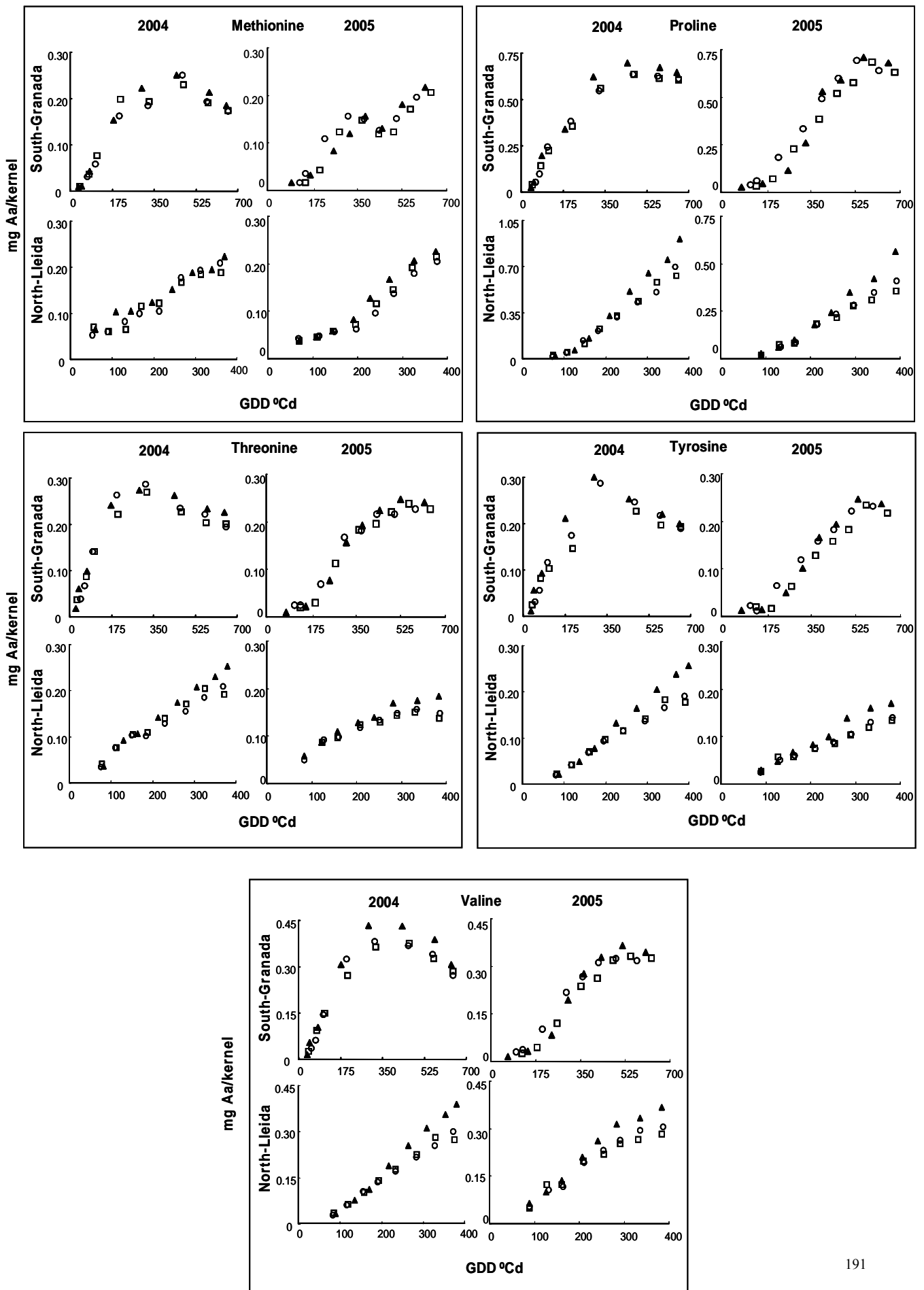


Figure 2 continuing.



Amino acid accumulation in mature kernel and relative percentage of each amino acid during the grain filling. **Table 2** shows the mean values of grain yield, single kernel weight at ripening, protein content and amino acid composition for period of release, site and year, at physiological maturity. Grain yield varied significantly from 4187 kg ha<sup>-1</sup> in old cultivars to 5134 kg ha<sup>-1</sup> in modern ones. In addition, grain yield was a 55.2% lower in the warmer than in the cooler environment and a 29% higher in 2004 than in 2005 (**Table 2**). Single kernel weight varied from 46.3 mg in old cultivars to 44.2 in modern ones, hence did not show significant differences between periods of release. However, the results for SKW showed a remarkable variation between environments and years of study. So the cooler environment showed an 18.6% higher single kernel weight than the warmer and a 23% of variation between years of study (deduced from **Table 2**). The grain protein content showed a marked variation between periods of release, site and years of study, varying significantly from old to modern cultivars. With respect to the amino acid content in mature kernels, the period of release seems to exert an important effect on the amino acid content, as it was observed a diminution from old to modern cultivars in all of the amino acid, except methionine that not changed. The highest content was observed for glutamic acid and proline and the lowest for cysteine and methionine. Moreover, in general, the highest amino acid values were observed in the warmer environment.

*Duration and rate of protein and amino acid accumulation.* The duration of the protein and amino acid accumulation in the grain is showed in **Table 3**. In accordance with our results, the highest duration for protein accumulation (PRD) was in intermediate cultivars. In addition, modern cultivars showed higher values of PRD (12.0%) than old ones for both environments.

North environment and the year 2005 need higher duration to reach the maximum accumulation of protein in the grain. (With respect to the rate of protein accumulation (PRR) (**Table 4**) modern cultivars showed the lowest values for the protein accumulation in both environments (-29.2%). The southern environment (19.6%) and the year 2004 (27.0%) showed the highest values in PRR when compared site and year, respectively (deduced from **Table 4**).

Our results also showed that the duration of the amino acid accumulation during the grain filling showed no changes for any amino in both environments, except lysine in north environment (**Table 3**). In addition, modern and intermediate cultivars, showed the higher duration in the accumulation of amino acid during grain filling, as well as, northern environment and the year 2005. In according to the maximum rate of accumulation of amino acid (AAR), the **Table 4** showed that in general, all the old cultivars presented the highest values of AAR during the grain filling in both environments, with the exception of aspartic acid and valine values in the northern environment. So, glutamine, lysine, proline and tyrosine were a 25.2 %, 30.4%, 36.1 % and 31.7 % higher in old than modern cultivars as average between environments (deduced from **Table 4**). Moreover, the southern environment and the year 2005 showed the highest values in AAR.

*Amino acid evolution during grain filling.* The relative proportion (i.e., the percentage of each amino acid in relation to total amino acid content) varied with the progress of kernel development. Thus, the relative amounts of the aspartic acid, threonine, alanine, lysine and arginine diminished in both environments (Table 5 and 6).



**Table 2.** Cultivars means for grain yield, single kernel weight, protein content, and amino acid composition (mg Aa/kernel) in mature grain of two contrasting regimes in the last century.

<i>Period</i>	Yield <sup>b</sup>	SKW	PC	Ala	Arg	Asx <sup>c</sup>	Cys	Glx <sup>d</sup>	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
Old	4187 c	46.3 a	7.2 a	0.27 a	0.43 a	0.32 a	0.20 a	1.92 a	0.26 a	0.22 a	0.25 a	0.49 a	0.26 a	0.19 a	0.34 a	0.71 a	0.32 a	0.22 a	0.21 a	0.31 a
Medium	4665 b	46.4 a	6.2 b	0.24 b	0.38 b	0.29 b	0.18 ab	1.62 b	0.23 b	0.19 b	0.21 ab	0.41 b	0.22 ab	0.18 a	0.28 b	0.60 b	0.28 b	0.19 ab	0.18 b	0.26 b
Modern	5134 a	44.2 a	5.9 b	0.23 b	0.36 b	0.28 b	0.17 b	1.57 b	0.22 b	0.18 b	0.20 b	0.40 b	0.21 b	0.17 a	0.28 b	0.56 b	0.27 b	0.18 b	0.17 b	0.26 b
<i>Site</i>	Yield <sup>b</sup>	SKW	PC	Ala	Arg	Asx <sup>c</sup>	Cys	Glx <sup>d</sup>	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
South-Granada	2881 b	40.9 b	6.7 a	0.27 a	0.40 a	0.30 a	0.19 a	1.80 a	0.26 a	0.21 a	0.22 a	0.43 a	0.25 a	0.20 a	0.30 a	0.64 a	0.31 a	0.21 a	0.21 a	0.30 a
North-Lleida	6443 a	50.3 a	6.1 b	0.22 b	0.39 a	0.30 a	0.17 b	1.61 b	0.22 b	0.19 b	0.21 a	0.43 a	0.25 b	0.17 b	0.30 a	0.61 a	0.27 b	0.18 b	0.17 b	0.26 b
<i>Year</i>	Yield <sup>b</sup>	SKW	PC	Ala	Arg	Asx <sup>c</sup>	Cys	Glx <sup>d</sup>	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
2004	5450 a	51.5 a	6.8 a	0.25 a	0.43 a	0.29 b	0.21 a	1.83 a	0.25 a	0.23 a	0.24 a	0.49 a	0.26 a	0.13 b	0.34 a	0.69 a	0.32 a	0.21 a	0.20 a	0.31 a
2005	3874 b	39.7 b	6.1 b	0.24 a	0.36 b	0.31 a	0.15 b	1.58 b	0.22 b	0.17 b	0.19 a	0.37 b	0.20 b	0.23 a	0.26 b	0.55 b	0.26 b	0.18 b	0.18 b	0.26 b

a Yield: grain yield (kg ha<sup>-1</sup>); SKW: single kernel weight (mg); PC: protein content (%); Ala: alanine; Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Glu: glutamine; Gly: glycine; His: histidine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Pro: proline; Ser: serine; Thr: threonine; Tyr: tyrosine; Val: valine; S.E.: standard error of means.

b Values followed by the same letter in a column are not significantly different according to Tukey's test (p<0.05).

c Asx: aspartic acid + asparagine d Glx: glutamic acid + glutamine.

**Table 3:** Means of protein and amino acid curve coefficients (D, grain filling duration) during the grain filling. Data are means of four experiments. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level.

		Duration (GDD)											
		Protein	Arg	Asx <sup>b</sup>	Cys	Glx <sup>c</sup>	Lys	Met	Pro	Thr	Tyr	Val	
Site and Period													
South-Granada	Old	382 a	502 a	459 a	386 b	445 a	411 a	438 a	429 a	312 a	411 a	394 a	
	Medium	447 a	663 a	450 a	332 b	426 a	424 a	413 a	461 a	343 a	441 a	399 a	
	Modern	439 a	600 a	497 a	416 a	460 a	459 a	476 a	480 a	342 a	470 a	416 a	
North-Lleida	Old	427 a	518 b	510 a	477 a	462 a	361 b	529 a	485 a	381 a	428 a	409 a	
	Méduim	464 a	557 ab	562 a	505 a	511 a	429 a	495 a	468 a	418 a	498 a	432 a	
	Modern	466 a	561 a	532 a	468 a	446 a	447 a	494 a	427 a	367 a	458 a	413 a	
Site													
South-Granada		422 a	588 a	468 b	378 b	444 b	431 a	443 b	457 a	336 b	441 a	403 a	
North-Lleida		452 a	545 a	535 a	483 a	473 a	413 a	506 a	460 a	388 a	461 a	418 a	
Year													
2004		372 b	512 b	445 b	355 b	419 b	385 b	432 b	422 b	326 b	361 b	373 b	
2005		503 a	622 a	559 a	507 a	497 a	459 a	516 a	494 a	399 a	540 a	448 a	

<sup>a</sup> Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Glu: glutamine; Lys: lysine; Met: methionine; Pro: proline; Thr: threonine; Tyr: tyrosine; Val: valine; S.E.: standard error of means.

<sup>b</sup> Asx: aspartic acid + asparagine <sup>c</sup> Glx: glutamic acid + glutamine.

In contrast, the relative amounts of glutamic acid, proline and phenylalanine increased. Serine, leucine, isoleucine and histidine had small variations during kernel filling. From 450-500 GDD for warmer conditions (**Table 5**) and 300 GDD for the cooler environment (**Table 6**), the amino acid composition of the kernel remained practically constant, whereas in the mature kernel the relative amounts of histidine, glycine, methionine and in particular arginine augmented. Glutamic acid was the most abundant throughout the development of the kernel in both environments, followed by proline, aspartate and alanine in the warmer one (**Table 5**) and by alanine, proline and aspartate in the cooler environment (**Table 6**). Methionine and cysteine showed the lowest values in both environments.

## **Discussion**

It is well known that environmental factors exert a great influence on yield, protein content and the amino acid composition of wheat kernel. In this study, we observed a different pattern of accumulation of dry matter and amino acid as a consequence of environmental factors during the two years of study.

The most important difference between environments was in the thermal time required to reach physiological maturity, higher in warmer than in cooler conditions, which could explain some of the differences encountered for traits studied in this work. With respect to the differences in the pattern of accumulation of dry matter and grain protein (and in turn in the accumulation of amino acids) during grain filling, our results are in agreement with Spiertz (1977) who reported that the temperature over a certain threshold play a negative role during kernel development.

Indeed, warmer experiment showed a diminution in dry matter and grain protein during grain filling in both years, whereas this did not happen in cooler ones. In warmer experiments, during grain filling the mean temperature usually exceeded 25°C, with maximum temperature over 30-35°C.

As a result, stomata were probably closed during a great part of the day and the respiration level augmented in the kernels, thus high temperatures during the grain filling induce the reduction in starch accumulation mainly due to the reduced activity of the soluble starch synthase (Keeling et al, 1993) leading to a lower conversion of sucrose to starch (Bhullar and Jenner, 1985; Jenner, 1994). However, little is known about the cumulative effect of this high temperature on protein and amino acid accumulation in durum wheat. A plausible explication on the diminishing of the protein and amino acid accumulation at the end of the grain filling in warmer experiments, may be that the synthesis of metabolic and reserve proteins is largely replaced by heat shock proteins when temperatures rise considerably (Blumenthal et al., 1990; Hendershot et al., 1992; Stone and Nicolas, 1998) or also because that heat shock proteins could causes a reduction in the size-distribution of the glutenin polymer protein (Corbellini et al., 1997; Gibson et al., 1998) or by chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat (Basha et al., 2004), however ,although evidence suggests that those protein is involved in plant thermotolerance when temperature increase considerably (Vierling, 1991), further investigation is necessary.

Thus, cooler experiments did not show this decrease because the temperature did not reach very high values. In addition, our results have shown that the accumulation of protein and amino acids during grain filling was different for the periods of release.

**Table 4:** Means of protein and amino acid curve coefficients (R, maximum rate of accumulation) during the grain filling. Data are means of four experiments. Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% probability level.

		Rate (mg/100GDD)										
		Protein	Arg	Asx <sup>b</sup>	Cys	Glx <sup>c</sup>	Lys	Met	Pro	Thr	Tyr	Val
Site and Period												
South-Granada	Old	3.44 a	0.14 a	0.15 a	0.02 ab	0.83 a	0.10 a	0.10 a	0.31 a	0.17 a	0.13 a	0.20 a
	Medium	2.83 ab	0.11 b	0.10 b	0.03 a	0.72 ab	0.09 ab	0.10 a	0.23 b	0.16 a	0.11 ab	0.20 a
	Modern	2.57 b	0.09 b	0.09 b	0.02 b	0.64 b	0.07 b	0.08 a	0.21 b	0.14 a	0.08 b	0.14 b
North-Lleida	Old	0.30 a	0.18 ab	0.12 a	0.08 a	0.87 a	0.13 a	0.08 a	0.40 a	0.09 a	0.08 a	0.10 b
	Médium	0.20 b	0.20 a	0.13 a	0.07 b	0.62 b	0.08 b	0.07 a	0.25 b	0.06 c	0.06 b	0.10 b
	Modern	0.20 b	0.14 b	0.13 a	0.07 b	0.63 b	0.09 b	0.07 a	0.24 b	0.07 b	0.06 b	0.13 a
Site												
South-Granada		2.95 a	0.12 b	0.11 a	0.06 b	0.73 a	0.09 a	0.09 a	0.29 a	0.15 a	0.11 a	0.18 a
North-Lleida		2.37 b	0.17 a	0.13 a	0.08 a	0.71 a	0.10 a	0.07 b	0.25 b	0.07 b	0.07 b	0.11 b
Year												
2004		3.07 a	0.14 a	0.13 a	0.07 a	0.77 a	0.11 a	0.08 a	0.29 a	0.15 a	0.11 a	0.18 a
2005		2.24 b	0.15 a	0.11 b	0.03 b	0.68 b	0.08 b	0.08 a	0.25 b	0.08 b	0.06 b	0.10 b

Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Glu: glutamine; Lys: lysine; Met: methionine; Pro: proline; Thr: threonine; Tyr: tyrosine; Val: valine; S.E.: standard error of means.

b Asx: aspartic acid + asparagine c Glx: glutamic acid + glutamine.

**Table 5:** Means and changes in total amino acid composition of wheat kernel during grain filling along two years of study in the south environment. Ala: alanine; Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Glu: glutamine; Gly: glycine; His: histidine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Pro: proline; Ser: serine; Thr: threonine; Tyr: tyrosine; Val: valine; S.E.: standard error of means. <sup>a</sup> Asx: aspartic acid + asparagine <sup>b</sup> Glx: glutamic acid + glutamine. GDD: Growing degree days. S: Sampling.

Site	Period	Sampling	GDD	Ala	Arg	Asx <sup>a</sup>	Cys	Glx <sup>b</sup>	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
<b>South Granada</b>																				
	<b>Old</b>	1	53.5	6,4	5,9	12,7	5,2	22,1	3,8	3,1	3,3	5,8	5,2	3,0	3,3	5,2	4,2	3,2	2,9	4,6
		2	99.8	7,4	6,4	8,5	4,4	21,4	4,4	3,6	3,5	6,4	6,4	2,7	3,6	4,7	4,6	4,1	3,2	4,8
		3	165.1	6,2	5,3	8,2	4,7	24,5	4,2	3,1	3,5	6,6	4,3	3,2	3,9	6,8	4,1	3,9	3,1	4,3
		4	249.7	6,2	4,9	6,4	5,8	22,6	4,4	2,7	4,0	6,7	3,9	3,3	4,4	6,9	4,5	4,4	3,4	5,5
		5	342.4	4,6	5,1	4,9	4,7	26,4	3,8	2,9	3,8	6,6	3,5	3,0	4,8	9,0	4,6	3,5	3,4	5,2
		6	450.8	4,5	5,6	4,7	3,2	28,0	3,8	3,1	3,7	6,9	3,6	2,7	5,0	9,2	4,5	3,4	3,1	5,2
		7	563.8	4,3	5,9	4,6	3,1	28,2	3,8	3,2	3,5	6,6	3,7	2,8	4,7	9,5	4,8	3,2	3,1	5,0
		8	647.8	4,2	6,1	4,6	3,0	27,9	3,9	3,2	3,5	6,8	3,5	3,1	4,6	9,8	4,8	3,3	3,1	4,6
	<b>Medium</b>	1	79.6	6,6	6,1	13,7	4,1	17,1	4,2	3,0	3,6	6,7	5,4	1,7	3,9	5,9	4,9	4,4	3,7	5,2
		2	101.6	6,4	6,0	9,1	5,5	22,3	4,1	2,9	3,4	6,4	5,0	3,3	3,9	6,6	4,5	3,7	2,4	4,6
		3	159.1	5,7	5,2	7,7	3,9	25,0	4,1	2,9	3,4	6,8	4,1	3,5	4,0	7,7	4,7	3,6	3,1	4,5
		4	257.8	5,3	4,6	5,7	5,8	23,9	4,3	2,8	4,0	6,8	3,5	3,6	4,6	7,6	4,6	4,4	3,0	5,5
		5	352.8	4,9	4,8	5,0	3,4	26,6	3,9	2,9	4,0	7,0	3,3	2,9	4,9	8,9	4,7	3,8	3,6	5,3
		6	457.8	4,4	5,4	4,7	3,3	28,0	3,7	3,1	3,8	6,9	3,4	2,9	4,9	9,5	4,5	3,4	3,2	5,0
		7	546.0	4,3	5,8	4,7	3,0	28,8	3,8	3,0	3,6	6,8	3,4	2,6	4,6	9,7	4,9	3,1	3,1	4,7
		8	633.1	4,2	6,3	4,7	3,0	27,4	4,1	3,2	3,4	6,7	3,3	3,0	4,6	10,0	4,9	3,2	3,3	4,5
	<b>Modern</b>	1	84.9	7,1	6,2	13,8	3,3	17,4	4,1	3,3	3,6	6,3	5,4	2,1	3,7	5,3	4,8	4,7	3,8	5,1
		2	134.3	6,7	5,9	9,4	5,2	22,5	4,3	2,6	3,2	6,4	4,8	3,1	3,9	6,5	4,7	3,5	2,6	4,5
		3	191.8	6,0	5,9	7,6	3,9	25,0	4,1	2,9	3,3	6,8	4,4	3,6	4,2	7,6	3,4	4,2	2,7	4,5
		4	290.5	5,5	4,6	5,7	3,6	25,8	4,3	2,9	3,9	6,9	3,4	3,8	4,6	8,0	4,7	4,2	2,9	5,3
		5	385.4	4,9	4,9	5,0	3,0	26,7	3,9	2,9	3,9	7,1	3,4	2,7	5,0	9,2	4,7	3,8	3,7	5,1
		6	490.5	4,4	5,7	4,9	3,2	27,4	3,8	3,1	3,6	6,9	3,5	2,8	4,8	9,5	4,7	3,4	3,1	5,2
		7	578.7	4,3	5,8	4,7	3,0	28,8	3,8	3,2	3,4	6,6	3,6	2,8	4,7	9,6	4,8	3,1	3,1	4,7
		8	663.2	4,2	6,0	4,7	2,9	27,6	4,1	3,2	3,5	6,8	3,3	3,1	4,8	9,8	4,9	3,3	3,2	4,6

**Table 6:** Means and changes in total amino acid composition of wheat kernel during grain filling along two years of study in the north environment. Ala: alanine; Arg: arginine; Asp: aspartic acid; Cys: cysteine; Glu: glutamine; Gly: glycine; His: histidine; Ile: isoleucine; Leu: leucine; Lys: lysine; Met: methionine; Phe: phenylalanine; Pro: proline; Ser: serine; Thr: threonine; Tyr: tyrosine; Val: valine; S.E.: standard error of means. <sup>a</sup> Asx: aspartic acid + asparagine <sup>b</sup> Glx: glutamic acid + glutamine. GDD: Growing degree days. S: Sampling.

Site	Period	Sampling	GDD	Ala	Arg	Asx <sup>a</sup>	Cys	Glx <sup>b</sup>	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Val
<b>North Lleida</b>																				
	<b>Old</b>	1	87.4	8,2	6,2	7,1	2,1	19,4	4,6	3,3	4,0	6,9	6,0	3,9	4,2	5,0	4,8	5,7	3,3	5,3
		2	129.5	8,3	6,6	7,5	2,3	19,6	4,8	3,3	3,8	6,8	5,8	2,8	3,8	5,2	4,8	6,0	3,4	5,3
		3	164.0	7,6	6,0	6,1	3,1	20,7	5,2	3,0	3,8	7,2	5,2	2,3	4,4	6,7	4,8	5,2	3,5	5,1
		4	210.2	6,6	5,7	5,3	2,2	23,6	4,5	2,9	4,1	7,8	5,4	1,3	5,2	8,1	4,7	4,2	3,3	5,2
		5	251.5	5,7	5,6	4,7	2,4	24,9	4,0	2,8	4,2	7,9	5,1	1,3	5,6	9,1	4,6	3,7	3,1	5,2
		6	294.6	4,8	5,8	4,8	2,4	27,2	3,8	2,9	3,9	7,5	4,7	1,6	5,4	9,3	4,4	3,5	3,1	4,8
		7	343.2	4,2	5,9	5,1	2,7	28,0	3,6	3,0	3,7	7,0	4,2	2,7	5,1	9,4	4,4	3,2	3,1	4,6
		8	381.0	3,7	6,3	4,9	2,8	27,1	3,6	3,2	3,7	7,3	4,0	3,0	5,2	10,6	4,4	3,0	3,0	4,4
	<b>Medium</b>	1	83.7	7,9	6,6	7,4	2,0	19,1	4,6	3,5	4,0	7,0	6,4	3,5	4,1	4,8	4,5	6,0	3,4	5,4
		2	122.3	8,3	6,9	7,6	2,2	18,6	4,8	3,4	3,9	7,0	6,2	1,9	4,0	5,2	4,7	6,4	3,5	5,4
		3	158.1	7,7	6,1	6,1	3,0	20,4	5,1	3,2	3,8	7,2	5,0	2,0	4,4	6,7	4,9	5,5	3,6	5,2
		4	198.7	6,5	5,7	5,0	1,8	23,6	4,4	2,9	4,1	8,1	5,3	1,3	5,3	8,4	4,7	4,3	3,3	5,4
		5	241.9	5,6	5,7	4,6	2,2	24,9	4,0	2,9	4,0	8,1	5,0	1,4	5,5	9,1	4,6	4,1	3,2	5,2
		6	285.7	5,3	5,7	4,6	2,5	25,6	3,9	2,8	4,0	7,9	4,7	1,6	5,5	9,4	4,6	3,8	3,1	5,1
		7	329.8	4,7	5,8	5,1	3,3	26,3	3,6	2,9	3,7	7,3	4,0	3,1	5,0	9,3	4,5	3,5	3,1	4,8
		8	377.5	3,8	6,7	5,4	3,0	26,9	3,7	3,3	3,4	7,0	4,1	3,4	4,7	9,9	4,5	3,1	2,9	4,4
	<b>Modern</b>	1	85.4	8,1	6,6	7,6	2,2	19,3	4,7	3,6	4,0	7,0	6,2	3,8	4,0	4,5	4,3	5,5	3,5	5,1
		2	121.2	8,4	6,8	7,6	2,2	19,3	4,8	3,4	3,8	6,9	6,2	2,6	4,0	5,2	4,6	5,6	3,4	5,3
		3	158.4	8,0	6,5	6,1	2,8	20,3	5,0	3,3	3,8	7,3	5,3	2,0	4,4	6,1	5,0	5,4	3,5	5,2
		4	200.3	6,6	5,7	5,0	2,6	23,0	4,4	2,9	4,0	8,0	5,2	1,5	5,3	8,3	4,7	4,3	3,2	5,3
		5	242.7	5,9	5,7	4,6	2,1	25,0	4,1	2,8	4,0	7,9	5,1	1,4	5,4	8,9	4,7	4,1	3,1	5,2
		6	286.2	5,3	5,7	4,7	3,0	25,8	3,7	2,9	3,8	7,7	4,6	2,2	5,2	9,1	4,6	3,8	3,0	4,9
		7	328.6	4,6	6,0	5,3	3,2	27,2	3,6	3,0	3,5	7,0	3,9	3,3	4,7	9,1	4,5	3,5	3,0	4,6
		8	377.8	3,8	6,8	5,4	3,1	26,7	3,6	3,3	3,4	7,0	4,2	3,2	4,8	9,6	4,5	3,1	3,0	4,4

During the first 175 GDD under cooler and 250 GDD under warmer conditions, approximately, the intermediate and modern cultivars presented similar or higher values of grain protein and amino acid content. From these GDDs to the end of kernel development, however, old cultivars presented the highest values for these traits. In this sense, two reasons may explain the differences observed between cultivars bred along the 20<sup>th</sup> century.

Firstly, breeding have induced a forward in the time to anthesis (Álvaro et al., 2008), *i.e.* modern cultivars reach anthesis before that old ones, thereby they could start filling kernels before old cultivars starts with their kernel development, hence they could start to remobilize assimilates before old cultivars. Secondly, Brancourt-Hulmel et al., (2003) have found in modern French cultivars presented a major efficiency in nitrogen used than their precedents and Álvaro et al., (2008) has found that dry matter translocation efficiency increased a 20% in modern cultivars compared to the old ones. That is, modern cultivars tended to translocate more pre-anthesis assimilates for filling the kernels and, because of the reduction of stem biomass, they were much more efficient in nitrogen translocation than the old cultivars. So, during the first days of grain filling the modern cultivars normally presented higher amount of grain protein and amino acid contents. As modern cultivars partitioned more dry mass to the ear, and the old cultivars store more amount of nitrogen in vegetative tissues during the pre anthesis period partitioned the majority of their assimilates to the stem (Bishop and Bugbee., 1998) as the kernel development progressed the vegetative store diminished and hence modern cultivars remained behind in the run to grain protein yield filling as they accumulated less reserve in stem biomass.

So, during the protein and amino acid accumulation old cultivars presented the highest value in the maximum rate (R) for all amino acids excepting methionine. Future



breeding, should attempt to augment nitrogen levels in the vegetative tissues and enlarge the protein reservoir available for translocation to the kernel.

Our results have also shown that there are differences between both environments. Thus in the south environment, the diminution in grain protein and amino acid content during the last part of the grain filling could be due to: i) higher temperatures during grain filling that changed the proportion of cytoplasm proteins accumulated; and ii) a possibly sharply decrease in the nitrogen availability as a result of less water availability so the main proportion of nitrogen was used during the first phases of the grain filling.

However, in the north environment, the thermal time did not reach the threshold of 400° GDD due to a less mean temperature during grain filling and therefore in this environment drought was less intense and did not show any reduction along the grain filling. Furthermore, in the North environment, the differences observed among periods of release were more significant, and this could be explained because the cooler and wetter environment of Northern Spain allowed cultivars to better express their yield potential (Garcia Del Moral et al., 2003).

The two years of study are representative of the great yield fluctuation for yield of durum wheat in the Mediterranean region caused significant year to year variations in precipitation and heat stress during kernel growth (Rharrabti et al., 2001). Under heat stress conditions the accumulated dry matter and nitrogen pool before anthesis appear to have a main role for filling the kernels and this could also explain the differences between periods of release and years. Although 2005 was a year with more drought than 2004 during the grain filling, the highest values of amino acids appeared in 2004. This is due to the fact that our results suppress the dilution effect between grain yield and

grain protein content and the conditions were very favourable during the grain filling in 2004.

The PRD and AAD to reach the 0.95 total protein and amino acid weight indicate that in the north environments needed more thermal time to obtain the maximum rate of accumulation, but they never reach the 400 GDD. On the other hand, southern cultivars could obtain a rate closer than the maximum, so southern and rainfed zones in this environment seem to favour the protein and amino acid accumulation and therefore quality parameters (Rharrabti et al., 2003) than northern environments.

The accumulation of the different protein fractions is highly asynchronous, inferring that the protein composition of the kernel changes during kernel development (Triboi et al., 2003). This in concordance with our results, where as development of the kernel progressed, a decrease occurred in the relative amounts of aspartic acid, threonine, alanine and lysine, which are more abundant in albumins and globulins, in both environments. In contrast, the relative amounts of glutamate, proline, arginine and phenylalaline more abundant in gliadins and glutenins increased. Similar changes have been reported by Singh et al., (1974) and Martín del Molino, et al. (1988). Glycine, which appears in higher proportions in glutenins than in gliadins, increased until 250GDD. Our results are in agreement with other reports (Martín del Molino, et al., 1988; Garcia del Moral et al, 2007), where the changes in amino acid composition during kernel development were probably due to the relative variation of protein fractions; the proportion of albumins and globulins decreased over time own to the increase in storage proteins.

Serine, leucine, isoleucine and histidine in general suffered small variations during kernel development; maybe due to the fact that they are found in similar proportions in the different protein fractions (Mossé, 1968). One possible explication to

the fact that arginine augmented in the last period of grain filling could be that at the end of grain filling proteins rich in defense and stress to protect against pathogens such as insect and fungi are synthesized (Vensel et al, 2005). In cooler conditions, lysine, arginine, aspartic acid and leucine were the most abundant amino acid when we compare environments; however, glycine, threonine, alanine and valine were higher in warmer conditions. The variation in the remainder amino acid, were distributed in the same proportion between environments.

## **Conclusions**

Climatic conditions during the grain filling play an important role in determining grain protein content under Mediterranean conditions, so that, in warmer conditions during grain-filling, protein accumulation in the grain diminish when thermal time exceeded 500 GDD, probably because the synthesis of proteins is largely replaced by heat shock proteins at high temperatures. From this threshold to physiological maturity, the grain and amino acid content decreased. In general, the maximum rate of accumulation of protein and amino acid was also higher in old cultivars when compare period of release. Possibly, old cultivars could have more capacity to uptake nitrogen and accumulate in vegetative tissues (stem) than modern ones.

Therefore, breeding during the last century have diminished the amount of protein and amino acid content in the kernels from old cultivars compared to modern cultivars, may be due to a lack of capacity to partitioned more dry mass to the stem. Future improvements should be leaded to augment nitrogen levels in the vegetative tissues will enlarge the protein reservoir available for translocation to the grain, as well

as to reduce the loss of nitrogen from the plants and improving the nitrogen partitioning efficiency to the kernels.

### **Abbreviations used**

Ala, alanine; Arg, arginine; Asp, aspartic acid; Cys, cysteine; daa, days after anthesis; GFD, grain filling duration; Glu, glutamic acid; Gly, glycine; His, histidine; Ile, isoleucine; Leu, leucine; Lys, lysine; Met, methionine; PC, protein content; Phe, phenylalanine; Pro, proline; Ser, serine; Thr, threonine; Tyr, tyrosine; Val, valine;

### **Acknowledgement**

This study was partially funded by CICYT, grants AGL-2002-04285 and AGL-2006-09226. Julio Isidro and Fanny Álvaro were recipients of PhD scholarships from CICYT and IRTA, respectively. The authors thank DAP (Empresa pública de Andalucía) and F. Martínez for management of field trials at Granada and Rafael Rodriguez and the staff of Cereal Breeding of IRTA for their skilled technical assistance.

## References

- Álvaro, F.; Isidro, J.; Villegas, D.; García del Moral, L.F.; Royo, C. Breeding effect on grain filling, biomass partitioning and remobilization in Mediterranean durum wheat. *Agron. J.* 2008, 100, 361–370.
- Angus, J. F.; MacKenzie, D. H.; Morton, R.; and Schafer, C. A. Phasic development in field crops. II. Thermal and photoperiodic responses of spring wheat. *Field Crops Res.* 1981, 4, 269-283.
- Approved Methods of AACCC, 8th ed.; *American Association of Cereal Chemist.* St. Paul, M.N., 1989.
- Basha, E.; Leel, G.J.; Demeler, B.; Vierling, E. Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur. J. Biochem.* 2004. 271, 1426-1436.
- Beauregard, M.; Hefford, M.A. Enhancement of essential amino acid contents in crops by genetic engineering and protein design. *Plant Biotech. J.* 2006, 4, 561-574.
- Bénétrix, F.; Autran, J.C. Protein synthesis in grains and seeds. In *Nitrogen Assimilation by Plants. Physiological, Biochemical and Molecular Aspects*; Morot-Gaudry J.F., Ed.; *Science Publishers Inc.*: Enfield, NH, 2001, pp 343-360.
- Bishop, D.L.; Bugbee, B.G. Photosynthetic capacity and dry mass partitioning in dwarf and semi-dwarf wheat (*Triticum aestivum* L). *J. Plant Physiol.* 1998, 153, 558-565.
- Bhullar, S.S.; Jenner, C.W.; Differential responses to high temperatures of starch and nitrogen accumulation in the grain of four cultivars of wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 1985, 12, 363-375.
- Blumenthal, C.; Bekes, F.; Wrigley, C.W.; Barlow, E.W.R. The acquisition and maintenance of thermotolerance in Australian wheats. *Austr. J. Plant Physiol.* 1990, 17, 37-47.
- Borghì, B.; Corbellini, M.; Minoia, C.; Palumbo, M.; DiFonzo, N.; Perenzin, M. Effects of Mediterranean climate on wheat bread-making quality. *Eur. J. Agron.* 1997, 6, 145-154.
- Brancourt-Hulmel, M.; Doussinault, G.; Lecomte, C.; Bérard, P.; Le Buanec, V.; Trottet, M. Genetic Improvement of agronomic traits of winter wheat cultivars released in France from 1946 to 1992. *Crop Sci.* 2003, 43, 37–45.

- Branlard, G.; Dardevet, M.; Saccomano, R.; Lagoutte, F.; Gourdon, J. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica*. 2001, 119, 59-67.
- Ciaffi, M.; Margiotta, B.; Colaprico, G.; De Stefanis, E.; Sgrulletta D.; Lafiandra, D. Effect of high temperatures during grain filling on the amount of insoluble proteins in durum wheat. *J. Gen. and Breeding*. 1995, 49, 285-296.
- Cohen, S.A.; Meys, M.; Tarvin, T.L. The Pico-Tag Method. A Method of Advanced Techniques for Amino-Acids Analysis. *Millipore Corporation*, Bedford, MA. 1989.
- Corbellini, M.; Canevara, M.G.; Mazza, L.; Ciaffi, M.; Lafiandra, D.; Borghi, B. Effect of the duration and intensity of heat shock during grain filling on dry matter and protein accumulation, technological quality and protein composition in bread and durum wheat. *Aust. J. Plant Physiol*. 1997, 24, 245-260.
- Darroch, B.A.; and Baker, R.J. Grain filling in three spring wheat genotypes: statistical analysis. *Crop Sci*. 1990. 30, 525-529.
- De Vita, P.; Nicosia O.L.D.; Nigro F.; Platani C.; Carmen R.; Di Fonzo, N.; Cattivelli, L. Breeding progress in morpho-physiological, agronomical and qualitative traits of durum wheat cultivars released in Italy during the 20th century. *Eur. J. Agron*. 2007, 26, 39–53.
- García del Moral, L.F.; Rharrabti, Y.; Martos, V.; Royo, C. Environmentally induced changes in amino acid composition in the grain of durum wheat grown under different water and temperature regimes in a Mediterranean environment. *J. Agric. Food Chem*. 2007, 55, 8144-8151.
- García del Moral, L.F.; Rharrabti, Y.; Villegas, D.; Royo, C. Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions: An ontogenic approach. *Agron. J*. 2003, 95, 266-274.
- Gibson, L.R.; McCuskey, P.J.; Tilley, K.A.; Paulsen, G.M. Quality of hard red winter wheat grown under high temperature conditions during maturation and ripening. *Cereal chem*. 1998, 75, 421-427.
- Hahn-Hägerdal B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Liden, G.; Zacchi, G. Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol*. 2006, 24, 549–556.
- Hendershot, K.L.; Weng, J.; Nguyen, H.T. Induction temperature of heat-shock protein synthesis in wheat. *Crop Sci*. 1992, 32, 256-261.

- Jenner, D.F.; Starch synthesis in the kernel of wheat under high temperature conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* 1994, 21, 791-806.
- Keeling, P.L.; Bacon, P.J.; Holt, D.C. Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta.* 1993, 185, 342-348.
- Martin del Molino, I.M.; Rojo, B.; Martinez-Carrasco, R.; Perez, P. Amino acid composition of wheat grain. 1: Changes during development. *J. Sci. Food Agric.* 1988, 42, 29-37.
- Martre, P.; Porter, J.R.; Jamieson, P.D.; Triboni, E. Modeling grain nitrogen accumulation and protein composition to understand the sink/source regulations of nitrogen remobilization for wheat. *Plant Physiol.* 2003, 133, 1959-1967.
- Mossé, J. Les protéines des céréales. In: *Profrés en Chimie Agricole et Alimentaire*, Hermann. Paris. 1968, 47-81.
- Ortiz-Monasterio, R.J.I.; Sayre, K.D.; Rajaram, S.; McMahon, M. Genetic progress in wheat yield and nitrogen use efficiency under four N rates. *Crop Sci.* 1997, 37, 898-904.
- Osborne, T.B. The proteins of the wheat kernel. In: Publications of the Carnegie Institution Washington, Judd and Detweiler, Washington, DC. 1907, 84.
- Rharrabti, Y.; Elhani, S.; Martos, V.; García del Moral, L.F. Protein and Lysine content, grain yield, and other technological traits in durum wheat under Mediterranean conditions. *J. Agri. Food Chem.* 2001, 49, 3802-3807.
- Rharrabti, Y.; Royo, C.; Villegas, D.; Aparicio, N.; García del Moral, L.F. Durum wheat quality in Mediterranean environments I. Quality expression under different zones, latitudes and water regimes across Spain. *Field Crops Res.* 2003, 80, 123-131.
- Royo, C.; Abaza, M.; Blanco, R.; García del Moral, L.F. 2000. Triticale grain growth and morphometry as affected by drought stress, late sowing and simulated drought stress. 2000. *Aust. J. Plant Physiol.* 27, 1051-1059.
- Royo, C.; Álvaro, F.; Martos, V.; Ramdani, A.; Isidro, J.; Villegas, D.; Garcia del Moral, L.F. Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica.* 2007, 155, 259-270.

- Simmonds, D.H. Wheat and wheat quality in Australia. *Australian Wheat Board and CSIRO*, Melbourne. 1989.
- Spiertz, J.H.J. The influence of temperature and light intensity on grain in relation to the carbohydrate and nitrogen economy of the wheat plant. *Neth. J. Agric. Sci.* 1977, 25, 182-197.
- Stone, P.J.; Nicolas, M.E. The effect of duration of heat stress during grain filling on two wheat varieties differing in heat tolerance: grain growth and fractional protein accumulation. *Aust. J. Plant Physiol.* 1998, 25, 13-20.
- Triboi, E.; Abad, A.; Michelena, A.; Lloveras, J.; Ollier, J.L.; Daniel, C. Environmental effects on the quality of two wheat genotypes: 1. quantitative and qualitative variation of storage proteins. *Eur. J. Agron.* 2000, 13, 47-64.
- Triboi, E.; Triboi-Blondel, A.M. Productivity and grain or seed composition: a new approach to an old problem—invited paper. *Eur. J. Agron.* 2002, 16, 163-186.
- Triboi, E.; Martre, P.; Triboi-Blondel, A.M. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *J. Exp. Bot.* 2003, 54, 1731-1742.
- Troccoli, A.; Borrelli, G.M.; De Vita, P.; Fares, C.; Di Fonzo, N. Durum wheat quality: A multidisciplinary concept. *J. Cereal Sci.* 2000, 32, 99-113.
- Vierling, E. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol.* 1991. 42, 579-620.
- Singh, U.; Chatterjee, S.R.; Das, H.K.; Development of amino acid imbalance in wheat proteins. Part 1-Changes in amino acid composition of proteins in endosperm and embryo during grain maturation. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 1974, 11, 74-77.
- Vensel, W.H.; Tanaka, C.K.; Cai, N.; Wong, J.H.; Buchanan, B.B.; Hurkman, W.J. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics.* 2005, 5, 1611-1994.





CARILLO 02/03

B. FALSO 02/03

CARILLO 02/03

B. FALSO 02/03

CARILLO 02/03

B. FALSO 02/03

7. Astigi 02/03

CARILLO 03/04

9. Capiti 03/04

8. Serran 03/04

PINET 03/04

14. Adam 03/04

8. Carlojucci 03/04

20. Serrat 03/04

9. Astig 03/04

## Using of SSRs to the introduction of new molecular techniques to the laboratory

Julio Isidro<sup>1</sup>, Conxita Royo<sup>2</sup>, Luís F. García del Moral<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología Vegetal, Universidad de Granada.

<sup>2</sup> IRTA, Cereal Breeding.

*En página anterior:  
Semillas germinadas para la  
extracción del ADN. Canadá 05*



## Using of SSRs to the introduction of new molecular techniques to the laboratory

### Introduction

Durum wheat (*Triticum turgidum* L.var.durum) is an allotetraploid (genome AABB,  $2n=4X=28$ ) with seven homoeologous groups. It is an especially popular cereal crop of the Mediterranean region, and its grain is used for food products such as pasta, couscous and burghul. More than half of the durum acreage lies in the Mediterranean basin, mainly Italy, Spain, France, Greece and the West Asian and North African (WANA) countries, where through history this cereal has received special attention as an important commodity (Royo et al, 2000).

The genetic diversity of major crops, including durum wheat, has suffered and overall reduction with time, primarily as a consequence of domestication processes and as a result of the recurrent use of adapted germplasm and the adoption of breeding schemes not favoring wide genetic recombination (Hoisington et al, 1999; Donini et al, 2000).

Molecular markers are a useful complement to morphological and physiological characterization of cultivars and analyse genetic relationships among accessions, because they are plentiful, independent of tissue or environmental effects, and allow cultivar identification early in plant development (Manifiesto et al., 2001). The location of genes affecting economically important characters is of great importance to plant and animal breeders, and molecular marker technology has made this increasingly possible. Many characters of economic interest, such as yield, heading date, malting quality or disease resistance, show a continuous range of values, rather than distinct phenotypes.

Although the first DNA marker techniques used to characterize wheat cultivars was RFLP (Restriction fragment length polymorphism) its low level of polymorphism (Chao et al, 1989; Cadalen et al, 1997) observed among wheat cultivars (Bryan et al, 1999) and the complexity and cost of the technique, limited the use of RFLP for routine cultivar identification. The polymerase chain reaction (PCR) technique facilitated the development of a second generation of simpler and lower-cost molecular markers, including SSR (microsatellites) and AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (Vos et al, 1995).

The genomes of all eukaryotes contain a class of sequences, termed microsatellites (Litt and Luty 1989) or simple sequenced repeats (SSRs) (Tautz et al,

1996). Microsatellites with tandem repeats of a basic motif of < 6 bp have emerged as an important source of ubiquitous genetic markers for many eukaryotic genomes. In plants, it has been demonstrated that microsatellites are highly informative, locus-specific markers in many species (Taramino and Tingey 1996, Smulders et al 1997).

Therefore, the elevated frequency of length polymorphism associated with microsatellites provides a basis for the development of a marker system that has broad application in genetic research including studies of genetic variation, linkage mapping, gene tagging, and evolution. Linkagemaps employing microsatellites have been developed for several cereal grains such as barley (*Hordeum vulgare*) (Liu *et al.*, 1996; Ramsay *et al.*, 2000), maize (*Zea mays* L.) (Senior *et al.*, 1993), rice (*Oryza sativa* L.) (McCouch *et al.*, 1997; Temnykh *et al.*, 1999), hexaploidwheat (*Triticum aestivum* L.) (Röder *et al.*, 1998) and durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) (Korzun *et al.*, 1999; Nachit *et al.*, 2001).

Only 30% of all primer pairs developed from microsatellites sequences is functional and suitable for genetic analysis (Röder *et al.*, 1995; Bryan *et al.*, 1997). In this sense, our work tries to improve the molecular characterization used in our lab, so that replaced AFLP markers to SSRs. For all that, the objective of this work was the development and introduction of the new techniques of analysis of SSRs as molecular market to future works in wheat at our lab.

## **Material and Methods**

### *Plant material*

A diverse collection of wheat germplasm, consisting of 24 durum wheat cultivars, was selected in order to represent the most relevant durum germplasm in Italy and Spain during the last century. The cultivars were grouped in three classes according to the year of released as old (before 1945); intermediate (from 1950 to 1985) and modern (from 1988 to 2000). The complete list of cultivars with origin, date of release is shown in (Table 1).

*DNA isolation*

A collection of diverse kinds of microsatellites was used to analyze all accessions. Table 2 show the complete list of its used in this work.

Total genomic DNA was extracted from each cultivar as reported by Doyle and Doyle (1987). To obtain enough vegetal tissue, for each cultivar, in Petri dishes with KNO<sub>3</sub> was introduced 3-4 seeds and when there was about 10 cm of leaf tissue it was ground to a fine powder using liquid nitrogen and then suspended in 600µl of extraction buffer (100mM Tris-HCL (pH 8.0), 1.4mM NaCl, 20mM EDTA (pH 8.0), 2% w/v CTAB, 1% w/v PVP-40, 1% v/v β-mercaptoethanol). The suspension was mixed well, incubated at 65°C for 60 min, followed by 10 min of centrifugation 14,000 rpm. Then, pipette off as much supernatant as possible and place in a clean centrifuge tube. Add 5 µl of RNA<sub>se</sub>A (10mg/ml), followed by a incubation of 37°C in bead bath for 30-60 min.

Afterwards, add 500 µl of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) and place tubes in Thermomixer at 1,000 rpm for 5-10 min. At the end, spin 14,000 rpm for 10 min, remove upper aqueous phase to clean tube and add 500 µl of ice cold iso-propanol (leave tubes 20 min in freezer), spin 5 min at 14,000 rpm to pellet the DNA and after decant iso-propanol add 1 ml of ice-cold 70% ETOH. The DNA was pelleted down by centrifugation at 14,000 rpm for 5 min suspended in 50 µl of TE buffer (1.0 M Tris-HCL (pH 8.0) — 0.5 M EDTA (pH 8.0)). Place in 37 °C bead bath for 15 min to dissolve pellet and store at either 4°C or -20 °C. DNA was quantified it with Phamacia GeneQuant detector to 260nm.

*Microsatellites and PCR amplification*

A collection of diverse kinds of microsatellites was used to analyze all accessions (Table 2).PCR amplification was performed in a volume of 25 µl of reaction mixture, each containing 2.5 µl of DNA (20ηg/ µl), 2.5 µl 10X PCR Buffer without Mg, 0.75 µl MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.5 µl of forward and reverse primer, respectively (100 ηg/ µl), 2 µl of each dNTP (10mM), 0.35 µl 5U/ µl Taq in Promega nuclease-free water. The mixture was heated at 94°C for 3 min for initial denaturation, followed by 44 cycles of 94°C for I min, annealing temperature of specific primer for I min, and 72°C during extension for 1 min. This was followed by 72 °C for 10 min for the final extension. The

PCR products were separated in 3% electrophoretic agarose gels ((2:1 Metaphor/SeaKem LE Agarose) in 0.5 Tris Borate EDTA buffer at 200 v for 2 to 3 h depending on separation requirements. The size of bands was determined with a 50 bp ladder. The lines were scored for each of the polymorphic markers.

#### *Data analysis*

For each primer the number of polymorphic and monomorphic bands was determined whereas bands were excluded from data analyses. Percentage of polymorphism was calculated as the proportion of polymorphic bands over the total number of bands. Variability for each locus was measured using the polymorphism index content (PIC) (Anderson et al., 1993).

$$\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2$$

where  $p_i$  is the frequency of the its allele.

The polymorphic information content (PIC) was calculated for each primer (Table 3). The marker index was calculated for each SSRs primer as  $\text{MI} = \text{PIC} \times \eta\beta$ , where PIC is the mean PIC value,  $\eta$  the number of bands, and  $\beta$  is the proportion of polymorphic bands (Table 3) (Powell et al., 1996). Genetic relationships among cultivars were calculated with the Dice's coefficient (Dice, 1945) using NTSYS-pc version 2.0 software (Rohlf, 2000).

## **Results and Discussion**

Thirty one different primers (Table 2) were used to generate the polymorphic bands. The number of polymorphic bands ranged from 0 to 7 and the percentage of polymorphic combination ranged from 0.071 to 0.917 (Table 3). Moreover, the marker index per primer varied from 0.02 to 0.78 with an average of 0.19. PIC values and marker indices were almost identical to those published by Bohn et al. (1999) and Manifesto et al. (2001) in wheat.

Table 1: Description of the 24 Italian and Spanish durum wheat cultivars

Cultivar	Year of release	Registered Pedigree	Origin
<i>ITALIAN</i>			
<i>Old</i>			
Balilla F.	<1930	Not recorded	Not recorded
Carlojucci	1945	Russello/Forlani	Not recorded
S. Capelli	1930	Jennah/Khetifa	Strampelli
Razza 208	<1930	Not recorded	Not recorded
<i>Intermediate</i>			
Adamello	1985	Valforte/Selezione Turca	Isi.Sper.Cerealicoltura
Capeiti 8	1955	S. Capelli/Eiti	Stazione Granic. Sicilia
Creso	1974	CpB14 x (((Yt 54 x N10 x B) X Cp 63 2) xTC 603)	ENEA
Trinakria	1970	B 14/Capeiti 8	Inst.Agronom. Palermo
<i>Modern</i>			
Cirillo	1992	Jucci/Polesine//Creso/Montanari	Miliani genética
Flavio	1992	Latino/Cappelli	SIS
Simeto	1988	Capeiti 8/Valnova	Stazione Granic. Sicilia
Zenit	1992	Valriccardo x Vie	SPS Bologna
<i>SPANISH</i>			
<i>Old</i>			
Blanco V.	<1930	Not recorded	Sevilla
Clarofino	<1930	Not recorded	Albacete
Pinet	<1930	Not recorded	Valencia
Rubio B.	<1930	Not recorded	Córdoba
<i>Intermediate</i>			
		Not recorded	
Bidi17	1950	Not recorded	Not recorded
Camacho	1975	Not recorded	INIA España
Esquilache	1976	Not recorded	Semillas Agrícolas SA
Mexa	1980	GDOVZ469/3/Jo's//61130/LSL	Cruzamiento 470
<i>Modern</i>			
Ariesol	1992	Not recorded	Agrar Semillas
Astigi	1999	Not recorded	ASGROW Semillas

If study the values of PIC and MI separately by origin, our results indicate that had not differences between Spanish cultivars (PIC=0.85; MI=0.35) and Italian ones (PIC=0.84; MI=0.35) (Data not shown).



Table 2: Primers used in the SSRs analysis.

Molecular Markets	Chromosome	Locus*	Sequence- Forward	Sequence- Reverse
WMS 88	6B	P and S	CACTACAACCTATGCGCTCGC	TCCATTGGCTTCTCTCTCAA
WMS 120	2B	KW and P.	GATCCACCTTCCTCTCTCTC	GATTATACTGGTGCCGAAAC
WMS 146	7B	P	CCAAAAAACTGCCTGCATG	CTCTGGCATTGCTCCTTGG
WMS 165 A	4A	Prot.	TGCAGTGGTCAGATGTTTCC	CTTTTCTTTCAGATTGCGCC
WMS 165 B	4B	KW, Prot, TW and P.	TGCAGTGGTCAGATGTTTCC	CTTTTCTTTCAGATTGCGCC
WMS 193	6B	KW and P.	CTTTGTGCACCTCTCTCTCC	AATTGTGTTGATGATTGGGG
WMS 251	4B	KW, Prot, TW, and P.	CAACTGGTTGCTACACAAGCA	GGGATGTCTGTTCCATCTTAG
WMS 339	2A	P, TW and S	AATTTTCTTCTCACTTATT	AAACGAACAACCACTCAATC
WMS 425	2A	KW, P, Prot., TW, and S.	GAGCCCACAAGCTGGCA	TCGTTCTCCCAAGGCTTG
WMS 495	4B	KW, Prot, TW and P.	GAGAGCCTCGCGAAATATAGG	TGCTTCTGGTGTTCCTTCG
WMS 526	7B	P	CAATAGTTCTGTGAGAGCTGCG	CCAACCCAAATACACATTCTCA
WMS 537	7B	Prot.	ACATAATGCTTCCTGTGCACC	GCCACTTTTGTGTGCTTCCT
			CGC TGC CAC TGT AAC CTT TAG AAG A	GCG AGT TGG AAT TAT TTG AAT TAA ACA AG
BARC 10	2A	KW, Prot, and TW	GCG TTG TGG AAA CTC AGT TTT GTT GAT TTA	GCG GAA AGG AAC GAA GTA CAT TTT GTA GA
BARC 14	6B	P and S	GCG TGA ATC CGG AAA CCC AAT CTG TG	TGG AGA ACC TTC GCA TTG TGT CAT TA
BARC 32	7B	P	GCG TTG GAA AGG AGG TAA TGT TAG ATA G	TCG TGG GTT ACA AGT TTG GGA GGT CA
BARC 79	6B	P and S	GCT CCT CTC ACG ATC ACG CAA AG	GCG AGT CGA TCA CAC TAT GAG CCA ATG
BARC 101	2B	KW,TW, S and Yield	CAC CCG ATG ATG AAA AT	GAT GGC ACA AGA AAT GAT
BARC 119	1B	S	GCG TCG AGG GTA AAA CAA CAT AT	GTA GCG TCA GTG CTC ACA CAA TGA
BARC 125	6B	KW and P	CCG GTG AGA GGA CTA AAA	GGC CTG TCA ATT ATG AGC
BARC 142	2B	Yield	GCG CAA CCA CAA TGT ATG CT	GGG GTG TTT TCC TAT TTC TT
BARC 148	1A	KW	GCG TAT TAG CAA AAC AGA AGT GAG	GCG ACT AGT ACG AAC ACC ACA AAA
BARC 178	6B	S	GCT TTG CCA GGT GAG CAC TCT	TGG CCG GGT ATT TGA GTT GGA GTT T
BARC 206	4A	Prot.	CAC GCG CAC ATC TCG CCA ACT AA	CGT GGT CTA GTC CGC GTT GGG TC
WMC 8	4B	TW	CTC ATG AGT ATA TCA CCG CAC A	GAC GCG AAA CGA ATA TTC AAG T
WMC 49	1B	S	GTT TTT GTG ATC CCG GGT TT	CAT GCG TCA GTT CAA GTT TT
WMC 95	1A	KW and TW	AAcgAcggccAgTgAATTccTc	AgcATcgAcATgcAAcAAccccc
WMC 114	2A	KW, TW and S	gcTcAgTcAAAaccgTAcTTcT	cAcTAcTccAATcTATcgccgT
WMC 175	2B	Prot.	AgTTATgTATTcTcTcgAgccTg	ggTAAccAcTAgAgTATgTccTT
WMC 273	7B	P	cATTTAcAAAgcgcATgAAgcc	gAAAAcTTTgggAAcAAgAgcA
WMC 332	2B	KW	GGGTCACCAACCCGCTC	CGTGGGTGCAATTCTCAGG
CFA 786 B	6A,6B,7B	KW and P	TCAAATGATTTTCAGGTAACCACTA	TTCTGATCCCAACCAACAT

\* P: Pigments; Prot: Protein; KW: Kernel Weight; S: Sedimentation; TW: Test Weight.

Table 3: Characterization of the degree of polymorphism generated with 31 primers combination

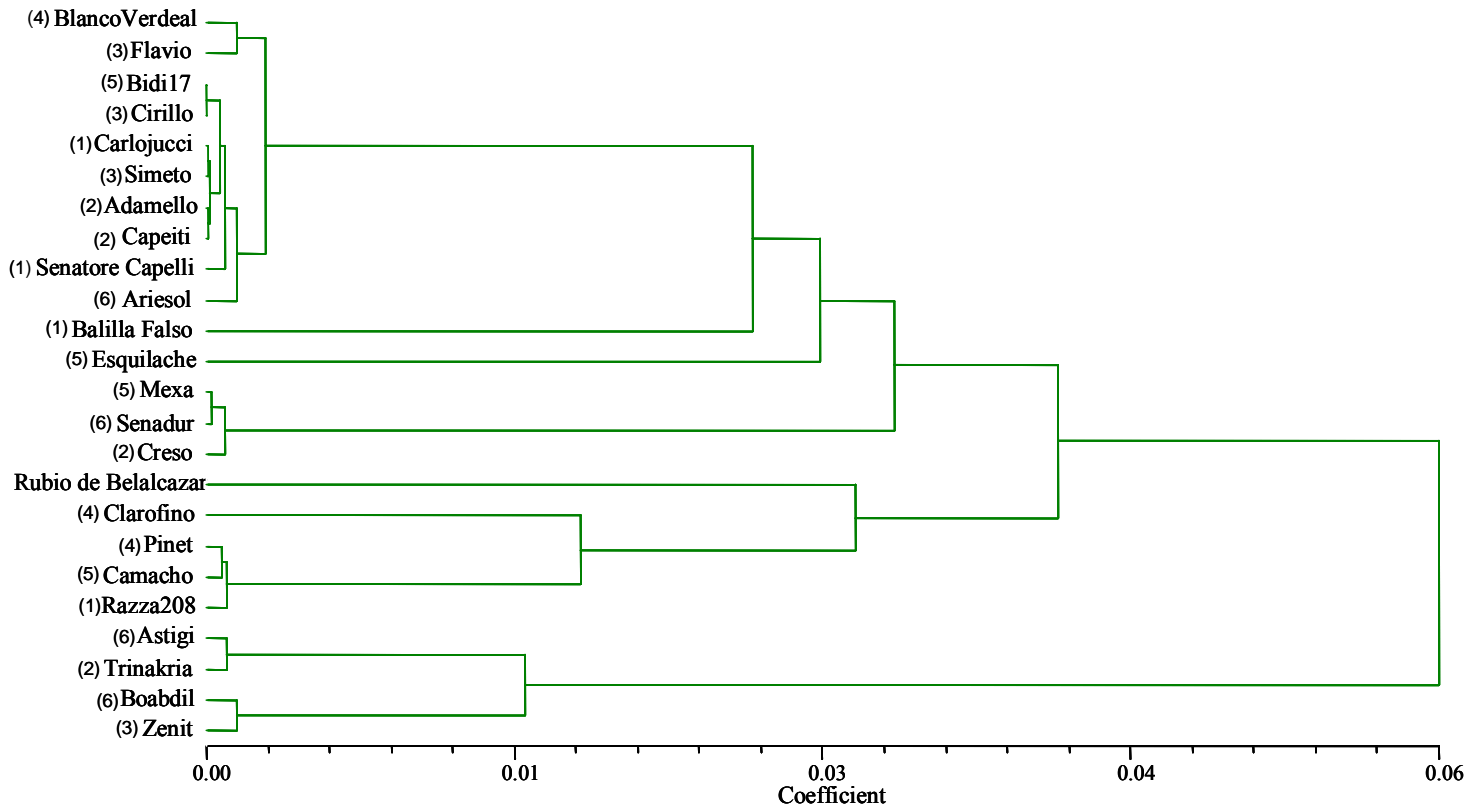
Chromosome	Primer	Polymorphic bands		<sup>a</sup> PIC (S.D)	<sup>b</sup> MI
		n	$\Sigma p_i^2$		
1A	Barc 148	2	0.781	0.22	0.10
1A	WMC 95	0			
1B	Barc 119	4	0.464	0.54	0.26
1B	WMC 49	3	0.342	0.66	0.23
2A	WMS 339	3	0.501	0.50	0.15
2A	WMS 425	2	0.546	0.45	0.07
2A	Barc 10	2	0.722	0.28	0.06
2A	WMC 114	1	1.000	0.00	0.02
2B	WMS 120	4	0.493	0.51	0.26
2B	Barc 101	3	0.263	0.74	0.16
2B	Barc 142	4	0.533	0.47	0.26
2B	WMC 175	3	0.071	0.93	0.49
2B	WMC 332	4	0.442	0.56	0.26
4A	WMS 165 A				
4A	Barc 206	1	1.000		0.02
4B	WMS 165 B	1	1.000		0.02
4B	WMS 251	4	0.429	0.57	0.26
4B	WMS 495	4	0.084	0.92	0.29
4B	WMC 8	0			
6A	WMC 786 B	4	0.325	0.67	0.27
6B	WMS 88	0			
6B	WMS 193	2	0.917	0.08	0.07
6B	Barc 14	3	0.483	0.52	0.16
6B	Barc 79	2	0.514	0.49	0.06
6B	Barc 125	1	1.000	0.00	0.02
6B	WMC 786B	4	0.325	0.67	0.27
6B	Barc 178	2	0.920	0.08	0.06
7B	WMS 146	2	0.802	0.20	0.09
7B	WMS 526	4	0.382	0.62	0.26
7B	WMS 537	1	1.000	0.00	0.02
7B	Barc 32	3	0.498	0.50	0.16
7B	WMC 273	7	0.323	0.68	0.78
7B	CFA 2004	5	0.319	0.68	0.42
7B	WMC 786 B	4	0.325	0.67	0.27
	Mean	2.96	0.560	0.53	0.19
	Total	89			

<sup>a</sup>PIC: mean PIC value observed for SSRs; S.D.: standard deviation.

<sup>b</sup>MI: marker index.

In our study, the polymorphic bands found in old, intermediate and modern cultivars were 39, 29 and 34, respectively. Spanish cultivars showed 22, 12 and 18 polymorphic bands and Italian cultivars 17, 17 and 16, for old, intermediate and modern periods, respectively. That is to say, The higher variability found in Spanish germplasm in comparison with Italians one could indicate the contrasting breeding strategies used by the two countries during the 20th century on durum wheat, as was stated by Royo et al., 2007. Possibly, Italian breeding programs started in 1900 by Nazareno Strampelli (Maliani 1979) and this could have reduced the variability in the germoplasm, in comparison with Spanish cultivars where the breeding start during the second half of the last century (García del Moral et al. 2005) as consequence of the introduction of CIMMYT semidwarf germplasm, which involved the gradual replacement of traditional tall cultivars by semidwarf and fertilizer-responsive varieties. In fact, a recent work speculated that the reduction of allele richness in Italian cultivars could be an indicator of the genetic erosion of the pre-breeding germplasm and pointed out that the implementation of appropriate methods of genetic conservation of this germplasm is a priority for breeding and food safety (Figliuolo et al., 2007).

A recent paper with the same cultivars as those used in the present study demonstrated that old, intermediate and modern Italian cultivars were genetically close, while old Spanish varieties clustered apart from the intermediate and modern cultivars (Martos et al. 2005). In this sense, we tried to do the same analysis with microsatellites markers (SSRs) (Figure 1). These results indicate that our set of markers can not differentiate between cultivars, for example between Clarofino and the rest of cultivars, indicating, then, that our analysis is not robust. Although, SSRs is a good tool to establish the phylogenetic relationships between cultivars, the chosen markers should have been taken of a homogeneous way in the genome, i.e. the same numbers of markers by each chromosome, and this could be an explanation to our inconclusive results. In fact, a recent work indicates that at least 73 loci with good polymorphism are needed to reflect genetic relationships among accessions with more than 90% certainty (You et al., 2004).



*Fig 1:* Dendrogram of 24 cultivars of durum wheat from Italy and Spain released in the last century based on 186 AFLP fragments. (1) Old Italian; (2) intermediate Italian; (3) modern Italian; (4) old Spanish; (5) intermediate Spanish; (6) modern Spanish.

## References

- Anderson, J.A., Churchill, J.E., Autrique, S.D., Tanksley, S., Sorrells, M.E. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-188.
- Bohn, M., Friedrich, U. H., Melchinger, A. E. 1999. Genetic Similarities among Winter Cultivars determined on the Basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and Their Use for Predicting Progeny Variance. *Crop Sci.* 39: 228-237.
- Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P., Orry, A., Smith, J.B. et al., 1997. Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 94: 557-563.
- Bryan, G.J., Stephenson, P., Collins, A.J., Kirby, J.B., Smith, J.B., Gale, M.D., 1999. Low levels of DNA sequence variation among adapted genotypes of hexaploid wheat. *Theor. Appl. Genet.* 99: 192-198.
- Cadalen, T., Boeuf, C., Bernard, S., Bernard, M., 1997. An intervarietal molecular marker map in *Triticum aestivum* L. Em. Thell and comparison with a map from a wide cross. *Theor. Appl. Genet.* 94: 367-377
- Chao, S., Sharp, P.J., Worland, A.J., Wargam, E.J., Koebner, R.M.D et al., 1989. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group of 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78: 495-504.
- Dice, L.R. 1945. Measurements of the amount of ecologic association between species. *Ecology.* 26. 297-302
- Donini, P., Law, J.R., Koebner, R.M.D., Reeves, J.C., Cooke, R.J., 2000. Temporal trends in the diversity of UK wheats. *Theor. Appl. Genet.* 100, 912–917.
- Figliuolo, G., Mazzeo, M., Greco, I., 2007. Temporal variation of diversity in Italian durum wheat germplasm. *Genet Resour Crop Evol.* 54, 615–626.
- García del Moral LF, Royo C. Slafer GA (2005) Genetic improvement effects on durum wheat yield physiology. In: Royo C, Nachit MM, Di Fonzo N, Araus JL, Pfeiffer WH Slafer GA (eds) *Durum wheat breeding: current approaches and future strategies*. Food Products Press. New York, pp 379–396
- Hoisington, D., Khairallah, M., Reeves, T., Ribaut, J.M., Skovmand, B., Taba, S., Warburton, M., 1999. Plant genetic resources: what can they contribute

- toward increased crop productivity? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5937–5943.
- Korzun, V., Röder, M.S., Wendekake, K., Pasqualone, A., Lotti, C., Ganal, M.W. and Blanco, A. 1999. Integration of dinucleotide microsatellites from hexaploid bread wheat into a genetic linkage map of durum wheat. *Theor. Appl. Genet* 98: 1202–1207.
- Litt, M., Luty, J.A., 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J.Hum. Genet.* 44: 397-401.
- Liu, Z.W., Biyashev, R.M., Maroof, M.A.S., 1996. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. *Theor. Appl. Genet.* 93: 869–876.
- Martos V, Royo C, Rharrabti Y, Garcí'a del Moral LF (2005) Using AFLPs to determine phylogenetic relationships and genetic erosion in durum wheat cultivars released in Italy and Spain throughout the 20<sup>th</sup> century. *Field Crops Res* 91:107–116.
- Maliani C (1979) Nazareno Strampelli, a fore-runner in green revolution. *Genet. Agr.* 33:1–4
- Manifesto, M.M., Schlatter, A.S., Hopp, H.E., Suarez, E.Y., Dubcovky, J., 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. *Crop Sci.* 41, 682–690.
- McCouch, S.R., Chen, X., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T., Blair, M., 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35: 89–99.
- Nachit, M., Elouafi, I., Pagnotta, M.A., El Saleh, A., Iacono, E., Labhilili, M., Asbati, A., Azrak, M., Hazzam, H., Benscher, D., Khairallah, M., Ribaut, J., Tanzarella, O.A., Porceddu, E., Sorrells, M.E. 2001. Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Theor. Appl. Genet.* 102: 177–186.
- Ramsay, L., Macaulay, M., Degli Ivannissevich, S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K.J., Tuveesson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmiroli, N., Sjakste, T., Ganal, M., Powell, W. and Waugh, R. *Genetics* 156: 1997–2005.

- Röder, M.S., Korzun, V., Wandehake, K., Planschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007–2023.
- Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrels, M.E., 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.
- Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate system (2.10t).
- Royo, C., Di Fonzo, N., Nachit, M.M., Araus, J.L. (eds) 2000. *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region: new challenges*. Proceedings of a Seminar, Zaragoza, Spain. 12-14 April, 2000. *Options Méditerranéennes* 40.
- Senior, M.L., Chin, E.C.L., Lee, M., Smith, J.S.C., 1996. Simple sequence repeat markers developed from maize found in the GenBank database: map construction. *Crop Sci.* 36: 1676–1683.
- Smulders, M.J.M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekass, W., Arens, P., Vosman, B., 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon species*. *Theor. Appl. Genet.* 97: 264-272.
- Taramino, G., Tingey, S., 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* 39: 277-287.
- Tautz, D., Trick, M., Dover, G.A., 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322: 652-656.
- Temnykh, S., Park, W.D., Ayers, N., Cartinhour, S., Hauck, N., Lipovich, L., Cho, Y.G., Ishii, T., McCouch, S.R. 1999. Mapping and genome organization of microsatellites in rice (*Oryza sativa*). *Theor. Appl. Genet.* 100: 698–712.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Res.* 23: 4407-4414.
- You, G.X., Zhang, X.Y., Wang, L.F., 2004. An estimation of the minimum number of SSR loci needed to reveal genetic relationships in wheat varieties: Information from 96 random accessions with maximized genetic diversity. *Mol. Breed.* 14, 397–406, 2004.







## **Discusión General**

*En página anterior:  
Cultivos de trigo en  
Swift Current (Canadá).*



## **Discusión general**

### **Introducción**

Para el año 2020, la demanda esperada de trigo será de un 40% más que los niveles actuales de 605 millones de toneladas (FAO 2008). Sin embargo los recursos disponibles para alcanzar esa producción son probablemente mucho menores. Para que este objetivo pueda alcanzarse se necesita un aumento en el rendimiento. El énfasis sobre la mejora de la rentabilidad de la producción de trigo, por tanto, no debe restringirse a condiciones favorables o de regadío, sino también para ambientes marginales o de secano. El desarrollo y liberación de los cultivares de trigo modernos en los años 60 originó la “Revolución Verde”. El primer y más importante factor que contribuyó al éxito de tal revolución fue la introducción de los genes de enanismo que provocaban un aumento del rendimiento. El segundo fue el establecimiento de un programa global de intercambio de germoplasma a nivel mundial y el tercero fue el aumento de la fertilización e irrigación.

También es importante indicar que no sólo hay que aumentar el rendimiento sino que es necesario aumentar las características y propiedades de calidad del trigo duro, no sólo incrementando la cantidad de proteínas sino su valor biológico. En este sentido, el contenido de proteínas que confieren calidad a la pasta y el de aminoácidos esenciales está adquiriendo cada vez más relevancia en los programas de mejora, posiblemente debido a la demanda creciente de cultivares de cereales con buena calidad. Una de las aproximaciones para estimar o identificar las características del cultivo que más influyen sobre la producción es estudiar como esas características o caracteres se han modificado a lo largo del proceso de selección, usando para ello genotipos obtenidos en diferentes periodos, lo que se conoce como uso de series históricas de cultivares.

En este sentido, ésta Memoria de Tesis Doctoral está dirigida a analizar el efecto de la introducción de los genes de enanismo sobre una serie de características fisiológicas que determinan los principales factores del rendimiento y sus componentes. Para ello se ha utilizado una colección de germoplasma formada por 24 genotipos, 12 italianos y 12 españoles registradas o cultivadas en diferentes periodos a lo largo del siglo pasado. Los ensayos se han realizado en dos ambientes contrastantes del clima mediterráneo de nuestro país.

Así, en el primer capítulo, se estudió el papel del análisis de coeficientes de senderos como herramienta para investigar las influencias que los distintos componentes del rendimiento ejercen en la formación del mismo, no sólo investigando los efectos directos sino también los indirectos causados por los posibles efectos pleiotrópicos derivados de la introducción de los genes de enanismo.

En el capítulo 2 se estudiaron los efectos de la mejora sobre el desarrollo apical durante el último siglo, analizando la influencia de cada uno de las etapas ejercía sobre la determinación del rendimiento. Los resultados del capítulo 2 sugieren que la mejora produjo un acortamiento de las primeras etapas del desarrollo apical y un aumento de la etapa zurrón hinchado-antesis, que es la etapa más importante en la determinación del número de flores fértiles por espiga, uno de los factores más importantes para la determinación del número de granos por espiga, uno de los componente principales en la determinación del rendimiento.

En los dos siguientes capítulos (3 y 4) estudiamos el papel de la mejora sobre la arquitectura del dosel foliar, así como los cambios producidos en la capacidad de interceptar radiación fotosintéticamente activa y en el uso eficiente de la misma. Los resultados sugieren que no se ha producido un cambio en la forma de interceptar la radiación en antesis, ni se ha producido un cambio en la arquitectura del dosel foliar como consecuencia de la introducción de los genes de enanismo. Por el contrario, los alelos *Rht-B1b* ejercieron un fuerte efecto pleiotrópico sobre el uso eficiente de la radiación durante la fase vegetativa y el llenado del grano.

Los resultados del capítulo 5 indican que el patrón de acumulación de proteínas y aminoácidos está altamente influenciado por las condiciones ambientales. Así, en el ambiente más cálido el tiempo necesario para alcanzar madurez fisiológica fue unos 250 GDD mayor que en el más frío. Los cultivares antiguos presentaron una tasa de llenado de proteínas y aminoácidos mayor que los modernos, posiblemente debido a la mayor capacidad de absorber nitrógeno y acumularlo en sus tejidos vegetativos (tallos).

Por último, en el capítulo 6 se aborda la introducción de una nueva técnica molecular en nuestro laboratorio. Aunque los resultados no fueron los esperados en el estudio de las relaciones filogenéticas entre los cultivares liberados en distintos periodos en el último siglo, sí observamos una reducción en la variabilidad del germoplasma

italiano como consecuencia de una mejora mucho más reciente que en el caso del germoplasma español.

### **Influencia de los alelos *Rht-B1b* sobre la estrategia de formación del rendimiento mediante análisis por coeficientes de sendero.**

En la mayor parte de los trigos duros, la reducción en altura está controlada por un alelo denominado *Rht-B1b*, introducido a partir de la variedad enana “*Norin 10*” (Hedden, 2003). El gen fue identificado por Peng et al. (1999) y su presencia reduce la sensibilidad a las giberelinas, hormonas necesarias la elongación del tallo (Flintham et al., 1997).

Los principales responsables del aumento en el rendimiento causado por la introducción de los genes de enanismo han sido un aumento del número de granos por metro cuadrado y del índice de cosecha (Brancourt-Hulmel et al., 2003), mientras que el peso del grano y la biomasa total de la planta han permanecido invariables a lo largo de los años (Royo et al., 2007). Así, en un reciente estudio llevado a cabo con las mismas variedades que en este estudio, se ha podido concluir que la tasa media del incremento en el número de granos por metro cuadrado fue del 0.55% anual y la contribución al aumento del número de granos por m<sup>2</sup> fue un 20%, 29% y un 51 % debido a las plantas por m<sup>2</sup>, espigas por planta y granos por espiga, respectivamente (Royo et al., 2007). Este aumento del rendimiento es consecuencia de un efecto pleitrópico de los genes de enanismo. Así, Gale y Youssefian (1985), indicaron que además del efecto directo de la insensibilidad a las giberelinas, también se producían otros efectos indirectos en el número y tamaño de las células del endospermo del grano, en el peso de la raíz, en la longitud del coleóptilo, en el tamaño de la hoja, y en componentes del rendimiento, índice de cosecha y contenido de proteínas

El análisis por coeficientes de sendero, en nuestro estudio, revela que en ausencia del alelo *Rht-B1b*, el rendimiento en grano fue principalmente dependiente de las variaciones en las espigas por metro cuadrado, sin embargo en los cultivares semienanos la mayor influencia sobre el rendimiento se produjo por el número de granos por espiga. No obstante, las espigas por metro cuadrado ejercieron una fuerte relación directa y negativa sobre el número de granos por espiga y el peso del grano en cultivares con o sin genes de enanismo, confirmando los efectos de compensación entre

los componentes del rendimiento durante la ontogenia del cultivo encontrados en otros estudios bajo condiciones mediterráneas (García del Moral et al., 2003, 2005).

En los cultivares sin el alelo *Rht-B1b*, el número de granos por espiga estuvo directa y positivamente influenciado por la duración del periodo vegetativo y el llenado del grano. Sin embargo, en los cultivares que llevan el alelo *Rht-B1b* esas relaciones directas fueron fuertemente negativas. Estos resultados implican que el mayor número de granos por espiga encontrados en nuestro estudio bajo condiciones mediterráneas se debió al acortamiento de algunas fases de desarrollo de la espiga reduciendo por tanto el periodo total entre siembra y antesis.

A su vez, el peso del grano aparece negativamente relacionado con el número de granos por espiga independientemente del aumento indirecto en el número de granos causado por los genes de enanismo, lo que demuestra que bajo condiciones mediterráneas el descenso en el peso del grano parece ser causado por el aumento de la competición entre los granos en crecimiento.

De esta forma, el análisis por coeficientes de sendero ha demostrado ser una aproximación muy útil no sólo para investigar las influencias directas en la determinación del rendimiento, sino también para cuantificar la magnitud de los efectos indirectos que la presencia de los alelos *Rht-B1b* determina sobre los componentes del rendimiento y otros caracteres relacionados con la producción de grano.

### **Cambios en el desarrollo apical de trigo duro causados por la mejora durante el siglo XX.**

El número de granos producido por unidad de área depende principalmente del número de flores fértiles espiga que, a su vez, está correlacionado con el peso seco de la espiga por m<sup>2</sup> en antesis (Fischer, 1985; Miralles and Slafer, 1995; Abbate et al., 1995). La reducción en la altura de la planta disminuye la competición entre el desarrollo de la espiga y el tallo, favoreciendo que una mayor cantidad de los asimilados se transporten hacia los órganos reproductivos durante la preantesis, lo que aumenta la fertilidad floral y por tanto se producen más granos por espiga, aunque más pequeños (Youssefian et al., 1992 b; Miralles et al., 1998; Rebetzke y Richards, 2000). La degeneración floral y la mortalidad de las flores coinciden con el periodo donde el tallo y la espiga crecen a su máxima tasa (Langer y Hanif, 1973; Kirby, 1988; Siddique et al., 1989; Youssefian et

al., 1992 a). Como se ha comentado, el aumento de la supervivencia de las flores observado con la introducción de los genes *Rht* se asoció con un peso mayor de las espigas en antesis (Siddique et al., 1989; Youssefian et al., 1992 a; Miralles et al., 1998), sugiriendo que el aborto floral se debe a la limitación en la translocación de recursos hacia el crecimiento de la espiga, principalmente debido a la competición con la elongación del tallo.

Nuestros resultados muestran que la mejora acertó durante el último siglo el tiempo hasta la floración, a expensas de la fase vegetativa. De hecho, la fase entre la siembra y espiguilla terminal (S-TS) y entre espiguilla terminal y zurrónes hinchados (TS-BO) disminuyó significativamente a través del proceso de mejora. La fase entre el estadio de zurrónes hinchados y la anthesis (BO-ANT) es particularmente relevante, ya que la mayoría de la mortalidad floral ocurre durante esta etapa (Kirby, 1988; Miralles et al., 2002). Nuestros resultados indican que la duración de esta etapa fue mayor en los cultivares modernos comparados con los más antiguos, lo que probablemente disminuyó la tasa de competición entre espiguillas dentro de las espigas, favoreciendo que una mayor cantidad de flores fértiles en los cultivares modernos pudiesen alcanzar la antesis y establecerse posteriormente como granos, lo que se confirma porque los cultivares modernos desarrollaron más granos por unidad de área (Royo et al., 2007) y tuvieron mayor rendimiento por ha (Royo et al., 2008) que los trigos duros cultivados al principio de siglo.

También se encontraron diferencias en la longitud de ciclo entre los cultivares de germoplasma español e italiano, posiblemente debido a la diferente estrategia para la mejora genética seguida por ambos países durante el siglo XX (Royo et al., 2007; Álvaro et al., 2008a).

De estos resultados se deduce que la futura mejora en rendimiento debería dirigirse por tanto a aumentar la capacidad de cuaje de los granos después de antesis, ya que el porcentaje de cuaje de los trigos duros modernos está todavía muy lejos del obtenido para trigo blando (Álvaro et al., 2008a). Esto podría conseguirse seleccionando cultivares con una rápida nascencia y emergencia, para así reducir la duración hasta antesis, mediante el acortamiento de la duración de la fase S-TS y aumentando la fase Bo-ANT. Esta estrategia podría aumentar el número de flores fértiles por espiga, resultando en un mayor número de flores fértiles capaces de cuajar en grano.



## **Efecto de los genes de enanismo sobre la arquitectura del dosel foliar y el uso de la radiación fotosintéticamente activa en trigo duro bajo condiciones Mediterráneas.**

### *I- Características del dosel foliar.*

Uno de los interrogantes que aparecieron al disminuir la altura de la planta fue su repercusión sobre la arquitectura del dosel foliar y la interceptación y uso de la radiación. En general, el aumento en el índice de cosecha ha ido acompañado por un menor peso de los tallos por unidad de superficie, pero con similar índice de área foliar (LAI) y peso de hojas por m<sup>2</sup>. De esta forma, diversos estudios no encuentran diferencias significativas en el LAI de variedades antiguas y modernas de trigo harinero en el Reino Unido (Austin et al., 1980), Estados Unidos (Deckerd et al., 1985), Alemania (Feil y Geisler, 1988), o Argentina (Calderini et al., 1997; Miralles y Slafer, 1997). En Australia, por el contrario, Siddique et al. (1989) y Yunusa et al. (1993) concluyen que LAI es menor en las variedades modernas durante el periodo desde espiguilla terminal hasta emergencia de las aristas. Entre la bibliografía consultada, solamente en el trabajo de Canevara et al. (1994) aparece una débil tendencia hacia un mayor LAI en las variedades modernas de trigo harinero.

En nuestro trabajo, LAI no mostró cambios importantes con la introducción de los genes de enanismo después de la “*Revolución Verde*”, como ya se encontró en otros trabajos (Royo et al., 2007; Álvaro et al., 2008a). Nuestros resultados han mostrado que el índice de área verde (GAI) tampoco mostró cambios a lo largo de la mejora, posiblemente debido al hecho de que la reducción en el índice de área del tallo (SAI) causado por la introgresión de los genes de enanismo fue compensado por el aumento en el índice de área de la espiga (EAI) debido al aumento en el número de espigas por metro cuadrado (Royo et al., 2007).

No obstante, aunque los cultivares con el alelo *Rht-B1b* tengan unas hojas más pequeñas (Miralles and Slafer, 1997) esto podría haber sido compensado por el aumento en la tasa fotosintética por unidad de superficie foliar, como han sugerido varios autores (Le Cain et al., 1989; Morgan et al., 1990; Flinthman et al., 1997), haciendo que no aparezcan diferencias significativas en la biomasa total entre los cultivares que llevan o no el alelo *Rht-B1b*, como también se observa en el presente trabajo.

Nuestros resultados también indican que cuando las condiciones son más apropiadas para el crecimiento de la planta, el proceso de senescencia tras la antesis no

varía entre los distintos cultivares que presentan el alelo *Rht-B1b*, lo que se puede deducir del hecho de que no existen diferencias significativas en el contenido de clorofilas en madurez fisiológica. Igualmente, no se encontraron diferencias en la duración del área foliar (LAD) y área verde total (GAD) con la introducción de los genes de enanismo. No obstante, excepto en el año 2001, los cultivares con el alelo *Rht-B1b* presentaron los valores más altos de LAD, probablemente debido a su antesis más temprana, ya que no muestran diferencias en la duración del llenado del grano en comparación con los cultivares que no llevan el alelo *Rht-B1b*.

Con respecto a los valores de contenido en clorofilas (SPAD), nuestros resultados indican que los cultivares con el alelo *Rht-B1b* presentaron los valores más altos durante el periodo vegetativo y el llenado del grano, posiblemente por el hecho de que las hojas bandera de los cultivares con *Rht-B1b* tienden a tener hojas más pequeñas y delgadas pero con mayor concentración de Rubisco por unidad de área que las hojas banderas de los cultivares sin el alelo *Rht-B1b* (Pyke and Leech, 1985). Se puede especular también que después de antesis, como consecuencia de su mayor fuerza de sumidero, los cultivares con el alelo *Rht-B1b* movilizan proteínas a una velocidad mayor que otros cultivares, ya que se ha demostrado que usan más eficientemente las reservas acumuladas durante preantesis que los cultivares sin el alelo *Rht-B1b* (Álvaro et al., 2008b; Isidro et al., 2008, enviado)

Con respecto a la biomasa (CDW) en antesis, nuestros resultados muestran que los cultivares sin el alelo *Rht-B1b* tuvieron los valores más altos en CDW presumiblemente debido a que ellos alcanzan la antesis más tarde y a que poseen mayor tasa fotosintética durante la elongación del tallo (Gent, 1995; Youssefian et al., 1992 b; Koc et al., 2003). No obstante, en madurez fisiológica no se observaron diferencias significativas entre cultivares, indicando que la biomasa en cosecha permaneció invariable con la introducción de los genes de enanismo.

Estos resultados confirman que el alelo *Rht-B1b* no ha cambiado la arquitectura del cultivo, sino más bien fue responsable de un cambio en la distribución de la biomasa dentro de la planta sin modificar la biomasa total en cosecha (Koc et al., 2003; Royo et al., 2007; Álvaro et al., 2008b). De hecho, varios autores (LeCain et al., 1989; Morgan et al., 1990; Richards, 2000) ha indicado que la mayor fuerza del sumidero durante el llenado del grano asociado a los cultivares con el alelo *Rht-B1b* conduce a una mayor tasa fotosintética durante este periodo, sugiriendo que dicha tasa disminuye si el tamaño del sumidero se reduce, es decir, que aunque las hojas de estos cultivares son más

pequeñas se compensa con una tasa fotosintética mayor, con lo que la biomasa total en cosecha no varía con respecto a los cultivares sin el alelo *Rht-B1b* (Koc et al., 2003; Foulkes et al., 2007). Es decir, durante el periodo de postantesis los cultivares sin el alelo *Rht-B1b* tienden a acumular significativamente menos biomasa (Calderini et al., 1997).

## *II- Absorption and use-efficiency of photosynthetic radiation.*

Los resultados del presente trabajo también indican que la introducción del alelo *Rht-B1b* no causó diferencias significativas en la fracción de radiación absorbida por el cultivo ni en las medidas longitudinales ni en las transversales, probablemente como consecuencia del efecto compensatorio en las superficies verdes mencionado más arriba. El trabajo también indica que el coeficiente de extinción ( $k$ ) fue similar entre los distintos cultivares, sugiriendo que bajo condiciones mediterráneas las reducciones en la altura de la planta como consecuencia de la mejora en el trigo duro no cambió el patrón de atenuación de la luz dentro del dosel foliar. Estos resultados apoyan estudios previos obtenidos con trigo blando en Argentina (Calderini et al., 1997) y en Australia (O'Connell et al., 2004)

Las diferencias en  $k$  entre cultivares pueden deberse a las variaciones en la distribución y orientación de las hojas (Bonhomme, 2000) y también a su contenido en clorofila, como se confirma en este estudio. Así, nuestros resultados indican que los valores de SPAD en la hoja bandera podrían ser un buen predictor para los valores de  $k$  en trigo duro en antesis. Además, se observa una tendencia al aumento de los valores de  $k$  como consecuencia de la introducción de los genes de enanismo, como ya indicaron Miralles y Slafer (1997).

Las diferencias en la eficiencia en el uso de la radiación (RUE) han sido bien documentada en cereales (ver revisión en Sinclair y Muchow, 1999), aunque hay varios estudios contradictorios para los valores de RUE y su influencia sobre la acumulación de biomasa antes de antesis. Siddique et al. (1989) y Yunusa et al. (1993) mostraron que los valores de RUE antes de antesis parecen haber aumentado en los cultivares australianos como consecuencia de la mejora, de manera que eran los cultivares modernos los que presentaban mayor biomasa en el periodo de preantesis. Sin embargo, los cultivares antiguos argentinos habían mostrado mucha más eficiencia que los modernos en la RUE (Slafer et al., 1990; Calderini et al., 1997; Reynolds et al., 2005).

Nuestros resultados están en acuerdo con estos autores, no sólo para los valores de RUE en antesis, sino también para los valores de RUE durante el llenado del grano. La presencia de los genes de enanismo afecta significativamente al periodo de pre y post antesis, respectivamente.

Posiblemente, los cultivares sin el alelo *Rht-B1b* presentan los valores más altos en RUE en preantesis debido a que pueden interceptar una mayor fracción de radiación difusa dentro del dosel foliar, como consecuencia de presentar unas hojas más grandes en comparación con los cultivares con el alelo *Rht-B1b*, y por lo tanto podrían interceptar menos radiación dispersa en capas más cercanas al suelo (Sinclair et al., 1992; Chouldhury, 2000).

De acuerdo con esto, la mayor fracción de radiación transmitida a través de las espigas hacia las hojas en los cultivares con el alelo *Rht-B1b* después de antesis, podría explicar la mayor eficiencia de estos cultivares para la acumulación de biomasa (Kemanian et al., 2004; Álvaro et al., 2008b). Además, el mayor RUE de los cultivares con el alelo *Rht-B1b* durante el llenado del grano podría ser debido no sólo a su mayor capacidad de sumidero, como ya postularon Calderini et al. (1997) y Muurinen y Peltonen-Sainio (2006), sino también a su mayor capacidad de interceptar radiación fotosintéticamente activa por la espiga, la cual contribuye marcadamente a la fotosíntesis total de la planta. Por lo tanto, sería importante aumentar la capacidad de sumidero para aumentar el RUE (Reynolds et al., 2000; Reynolds and Pfeiffer, 2000; Pfeiffer et al., 2000).

No obstante, ya que la capacidad fotosintética no ha limitado el aumento del rendimiento en el pasado, la fotosíntesis por unidad de área foliar no es el factor limitante para los aumentos futuros del rendimiento en trigo duro ya que la capacidad fotosintética de los cultivares modernos no ha variado mucho, como ya estableció Richards en 1996. A su vez, los valores más bajos en RUE durante el periodo de preantesis en aquellos cultivares portadores del alelo *Rht-B1b* podrían deberse a la desfavorable arquitectura del dosel foliar determinada por la reducción en la longitud de los entrenudos (Calderini et al., 1996; Foulkes et al., 2001).

Con respecto a la tasa de crecimiento relativo (CGR), nuestros resultados muestran un importante descenso en CGR y RUE después de antesis para los cultivares sin el alelo *Rht-B1b*, probablemente asociada con su reducción en el tamaño del sumidero (Calderini et al., 1997). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la fuerza del sumidero podría jugar un papel importante en el mantenimiento de las áreas verdes

en los cereales durante la maduración, causada por la superior demanda de asimilados por parte de su mayor número de granos en crecimiento (Evans, 1993). Realmente, en nuestro trabajo, el rendimiento de todos los cultivares se relacionó linealmente con la tasa de asimilación neta durante el llenado del grano, lo que sugiere la presencia de un fuerte mecanismo de retroalimentación fotosintética en los cultivares con mayor capacidad de sumidero.

### **Efecto de la mejora sobre la acumulación de proteínas y aminoácidos a lo largo del llenado del grano.**

Se observaron diferencias en el patrón de acumulación de materia seca, proteínas y aminoácidos durante los dos años de estudio entre los distintos cultivares en ambos ambientes. En este sentido, la diferencia más notable se encontró en el tiempo térmico necesario para alcanzar la madurez fisiológica entre los distintos ambientes. Así, en Granada, el tiempo térmico necesario fue aproximadamente de unos 250 GDD mayor que en Lleida. Además, se observó una disminución en la acumulación de materia seca y aminoácidos cuando se supera un cierto umbral de temperatura.

Estos resultados están de acuerdo con estudios previos de Spiertz (1977), quién informó que la temperatura podría jugar un papel negativo en la acumulación de materia seca. Esto explicaría que en el ambiente del sur se produzca una disminución en la acumulación de materia seca al final de la curva de llenado del grano que no ocurre en el norte, ya que las temperaturas no alcanzan los valores tan altos como en el sur. Las altas temperaturas inducen una reducción de la acumulación de almidón posiblemente debido a un aumento de las pérdidas por respiración, conduciendo a una menor conversión de sacarosa a almidón (Jenner, 1994), ya que se reduce la actividad de la enzima almidón sintasa (Keeling et al., 1993).

Poco se conoce del efecto de la temperatura sobre la acumulación de aminoácidos y proteínas en trigo duro. Una posible explicación de la disminución en la acumulación de estos compuestos al final del llenado del grano en ambiente más cálido, podría ser que la síntesis de proteínas metabólicas y de reserva se reemplace por proteínas protectoras frente al calor cuando las temperaturas aumentan considerablemente (Blumenthal et al., 1990; Hendershot et al., 1992) o porque esas proteínas protectoras causen la reducción en el tamaño y distribución de las gluteninas (Gibson et al., 1998) o por la actividad chaperona de algunas proteínas protectoras

frente al calor (Basha., 2004). No obstante, aunque las evidencias sugieren que estas proteínas de protección frente al calor tienen un papel de termotolerancia al estrés por calor cuando las temperaturas aumentan considerablemente (Vierling, 1991), es necesario estudiarlo más en profundidad.

Además, se encontraron diferencias entre los distintos periodos con respecto a la acumulación de proteínas y aminoácidos durante el llenado del grano. En primer lugar, durante los primeros 175 GDD y 250 GDD bajo condiciones más frías y más calurosas, respectivamente, los cultivares modernos e intermedios presentaron valores similares de contenido de proteína y aminoácidos. A partir de ese tiempo térmico hasta el final del desarrollo del grano, los cultivares antiguos presentaron los valores más altos para esas variables. En segundo lugar, cuando se estudió la máxima tasa de acumulación de proteínas y aminoácidos, se observó que los cultivares antiguos mostraron los valores más altos para el contenido de proteínas y la mayoría de los aminoácidos.

Dos posibles razones pueden explicar las diferencias observadas a lo largo de la mejora en el siglo XX. Primeramente, la mejora ha adelantado el tiempo a antesis (Álvaro et al., 2008b), con lo que podrían empezar a llenar los granos antes que los más antiguos, pudiendo así, removilizar antes los asimilados de naturaleza proteica.

En segundo lugar, Brancourt-Hulmel et al., 2003 ha encontrado para cultivares franceses que los cultivares modernos usan más eficientemente el nitrógeno aportado con los fertilizantes y que la eficiencia de translocación de materia seca aumentó un 20% en los cultivares modernos cuando se comparan con los antiguos (Álvaro et al., 2008b). No obstante, los cultivares modernos presentan un tallo más pequeño como consecuencia de la mejora, particionando mucha más materia seca hacia la espiga que los cultivares antiguos (Bishop and Bugbee, 1998). Así, durante los primeros días del llenado del grano los cultivares modernos normalmente presentan mayor cantidad de contenido de proteínas y aminoácidos.

Sin embargo, a medida que el desarrollo del grano progresa, las reservas vegetativas (tallo) disminuyen, con lo que al final del llenado del grano los cultivares modernos presentan menos proteínas y aminoácidos. La futura mejora debería intentar aumentar los niveles de nitrógeno en las partes vegetativas de la planta, aumentando así las reservas para la translocación de proteínas y aminoácidos hacia el grano.

Nuestros resultados también han mostrado cambios entre los distintos ambientes. Así en el sur, la disminución en el contenido de proteína y aminoácidos durante la última parte del llenado del grano podría ser debido a las mayores temperaturas durante

el llenado del grano que cambian la proporción de proteínas citoplasmáticas acumuladas (comentado anteriormente), y al posible descenso en la disponibilidad de nitrógeno como resultado de la menor disponibilidad de agua, de manera que la mayor parte del nitrógeno se usa durante las primeras fases del desarrollo. No obstante, en el norte no se observa tal efecto, posiblemente debido a que no superan el umbral de 400 GDD con lo que no muestran ninguna reducción durante el llenado del grano.

Nuestros resultados también demuestran que la duración de la acumulación de proteínas y aminoácidos necesarios para alcanzar el 95% del total del peso de proteína y aminoácidos fue mayor para el ambiente del norte que en el sur. Es decir, los cultivos del sur están más cerca de la máxima tasa de acumulación, con lo que las condiciones más áridas de este ambiente favorecen mejor la acumulación de proteínas y aminoácidos que en el norte (Rharrabti et al., 2003).

Con respecto a la composición aminoacídica, es conocido que la acumulación de las distintas fracciones de proteínas es altamente asincrónica, afectando por tanto a los cambios en la composición de proteínas durante el desarrollo del grano (Triboi et al., 2003). Nuestros resultados, que son similares a otros trabajos Singh et al., (1974) y Martín del Molino, et al., (1988), muestran como a medida que el desarrollo del grano progresa, se produce una disminución de las cantidades relativas de ácido aspártico, treonina, alalina y lisina, que son más abundantes entre las albúminas y globulinas. Por otro lado, las cantidades relativas de glutamina, prolina, arginina y fenilalanina, que son más abundantes en gliadinas y gluteninas, aumentan.

También, se observan cambios en la composición de aminoácidos debidos a la proporción relativa de las fracciones de proteínas. Así, la proporción de albúminas y globulinas disminuye a lo largo del tiempo a medida que aumenta las proteínas de almacenamiento. Los aminoácidos, serina, leucina, isoleucina e histidina, no sufren grandes variaciones a lo largo del desarrollo del grano, posiblemente debido a que se encuentran en proporciones similares entre las distintas fracciones de proteínas (Mossé, 1968). La cantidad de arginina aumenta al final del periodo de llenado del grano, posiblemente debido a que se sintetizan proteínas protectoras del del estrés térmico e hídrico y contra el ataque de de patógenos (Vensel et al, 2005).

## **Uso de los marcadores SSRs para la introducción de una nueva técnica molecular en laboratorio**

La diversidad genética de la mayoría de los cultivos incluidos el trigo duro, ha sufrido cambios a lo largo del tiempo, primeramente como consecuencia de los procesos de domesticación y también debido al uso recurrente del germoplasma que no favorecen la recombinación genética (Hoisington et al, 1999; Donini et al, 2000). Los marcadores moleculares son una herramienta útil para la caracterización morfológica y fisiológica de los cultivares, así como para el análisis de las relaciones genéticas entre los mismos, ya que son muy independientes del tejido y del efecto ambiental, permitiendo la identificación de un cultivar de una forma muy temprana en el cultivo (Manifiesto et al., 2001).

El objetivo principal de este capítulo fue el aprendizaje de una técnica molecular nueva para nuestro laboratorio. Aunque los resultados no han sido los deseados a la hora de determinar las relaciones filogenéticas entre los cultivares, como consecuencia de una batería de marcadores SSRs limitada, sí se ha podido comprobar que la mayor variabilidad encontrada en el germoplasma español en comparación con los italianos podría indicar las estrategias de mejora contrastante entre ambos países como ya estableció Royo et al (2007). Así, la mejora en Italia empezó con los estudios de Strampelli en 1900 y esto podría haber reducido la variabilidad en el germoplasma Italiano.

Sin embargo, la mejora en España ocurrió durante la segunda mitad del siglo XX, con la introducción de germoplasmas del CIMMYT. De hecho, un trabajo reciente especuló que la reducción en la riqueza alélica de los cultivares italianos podrían ser un buen indicador de la erosión del germoplasma pre-mejora y apuntó que la implementación de apropiados métodos de conservación de germoplasma es prioritario para la calidad del alimento (Figliuolo et al., 2007).



## References

- Abbate, P.E., Andrade, F.H., Culot, J.P., 1995. The effects of radiation and nitrogen on number of grains in wheat. *J. Agr. Sci. (Cambridge)*. 14, 351-360.
- Álvaro, F., Isidro, J., Villegas, D., Garcia del Moral, L.F., Royo, C., 2008a. Old and modern durum wheat varieties from Italy and Spain differ in main spike components. *Field Crops Res.* 106, 86-93.
- Álvaro, F., Isidro, J., Villegas, D., Garcia del Moral, L.F., Royo, C., 2008b. Breeding effect on grain filling, biomass partitioning and remobilization in Mediterranean durum wheat. *Agron. J.* 100, 361-370.
- Austin, R.B., Morgan, C.L., Ford, M.A., Blackwell, R.D., 1980. Contributions to grain yield from pre-anthesis assimilation in tall and dwarf barley phenotypes in two contrasting seasons. *Ann. Bot.* 45, 309-319.
- Basha, E., Leel, G.J., Demeler, B., Vierling, E., 2004. Chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from wheat. *Eur. J. Biochem.* 271, 1426-1436.
- Bishop, D.L., Bugbee, B.G., 1998. Photosynthetic capacity and dry mass partitioning in dwarf and semi-dwarf wheat (*Triticum aestivum* L). *J. Plant Physiol.* 153, 558-565.
- Blumenthal, C., Bekes, F., Wrigley, C.W., Barlow, E.W.R., 1990. The acquisition and maintenance of thermotolerance in Australian wheats. *Austr. J. Plant Physiol.* 17, 37-47.
- Bonhomme, R., 2000. Beware of comparing RUE values calculated from PAR vs solar radiation or absorbed vs. intercepted radiation. *Field Crops Res.* 68, 247-252.
- Brancourt-Hulmel, M., Doussinault, G., Lecomte, C., Bérard, P., Le Buanec, B., Trotter, M., 2003. Genetic Improvement of Agronomic Traits of Winter Wheat Cultivars Released in France from 1946 to 1992. *Crop Sci.* 43, 37-45.
- Calderini, D.F., Miralles, D.J., Sadras, V.O., 1996. Appearance and growth of individual leaves as affected by semidwarfism in isogenic lines of wheat. *Ann. Bot.* 77, 583-589.
- Calderini, D.F., Dreccer, M.F., Slafer, G.A., 1997. Consequences of breeding on biomass, radiation interception and radiation use efficiency in wheat. *Field Crops Res.* 52, 271-281.

- Choudhury, B.J., 2000. A sensitivity analysis of the radiation use efficiency for gross photosynthesis and net carbon accumulation wheat. *Agric. Forest Meteorol.* 101, 217-234.
- Deckerd, E.L., Bush, R.H., Kofoid, K.D., 1985. Physiological aspects of spring wheat improvement. In, J.Hasper, L.Schrader and R.Howell (Eds.), *Exploitation of Physiological and Genetic Variability to enhance crop productivity. American Society of Plant Physiologists, Rockland, MD*, pp. 45-54.
- Donini, P., Law, J.R., Koebner, R.M.D., Reeves, J.C., Cooke, R.J., 2000. Temporal trends in the diversity of UK wheats. *Theor. Appl. Genet.* 100, 912–917.
- Evans, L.T., 1993. *Crop, evolution, adaptation and Yield.* Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Feil, B., Geisler, G., 1988. Untersuchungen zur Bildung und Verteilung der Biomasse bei altern und neuen deutschen sommerweizensorten. *J. Agro. Crop. Sci.* 161, 148-156.
- Figliuolo, G., Mazzeo, M., Greco, I., 2007. Temporal variation of diversity in Italian durum wheat germplasm. *Genet Resour Crop Evol.* 54, 615–626.
- Fischer, R.A., 1985. Number of kernels in wheat crops and the influence of solar radiation and temperature. *J. Agri. Sci, Cambridge* 105: 447-461.
- Flintham, J.E., Borner, A., Worland, A.J., Gale, M.D., 1997. Optimizing wheat grain yield, effects of Rht (gibberellin-insensitive) dwarfing genes. *J. Agri. Sci.* 128, 11-25.
- Foulkes, M.J., Snape, J.W., Shearman, V.J., Reynolds, P., Gaju, O., Sylvester- Bradley, R., 2007. Genetic progress in yield potential in wheat, recent advances and future prospects. *J. Agric. Sci.* 145, 17–29.
- Gale, M.D., Youssefian, S., 1985. Dwarfing genes of wheat. In G.E Russell (ed.). *Progress in Plant Breeding*, Butterworth, London. p. 1-35.
- García del Moral L.F., Rharrabti, Y., Elhani, S., Martos, V., Royo, C., 2005. Yield Formation in Mediterranean durum wheats under two contrasting water regimes based on path-coefficient analysis. *Euphytica* 146, 213-222.
- García del Moral, L.F., Rharrabti, Y., Villegas, D., Royo, C., 2003. Evaluation of grain yield and its components in durum wheat under Mediterranean conditions: An ontogenic approach. *Agron. J.* 95, 266-274.
- Gent, M.P.N., 1995. Canopy light interception, gas exchange and biomass in reduced height isolines of winter wheat. *Crop Sci.* 35, 1636-1642.

- Gibson, L.R., McCuskey, P.J., Tilley, K.A., Paulsen, G.M., 1998. Quality of hard red winter wheat grown under high temperature conditions during maturation and ripening. *Cereal chem.* 75, 421-427.
- Hedden, P., 2003. The genes of the Green Revolution. *Trends Gen.* 19, 5-9.
- Hendershot, K.L., Weng, J., Nguyen, H.T., 1992 Induction temperature of heat-shock protein synthesis in wheat. *Crop Sci.* 32, 256-261.
- Hoisington, D., Khairallah, M., Reeves, T., Ribaut, J.M., Skovmand, B., Taba, S., Warburton, M., 1999. Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 5937–5943.
- Jenner, D.F., 1994. Starch synthesis in the kernel of wheat under high temperature conditions. *Aust. J. Plant Physiol.* 21, 791-806.
- Keeling, P.L., Bacon, P.J., Holt, D.C., 1993. Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. *Planta.* 185, 342-348.
- Kemalian, A.R., Stöckle, C.O., Huggins, D.R., 2004. Variability of Barley radiation-use efficiency. *Crop Sci.* 44, 1662-1672.
- Kirby, E.J.M., 1988. Analysis of leaf stem and ear growth in wheat from terminal spikelet stage at anthesis. *Field Crops Res.* 18, 127-140.
- Koc, M., Barutcular, C., Genc, I., 2003. Photosynthesis and productivity of old and modern durum wheats in a Mediterranean environment. *Crop Sci.* 43, 2089–2098.
- Langer, R.H.M., Hanif, M., 1973. A study of floret development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ann.Bot.* 37, 743-751.
- LeCain, D.R., Morgan, J.A., Zerbi, G., 1989. Leaf anatomy and gas Exchange in nearly isogenic semi-dwarf and tall winter wheat. *Crop Sci.* 29, 1246-1251.
- Manifesto, M.M., Schlatter, A.S., Hopp, H.E., Suarez, E.Y., Dubcovky, J., 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. *Crop Sci.* 41, 682–690.
- Martin del Molino, I.M., Rojo, B., Martinez-Carrasco, R., Perez, P., 1988. Amino acid composition of wheat grain. 1: Changes during development. *J. Sci. Food Agric.* 42, 29-37.

- Miralles, D.J., Slafer, G.A., 1995. Yield, biomass and yield components in dwarf, semidwarf and tall isogenic lines of spring wheat under recommended and late sowing dates. *Plant Breed.* 14, 392–396.
- Miralles, D.J., Katz, S.D., Colloca, A., Slafer, G.A., 1998. Floret development in near isogenic wheat lines differing in plant height. *Field Crops Res.* 59, 21-30.
- Miralles, D.J., Rharrabti, Y., Royo, C., Villegas, D., García del Moral, L.F., 2002. Grain setting strategies of Mediterranean durum wheat cultivars released in different periods (1900–2000). In: Association of applied biologists (eds) *Genotype to phenotype: narrowing the gap*. The Royal Agricultural College, Cirencester, UK. December 16–18.
- Morgan, J.A., LeCain, D.R., Wells, R., 1990. Semi-dwarfing genes concentrate photosynthetic machinery and affect leaf gas exchange of wheat. *Crop Sci.* 30, 602-608.
- Mossé, J., 1968. Les protéines des céréales. In: Profrés en Chimie Agricole et Alimentaire, *Hermann*. Paris. 47-81.
- Miralles, D.J., Slafer, G.A., 1997. Radiation interception and radiation use efficiency of near-isogenic wheat lines with different height. *Euphytica* 97, 201-208.
- Muurinen, S., Peltonen-Sainio, P., 2006. Radiation-use efficiency of modern and old spring cereal cultivars and its response to nitrogen in northern growing conditions. *Field Crops Res.* 96, 366-373.
- O’Connell, M.G., O’Leary, G.J., Whitfield, D.M., Connor, D.J., 2004. Interception of photosynthetically active radiation and radiation-use efficiency of wheat, field pea and mustard in a semi-arid environment. *Field Crops Res.* 85, 111-124.
- Peng, J.R., Richards, D.E., Hartley, N.M., Murphy, G.P., Devos, K.M., Flintham, J.E., Beales, J., Fish, L.J., Worland, A.J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J.W., Gale, M.D., Harberd, N.P., 1999. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature.* 400, 256-261.
- Pyke, K.A., Leecie, R.M., 1985. Variation in ribulose-1,5-biphosphate carboxylase content in a range of winter wheat genotypes. *J. Exp. Bot.* 36, 1523-1529.
- Rebetzke, G.J., Richards, R.A., 2000. Gibberellic acid-sensitive dwarfing genes reduce plant height to increase kernel number and grain yield of wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 51, 235-245

- Reynolds, M.P., Pfeiffer, W.H., 2000. Applying physiological strategies to improve yield potential. En, C.Royo, M.M Nachit, N. di Fonzo, J.L Araus (Eds.), *Durum Wheat Improvement in the Mediterranean Region*. New challenges, Zaragoza, Spain, Options Méditerranéennes. Serie A. Séminaires Méditerranéens, No. 40, 95-103.
- Reynolds, M.P., Van Ginkel, M., Ribaut, J.M., 2000. Avenues for genetic modification of radiation use efficiency in wheat. *J. Exp. Botany*. 15, 459-473.
- Reynolds, M.P., Pellegrinesch, A., Skovmand, B., 2005. Sink-limitation to yield and biomass, a summary of some investigations in spring wheat. *Ann. Appl. Biol.* 146, 39-49.
- Richards, R.A., 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Regul.* 20, 157-166.
- Richards, R.A., 2000. Selectable traits to increase crop photosynthesis and yield of grain crops. *J. Exp. Bot.* 51, 447-458.
- Rosegrant, M.W., Sombilla, M.A., Gerpacio, R.V., Ringler, C., 1997. Global food markets and US exports in the twenty-first century. Paper presented at the Illinois World Food and Sustainable Agriculture Program Conference, Meeting the Demand for Food in the 21st Century: Challenges and Opportunities, 28 May, University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Royo, C., Álvaro, F., Martos, V., Ramdani, A., Isidro, J., Villegas, D., Garcia del Moral, L.F., 2007. Genetic changes in durum wheat yield components and associated traits in Italian and Spanish varieties during the 20th century. *Euphytica* 155, 259-270.
- Royo, C., Martos, V., Ramdani, A., Villegas, D., Rharrabti, Y., García del Moral, L.F., 2008. Genetic improvements in yield and carbon isotope discrimination in Italian and Spanish durum wheat during the 20th century. *Agron. J.* 100, 352-360.
- Siddique, K.H.M., Beldford, R.K., Perry, M.W., Tennant, D., 1989. Growth, development and light interception of old and modern wheat cultivars in a Mediterranean environments. *Aust. J. Agric. Res.* 40, 473-487.
- Sinclair, T.R., Shiraiwa, T., Hammer, L.G., 1992. Variation in crop radiation-use efficiency with increased diffuse radiation. *Crop Sci.* 32, 1281-1284.
- Sinclair, T.R., Muchow, R.C., 1999. Radiation use efficiency. *Adv. Agron.* 65, 215-265.

- Singh, U., Chatterjee, S.R., Das, H.K., 1974. Development of amino acid imbalance in wheat proteins. Part 1-Changes in amino acid composition of proteins in endosperm and embryo during grain maturation. *Ind. J. Biochem. Biophys.* 11, 74-77.
- Slafer, G.A., Andrade, F.H., Satorre, E.H., 1990. Genetic improvements effects on pre-anthesis physiological attributes related to wheat grain yield. *Field Crops Res.* 23, 255-263.
- Spiertz, J.H.J., 1977. The influence of temperature and light intensity on grain in relation to the carbohydrate and nitrogen economy of the wheat plant. *Neth. J. Agric. Sci.* 25, 182-197.
- Triboi, E., Martre, P., Triboi-Blondel, A.M., 2003. Environmentally-induced changes in protein composition in developing grains of wheat are related to changes in total protein content. *J. Exp. Bot.* 54, 1731-1742.
- Youssefian, S., Kirby, E.J.M., Gale, M.D., 1992a. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat. 1. Effects on development of the ear, stem and leave. *Field Crops Res.* 28, 179-190.
- Youssefian, S., Kirby, E.J.M., Gale, M.D., 1992b. Pleiotropic effects of the GA-insensitive Rht dwarfing genes in wheat 2. Effects on leaf, stem, ear and floret growth. *Field Crops Res.* 28, 191- 210.
- Yunusa, I.A.M., Siddique, K.H.M., Belford, R.K., Karimi, M.M., 1993. Effect of canopy structure on efficiency of radiation interception and use in spring wheat cultivars during the pre-anthesis period in a Mediterranean type environment. *Field Crops Res.* 35, 113-122.
- Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Cai, N., Wong, J.H., Buchanan, B.B., Hurkman, W.J., 2005. Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *Proteomics.* 5, 1611-1994.
- Vierling, E., 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol and Plant Mol Biol.* 42, 579-620.



## Conclusiones

*En página anterior:  
Espigas de trigo a punto de ser  
cosechadas.*





## Conclusiones

1. El rendimiento en grano depende principalmente de las variaciones en el número de espigas por metro cuadrado en aquellos cultivares que no llevan el alelo *Rht-B1b*, mientras que en aquellos que si presentan el alelo depende principalmente de las variaciones en el número de granos por espiga.
2. El análisis por coeficientes de sendero constituye una herramienta útil no sólo para estudiar el efecto directo entre caracteres que determinan el rendimiento, sino también para cuantificar la magnitud de los efectos indirectos que la presencia del alelo *Rht-B1b* determina sobre los componentes del rendimiento y otros atributos relacionas con la producción de grano.
3. La reducción del tiempo desde siembra a antesis como consecuencia del proceso de mejora durante el último siglo, se debió principalmente a un acortamiento de las fases de siembra a espiguilla terminal y de espiguilla terminal a zurrones hinchados.
4. Futuros aumentos en el número de granos por espiga se alcanzarían aumentando la fase entre zurrón-antesis, disminuyendo así el periodo de competición entre tallo y espiga y por lo tanto aumentando el número de flores fértiles que sobreviven hasta antesis.
5. El número de granos por espiga depende en mayor proporción del número absoluto de flores fértiles que llegan a antesis más que de la cantidad relativa de aborto floral que se produce después de la fertilización, dado que el aborto floral resulta bastante estable entre cultivares y ambientes.
6. La introducción del alelo *Rht-B1b* durante el último siglo no cambió significativamente el índice de área verde, posiblemente debido a que la reducción en el índice de área foliar y de área de tallos causada por la

- disminución de altura de la planta y del número de hojas, ha sido compensada por un aumento en el índice de área de las espigas, derivado del mayor número de éstas por m<sup>2</sup> en las variedades modernas.
7. El peso seco en antesis de los cultivares sin el alelo *Rht-B1b* se debió a la presencia de un mayor índice de área de los tallos, así como a un mayor periodo hasta antesis, lo que permite probablemente la captación de una mayor radiación total durante la preantesis y por lo tanto una mayor producción de biomasa.
  8. La biomasa total en madurez no ha cambiado a lo largo de la mejora, posiblemente debido a que la mayor fuerza de sumidero de los cultivares con el alelo *Rht-B1b* permite compensar las diferencias encontradas en biomasa en antesis.
  9. La mejora durante el último siglo no ha cambiado la fracción de radiación absorbida ni el coeficiente de extinción en antesis, posiblemente debido al efecto compensatorio entre la superficie verde de los distintos órganos de la planta, que no cambia la arquitectura del cultivo.
  10. El contenido de clorofila de la hoja bandera en antesis, medido en unidades SPAD, podría ser un buen estimador para los valores del coeficiente de extinción bajo condiciones Mediterráneas.
  11. El patrón de llenado de proteínas y aminoácidos a lo largo del llenado del grano es diferente entre los ambientes estudiados. Mientras que en el sur se necesita unos 250 GDD más para alcanzar la madurez fisiológica, en el norte no superan los 400 GDD.
  12. La tasa de acumulación de proteínas y aminoácidos fue mayor en los cultivares antiguos que en los modernos. Posiblemente a la mayor capacidad de

almacenar nitrógeno y acumularlo en sus tejidos vegetativos (tallo) que los cultivares modernos.

13. La mejora futura debería conducir hacia un aumento de los niveles de nitrógeno en los tejidos vegetativos (tallo) en ambiente mediterráneo, de esta manera se aumentaría la reserva disponible para la translocación hacia el grano, reduciéndose la pérdida de nitrógeno de las plantas y mejorando la eficiencia de partición hacia los granos.



*Llegué por el dolor a la alegría.  
Supe por el dolor que el alma existe.  
Por el dolor, allá en mi reino triste,  
un misterioso sol amanecía.*

*Era alegría la mañana fría  
y el viento loco y cálido que embiste.  
(Alma que verdes primaveras viste  
maravillosamente se rompía. )*

*Así la siento más. Al cielo apunto  
y me responde cuando le pregunto  
con dolor tras dolor para mi herida.*

*Y mientras se ilumina mi cabeza  
ruego por el que he sido en la tristeza  
a las divinidades de la vida.*

*José Hierro*

*De "Alegría" 1947*