

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS
DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**ESTABILIDAD Y TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE
LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

ROSARIO ESMERALDA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN FRANCISCO PONCE MEDINA

ESTA TESIS FUE REALIZADA BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR INDICADO, HA SIDO APROBADA POR EL MISMO Y ACEPTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California. Octubre de 2010

COMITÉ PARTICULAR

Director: _____
Dr. Juan Francisco Ponce Medina

Co-director: _____
Dr. Edgar Omar Rueda Puente

Asesor: _____
Dr. Leonel Avendaño Reyes

Asesor: _____
Dr. Jesús Santillano Cazares

Secretario: _____
Dr. Manuel Cruz Villegas

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por brindarme la oportunidad mediante el otorgamiento de una beca para la realización de mis estudios de doctorado.

Al Instituto de Ciencias Agrícolas

Por brindarme la oportunidad de regresar como alumna, gracias por apoyarme durante mis estudios y brindarme recursos humanos con excelencia académica, mis maestros, que son parte importante para mi formación profesional, gracias.

Al Dr. Juan Francisco Ponce Medina por darme la oportunidad de realizar esta investigación y por darme una palabra de aliento cuando más lo necesitaba, recuerdo su frase “Solo tiene que dormir tres horas, a la semana siguiente solo tiene que dormir una hora... Gracias por estar ahí, a pesar de todos los obstáculos... se ha logrado finalizar esta etapa de mi formación profesional. Mi más profundo agradecimiento por ayudarme a conseguir este logro personal.

Al M.C Juan José Paz Hernández por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo para realizar esta investigación y por brindarme sus conocimientos, que fueron de gran ayuda para culminar esta etapa de mi vida. Gracias Ing.

A la Molinera del Valle por brindarme su apoyo en infraestructura para realizar los análisis Reológicos y en las labores de campo. Gracias.

Al Dr. Leonel Avendaño por su invaluable apoyo en los análisis estadísticos, y sus acertados consejos en la redacción del artículo y tesis. Gracias

Al Dr. Rueda Puente por brindarme su apoyo, por darme ánimo y sus acertados consejos para la redacción de la tesis. Gracias

Al Dr. Manuel Cruz Villegas por su apoyo y acertados consejos en la revisión de la tesis. Gracias

Al Dr. Jesus Santillano Cazares por su apoyo y acertados consejos en la revisión de la tesis. Gracias

Al Ph. D. Mike Giroux. por la oportunidad que me brindó al haberme aceptado como estudiante para realizar una estancia de investigación en Plant Science Department of Montana State University, dentro de mi formación doctoral.

A todos mis profesores y amigos que me brindaron su apoyo en la Universidad Autónoma de Baja California. Gracias

Dedicatoria

A mi esposo César, gracias por brindarme tu apoyo y siempre estar conmigo en los momentos más difíciles. Gracias a Tí se ha logrado realizar mi sueño profesional. A mi hijo Valeria, gracias por integrarte a esta etapa de mi vida. A ustedes dedico esta tesis reflejo del gran esfuerzo, dedicación y la paciencia compartida en familia durante mis estudios de doctorado.

Con amor

ESMERALDA

INDICE DE CONTENIDO

	Pag.
Agradecimientos	III
Dedicatoria.....	V
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
INDICE DE FIGURAS	IX
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
1.2 HIPÓTESIS.....	4
2. RESUMEN	5
2.1 ABSTRACT.....	8
3 REVISIÓN DE LITERATURA	11
3.1 FENOTIPO.....	11
3.1.1 Definición y diversidad biológica	11
3.1.2 Ambiente	11
3.1.3 Interacción genotipo x ambiente (IGA).....	12
3.1.3.1 Naturaleza y Causas de la Interacción.....	13
3.1.3.2 Consecuencias de la IGA en el mejoramiento.....	14
3.1.3 Estabilidad y Adaptabilidad	19
3.1.4.1 Definición de términos	19
3.1.4.2 Origen genético de la estabilidad.....	23
3.1.4.3 Análisis de estabilidad	25
3.1.5 Modelos que tienen en cuenta únicamente el efecto genotípico	26
3.1.5.1 Métodos que utilizan el análisis de varianza.....	27
3.1.5.1 Métodos que utilizan la regresión.....	29
3.1.5.1.1 Modelo general.....	29
3.1.5.1.2 Modelo de Eberhart y Russell.....	30
3.1.5.1.3 Métodos multiparamétricos.....	32
3.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS.....	36
3.2.1 Metodología de transferencia directa	37
3.2.1.1 Transformación genética con biobalística	37
4 MATERIALES Y MÉTODOS	39
PARA ESTABILIDAD DE TRIGOS DE GLUTEN FUERTE.....	39
4.1 DESCRIPCIÓN DE LAS LOCALIDADES DE LOS EXPERIMENTOS.....	39
4.2 ARREGLO DE TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
4.3 METODOLOGÍA PARA LA COLECCIÓN DE DATOS	42
4.3.1 Rendimiento de grano.....	42
4.3.2 Rendimiento de paja.....	42
4.3.3 Índice de cosecha.....	42
4.3.4 Peso hectolítrico	42
4.3.5 Concentración de proteína en el grano	43
4.3.6 Porcentaje de panza blanca.....	43
4.3.7 Análisis reológicos de las harinas	43
4.3.8 Alveogramas para medir la fuerza de gluten	44
4.3.9 Concentración de proteína en la harina y fuerza de gluten (W).....	44
TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE.	46
4.4 PLANTA Y ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS	46

4.5	DISCOS DE RUPTURA Y ESTERILIZACIÓN DE MACROCARRIER Y MEDIO DE CULTIVO	46
4.6	ESTERILIZACIÓN DE MICROPROYECTILES Y BOMBARDEO DE DNA	47
4.7	PRECIPITACIÓN DEL DNA EN LOS MIRCROPROYECTILES, CULTIVO DE EMBRIONES , MICROPROYECTILE-DNA EN EMBRIONES Y DETECCIÓN HISTOQUÍMICA DEL GUS.....	47
4.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	49
4.4.1	Análisis de varianza.....	49
4.4.2	Análisis estadísticos para evaluar parámetros de estabilidad	49
4.4.2.1	Modelo de Eberhart y Russell (1966).....	50
4.4.2.2	Modelo AMMI (Modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa)....	54
4.4.2.3	Maximización de los parámetros de bombardeo	55
5	RESULTADOS Y DISCUSION.....	56
	PARA ESTABILIDAD DE TRIGOS DE GLUTEN FUERTE	56
5.1	ANÁLISIS DE VARIANZA COMBINADO	56
5.2	COMPARACIÓN DE MEDIAS ENTRE GENOTIPOS	58
5.2.1	Rendimiento de grano.....	58
5.2.2	Rendimiento de paja.....	58
5.2.3	Panza blanca.....	59
5.2.4	Peso hectolítrico	60
5.2.5	Índice de cosecha.....	61
5.2.6	Proteína en grano.....	62
5.2.7	Fuerza de gluten.....	62
5.3	METODOLOGÍA DE EBERHART Y RUSSELL(1966).....	64
5.3.1	Rendimiento de grano.....	64
5.3.2	Rendimiento de paja.....	65
5.3.3	Panza Blanca	65
5.3.4	Peso hectolítrico	66
5.3.5	Índice de cosecha.....	66
5.3.6	Proteína en grano.....	67
5.3.7	Fuerza del gluten.....	67
5.4	MODELO AMMI PARA RENDIMIENTO DE GRANO Y SUS COMPONENTES	69
5.5	TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMACIÓN DE LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE.	85
6	CONCLUSIONES	89
	PARA ESTABILIDAD DE TRIGOS DE GLUTEN FUERTE	89
	PARA TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMACIÓN DE LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE.	90
7.	LITERATURA CITADA	91

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag
Cuadro 1. Análisis de varianza de bloques completos al azar combinado apropiado para estudiar la interacción y estimación de componentes de varianza.....	51
Cuadro 2. Análisis de varianza combinada para la estabilidad de Eberhart y Russel (1966)	52
Cuadro 3. Interpretación de los parámetros de Eberhart y Russell para diferentes situaciones posibles que pueden tomar los parámetros de estabilidad, Carballo y Márquez(1970).....	53
Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis combinado para trigos de gluten fuerte evaluados en cuatro ambientes para rendimiento, sus componentes y calidad harinera.....	57
Cuadro 5. Comparación de medias para rendimiento de grano, sus componentes y calidad en tres genotipos de trigo de gluten fuerte durante los años 2007 y 2008.....	63
Cuadro 6. Interpretación de la estabilidad para rendimiento de grano, sus componentes con el modelo univariado de Eberhart y Russell de acuerdo a la interpretación de Carballo y Márquez 1970.....	68
Cuadro 7. Análisis de varianza AMMI en trigos de gluten fuerte bajo fertilidad residual y complementaria durante los ciclos 2007 y 2008.....	71
Cuadro 8. Análisis de varianza AMMI en trigos de gluten fuerte bajo fertilidad residual y complementaria durante los ciclos 2007 y 2008.....	72
Cuadro 9. Media de número de puntos por embrión en varios niveles de presión.....	88

INDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Comportamiento de dos genotipos (G1y G2) en dos ambientes (A1 y A2). a) Ausencia de interacción, b) Interacción simple o cuantitativa y c) Interacción cruzada o cualitativa.....	16
Figura 2. Alveografo para determinar la fuerza de gluten en harina.....	45
Figura 3. Equipo Per Con Inframatic 8611 utilizado para determinar la proteína en harina.....	45
Figura 4. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de rendimiento de grano evaluados en cuatro ambientes.....	73
Figura 5. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de rendimiento de paja evaluados en cuatro ambientes.....	74
Figura 6. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de panza blanca evaluados en cuatro ambientes.....	76
Figura 7. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de peso hectolítrico evaluados en cuatro ambientes.....	78
Figura 8. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de índice de cosecha evaluados en cuatro ambientes.....	80
Figura 9. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de proteína en grano evaluados en cuatro ambientes.....	82
Figura 10. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de fuerza de gluten evaluados en cuatro ambientes.....	84
Figura 11. Media de la relación entre total de número de puntos y el número de embriones como una función de la presión y distancia.....	85

1. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* y *T. durum* L) es uno de los principales cultivos a nivel mundial, ya que se estimó una producción, en los años 2008 y 2009, de 683 millones de toneladas (Canimolt, 2008). La producción de trigo en México en el año 2008 fue de 3.3 millones de toneladas, de las cuales 1.9 millones fueron trigos cristalinos y 1.4 millones destinados para la panificación (INFORURAL, 2008). Este cultivo es uno de los principales granos para la alimentación mexicana, pues con él se elaboran varios productos de consumo masivo como panes, tortillas, pastas, galletas, atoles, papillas, obleas y pasteles. De igual forma, este cultivo es uno de los principales en la temporada otoño –invierno en el noroeste de México y forma parte de la cultura agrícola de los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California. En este último, el Valle de Mexicali representa la zona de mayor producción, ya que en los últimos diez años, la superficie promedio sembrada en este Valle ha sido de 80,000 ha/año, con una producción superior a las 500 mil toneladas y un rendimiento medio de 6.2 ton ha⁻¹, beneficiando a más de 2000 productores y sus familias. En el año 2008, el estado de Baja California generó una producción de 532,450 ton (Pronespere, 2008).

La mayoría de los procesos de selección de germoplasma para la liberación comercial de semillas involucran generalmente varias variables productivas, sin embargo, en México estos procesos solo han enfatizado en el rendimiento de grano (González et al., 2007; Lozano del Río et al., 2009).

En la mecánica de estos procesos, las semillas son sometidas a pruebas ricas en nutrientes y ambientes muy específicos.

Sin embargo, cuando las semillas son liberadas, estas se siembran bajo diferentes condiciones de manejo como densidad y fecha siembra, fertilización, control de plagas, tipos de suelo, pH, duración de horas luz (fotoperiodo), temperatura, etc. Esto hace que al sembrarse en ambientes diferentes, su rendimiento varíe, lo cual se define como interacción genotipo x ambiente o estabilidad fenotípica.

La estabilidad fenotípica del rendimiento ha tenido varias interpretaciones, siendo dos de ellas la biológica y la agronómica. La biológica es cuando el genotipo presenta mínima variación a través de los ambientes, mostrando un rendimiento constante en cualquier condición de producción. La agronómica es cuando existe una mínima interacción genotipo x ambiente, lo cual está asociado a la pretensión de obtener un incremento del rendimiento en respuestas para su evaluación, con una amplia variedad de condiciones para la obtención de genotipos estables (Becker, 1981).

En el Valle de Mexicali, la mayoría de los productores de hortalizas rentan por varios años las tierras en aproximadamente 700 dólares/ha, y para tratar de amortiguar los costos, siembran también otro tipo de cultivo, que frecuentemente es trigo; de las 80,000 ha utilizadas para la siembra de trigo, aproximadamente el 50% proviene de la siembra de hortalizas. Durante la siembra de hortalizas se adicionan grandes cantidades de fertilizantes para obtener la calidad requerida para su comercialización, y solo una parte de estos nutrientes son absorbidos por las hortalizas, ya que el resto queda en el suelo y pueden ser aprovechados por cultivos posteriores como el trigo.

Por esta razón, las zonas trigueras del valle de Mexicali favorecen el concepto agronómico de la estabilidad, debido a las variaciones ocurridas entre sitios y ciclos agrícolas por efectos climáticos, de manejo y tipo de suelo.

Existen otras técnicas de mejoramiento genético para incrementar el rendimiento, componentes y calidad harinera, la más utilizada es la técnica de bombardeo con microproyectiles. El bombardeo está basado en el sistema de transferencia de partícula gen-cañón, en el cual DNA desnudo es físicamente introducido dentro de células mediante bombardeo con microproyectiles. Este proceso involucra: aceleración de alta velocidad de microproyectiles de oro, los cuales llevan consigo DNA ajeno; penetración a través de la pared y membranas celulares mediante microproyectiles, y entrega de DNA dentro de las células de la planta (He and Lazzeri, 1998).

Para lograr una determinación adecuada de la estabilidad y mejoramiento genético en variedades de trigo, resulta pertinente tener un conocimiento más preciso de su comportamiento en diferentes ambientes y aplicar otras técnicas para modificar genéticamente las plantas para producir nuevas variedades con características fenotípicas estables.

Considerando que no existe información de investigación en variedades de trigo relacionada con rendimiento, sus componentes y la calidad harinera en estos sistemas de rotación hortalizas-trigo con regímenes de fertilidad residual y fertilización comercial, se realizó esta investigación con el objeto de evaluar la estabilidad fenotípica de las variedades comerciales de trigo Cachanilla F-2000, Yécora F-70 y Trigueno F-00, en Valle de Mexicali, Baja California, bajo cuatro ambientes de prueba.

Así como, evaluar la presión óptima de bombardeo y la distancia aplicado durante el proceso de bombardeo, para la maximización la expresión del gen β -glucuronidasa (GUS) en el trigo.

1.1 Objetivos Específicos

1.1.1 Evaluar la estabilidad fenotípica del rendimiento de grano y sus componentes en tres genotipos de trigos (Cachanilla F-2000, Yécora F-70 y Triguenio F-00) en cuatro ambientes, utilizando un modelo univariado y otro multivariado.

1.1.2 Evaluar la estabilidad fenotípica de calidad harinera de tres genotipos de trigos (Cachanilla F-2000, Yécora F-70 y Triguenio F-00) en cuatro ambientes, utilizando dos modelos, un modelo univariado y otro multivariado.

1.1.3 Evaluar las variables óptimas de presión y distancia aplicada durante el proceso de bombardeo de tejido embriogénico de trigo, para la maximización de la expresión del gen β -glucuronidase (GUS).

1.2 Hipótesis

1.2.1 Ho: La estabilidad fenotípica del rendimiento del grano, sus componentes y calidad harinera de tres variedades de trigos (Cachanilla F-2000, Yécora F-70 y Triguenio F-2000) no se modifica bajo fertilidad residual ó fertilización comercial cuando se aplican los métodos propuestos por Eberhart y Russell, (1966) y por el modelo AMMI (1996).

1.2.2 Ho: La presión y distancia aplicada durante el proceso de bombardeo de tejido embriogénico de trigo, no maximiza la expresión del gen β -glucuronidase (GUS).

2. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la estabilidad fenotípica de tres genotipos de trigo en cuatro ambientes en 2008 y 2009 utilizando el modelo de regresión de Eberhart y Russell y con el de efectos principales aditivos e interacciones multiplicativas (AMMI). Adicionalmente, fueron estimadas la interacción Genotipo X Ambiente y la comparación de medias de los genotipos para rendimiento de grano y sus componentes, y la fuerza de gluten. El experimento 1 fue realizado en el Ejido Mezquital, mientras que el experimento 2 fue llevado a cabo en el Ejido Nuevo León. Ambas localidades están situadas en el Valle de Mexicali, Baja California. En cada localidad fueron sembrados tres genotipos de trigo, Yécora F-70(Y), Cachanilla F-2000 (C) y Triguenio F-00 (TR), en un diseño experimental de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. La siembra fue hecha en surcos con una densidad de siembra de 40kg ha^{-1} . Para el experimento 1, los tratamientos fueron: (FR) uso de la fertilidad residual proveniente del cultivo anterior cebollín, y (FR+FC) la utilización de la fertilidad residual más fertilización comercial. Lo mismo fue establecido en el experimento 2, pero en suelos provenientes de Raphani como cultivo anterior.

Los resultados encontrados en el análisis de la interacción Genotipo X Ambiente resultó altamente significativa ($P < 0.01$) para las variables de estudio. En la comparación de medias, para el rendimiento de grano y peso hectolítrico no se encontraron diferencias entre los genotipos (C) con respecto a (Y) y (TR) (7721.9 , 7600 , 7251.3 Kg ha^{-1} y 80 , 80 , 79 Kg hL^{-1} , respectivamente), ni entre los genotipos (Y) y (TR).

En el rendimiento de paja y panza blanca, el genotipo (C) tuvo mayor rendimiento y porcentaje de panza blanca (9848.5 Kg ha⁻¹ y 2.31%, respectivamente) con respecto a (Y) y (TR).

El índice de cosecha fue menor en el genotipo (C) (0.45) con respecto a (Y) y (TR) (0.47 y 0.48 respectivamente). El genotipo (TR) presentó mayor porcentaje de proteína en grano y fuerza de gluten (12.5% y 436.8 x 10⁻⁴ J) con respecto a (Y) y (C). Con el modelo de Eberhart y Russell, los genotipos (C), (Y) y (TR) fueron clasificados como estables para las variables de rendimiento de grano, sus componentes y fuerza de gluten, sin embargo, para panza blanca los genotipos (Y) y (TR) no fueron estables.

El modelo AMMI no resultó ser más efectivo para caracterizar la respuesta de los genotipos. Existen diferencias entre los resultados obtenidos con el modelo de Eberhart y Russell que no son explicados por el Modelo AMMI y viceversa. Es probable que no todas las variables de rendimiento de grano, sus componentes y fuerza de gluten puedan ser evaluadas con el mismo modelo. Por lo tanto, en base a estas diferencias es necesario evaluar otros modelos que proporcionen mayor información, tales como la metodología de la varianza de estabilidad de Shukla, Lin y Binns; la regresión de Finlay y Wilkinson; índices de Eskridge; entre otros.

Hay algunos parámetros de bombardeo que han sido examinados en arroz y trigo, como la optimización de DNA, presión de bombardeo, distancia del blanco, número de bombardeos y el uso de un tubo para el disparo. Preliminares estudios han encontrado que la variedades elite son más susceptibles al daño por el bombardeo resultando una respuesta pobre en el tejido de cultivos y una recuperación ineficiente de plantas transgénicas.

Por lo tanto, es importante evaluar la presión óptima de bombardeo y la distancia aplicado durante el proceso de bombardeo, para la maximización la expresión del gen β -glucuronidasa (GUS) en el trigo. Los resultados mostraron que la mejor expresión del gen GUS fue conseguida a distancia máxima del blanco (7.5cm) y a un nivel de presión media (1100psi). Los resultados muestran ser útiles para incrementar la probabilidad de inserción y expresión del gen durante la manipulación genética del trigo.

Palabras claves: Estabilidad, pared celular, embrión inmaduro, Biobalística.

2.1 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the phenotypic stability of three different wheat genotype, carried out at four different environments during 2008 and 2009, using the regression model of Eberhart and Russell, as well as the model of additive main effects and multiplicative interaction (AMMI). In the other hand, the interaction genotype X environment was estimated. The mean comparison between genotypes for grain yield and its components, as well as for gluten strength was also assessed.

The first experiment was carried out in Ejido Mezquital, while the second experiment was carried out in Ejido Nuevo Leon. Both places are located in Mexicali Valley, in the State of Baja California. Three different wheat genotypes, Yécora F-70(Y), Cachanilla F-2000(C), and Triguenio F-00(TR); were sown in each location, using a randomized complete block design with four replications. The seed rate was 40 kg ha⁻¹. The treatments for the first experiment were as follows: (FR), residual fertility from previous green bunching anion crop; and (FR+FC), same residual fertility plus commercial fertilization. The same treatments were established for the second experiment, with the exception that *Raphini*, was the previous crop.

Data analysis showed that the interaction genotype X environment was highly significant ($P < 0.01$), for the study variables. Regarding analysis of means, no differences were found between genotypes (C), (Y) and (TR), neither for grain yield nor for test weight (7721.9, 7600, 7251.3 Kg ha⁻¹ and 80, 80, 79 Kg hL⁻¹, respectively).

Genotype (C) showed higher straw yield and yellow berry (9848.5 Kg ha⁻¹ y 2.31%, respectively), compared to (Y) and (TR) types. Meanwhile, harvest index was lower in genotype (C) (0.45), versus (Y) and (TR) (0.47 and 0.48 respectively).

Genotype (TR) showed the highest protein concentration in grain and gluten strength (12.5% and 436.8×10^{-4} J), compared to (Y) and (C).

Throughout the application of Eberhart and Russell model, genotypes ©, (Y) and (TR) were classified as stable for grain yield and its components and gluten strength variables. Nevertheless, genotypes (Y) and (TR) were not stable regarding yellow berry. AMMI model did not prove to be more effective than the Eberhart and Russell regarding genotypes response characterization. In some cases, the differences found through the application of Eberhart and Russell model cannot be explained by AMMI model, and vice versa. It is likely that grain yield and its components as well as gluten strength variables cannot be all evaluated with the same model. Therefore, based on these differences, it is important to evaluate the application of other models which could give further insight, such as variance stability methodology from Shukla, Lin and Binns; regression from Finlay and Wilkinson; and Eskridge indexes, among others. There are some bombardment parameters that have been examined in rice and wheat, such as the optimization of DNA, gun pressure, target distance, number of bombardments, and the usage of a focusing nozzle. Therefore, is important to evaluate the optimum gun pressure and target distance applied during the bombardment process to maximize transgenic β -glucuronidase (GUS) expression in wheat. The results showed that the best transient expression of the GUS gene was achieved at the maximum target distance (7.5 cm) and at the middle pressure level (1100 psi).

These results can be useful in order to increase the probabilities of insertion and expression of genes during wheat genetic manipulation. As a result, using this protocol, gold particle losses can be minimized as well as tissue damage for future applications of embryo bombardment.

keywords: Stability, Cell wall; immature embryo; Biolistic.

3 REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Fenotipo

3.1.1 Definición y diversidad biológica

El fenotipo de un individuo es determinado por dos componentes básicos: El genotipo o constitución genética del individuo y el ambiente específico en el cual el individuo se desarrolla. El fenotipo se observa, cuantifica y analiza, mientras que el genotipo no es observable, pero es deducible a partir del fenotipo por diferentes métodos de análisis genético. Como reacción al ambiente un genotipo es capaz de producir varios fenotipos como resultado de la IGA (Interacción genotipo x Ambiente). En otras palabras individuos con el mismo genotipo pueden mostrar distintos fenotipos dependiendo del ambiente (Puertas, 1992).

3.1.2 Ambiente

Éste ha sido discutido en forma amplia por gran número de investigadores. Allard (1960), lo expresa como la suma de todas las condiciones externas que afectan el crecimiento y desarrollo de un organismo. Para Lin y Binns (1986), el efecto ambiental sobre un genotipo depende del suelo y de las condiciones atmosféricas. Para estos investigadores el suelo permanece casi constante de año en año y puede ser, a pesar de todo, considerado como un efecto fijo. El tiempo atmosférico es más complejo, porque tiene una parte persistente representada por la zona climática general y una parte no predecible representada por la variación del clima, año en año.

En general, ambiente se puede definir en forma amplia y de acuerdo con los factores bióticos y abióticos, como el conjunto de las condiciones del suelo, clima, manejo agronómico y administración (oportunidad de las prácticas de manejo) los cuales tendrán un efecto marcado sobre la expresión del rendimiento en el genotipo de las plantas.

3.1.3 Interacción genotipo x ambiente (IGA)

La IGA surge cuando una variación ambiental tiene distinto efecto sobre genotipos diferentes; es decir, la interacción resulta de la respuesta diferencial de los genotipos a la variación ambiental o, a la inversa, cuando un genotipo que presenta una respuesta diferencial responde de distinta manera a las variaciones del ambiente (Fox et al., 1997). La IGA es un aspecto a tener en cuenta en los programas de mejoramiento ya que la estabilidad de rendimiento de un genotipo en particular depende de su respuesta a diversos factores adversos en etapas críticas del desarrollo de la planta (Crossa et al., 1988). La IGA es el factor que más interfiere en la identificación de genotipos específicos para ambientes específicos (Snedecor y Cochran, 1980).

En el mejoramiento de plantas, las consideraciones sobre la IGA son esenciales para la eficiencia del proceso selectivo, debido a que la mayoría de los caracteres de importancia en el mejoramiento son caracteres métricos. Estos caracteres presentan distribución continua, poseen herencia poligénica y son muy influenciados por las variaciones del ambiente.

Por lo anterior, el buen entendimiento de la IGA contribuirá tanto al aprovechamiento de los efectos benéficos de la interacción como a contrarrestar los efectos negativos del ambiente sobre la evaluación de genotipos y la recomendación de cultivares (Chaves, 2001).

3.1.3.1 Naturaleza y Causas de la Interacción

Según Allard (1999), los efectos fenotípicos no están normalmente relacionados con los genes de un modo directo, sino de una sucesión de relaciones físico-químicas e interacciones iniciadas por ciertos genes, pero modificadas por un sistema de reacciones controladas o modificadas por otros genes, y por el ambiente externo hasta determinar el fenotipo final. La complejidad biológica de la IGA ha sido puesta de manifiesto en numerosos trabajos. Chaves (2001), indica que la IGA debe ser abordada como un fenómeno biológico en sus aplicaciones en el mejoramiento de plantas y no, como un simple efecto estadístico.

Cuando una IGA significativa es detectada, el interés se concentra en conocer las causas de esa interacción a fin de hacer una predicción precisa del comportamiento de un determinado genotipo bajo una variedad de ambientes. Entender las respuestas de un genotipo a factores individuales ayuda a una mejor interpretación y explotación la IGA. Un factor ambiental representa un estrés cuando presenta un nivel fuera del óptimo.

Becker referenciado por Yan y Kang (2003), indican que diferencias en la tasa de aumento de la respuesta genotípica a un nivel sub-óptimo refleja diferencias en la eficiencia y las diferencias en las tasas de decrecimiento de la respuesta genotípica a un nivel súper-óptimo, refleja diferencias en tolerancia. Por ejemplo, en condiciones de sequía ocurre que el agua está a un nivel sub-óptimo y pueden ser identificados genotipos que hagan un uso eficiente del agua; en condiciones de inundación hay un nivel súper-óptimo y en este caso la selección se dirigirá a la identificación de genotipos tolerantes a excesos de humedad.

Chaves (2001), indica que en cuanto a la naturaleza de la interacción, diferencias en la adaptación de genotipos resultan, de diferencias en la constitución génica para los caracteres importantes en esta adaptación. La reacción a diferentes cambios ambientales se puede dar desde los mecanismos de regulación génica hasta los caracteres morfológicos finales. Cuando se consideran caracteres métricos de importancia para el mejoramiento deben haber varios factores actuando en los diferentes niveles, desde la regulación génica hasta la manifestación final (Chaves, 2001).

3.1.3.2 Consecuencias de la IGA en el mejoramiento

Según Allard (1999) los efectos fenotípicos no están normalmente relacionados con los genes de un modo directo. Más bien resultan de una sucesión de relaciones físico-químicas e interacciones iniciadas por ciertos genes, pero modificadas por un sistema de reacciones controladas o modificadas por otros genes, y por el ambiente externo hasta determinar el fenotipo final.

La complejidad biológica de la IGA ha sido puesta de manifiesto en numerosos trabajos. Chaves (2001) indica que la IGA debe ser abordada como un fenómeno biológico en sus aplicaciones en el mejoramiento de plantas y no, como un simple efectoestadístico. Cuando una IGA significativa es detectada, el interés se concentra en conocer las causas de esa interacción a fin de hacer una predicción precisa del comportamiento de un determinado genotipo bajo una variedad de ambientes.

En cuanto a la naturaleza de la interacción, diferencias en la adaptación de genotipos resultan, de diferencias en la constitución génica para los caracteres importantes en esta adaptación. La reacción a diferentes cambios ambientales se puede dar desde los mecanismos de regulación génica hasta los caracteres morfológicos finales. Cuando se consideran caracteres métricos de importancia para el mejoramiento deben haber varios factores actuando en los diferentes niveles, desde la regulación génica hasta la manifestación final (Chaves, 2001).

Allard y Bradshaw (1964), presentan una situación simple donde son considerados dos genotipos en dos ambientes para ilustrar algunos tipos de interacción y las implicaciones que ello tiene en programas de mejoramiento genético. En la figura 1 se tiene la representación gráfica de algunas de estas situaciones en la IGA.

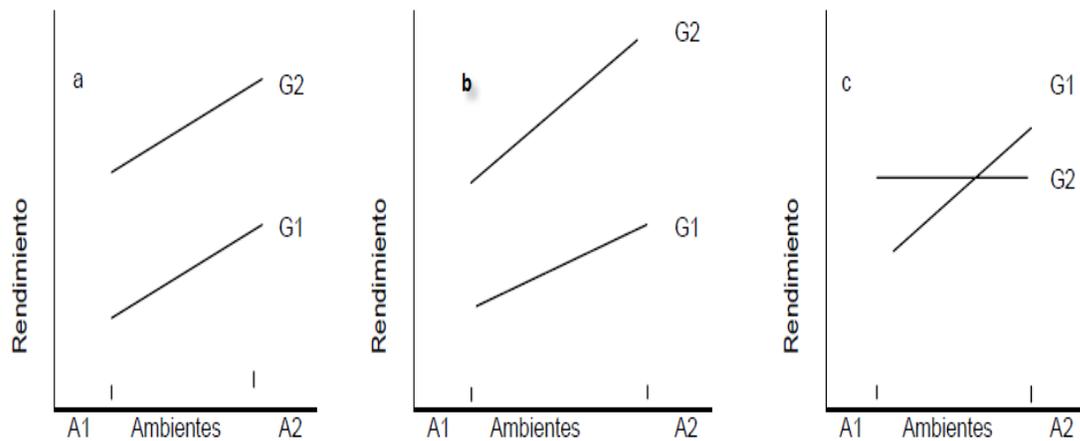


Figura 1. Comportamiento de dos genotipos (G1y G2) en dos ambientes (A1 y A2). a) Ausencia de interacción, b) Interacción simple o cuantitativa y c) Interacción cruzada o cualitativa. Fuente: (Becker, 1988).

En la Figura “a” el cambio en las condiciones ambientales afecta por igual el comportamiento de los genotipos, caracterizándose la ausencia de interacción. Para la situación “b” y “c” los cambios del ambiente afectan desigualmente la manifestación del carácter para los dos genotipos, es decir, la diferencia entre genotipos varía entre ambientes. Para el caso de “b” el orden de respuesta de un genotipo no cambia de un ambiente a otro, siendo este tipo de interacción denominada simple o cuantitativa. Para la situación “c” la interacción es denominada cruzada o cualitativa (Becker., 1988).

En las situaciones “a” y “b” un mismo genotipo G2 es adaptado a las dos condiciones ambientales y una selección basada en el promedio de los ambientes beneficiará siempre al mejor genotipo.

En la situación “c”, la selección basada en el promedio de los ambientes no es capaz de satisfacer el conjunto de los ambientes pudiendo llevar a la selección de genotipos mal adaptados a una situación particular (Chaves., 2001).

Cuando la interacción genotipo ambiente es significativa a través de cada ambiente se ve reducida la utilidad de los promedios de los genotipos sobre todos los ambientes para la identificación de genotipos superiores. La detección de IGA en ensayos de campo y el deseo del fito-mejorador de manejar estas interacciones apropiadamente ha llevado al desarrollo de procedimientos que son llamados genéricamente análisis de estabilidad. Los métodos disponibles proveen diferentes estrategias para una mejor interpretación y tomar las mejores alternativas en los procesos de selección y recomendación de cultivares (Yan y Kang, 2003).

Marín (1995), indica que hoy día es necesario ajustar las técnicas estadísticas para el análisis de estabilidad del rendimiento debido: a) Al número y diversidad de genotipos y localidades involucradas en los ensayos regionales: b) A la necesidad de estimar y predecir con mayor precisión los rendimientos basados sobre un limitado conjunto de datos experimentales; c) Determinar patrones de respuesta de genotipos interrelacionados con ambientes y d) Proveer una fuente confiable para la selección de los mejores genotipos y estudiar el comportamiento de cada cultivo en cada uno de los ambientes evaluados.

Pandey y Vargas (1985) mencionan que generalmente, los programas de mejoramiento intentan desarrollar cultivares estables en su rendimiento y otros atributos deseables a través de un amplio rango de condiciones ambientales.

Cuando un carácter es controlado por pocos genes (herencia cualitativa o Mendeliana), la IGA no es una fuente importante de varianza. Mientras que cuando un carácter está gobernado por varios loci con pequeños efectos mostrando varianzas aditivas, dominantes y epistáticas (herencia cuantitativa), la IGA adquiere mayor importancia; se sabe que varios tipos de efectos de los genes interactúan con el ambiente para afectar la expresión de su fenotipo (Becker, 1988).

Los fitomejoradores han reconocido durante mucho tiempo las implicaciones de la IGA en los programas de mejoramiento genético de las especies (Yates y Cochran, 1938). La IGA tiene un impacto negativo sobre la heredabilidad, según Allard y Bradshaw (1964) la IGA es importante para el fito-mejorador porque reduce la correlación entre genotipo y fenotipo y contribuye a la inestabilidad de los genitivos en varios ambientes.

El conocimiento de la naturaleza y magnitud de la IGA contribuye significativamente a determinar el número de ambientes de evaluación en los que los genotipos deben ser evaluados con el objetivo de lograr la precisión necesaria para medir las diferencias entre genotipos. Adicionalmente, porque puede ayudar a determinar si es necesario el desarrollo de cultivares para todos los ambientes de interés o si se deberían desarrollar cultivares para ambientes específicos (Yan y Kang, 2003).

En cuanto a las alternativas para reducir la IGA Eberhart (1970), indica que la variabilidad genotípica puede tener influencia en el número de ambientes; por ejemplo, en familias S1 requieren de 3-4 ambientes para su evaluación, mientras en familias de medios hermanos se necesitan 7 ó más localidades.

Sprague y Eberhart (1977), recomiendan aumentar el número de localidades para los ensayos, si la IGA se debe a factores ambientales impredecibles. La variación genotípica también se puede reducir usando diseños experimentales apropiados.

En programas prácticos de mejoramiento, la estratificación basada en genotipos y en ambientes, puede usarse para reducir la IGA (especialmente la debida a factores ambientales predecibles), y desarrollar e identificar genotipos superiores para una gama menor de ambientes.

3.1.3 Estabilidad y Adaptabilidad

3.1.4.1 Definición de términos

El fito-mejorador busca los genotipos que presenten una buena estabilidad. La estabilidad del rendimiento es un concepto de primer orden en el mejoramiento vegetal. No existe una definición única de estabilidad y algunos investigadores prefieren utilizar el término análisis de sensibilidad en vez del término análisis de estabilidad (Dyke et al., 1995).

La estabilidad tiene muchos conceptos. Becker (1981), distinguió dos tipos de estabilidad genotípica (estabilidad biológica y estabilidad agronómica). Por una parte la estabilidad biológica con un sentido homeostático, mediante el cual un genotipo mantiene un rendimiento constante en diferentes ambientes. Este tipo de estabilidad no es deseable en la agricultura moderna, donde los genotipos deberían responder a las condiciones del medio mejoradas.

Por su parte el concepto de estabilidad agronómica implica que un genotipo es considerado estable si rinde relativamente bien respecto al potencial de los ambientes evaluados, mostrando una baja interacción en términos de ecovalencia. Wricke, (1962) define la ecovalencia como la contribución de un genotipo particular a la suma de cuadrados totales de la IGA en un análisis de variancia.

León (1985), propone que dependiendo de la característica evaluada o el objetivo del estudio se pueden considerar dos conceptos diferentes de estabilidad: estabilidad estática y estabilidad dinámica. Para este investigador estabilidad estática, es cuando un material posee un rendimiento aceptable, sin tener en cuenta la variación de las condiciones ambientales. Este material estable no muestra desviación del nivel esperado para el carácter en estudio lo que significa que su variancia entre ambientes es cero. Por otro lado, indica que estabilidad dinámica es aquella que muestra la menor desviación de su respuesta a los ambientes. Los conceptos dinámico (León y Becker, 1988) y el agronómico son equivalentes(Becker, 1981). El concepto estático de León (1985) coincide con el concepto estático de Becker (1981).

Heinrich et al. (1983), definen la estabilidad de un carácter como la habilidad del genotipo para evitar fluctuaciones sustanciales en el rasgo sobre un rango de condiciones ambientales. Baena et al. (1991) mencionan que la estabilidad de un material se considera el comportamiento de éste en un mismo sitio pero probado en diferente tiempo, lo que se evalúa es el efecto de las condiciones climáticas cambiantes de un semestre a otro (en el trópico, especialmente la precipitación).

Para el caso de la Adaptabilidad se evalúa el comportamiento de genotipos en localidades diferentes. Eberhart y Russell (1966) publicaron varios resultados llegando a la conclusión que una variedad estable es aquella que no interacciona con el ambiente sino que responde mejor a los cambios ambientales. Hanson (1970) propone, a partir de sus respectivos estudios, que un material estable es aquel que muestra la menor variación del rendimiento sobre todos los ambientes de evaluación. Así mismo Heinrich et al. (1983), explican la estabilidad como una habilidad que posee determinado genotipo para evitar fluctuaciones substanciales en el rendimiento al ser evaluado en diferentes ambientes.

Uno de los conceptos más precisos que existe sobre estabilidad es la reseñada por Laing (1978), quien la define como la respuesta relativa de un genotipo a las variaciones del ambiente en una localidad específica. Este investigador diferencia además entre estabilidad espacial, o sea la variación entre repeticiones cuando se cultiva en una misma localidad y estabilidad temporal que es la variación de una estación de cultivo a otra.

La adaptabilidad es la propiedad o habilidad de un genotipo o población de genotipos que permite la alteración de las normas de adaptación en respuesta a distintas presiones de selección (Simmonds, 1979), mientras que adaptación es un estado de adecuación a un ambiente dado. Simmonds (1979) diferencia entre los siguientes conceptos:

- a) Adaptación genotípica general es la capacidad de un genotipo para producir en un rango de fenotipos compatibles con un rango de ambientes determinado.

- b) Adaptación específica de una población, es la parte de la adaptación
- c) específica de una población heterogénea que es atribuible a la interacción entre los componentes más que a la adaptación de los componentes por sí mismos. La adaptación general de una población es la capacidad de poblaciones heterogéneas para adaptarse a variedad de ambientes.

Laing (1978), denominó adaptabilidad a la respuesta de un genotipo cuando se cultiva en diversas localidades (suelo). Este término fue explicado con más detalle por el mismo investigador y surgió el concepto de adaptabilidad amplia que consiste en el comportamiento relativo de los genotipos bajo gran diversidad de ambiente y adaptabilidad específica o local como el comportamiento relativo de un genotipo bajo una gama estrecha de ambientes

En general los términos estabilidad y adaptabilidad son empleados con sentido diferente. Tampoco existe unanimidad de criterios y los resultados experimentales son también dispares con relación a sí materiales adaptables son también estables. Varios investigadores han indicado que la estabilidad está bajo control genético, apoyados en que la estabilidad y adaptabilidad muestran una alta correlación y que la falta de estabilidad indica falta de adaptabilidad. Sin embargo, Evenson et al. (1975), encontraron después de remover en forma alterna los efectos de localidad y de semestre que la adaptabilidad y la estabilidad no estaban asociadas, lo cual indica que los mejoradores no pueden seleccionar a través de localidades para hacerlo por estabilidad.

3.1.4.2 Origen genético de la estabilidad

La estabilidad tiene dos orígenes: por un lado el poder tampón derivado de la estructura genética de ciertos genotipos y por otro, la existencia de genes específicos de adaptación (Stelling et al., 1994). Diversos trabajos han asociado una mayor estabilidad a las estructuras genéticas heterogéneas (una población, una mezcla de híbridos, una variedad multilínea, una variedad multiclón) que a las poblaciones homogéneas (una línea parental o híbrido).

En judía Stelling et al. (1994) encontraron mayor estabilidad en poblaciones heterogéneas. Eberhart y Russell (1969), en maíz observaron mayor estabilidad en los híbridos dobles respecto a los híbridos simples.

Heinrich et al. (1983), menciona que desde los puntos de vista fisiológico, morfológico y fenológico, los mecanismos que influyen sobre la estabilidad del rendimiento son la heterogeneidad genética, compensación en los componentes de rendimiento, tolerancia al estrés, y capacidad de recuperación rápida del estrés. Según Vega (1988) los mecanismos genéticos que operan en la producción de la estabilidad espacial son la diversidad genética, heterocigosis, plasticidad genotípica, y poliploidía.

En general, se ha aceptado que a mayor variabilidad genética de una especie, mayor su estabilidad sobre el ambiente. El efecto de la heterogeneidad y la heterocigosis es variable entre especies y algunas diferencias interespecíficas de estos efectos han sido observadas en maíz sorgo y otras especies de plantas.

Stelling et al. (1994), Allard y Bradshaw (1964), indican que una variedad puede estar compuesta por un número de individuos diferentes, cada uno adaptado a un rango diferente de ambientes (amortiguamiento poblacional), o puede estar conformado por individuos semejantes, pero cada uno adaptado a un rango de ambientes (amortiguamiento individual).

Pandey y Vargas (1985), señala que para el caso de las especies autóгамas, en donde las poblaciones son de genotipo homocigótico, cada planta puede ser adaptada a un grupo de condiciones ambientales y estaría bien amortiguada, produciendo un fenotipo aceptable sobre condiciones ambientales variables. Lo mismo sería el caso de híbridos simples de una especie alógama como el maíz, donde todos los individuos de una población son similares en su fenotipo. Dichos cultivos, se sabe que tienen amortiguamiento individual.

Por otra parte, cuando un cultivo es una mezcla de genotipos, los diferentes genotipos pueden adaptarse a diferentes condiciones ambientales con el resultado de que el cultivo tenga mayor adaptación (Pandey y Vargas, 1985).

Este mecanismo de estabilidad se debe al amortiguamiento poblacional y se atribuye a la heterogeneidad del cultivo. Este amortiguamiento resulta de la coexistencia e interacción entre los genotipos que lo componen (Pandey y Vargas, 1985).

3.1. 4.3 Análisis de estabilidad

Los estudios de adaptabilidad y estabilidad fenotípica, para fines de mejoramiento, se refieren a la evaluación de la respuesta diferencial de los genotipos a la variación de las condiciones del ambiente. La mayoría de los métodos utiliza las técnicas de la regresión, midiendo un determinado carácter, por ejemplo productividad, en relación con un índice ambiental. La diferencia en los métodos se da por el modelo de regresión utilizado, por la forma de interpretación de los parámetros del modelo y la manera de estimar el índice ambiental (Pandey y Vargas, 1985).

Lin et al. (1986) y Lin y Binns (1988), definen cuatro conceptos estadísticos de estabilidad con base en los análisis de varianza (ANOVA) de un ensayo de variedades:

1. Si su varianza entre ambiente es pequeña. Importante cuando se tiene muchos ambientes desfavorables.
2. Si su respuesta a los ambientes es paralela al promedio de las respuestas de todos los genotipos de la prueba. Concepto preferido por el mejorador.
3. Si la suma de cuadrados residual de la regresión sobre el índice ambiental es pequeña. Tipo propuesto por Eberhart y Russell.
4. Si su cuadrado medio dentro de ambientes, esto es, si su variabilidad para cualquier ambiente en diferentes años, es pequeña.

Se han propuesto un gran número de modelos estadísticos para estimar la estabilidad fenotípica o analizar la interacción genotipo por ambiente (IGA).

Entre los modelos tradicionales, algunos permiten estratificar la población de ambientes en sub-regiones, dentro de las cuales la interacción no se presente significativa, permitiendo recomendaciones regionalizadas; otros procuran identificar genotipos que menos contribuyan para la interacción y que puedan ser recomendados para toda la población de ambientes siempre y cuando presenten un rendimiento promedio elevado (Pérez *et al.*, 2005).

3.1.5 Modelos que tienen en cuenta únicamente el efecto genotípico

Para el caso específico de medir la estabilidad fenotípica de acuerdo al concepto estático, Roemer (1917) propuso el uso de la varianza de cada genotipo sobre los ambientes. La expresión utilizada para estimar la variancia ambiental es:

$$S_i^2 = \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{ij})^2 / (a - 1)$$

Donde:

Y_{ij} = valor de la variable considerada del genotipo i ambiente j .

Y_i = valor medio de la variable del genotipo i , considerada en todos los ambientes.

a = número de ambientes

Un genotipo es considerado estable si la variancia estimada no es significativamente diferente de cero ($H_0: \sigma^2_i = 0$), lo que significa que su rendimiento no varía con cambios en el ambiente. Un problema con este método, en general, es que genotipos con alta estabilidad fenotípica medida a través de la variancia ambiental muestran bajo rendimiento. Por lo que este método ha sido más utilizado para evaluar caracteres cualitativos como resistencia a enfermedades que caracteres cuantitativos como rendimiento u otras variables aleatorias relacionadas.

3.1.5.1 Métodos que utilizan el análisis de varianza

En estos métodos se emplea el análisis de varianza siguiente:

Donde:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha_i \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = es el valor medio;

μ = la media general;

α_i = el efecto genotípico;

β_j = el efecto ambiental;

$\alpha_i \beta_j$ = la interacción del genotipo i con el ambiente j ;

ε_{ij} = el error experimental

Estos métodos se basan en el concepto dinámico (León y Becker, 1988) ó agronómico (Becker, 1981) de estabilidad, según el cual un genotipo es estable si su respuesta al ambiente no presenta desviaciones con respecto a la respuesta al ambiente del conjunto de genotipo estudiados.

Dentro de estos métodos se consideran los conceptos de ecovalencia (ω_i), la varianza de Shukla, el Índice de Superioridad y la regresión conjunta.

Para la estimación de este Índice se utiliza la expresión:

$$P_i = \sum_{j=1}^n (X_{ij} - M_j) / 2n$$

Donde:

P_i = índice de superioridad de i-ésimo cultivar.

X_{ij} = productividad de i-ésimo cultivar evaluado en la j-ésima localidad.

M_j = respuesta máxima obtenida entre todos los cultivares en la j-ésima localidad.

n = número de localidades.

A pesar del método propuesto por Lin y Binns (1988) es poco conocido, se presenta como una alternativa en la evaluación de la estabilidad, pues no presenta las limitaciones que se mencionan con el uso de la regresión y posibilita la identificación de los genotipos de mejor comportamiento en los diferentes ambientes de evaluación.

Los resultados de estabilidad obtenidos por este método son basados tanto en efecto medio genotípicos, como en efecto de interacción genotipo x ambiente. Cada genotipo es comparado con la respuesta máxima en cada ambiente, suministrando una medida de superioridad. Esa medida (P_i) de genotipo es definida por Lin y Binns (1988) como la distancia entre cuadrado medio de genotipo i y el genotipo con respuesta máxima.

3.1.5.1 Métodos que utilizan la regresión

3.1.5.1.1 Modelo general

El análisis de regresión conjunta fue descrito por Mooers (1921), citado por Yates y Cochram (1938) y desarrollado posteriormente por Finlay y Wilkinson (1963), Eberhart y Russell (1966) y Perkins y Jinks (1968). Ha sido una de las técnicas más utilizadas para analizar la IGA en el rendimiento de numerosas especies y abordar los problemas de la estabilidad (Crossa, 1996; Zobel *et al.*, 1988).

El modelo general de análisis de varianza regresión conjunta es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \phi_i \beta_j + \theta_j + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = resultado del genotipo i en el ambiente j .

μ = media general.

α = desviación media genotípica.

β = desviación media ambiental.

ϕ_i = coeficiente de regresión genotípica.

θ_j = residual de la IGA.

ε_{ij} = error.

La forma más frecuente de caracterizar la estabilidad fenotípica a través de los ambientes es mediante el coeficiente de regresión de cada genotipo sobre la media ambiental ($b_i = \phi_i$). Yates y Cochram (1938) utilizaron la media total de todos los genotipos en un ambiente determinado como Índice ambiental, es decir, como media del ambiente.

Estos autores estudiaban el comportamiento de un genotipo o grupo de genotipos por medio de la regresión lineal de las medias del genotipo en cada ambiente en función de dichos Índices o valores ambientales.

Finlay y Wilkinson (1963) relacionaron el coeficiente de regresión lineal de la productividad de cada genotipo sobre la media general de los genotipos en cada ambiente, con los conceptos de adaptabilidad y estabilidad fenotípica. Así, coeficientes de regresión próximos a 1.0 indica estabilidad media. Cuando este coeficiente es asociado a alto rendimiento caracteriza a un genotipo con adaptabilidad general y si asociado a bajo rendimiento el genotipo presenta baja adaptación a todos los ambientes. Genotipos con valores significativamente mayores que 1.0 son específicamente adaptados a ambientes favorables y son poco estables; sin embargo, genotipos con valores significativamente menores que 1.0 son más estables y se adaptan a ambientes desfavorables.

3.1.5.1.2 Modelo de Eberhart y Russell

Eberhart y Russell (1966) propusieron un modelo de regresión lineal para el estudio de la adaptabilidad fenotípica de cultivo ampliamente utilizado, en este tipo de estudios, en todo el mundo. En este modelo, además del promedio general y del coeficiente de regresión lineal de cada genotipo, fue también considerado como parámetro de estabilidad la varianza de los desvíos de la regresión de cada genotipo.

Este tipo de análisis fue clasificado por Becker (1981) como de estabilidad en el sentido agronómico. Los parámetros para el estudio de la estabilidad son definidos por el modelo:

$$Y_{ij} = \mu_i + \beta_i l_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = promedio del genotipo i en el ambiente j .

μ_i = media del genotipo i en todos los ambientes.

β_i = coeficiente de regresión que mide la respuesta del genotipo i a la variación ambiental.

l_j = índice ambiental.

δ_{ij} = desvío de la regresión del genotipo i en el ambiente j .

ε_{ij} = desviación de la regresión de la variedad y el ambiente.

El índice ambiental, en cada ambiente, es calculado por el desvío del promedio de todos los genotipos en ese ambiente, en relación con el promedio general: $l_j = Y_{.j} - Y$.

De acuerdo con los autores, un genotipo estable es aquel para el cual se obtiene un coeficiente de regresión igual a la unidad ($b_i = 1$) y una mínima desviación de la línea de regresión ($S^2_{di}=0$). Valores del coeficiente b_i mayores que la unidad, indican que el correspondiente genotipo responde bien a ambiente favorables, pero su comportamiento es pobre en ambientes desfavorables. Por el contrario, si el valor de b_i es menor que la unidad, indica que tal genotipo se comporta bien en ambientes desfavorables.

3.1.5.1.3 Métodos multiparamétricos

Los métodos multiparamétricos o multivariados son apropiados para analizar matrices de dos dimensiones, como las que contienen datos de genotipos y ambientes. Existen dos grupos de técnicas multiparamétricas: las técnicas de ordenación, tales como el análisis de componentes principales y el análisis factorial; y las técnicas de clasificación como el análisis de grupos y el análisis discriminante (Cubero y Flores, 1994).

El análisis de componentes principales (ACP) es una de los métodos multivariados más utilizados y de los más antiguos. En esencia el método trata de simplificar la estructura de los datos para poder explicar en pocos componentes la mayor parte de la información que contienen las variables.

Es útil tanto para la caracterización de condiciones ambientales como para la clasificación de variedades por estabilidad de rendimiento.

La principal dificultad del estudio de la IGA atribuida a este método está en la interpretación de los componentes principales extraídos ya que puede ocurrir que estos no muestren ninguna relación directa con las condiciones ambientales. Un modelo para analizar la interacción G X A es el modelo de interacción multiplicativa y de efectos principales aditivos AMMI (Additive Main Effects and Multiplicative Interaction Analysis. Crossa et al. (1988). Este modelo es un caso particular del ACP (Gauch, 1988).

El modelo AMMI integra algunos modelos estadísticos comúnmente aplicados a series de ensayos de rendimiento donde los efectos principales correspondientes a la parte aditiva son analizados mediante un análisis de varianza simple (ANDEVA).

La parte no aditiva residual (interacción) corresponde a la parte multiplicativa del modelo, y es analizada con el análisis de componentes principales (PCA) (Zobel, 1990; Gauch y Zobel, 1988).

En síntesis el modelo AMMI combina análisis de variancia y análisis de componentes principales (ACP) en un único modelo, aditivo para los efectos principales de genotipos y ambientes y multiplicativo para los efectos de interacción GA. El modelo AMMI está representado por la ecuación (Crossa et al., 1988):

$$Y_{ger} = \mu + \alpha_g + \beta_e + \sum_n B_{gn} \delta_{en} + p_{ge} + \varepsilon_{ger}$$

Donde:

Y_{ger} = rendimiento del i ésimo genotipo “g” en el j ésimo ambiente “a” y para la repetición r.

Los parámetros aditivos son:

μ = gran media.

α_g = desviación del genotipo **g** de la gran media.

β_e = desviación del ambiente **a**. Los parámetros multiplicativos son:

B_n = valor singular para el eje n del componente principal de interacción (CPI).

B_{gn} = eigenvector del genotipo **g** para el eje **n**.

δ_{en} = eigenvector del ambiente **e** para el eje **n**.

p_{ge} = Somatoría de los ejes que no están explicado por los vectores (residuo de IGA).

ε_{ger} = desviación del genotipo **g** en ambiente **e** la repetición **r**.

P_{ge} es interacción que no es explicado por el análisis de componentes principales.

Para el modelo AMMI, los datos son divididos en dos subgrupos, el modelo y los datos de validación. Para cada combinación de genotipos y localidades, se escogen dos repeticiones al azar para ser usadas en la estimación de parámetros del modelo AMMI y la otra es usada para validar el modelo (Crossa et al., 1988; Crossa et al., 1990; Crossa et al., 1991).

Los resultados de AMMI, pueden ser graficados en un biplot en donde se colocan tanto los efectos principales como los efectos de interacción para los genotipos y los ambientes. Una ventaja del modelo AMMI radica en la posibilidad de retener en muy pocos componentes la mayor variabilidad debida a la interacción, en orden secuencial, desde lo más simple o lo más complejo, despreciando aquellos componentes que explican poca variabilidad (Pla, 1986).

El modelo AMMI puede ayudar desde la identificación de genotipos de alta productividad y amplia adaptación hasta en la realización de llamado zoneamiento agronómico, con la selección de localidades claves; además, permite hacer un estudio más detallado tanto de las variedades como de las localidades y su interacción.

El modelo AMMI ha sido empleado en trabajos de interacción genotipo-ambiente en distintos cultivos (Zobel et al., 1988; Crossa et al., 1990, 1991; Shafii et al., 1992).

Este modelo multivariante ha resultado ser de suma utilidad en la explicación de la suma de cuadrados de la interacción en estudios que involucran una amplia diversidad ambiental ó ante un elevado número de ambientes (Riggs, 1986; Zobel *et al.*, 1988; Gauch Junior, 1992; Nachit *et al.*, 1992).

Dado que las respuestas genóticas en los distintos ambientes son multivariadas, más que univariadas (Lin *et al.*, 1986) serán las técnicas multivariantes las que permitirán describir e interpretar los efectos de la interacción genotipo-ambiente (Gauch Junior y Funnas, 1991). Cuando se evalúan un alto número de genotipos y ambientes (a nivel regional ó continental), las técnicas multivariantes y de ordenación pueden ser utilizadas para establecer la naturaleza de la interacción, al poner de manifiesto las asociaciones existentes entre genotipos ambientes y por la caracterización que realizan de los ambientes (Thomson y Cunningham, 1979).

Cubero y Flores (1994) enumeran las siguientes ventajas del modelo AMMI respecto a los demás métodos de estudio de la IGA:

- a) Se trata de un método potente de diagnóstico, ya que permite la posibilidad de estudiar submodelos representativos de los datos totales del ensayo.
- b) Aporta gran información sobre la naturaleza de la IGA, permitiendo clasificar tanto los genotipos como los ambientes según sus patrones de comportamiento.
- c) Se obtienen la misma precisión en la estimación del rendimiento que con otros tipos de análisis con un número de repeticiones 2 a 5 veces mayor.

3.2 Transformación genética de plantas

Los métodos de transferencia de genes pueden ser de dos clases: 1) Sistemas de transformación indirecta y 2) Sistemas de transformación directa.

La transferencia indirecta mediante la bacteria *Agrobacterium* es la más usada aprovechando la habilidad natural de la bacteria para actuar como un ingeniero genérico. El bombardeo de microproyectiles con DNA ó pirobalística es el segundo método empleado. Otros métodos de transferencia directa que se han desarrollado son la electroporación, tratamientos con polietilenglicol, microinyección y el uso de microfibras (Sharma et al., 2005).

Para la obtención de plantas transgénica los principales elementos a considerar son: a) Tener un sistema eficiente de regeneración, b) una construcción genética, c) un sistema de transformación eficientes, d) recobrar y multiplicar plantas transgénicas, e) tener una expresión eficiente y estable del gen adquirido, f) lograr la transferencia de estos genes a cultivos por métodos convencionales y g) evaluar el comportamiento de estas plantas en condiciones de campo para demostrar su inocuidad (Sharma et al., 2005).

3.2.1 Metodología de transferencia directa

3.2.1.1 Transformación genética con biobalística

El bombardeo de partículas se desarrollo en lo 1980s como un método alternativo para la transformación genética de plantas recalcitrantes a la transformación mediante *Agrobacterium*, en su mayoría cereales y leguminosas (Taylor y Fauquet, 2002). Esta tecnología involucra partículas metálicas (0.4 a 20 μm de diámetro) de oro ó tungsteno cubiertas con material genético y que son impulsadas a alta velocidad sobre tejido para permitir que dicho material se liberado en el interior de la célula, Estas partículas son aceleradas mediante macrocarreadores de polietileno o de nylon(cilindros o discos), que a su vez, son impulsadas por la onda de choque causada por un gas (He) a alta presión. Entonces en una cámara bajo un vacío parcial, lo que evita la desaceleración de los microcarreadores como consecuencia de la fricción con el aire, solo colocados los tejidos al momento del bombardeo, el gas se deja pasar a una presión dada por una membrana, que al romperse impulsa las partículas cubiertas con el DNA hacia los tejidos, quedando la membrana retenida por una malla. El impacto de las partículas de oro presenta un patrón circular de uno ó varios centímetros dependiendo de la distancia a la que se coloca el tejido (Taylor y Fauquet, 2002).

Los primeros ensayos se limitaron a la expresión transitoria de genes marcadores, realizándose con células de catafilo de cebolla, las cuales, permitieron viables y mostraron la expresión del ; acido nucleico foráneo, otros cultivos empleados fueron maíz, soya, trigo y arroz (Klein et al., 1978;Wang et al., 1988).

El primer sistema para impulsar los microproyectiles fue desarrollado por Sanford et al., 1991, siendo modificado posteriormente para dar lugar a la pistola PDS-1000/He (Russell, 1993).

4 MATERIALES Y MÉTODOS

PARA ESTABILIDAD DE TRIGOS DE GLUTEN FUERTE

4.1 Descripción de las localidades de los experimentos

Los experimentos se realizaron durante dos años consecutivos. Experimento 1. En el ciclo otoño-invierno del año 2007-08, en terrenos de un agricultor cooperante del Ejido Mezquital. Se localiza a una latitud norte de $32^{\circ}24' 40''$ y $115^{\circ}11' 46''$ de longitud oeste. Experimento 2. En el ciclo otoño-invierno del año 2008-09, en terrenos de un agricultor cooperante del Ejido Nuevo León. Se localiza a una latitud norte de $32^{\circ} 24'$ y $115^{\circ} 11'$ de longitud oeste, a una altitud de 8.7 msnm (Avendaño et al., 2007). Ambos Ejidos se encuentran en el Valle de Mexicali, Baja California, México. El clima es de tipo desértico y en verano se caracteriza por ser cálido, muy seco, con temperaturas promedio máximas y mínimas de 43 y 16 °C, respectivamente. La precipitación pluvial promedio anual es de 85 mm (García et al., 1985).

4.2 Arreglo de tratamientos y diseño experimental

Experimento 1: Los tratamientos del presente experimento fueron el uso de la fertilidad residual proveniente del cultivo anterior cebollín, y el otro fue la utilización de la fertilidad residual más fertilización comercial. La fertilidad residual más fertilización comercial fue ajustada de acuerdo a las recomendaciones para este cultivo de acuerdo a las recomendaciones para el valle de Mexicali (INIFAP, 2008). En ambos tratamientos se sembraron tres variedades de trigo de gluten fuerte: Yécora F-70 (Y), Cachanilla F-2000 (C) y Triguero F-00 (TR). Lo mismo se establece en el experimento 2, pero en suelos provenientes de Raphani como cultivo anterior.

La siembra se hizo en surcos con una densidad de (40 kg ha^{-1}) en cada año. El diseño experimental fue bloques completos al azar y cuatro repeticiones. El factor de bloqueo fue la heterogeneidad del suelo. Las variables evaluadas fueron: Rendimiento de grano (RG) en Kg ha^{-1} y sus componentes: Rendimiento de paja (RP) en Kg ha^{-1} , Panza blanca (PB), Peso hectolítrito (PH) en Kg hL^{-1} , (5) Índice de cosecha (IC), (6) Proteína en grano (PG) en %, y calidad harinera: Fuerza de gluten (W) y ($W = R \times 10^{-4} \text{ J}$), donde R= Valor cuantitativo y J= Joules, y , para los cuatro ambientes: Ambiente 1: fertilidad residual-2007 (FR), Ambiente 2: fertilidad residual+ fertilización comercial - 2007(FR+FC) , Ambiente 3: fertilidad residual-2008 (FR), Ambiente 4: Fertilidad residual+ Fertilización comercial -2008 (FR+FC).

En los ciclos 2007-08 y 2008-09 previo a la siembra, se realizaron análisis de suelos en cada una de las 24 parcelas. Las muestras se obtuvieron a una profundidad de 30 cm de tres puntos de cada parcela, se obtuvo un promedio por parcela y éstos se utilizaron para obtener un promedio general del área del experimento 1. Se obtuvo un promedio de $147 \text{ kg de N ha}^{-1}$ y $27 \text{ kg de P}_2\text{O ha}^{-1}$. Estos valores se consideraron como fertilidad residual.

La FR consistió en la no adición de fertilizante N y $29 \text{ kg de P}_2\text{O ha}^{-1}$ durante el periodo de desarrollo del cultivo, mientras que la FR+FC consistió en la adición de $185 \text{ kg de N ha}^{-1}$ y de $29 \text{ kg de P}_2\text{O ha}^{-1}$. Así, el tratamiento de FR tuvo una fertilización de 147-56-00, N, P y K, respectivamente, mientras que el tratamiento FR+FC tuvo una fertilización de 332-56-00, N, P y K, respectivamente.

La fuente de P_2O utilizada fue ácido fosfórico y se aplicó en el primer riego de auxilio, 45 días después de la siembra y primer riego de germinación en subfase Z 2.6 (Zadoks et al., 1974). La fuente de N utilizada fue UAN-32 y fue fraccionada en cinco aplicaciones, comenzando con el primer riego de auxilio y terminando con el quinto riego de planta, cuando el trigo ya se encontraba en etapa de llenado de grano ó sub fase Z 7.1 (Zadoks *et al.*, 1974). En total se aplicaron seis riegos de auxilio, además del primero de germinación.

El 25 de Febrero se realizaron operaciones de control de malezas utilizando una mezcla de los productos comerciales “Axial” (2,2-ácido dimetil-propanoico 8-(2,6 dietil-4metilfenil)-1,2,4,5-tetrahidro-7-oxo-7H-pirazolo [1,2-d] [1,4,5] oxadiazepin-9-il ester (CA), “Adigor” (coadyuvante A12127R), “Amber” (Triasulfuron al 75.0%) y “Buffex”, regulador del pH y dureza del agua a base de ácidos orgánicos en 42% y sales de ácidos orgánicos poli carboxílicos en 45%. No se realizó ninguna aplicación para el control de plagas o de enfermedades.

En el experimento 2, en el análisis de suelo previo a la siembra se obtuvo un promedio de 62 kg de N ha^{-1} y 5 kg de P_2O ha^{-1} . Estos valores se consideraron como fertilizantes residuales. La FR consistió en la no adición de fertilizante N y 5 kg de P_2O ha^{-1} , durante el periodo de desarrollo del cultivo; mientras que la FR+FC consistió en la adición de 270 kg de N ha^{-1} y de 51 kg de P_2O ha^{-1} . Así, el tratamiento de FR tuvo una fertilización de 62-5-00, N, P y K, respectivamente, mientras que el tratamiento FR+FC tuvo una fertilización de 332-56-00, N, P y K, respectivamente.

La fuente de P₂O utilizada fue ácido fosfórico y se aplicó en el primer riego de auxilio, 45 días después de la siembra y primer riego de germinación en subfase Z 2.6 (Zadoks, et al, 1974). La fuente de N utilizada fue el UAN-32 y fue fraccionada en cinco aplicaciones, comenzando con el primer riego de auxilio y terminando con el último.

4.3 Metodología para la colección de datos

4.3.1 Rendimiento de grano

La estimación del rendimiento de grano se realizó cosechando manualmente 2 m² dentro de cada unidad experimental, trillando y separando éste de la paja. Posteriormente, se obtuvo el rendimiento de paja de cada uno de los tratamientos evaluados. Se expresa como $RG = [\text{Peso de grano (Kg)}] \text{ ha}^{-1}$.

4.3.2 Rendimiento de paja

Después de haber estimado el rendimiento de grano, se separó la paja, se pesó y se estimó el rendimiento de paja por hectárea. Se expresa como $RP = [\text{Peso de paja (Kg)}] \text{ ha}^{-1}$.

4.3.3 Índice de cosecha

El índice de cosecha fue calculado mediante la siguiente fórmula: $IC = \text{rendimiento de grano} / \text{rendimiento de grano} + \text{rendimiento de paja}$.

4.3.4 Peso hectolítrico

Es una medida de la relación peso/volumen y tiene unidades kg de grano hectolitro⁻¹ (Kg hl⁻¹), y se calculó mediante el pesado de muestras de un volumen conocido de grano seleccionadas aleatoriamente de cada tratamiento.

4.3.5 Concentración de proteína en el grano

La concentración de proteína en el grano se realizó a través del método de Kjeldhal (nitrógeno \times 5.70) (JAOAC, 1968). Para el análisis estadístico de esta variable se usó la transformación de raíz cuadrada del porcentaje de proteína. Para la discusión de resultados se transformó de nuevo a porcentaje.

4.3.6 Porcentaje de panza blanca

El porcentaje de panza blanca se calculó mediante el pesado de una muestra de 250 g de grano, se separaron los granos que presentaron panza blanca, se pesaron los granos con panza blanca y la fracción fue expresada como porcentaje de la muestra original. Para el análisis estadístico el porcentaje se transformó con la siguiente ecuación: Panza blanca = $\sqrt{X+1}$), donde X= porcentaje de panza blanca. Para la discusión de resultados se transformó de nuevo a porcentaje.

4.3.7 Análisis reológicos de las harinas

Las pruebas más importantes para determinar la funcionalidad de las harinas de trigo tienen como objetivo estudiar las propiedades físicas del gluten hidratado y formación por la acción del amasado. Estas son de suma importancia porque están estrechamente vinculadas con los parámetros de procesamiento (absorción óptima de agua y tiempo de amasado) y con la calidad del producto terminado. Finalmente, a nivel de manufactura de pan, galletas y productos afines, los ensayos reológicos son considerados como las pruebas críticas para determinar importantes parámetros de procesamiento (absorción de agua, tiempo de amasado y estabilidad de la masa) y predecir la calidad del producto terminado (Serna, 1996).

4.3.8 Alveogramas para medir la fuerza de gluten

El alveógrafo marca Chopin mide propiedades reológicas de las masas (extensión y tenacidad) con la inyección de aire en discos de masas de dimensiones estandarizadas. Consiste en amasar 250 g de harina por ocho minutos con una solución salina al 2.5%. La cantidad de agua salina a utilizar está determinada en función del porcentaje de humedad inicial de la harina. La masa resultante se divide en cuatro partes iguales, las cuales posteriormente son laminados con un rodillo para obtener un grosor constante de 12mm. Las láminas son finalmente moldeadas en discos de diámetro y grosor uniforme.

Los discos son introducidos en la mini cámara isotérmica de fermentación o reposo del aparato. Los ensayos alveográficos se realizan en 20 min después del moldeado. El disco de masa se coloca en el centro de la platina fija o placas de soporte del alveógrafo, posteriormente se cierra y se aplasta de una manera estandarizada mediante el movimiento lento de la platina superior. Finalmente se remueve la tapa, se inyecta manualmente aire con el objetivo de despegar el disco de la masa y se inyecta aire a presión constante. El aire inyectado provoca la formación de una burbuja, la cual se hincha formando un pequeño globo hasta que se rompe.

4.3.9 Concentración de proteína en la harina y fuerza de gluten (W)

La medición de los parámetros reológicos, es decir, la concentración de proteína en la harina y la fuerza de gluten (W) se obtuvieron mediante la elaboración de alveogramas, con el uso de un alveógrafo (figura 2).

Para la determinación de la proteína en las harinas, se utilizó un equipo marca Per Con, modelo Inframatic 8611 (figura 3).



Figura 2. Alveografo para determinar la fuerza de gluten en harina



Figura 3. Equipo Per Con Inframatic 8611 utilizado para determinar la proteína en harina

TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMIZACIÓN DE LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE.

4.4 Planta y esterilización de semillas

Plantas de trigo Bobwhite 56 (*Triticum aestivum L.*) se desarrollaron en el invernadero bajo condiciones controladas con 16 hrs de fotoperiodos, temperatura e día de 24-28°C y temperatura de noche a 15-18°C. Rutina de pesticidas y tratamientos de fertilización fueron aplicadas a las plantas donadoras. Inmaduros embriones fueron cosechados de 5-10 día después de la antesis con una longitud de 0.5-1.5, fueron inmediata sacados desde la semilla (Pellegrineschi et al; 1998). Previo a la aislación del embrión las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 15% con 0.1% Twee 80(Merck), lavados con agua estéril cinco veces en base a los protocolos (Lazzeri et al.,1993; Chistov et al., 1996; Fabienne et al.,2005).

4.5 Discos de ruptura y esterilización de macrocarrier y medio de cultivo

Disco de ruptura y macrocarrier fueron esterilizados en una solución de etanol al 100% y secados en una caja petri (Sparks, 2003). El medio de cultivo fue formulado en base a (Smidansky, 2002), con las siguientes modificaciones: 500 mL de agua destilada, 4.32 g de MS sal (Murashig and Skoog, 1962) con 150 mg of L. asparagina, 40 mg de tiamina, 150 g of maltosa 1 mL of 5mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Después, adicionar agua destilada hasta un volumen final de 700 mL y ajustar pH= 5.8 con NaOH antes de la autoclave por 30 min.

El medio fue filtrado a través de una membrana de nailon (0.45 μm) en una botella de 1 L con 300 ml de solución de pitagel (2 g).

4.6 Esterilización de microproyectiles y bombardeo de DNA

Las partículas (0.6 μm) (BioRad, Hercules, CA) fueron esterilizados con 1 mL proveniente de una solución de etanol al 70% por cada 5 mg de oro, en un tubo de 1.5 mL, mezclar por 15 min, centrifugar por 5 segundos, eliminar el supernadante. Repetir el proceso tres veces, las partículas de oro fueron suspendidas en 0.5 mL de una solución de etanol al 70% etanol (Pellegrinesch., 1998). El vector pScBV-3m plásmido contiene la bacteria con el gen β -glucuronidase (*GUS*), bajo del control del promotor ScBV conduce la expresión a corde maíz ADH intron I y *GUS*, fue gentilmente donado por Neil Olszewski (Department of Plant Biology, University of Minnesota).

4.7 Precipitación del DNA en los microproyectiles, cultivo de embriones, microproyectile-DNA en embriones y detección histoquímica del GUS.

La solución con partículas de oro fue colocada en un baño ultrasónico por 10 segundos, y mezclado por 13 sec. La reacción de precipitación fue preparada en un tubo de 2 mL. Cada bombardeo consistió de: 8.33 μL de partículas de oro, 8.33 μL 2.5M CaCl_2 , 8.33 μL 0.1M espermidina libre de bases, 0.5 μL DNA (0.5 μg). Mezclar continuamente por 5 min. El supernadante fue desechado y 20 μL 70% etanol fueron adicionados.

Finalmente, adicionar 15 μL de etanol 100%. Los microproyectiles fueron colocados sobre el disco de ruptura (Pellegrinesch et al., 1998; Rasco et al., 1999) (Figure 2).

Embriones fueron sacados y colocados en el centro de una caja de petri con un diámetro de 35 mm con medio de cultivo. Hay tres diferentes distancias: 1) Entre 65 y 87 embriones (6.8-7.5 cm diámetro de disparo) para un distancia de disparo de 1.5 cm; 2) 120 embriones fueron colocados en el centro de la caja de petri (8.8-9.5 cm diámetro de disparo) para una distancia de 4.5 cm; 3) 115 embriones fueron colocados en el centro (12 cm diámetro de disparo) para una distancia 7.5 cm. Los embriones fueron incubados en el medio de cultivo a 25°C en la oscuridad un día antes del bombardeo.

El bombardeo fue conducido a unas distancias de (1.5, 4.5 and 7.5 cm), en vacío con PDS 1000/He microproyectiles gun (Bio-Rad), con discos de ruptura de a tres diferentes niveles de presión (650, 1100, and 1800 psi), cada tratamiento fue repetido dos veces.

La expresión de gen GUS fue analizado dos días después del bombardeo inmerso dentro de una solución bufer de histoquímica tinción (50mM NaH₂ PO₄ pH 7.2, 0.5% Triton X-100, 1mM 5-bromo-4-chloro-3 indolyl-β-D-glucuronide) como sustrato cromogenico [15]. Un vacío parcial vacío (27 pulgadas Hg) fue aplicado por 25 min para introducir el sustrato dentro de la células. Los embriones fueron incubados en la oscuridad con agitación a 37°C. La solución de tinción fue removida y remplazada con solución de etanol al 70% etanol hasta la expresión del gen usando un microscopio.

La expresión el gen GUS fue cuantificada por el número de puntos azules por bombardeo. La cuantificación del número de puntos fue determinada por la observación de puntos bien definidos.

4.4 Análisis estadístico de los resultados PARA ESTABILIDAD DE TRIGOS DE GLUTEN FUERTE

4.4.1 Análisis de varianza

Se realizaron análisis de varianza de bloques completos al azar para estudiar el efecto de la interacción para las diferentes variables agronómicas (Cuadro 1), adicionalmente se corrieron contrastes ortogonales para evaluar posibles diferencias entre los genotipos para las variables: rendimiento de grano, sus componentes (panza blanca, peso hectolítrico, índice de cosecha, rendimiento de paja) y calidad harinera (Fuerza de gluten): contraste 1a: (C vs Y+TR) y el contraste 1b: (Y vs TR) para el rendimiento del grano, panza blanca, peso hectolítrico, índice de cosecha, rendimiento de paja, respectivamente. El contraste 2a: (YR vs C+Y) y el contraste 2b: (C vs Y) para proteína en grano, fuerza de gluten en los dos años y con los tratamientos con FR y FR+FC. Estos análisis se realizaron con un nivel de significancia de 0.05 utilizando el programa SAS (SAS, 2000).

4.4.2 Análisis estadísticos para evaluar parámetros de estabilidad

Para los análisis de estabilidad fenotípica se utilizaron los métodos propuestos por Eberhart y Russell (1966) y el Modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa (Modelo AMMI).

4.4.2.1 Modelo de Eberhart y Russell (1966)

En este caso, se incluye al coeficiente de regresión β_i , calculado con base en el efecto ambiental (índice ambiental), considerado fijo, y a la varianza de las desviaciones de regresión por genotipo $\delta_{di}^2 \cdot \beta_i$ representa la respuesta de un genotipo al mejorar la condición ambiental, en tanto que el segundo ofrece una medida de variabilidad, interpretada como falta de estabilidad.

Un genotipo es considerado estable si su coeficiente de regresión es igual a 1 y las desviaciones de regresión son iguales a cero. Este análisis provee pruebas de hipótesis para determinar las dos condiciones de estabilidad, así como la presencia de diferencias de medias entre genotipos.

La estimación de los coeficientes de regresión y de las varianzas de desviaciones de regresión se efectuó utilizando el programa PARAM propuesto por Ortega y Magaña (1992; Cuadro 2).

Para la interpretación de los valores estimados del modelo Eberhart y Russell se utilizó la interpretación de estabilidad propuesta por Carballo y Márquez (1970; Cuadro 3).

Cuadro 1. Análisis de varianza de bloques completos al azar combinado apropiado para estudiar la interacción.

FUENTES DE VARIACION	G. L.	C. M.
AMBIENTES (A)	I-1	M ₅
REP/LOCALIDADES	(r-1)I	M ₄
GENOTIPO (G)	G-1	M ₃
G X A	(G-1) (I-1)	M ₂
ERROR EXPER.	(r-1) (V-1)I	M ₁
TOTAL	G(r-1)	

Cuadro 2. Análisis de varianza combinada para la estabilidad de Eberhart y Russell (1966)

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios
Total	$(n G - 1)$	$\sum_i \sum_j Y^2_{ij} - F. C.$	
Genotipo (G)	$(G - 1)$	$\frac{1}{n} \sum_i Y^2_{i.} - F. C.$	CM ₁
Ambientes (A) +	$(n - 1)$ $r (n - 1)$	$\sum_i \sum_j Y^2_{ij} = \sum_i Y^2_{i.} / n$	
G x A Ambiente (lineal)	$(G - 1)(n - 1)$ $G - 1$	$\frac{1}{v_j} (\sum_i Y_{ij} l_j)^2 / \sum_j l_j^2$	
G x A (lineal)	$G - 1$	$\sum_j [(\sum_i Y_{ij} l_j)^2 / \sum_j l_j^2] - S. C. amb. (lineal)$	CM ₂
Desviación conjunta	$G (n - 2)$	$\sum_{ij} S^2_{ij}$	CM ₃
Genotipo 1	$n - 2$	$[\sum_j Y^2_{ij} - \frac{(Y_{i.})^2}{n}] - (\sum_j Y_{ij} l_j)^2 / \sum_j l_j^2$	CMF ₁
⋮			
⋮			
⋮			
Genotipo f	$n - 2$	$[\sum_j Y^2_{fj} - \frac{(Y_{f.})^2}{n}] - (\sum_j Y_{fj} l_j)^2 / \sum_j l_j^2$	CM ₄
Error conjunto	$n (r - 1)(G - 1)$		

Cuadro 3. Interpretación de los parámetros de Eberhart y Russell para diferentes situaciones posibles que pueden tomar los parámetros de estabilidad (Carballo y Márquez, 1970).

Situación	Coficiente de Regresión	Desviaciones de la Regresión	Descripción de la Variedad
a)	$b_{i.} = 1$	$S^2 d_i = 0$	Variedad estable.
b)	$b_{i.} = 1$	$S^2 d_i > 0$	Buena respuesta en todos los ambientes pero inconsistente.
c)	$b_{i.} < 1$	$S^2 d_i = 0$	Mejor respuesta en ambientes desfavorables y consistente.
d)	$b_{i.} < 1$	$S^2 d_i > 0$	Mejor respuesta en ambientes desfavorables e inconsistente.
e)	$b_{i.} > 1$	$S^2 d_i = 0$	Mejor respuesta en buenos ambientes y consistente.
f)	$b_{i.} > 1$	$S^2 d_i > 0$	Mejor respuesta en buenos ambientes e inconsistente.

4.4.2.2 Modelo AMMI (Modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa).

Explica inicialmente los efectos principales de genotipos y ambientes mediante un análisis de varianza convencional y posteriormente describe la parte no aditiva correspondiente a la interacción genotipo x ambiente por medio de un análisis multivariado de componentes principales (CP1, CP2, CPn) (Crossa, 1990). A partir del primer componente principal y el resto de los componentes, en caso de representar un porcentaje aceptable de la interacción (60%), es posible generar un figura (biplot) con el programa infogen y representar las similitudes de genotipos o de ambientes.

El modelo AMMI está representado por la ecuación (Zobel et al., 1998)

$$Y_{ij} = \mu + G_i + a_j + \sum_{k=1}^k \lambda_k \alpha_{ik} \gamma_{jk} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = es el rendimiento del i-ésimo genotipo en el j-ésimo ambiente

Los parámetros aditivos son: μ = media general; G_i = Efecto del i-ésimo genotipo; a_j =

Efecto del j-ésimo ambiente; λ_k = Valor propio del componente principal K; $\alpha_{ik} \gamma_{jk}$ = Valor

del componente principal k de genotipo y localidad

ε_{ij} = Error experimental

Para la representación gráfica del CPI en función de un variable se utilizaron las siguientes abreviaciones: (C)= Genotipo Cachanilla F-2000, (Y)= Genotipo Yécora F-70, (TR)= Genotipo Trigueno F-00, A= Fertilidad residual- 2007, B= Fertilidad residual+ Fertilización comercial-2007, C= Fertilidad residual -2008 y D= Fertilidad residual+ Fertilización comercial -2008.

TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMACIÓN DE LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE

4.4.2.3 Maximización de los parámetros de bombardeo

Fue realizado usando un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x2. Los factores considerados fueron presión de bombardeo (650, 1100, and 1800 psi) y distancia de (1.5, 4.5, and 7.5 cm). La variable dependiente fue la relación de número de puntos azules por embriones bombardeados. La comparación de medias fueron detectadas usando la prueba de Rangos Múltiples de Duncan y la diferencia fue considerada para un valor de ($P < 0.05$). El análisis fue realizado en el SAS (Proc GLM)

5 RESULTADOS Y DISCUSION

PARA ESTABILIDAD DE TRIGOS DE GLUTEN FUERTE

5.1 Análisis de varianza combinado

La IGA resultó altamente significativa ($P < 0.01$) para las variables rendimiento de grano, sus componentes y calidad harinera, las cuales fueron evaluadas en cuatro ambientes de prueba durante dos años. Estos resultados demuestran que los genotipos tienen un comportamiento desigual en los diferentes ambientes probados (Cuadro 4). López et al. (2001) evaluaron la adaptación y rendimiento de 15 líneas avanzadas de frijol negro, así como un testigo local en 11 localidades bajo condiciones de riego, temporal y humedad residual. Los resultados obtenidos indican diferencias entre las líneas estudiadas, localidades y para la interacción línea por localidad. Estos mismos resultados concuerdan con lo obtenido por Gleenys et al. (2006), quienes estudiaron la IGA en 16 híbridos experimentales de maíz de grano blanco, en varios ambientes del estado Yaracuy, Venezuela, en el período 2000-2001. Ellos detectaron diferencias para los efectos principales de genotipos y ambientes, así como en la IGA. Asimismo, Balbuena et al. (2008) estudiaron 20 genotipos de Maíz y Trigo para identificar los sobresalientes en rendimiento de grano y componentes de rendimiento en cuatro ambientes del valle de México. Los resultados indicaron que en la IGA fue significativa para el rendimiento del grano. Estos mismo resultados coinciden con los obtenidos por Zepeda et al. (2009), quienes evaluaron 8 híbridos de maíz adaptados a la región de Valles Altos Centrales de México, y sus características físicas, estructurales y calidad del nixtamal-tortilla del grano.

Los resultados mostraron que la IGA fue significativa para la mayoría de las variables, pero para el rendimiento de tortilla fría un híbrido respondió diferente a los ambientes debido a sus características genéticas particulares y por su respuesta en cada año agrícola. Estos mismos autores también observaron significancia en la IGA al evaluar el índice de floración del grano en 10 genotipos de maíz en dos ambientes.

Cuadro 4. Cuadrados medios del análisis combinado para trigos de gluten fuerte evaluados en cuatro ambientes para rendimiento, sus componentes y calidad harinera.

Fuente	RG Kg ha ⁻¹	RP Kg ha ⁻¹	PB (X+1) ^{1/2}	PH Kg hL ⁻¹	IC	PG (X) ^{1/2}	W Joules
Genotipo x Ambiente	26327329.4* *	6699574.7**	4.84**	1119.6**	0.008357**	0.0552**	10969.3**
CV (%)	11.13	7.91	50.85	16.17	7.73	1.58	9.07
R²	0.92	0.98	0.75	0.74	0.68	0.86	0.78

*Significativo (P= 0.01); **Altamente significativo (P= 0.0001); C.V.=Coeficiente de variación; R²=Coeficiente de determinación; RG=Rendimiento de grano; RP=Rendimiento de paja; PB= Panza blanca; PH= Peso hectolítrico; IC= Índice de cosecha; PG= Proteína en grano; W=Fuerza de gluten.

5.2 Comparación de medias entre genotipos

5.2.1 Rendimiento de grano

No se encontraron diferencias ($P>0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (T) (7721.9, 7600, 7251.3 Kg ha⁻¹ respectivamente), ni entre los genotipos (Y) y (TR) ($P>0.05$) (Cuadro 5). Estos mismo resultados concuerdan con los obtenidos por Syed et al. (2007), quienes evaluaron el análisis de estabilidad del trigo en pre y post anthesis bajo condiciones de estrés hídrico, los resultados indican que no se encontraron diferencias significativas entre el genotipo Rawal-87 y Potohar-93.

5.2.2 Rendimiento de paja

Se encontraron diferencias entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR) ($P<0.05$), mientras que entre el genotipo (Y) y (TR) no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$; Cuadro 5). Estos resultados se deben principalmente a que el genotipo (C) es un genotipo de porte alto, es decir, presentó el rendimiento promedio más alto de 9848.5 Kg ha⁻¹, en el caso de (Y) es un genotipo clasificado como triple enano (tres genes para enanismo) y presentó un rendimiento promedio menor de 8624.8 Kg ha⁻¹, siendo similar a (TR) (Cuadro 5).

5.2.3 Panza blanca

Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR), mientras que entre el genotipo (Y) y (TR) no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) (Cuadro 5). La media más alta de panza blanca fue observada en el genotipo (C), mientras que en (Y) y (TR) fue similar ($P > 0.05$) (2.31, 0.85 y 0.82 % respectivamente), lo que se puede atribuir a que el genotipo (C) tuvo también un mayor rendimiento de grano que los demás genotipos, por lo que tiene mayores necesidades de absorción de nitrógeno por su porte alto y, por ende, contiene menor contenido de proteína que (Y) y (TR) (11.4, 12.1 y 12.5% respectivamente). Se ha demostrado que el carácter de panza blanca está fuertemente asociado con una disminución del contenido de proteína en el grano (Robinson et al., 1977; Solís et al., 2001). También se reconoce que su expresión es debido a factores genético-ambientales (Sivori, 1980; Valenzuela, 1990).

Por otro lado, Sivori (1980) indica que si el tiempo de maduración de la semilla se prolonga más allá de lo normal por efecto de bajas temperaturas y alta humedad relativa, la planta no asimila suficiente nitrógeno, lo que eleva el contenido de hidratos de carbono y disminuye la proteína.

5.2.4 Peso hectolítrico

No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR), ni tampoco entre (Y) y (TR) (Cuadro 5). El genotipo (C) presentó media similares a (Y) y (TR), siendo de 80, 80, 79 Kg hL⁻¹ respectivamente, lo que significa que los genotipos tienen la capacidad de absorber la misma cantidad de agua para el llenado del grano. Valenzuela y Martínez (1992) encontraron un alto grado de asociación entre el peso de 1000 semillas y el peso hectolítrico, así también, observaron que el endospermo aumenta conforme aumenta el peso hectolítrico en diferentes fechas de siembra. Estos mismos autores encontraron que la disminución, se debe a las temperaturas máximas (32°C) que se presentan durante el periodo de floración-madurez fisiológica, lo cual repercute en el tamaño y peso de la semilla. Por consiguiente ellos recomiendan que la mejor época de siembra para producir semilla en donde la calidad sea menos afectada es durante el mes de diciembre. Es decir, las temperaturas de estas épocas otoño- invierno muestran condiciones más favorables para el desarrollo de las variedades de esta región.

5.2.5 Índice de cosecha

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR), mientras que entre genotipo (Y) y (TR) no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 5). Estos resultados se deben principalmente a que el genotipo (C) es de porte alto, es decir, tiene mayor rendimiento de paja ($9848.5 \text{ Kg ha}^{-1}$) y mayor rendimiento de grano ($7721.9 \text{ Kg ha}^{-1}$) con un índice de cosecha de 0.45. Se ha observado que las plantas de trigo desarrollan una estructura de hojas y tallos muy grande en relación al rendimiento de grano y que hay un desequilibrio entre el período de crecimiento vegetativo y el de madurez de los granos (Singh y Stoskopf, 1971). Caso contrario para el genotipo (Y) que es clasificado como triple enano (tres genes para enanismo), su porte es pequeño, es decir, presenta menor media de rendimiento de paja respecto a (C), $8624.8 \text{ Kg ha}^{-1}$, y con índice de cosecha de 0.47, no obstante tiene un comportamiento similar con (TR) con índice de cosecha de 0.48. Los índices de cosecha con valores mayores a 0.5 indican una mayor eficiencia de absorción de nitrógeno para el rendimiento de grano, lo que se debe principalmente a que las plantas tienen una mayor capacidad fotosintetizadora, con una mayor distribución de la asimilación en los granos y una menor en la paja (hojas y tallos) (Barriga, 1974). Los índices de cosecha menores a 0.5 indican mayores necesidades de nitrógeno para el rendimiento de grano. Syme (1970 y 1972) encontró una alta correlación entre el índice de cosecha y peso seco del grano (rendimiento).

5.2.6 Proteína en grano

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), entre el genotipo (TR) con respecto a (C) y (Y), y entre el genotipo (C) con respecto a (Y) (Cuadro 5). La variedad (TR) presenta mayor porcentaje de proteína con respecto a (C) y (Y) (12.5, 11.4, 12.1 % respectivamente). En relación a esta variable, Kramer (1979) define que la variación en el contenido de proteína no solo se debe al genotipo, también a la influencia ambiental (fertilización nitrogenada, densidad de siembra, método de siembra, entre otros).

5.2.7 Fuerza de gluten

Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el genotipo (TR) con respecto a (C) y (Y), mientras que entre el genotipo (C) con respecto a (Y) no encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 5). Estos resultados indican que el genotipo (C) presentó menor fuerza de gluten que (Y) y (TR) (338.8, 367.8 y 436.8 x 10⁻⁴J respectivamente), y con un porcentaje de proteína de 11.4, 12.1 y 12.5% respectivamente. Esto se debe a las variaciones en el contenido total de proteína y las variaciones del contenido de gluten, en consecuencia, por eso a mayor cantidad y calidad de proteína mayor será la fuerza del gluten, siendo un parámetro de calidad importante para la comercialización (Mohan y Martino, 1997).

Cuadro 5. Comparación de medias para rendimiento de grano, sus componentes y calidad en tres genotipos de trigo de gluten fuerte durante los años 2007 y 2008.

Variables de estudio	Genotipos			Contrastes y valor de P		DE
	(C)	(Y)	(TR)	(C) vs (Y)+(TR)	(Y) vs (TR)	
RG	7721.9	7600.0	7251.3	0.25	0.25	837.64
RP	9848.5	9848.5	9848.5	<0.01	0.53	711.07
PB	2.31	0.85	0.82	0.05	0.96	0.77
PH	80	80	79	0.58	0.34	0.37
IC	0.45	0.47	0.48	0.04	0.91	0.036
PG	11.4	12.11	12.5	<0.01	<0.01	0.05
W	338.8	367.8	436.8	0.87	<0.01	34.56

(C)= Cachanilla F-2000; (Y)= Yécora F-70; (TR)= Trigueno F-00; RG=Rendimiento de grano Kg ha⁻¹; DE= Desviación estándar
 RP= Rendimiento de paja Kg ha⁻¹; PB= Panza blanca (%); PH= Peso hectolítrico Kg hL⁻¹; IC= índice de cosecha; PG= Proteína en grano
 (%); W= Fuerza de gluten x 10⁻⁴ J; Contrastes: (C) vs (Y)+(TR)= Cachanilla F-2000 contra Yécora F-70+ Trigueno F-00; (Y) vs (TR)=
 Yécora F-70 contra Trigueno-F00.

5.3 Metodología de Eberhart y Russell(1966)

El modelo de estabilidad univariado de Eberhart y Russell para probar la significancia de la interacción genotipo por ambiente, permitió identificar varias situaciones en función de los parámetros b_i y S^2d_i (Cuadro 6), conforme a la interpretación propuesta por Carballo y Márquez (1970).

5.3.1 Rendimiento de grano

Los tres genotipos de trigo (C), (Y) y (TR) se comportan estables, ya que sus coeficientes de regresión b_i tuvieron un valor igual uno y sus desviaciones de la regresión fueron iguales a cero, con promedios de rendimiento de 7721.9, 7600, y 7251.3 Kg ha⁻¹, respectivamente. Estos resultados muestran concordancia con algunos estudios previos. Gutiérrez et al.(1999) evaluaron la estabilidad de nueve genotipos de trigo en cuatro localidades de México y los resultados obtenidos indicaron que la línea AN-1461 presentó un comportamiento estable y tuvo un alto rendimiento, por lo que pasó al proceso de registro como variedad comercial. López et al. (2001) evaluaron quince líneas avanzadas de frijol negro en once localidades; los experimentos se establecieron bajo condiciones de riego, temporal y humedad residual. Las líneas ICTA-Ju 97-1, ICTA-Ju II-307, DOR-678 y Cut-45, resultaron sobresalientes por su rendimiento, amplia adaptación y estabilidad.

5.3.2 Rendimiento de paja

Los tres genotipos de trigo (C), (Y) y (TR) se comportaron estables, ya que sus coeficientes de regresión b_i tuvieron valores iguales a uno y sus desviaciones de la regresión fueron iguales a cero, con promedios de 9848.5, 8624.8 y 8463.8 Kg ha⁻¹, respectivamente.

5.3.3 Panza Blanca

El genotipo de trigo (Y) se comportó estable, ya que su coeficiente de regresión tuvo un valor igual a uno y su desviación fue igual a cero, con un promedio de 0.85%. El genotipo (C) presenta un coeficiente de regresión b_i mayor a 1 y su desviación igual a cero, que de acuerdo a Eberhart y Russell se comporta mejor en buenos ambientes y es consistente, con un promedio 2.31 %. El genotipo (TR) presenta un coeficiente de b_i menor a 1 y su desviación mayor a cero, que de acuerdo a Eberhart y Russell se comportan mejor en un ambiente desfavorable, con un promedio de 0.82% respectivamente. Esto concuerda con el análisis de contrastes ortogonales realizado en este estudio.

5.3.4 Peso hectolítrico

Los tres genotipos de trigo (C), (Y) y (TR) se comportaron estables, ya que sus coeficientes de regresión b_i tuvieron un valor igual a uno y sus desviaciones fueron iguales a cero, con un promedio de peso de 80, 80 y 79 kg hL⁻¹ respectivamente. La mayoría de los pesos hectolítricos observados en el presente estudio superan el promedio que establece la norma mexicana NMX-FF-036-1996, que rige la comercialización del trigo a nivel nacional (DGC,1996), donde se especifica un peso hectolítrico mínimo de 74 Kg hL⁻¹ para el grado de calidad México 1 y menor para los grados de calidad México 2 y 3 (72 y 68 Kg hL⁻¹ respectivamente), de modo que los genotipos (C), (Y) y (TR) reúnen las características necesarias para su comercialización.

5.3.5 Índice de cosecha

Los tres genotipos de trigo (C), (Y) y (TR) se comportaron estables, ya que sus coeficientes de regresión b_i tuvieron un valor igual a uno y sus desviaciones fueron iguales a cero, con índices promedio de 0.45, 0.47, 0.48 respectivamente. Wallace et al.(1966) afirman que hay evidencias de que el éxito del mejoramiento de variedades altamente productivas se ha debido, en parte, a una selección inconsciente para un índice de cosecha más alto, particularmente cuando los órganos reproductivos, tales como los granos, son parte de la planta que poseen un interés económico.

Sin embargo, en el presente estudio, el índice de cosecha para la variedad (TR) fue de 0.48 y su rendimiento de grano de 7251.3 Kg ha⁻¹, mientras que en la variedad (C) se obtuvo 0.45 y 7721.9 Kg ha⁻¹ de índice de cosecha y rendimiento, respectivamente, lo cual no concuerda con lo señalado por este autor.

5.3.6 Proteína en grano

Los genotipos de trigo (C), (Y) y (TR) se comportaron estables, de acuerdo a Eberhart y Russell, y presentan coeficientes de regresión igual a uno y desviaciones iguales a cero, con promedios de 11.42, 12.11 y 12.46% respectivamente.

5.3.7 Fuerza del gluten

Los tres genotipos de trigo (C), (Y) y (TR) se comportaron estables, ya que sus coeficientes de regresión tuvieron valor igual a uno y sus desviaciones fueron iguales a cero, con promedios de 338.8×10^{-4} , 367.8×10^{-4} , 436.8×10^{-4} J, respectivamente. Estos resultados muestran una fuerza de gluten promedio mayor 314×10^{-4} J (Cámara Nacional de la Industria Molinera de Trigo). La ventaja de esto es que la harina de gluten fuerte se puede utilizar como mejorador de trigos de gluten débil, para establecer parámetros de calidad dirigidos a la elaboración de un producto en particular.

Cuadro 6. Interpretación de la estabilidad para rendimiento de grano, sus componentes con el modelo univariado de Eberhart y Russell de acuerdo a la interpretación de Carballo y Márquez 1970.

Variables evaluadas	Variedad	Media	S²d_i	Descripción
Rendimiento de Paja (Kg ha⁻¹)	Cachanilla F-2000	9848.5	0	Estable
	Yécora F-70	8624.8	0	Estable
	Triguenio F-00	8463.8	0	Estable
Rendimiento de grano(Kg ha⁻¹)	Cachanilla F-2000	7721.9	0	Estable
	Yécora F-70	7600	0	Estable
	Triguenio F-00	7251.3	0	Estable
Índice de cosecha	Cachanilla F-2000	0.45	0	Estable
	Yécora F-70	0.47	0	Estable
	Triguenio F-00	0.48	0	Estable
Panza Blanca (x+1)^{1/2}	Cachanilla F-2000	1.82	0	Mejor respuesta en buenos ambientes y consistente
	Yécora F-70	1.36	0	Estable
	Triguenio F-00	1.35	>0	Mejor respuesta en ambientes desfavorables
Peso Hectolítrico (Kg hL⁻¹)	Cachanilla F-2000	80	0	Estable
	Yécora F-70	80	>0	Estable
	Triguenio F-00	79	>0	Estable
Proteína en grano (X)^{1/2}	Cachanilla F-2000	3.38	0	Estable
	Yécora F-70	3.48	0	Estable
	Triguenio F-00	3.53	0	Estable
Fuerza de gluten X 10⁻⁴Joules (W)	Cachanilla F-2000	338.81	0	Estable
	Yécora F-70	367.75	0	Estable
	Triguenio F-00	436.75	0	Estable

5.4 Modelo AMMI para rendimiento de grano y sus componentes

Los materiales experimentales (C), (Y) y (TR) son formados en ocasiones en ambientes muy particulares, que requieren probarse bajo las diferentes condiciones de manejo que prevalecen en una región antes de ser liberados para su explotación comercial, así como la selección de aquellos que muestren un mayor potencial de rendimiento y calidad bajo esas condiciones. Es necesario demostrar la estabilidad de producción de estas variedades en diferentes ambientes de prueba. Efectos significativos para IGA justifican la continuidad del análisis para determinar su interacción en el comportamiento de las diferentes variedades a través de ambientes. En base a lo anterior, una de las metodologías más utilizadas actualmente para medir la estabilidad es el modelo AMMI se discute a continuación.

El análisis de varianza para el modelo AMMI de las variables estudiadas se presentan en los cuadros 7 y 8, en estos se observa los resultados de la IGA, para RG el cual fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 4. En ésta, el primer componente explica el 99.33 % de la varianza total y el segundo componente mostró el 0.67%, se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente C y D donde se destaca el genotipo (Y), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran C y B con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente D y A con el genotipo (C) como el más adaptado.

Así, los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variable. El genotipo más estable fue (C) en el ambiente D. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2.

Cuadro 7. Análisis de varianza AMMI en trigos de gluten fuerte bajo fertilidad residual y complementaria durante los ciclos 2007 y 2008.

Fuente	gl	Proteína en grano			Rendimiento de paja Kg ha ⁻¹			Peso hectolítrico Kg hL ⁻¹			Rendimiento en grano %		
		SC	CM	%	SC	CM	%	SC	CM	%	SC	CM	%
Modelo	23	0.6514	0.0283 **	—	738942608.91	32127939.51	—	13659.10	593.87**	—	297703264.58	12943620.19 **	—
Repeticiones	12	0.0441	0.037 ^{ns}	—	1989406.49	165783.88	—	1343.92	111.99 ^{ns}	—	9847891.67	820657.64 ^{ns}	—
Ambientes (A)	3	0.778	0.0259 **	—	710383691.41	236794563.81**	—	3532.06	1177.35 **	—	277384539.58	92461513 **	—
Variedad (G)	2	0.1930	0.0965 **	—	18314340.042	9157170.02 **	—	2199.09	1099.55*	—	167879.17	83939.58 ^{ns}	—
G X A	6	0.3364	0.0561 **	—	8255170.95	1375861.82	—	6584.03	1097.34 **	—	10302954.17	1717159.03 *	—
Error	24	0.0650	0.0027	—	14812193	617174.71	—	3355.21	139.80	—	10280033.33	678334.72	—
Total	47	0.7174			753754801.91			17014.31			313983297.92		
Términos AMMI													
G X A	6	0.3364	0.0561 **	—	8255170.95	1375861.82 ^{ns}	—	6584.03	1097.34 **	—	10302954.17	1717159.03 *	—
CP1	4	0.3349	0.0837 **	99.5	5856191.94	1464047.99*	70.94	6561	1640.25 **	99.65	10204035.90	255100897 *	99.03
CP2	2	0.00156	0.00778	0.5	2398979.02	1199489.5 ^{ns}	29.06	23.03	11.25 ^{ns}	0.35	98918.27	49459.13 ^{ns}	0.97

SM, gl, CM, %, CP1, CP2 =Suma de cuadrados, Grados de libertad, Cuadrados medios, Porcentaje: Componente principal 1, Componente principal 2, respectivamente. *Significativo (P= 0.01), **Altamente significativo (P= 0.0001), ns=no significativa

Cuadro 8. Análisis de varianza AMMI en trigos de gluten fuerte bajo fertilidad residual y complementaria durante los ciclos 2007 y 2008.

Fuente	gl	Panza Blanca			Índice de cosecha			Fuerza de gluten Joules		
		SC	CM	%	SC	CM	%	SC	CM	%
Modelo	23	72.54	3.15 [*]	—	0.1026	0.0044 [*]	—	150225.00	6531.52 ^{**}	—
Repeticiones	12	19.7053	1.6421 ^{**}	—	0.01072	0.0009 ^{ns}	—	29562.83	2463.57 [*]	—
Ambientes (A)	3	45.2398	15.6421 ^{**}	—	0.0649	0.0217 ^{**}	—	16062.50	5354.17 [*]	—
Variedad (G)	2	2.2562	1.1281 [*]	—	0.0055	0.0027 ^{ns}	—	55893.04	27946.52 ^{**}	—
G X A	6	4.6161	0.7693 [*]	—	0.0214	0.0036 [*]	—	48706.63	8117.77 ^{**}	—
Error	24	4.11	0.178	—	0.0334	0.0013	—	25459.67	1060.82 ^{**}	—
Total	47	76.65			0.1361			175684.67		
G X A	6	4.6161	0.7693 [*]	—	0.0214	0.0036 [*]	—	48706.63	8117.77	—
CP1	4	4.0522	1.0131 ^{ns}	88.31	0.0165	0.0041 [*]	77.11	46399.29	11599.82	95.26 [*]
CP2	2	0.5362	0.2681 ^{ns}	11.69	0.0049	0.0024 ^{ns}	22.89	2307.33	1153.67	4.74

SM, gl, CM, %, ACP1, ACP2 =Suma de cuadrados, Grados de libertad, Cuadrados medios, Porcentaje de Componente principal 1, Componente principal 2, respectivamente. *Significativo (P= 0.01), **Altamente significativo (P= 0.0001), ns=no significativa

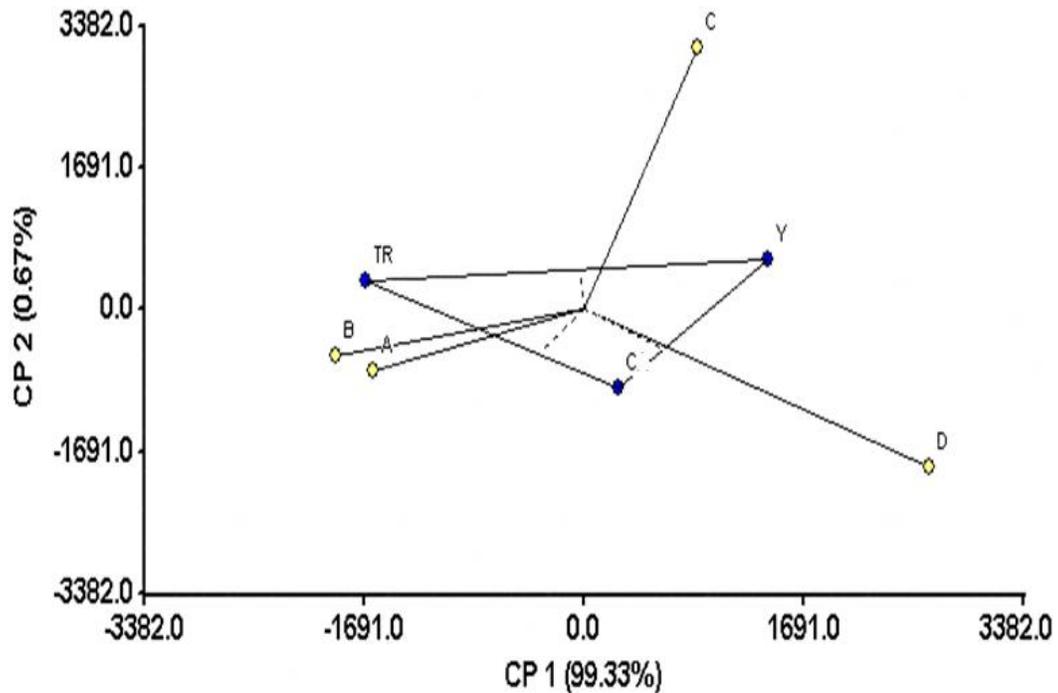


Figura 4. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de rendimiento de grano evaluados en cuatro ambientes.

Para RP, la IGA fue significativa ($P > 0.05$). Esta interacción se puede observar en el biplot de la figura 5. En ésta el primer componente representó el 70.94% de la varianza total y el segundo componente representó el 29.06%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A donde se destaca el genotipo (TR), en el sector izquierdo los ambientes en los que se

encuentran C y D con el genotipo (C) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente B y D con el genotipo (Y) como el más adaptado.

El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente B. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CPI; (TR) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP1.

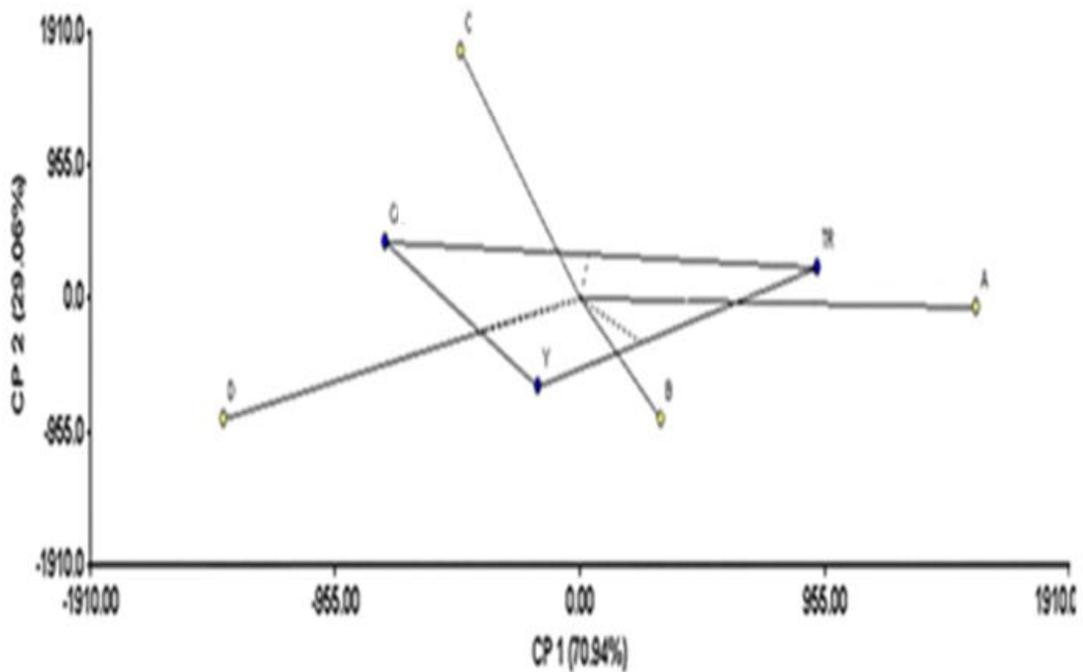


Figura 5. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de rendimiento de paja evaluados en cuatro ambientes.

Para PBIa IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se aprecian en el biplot de la figura 6. En ésta el primer componente representó el 88.3% de la varianza total y el segundo componente el 11.69%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A donde se destaca el genotipo (C), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran C y D con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente B con el genotipo (Y) como el más adaptado. Así los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variables. El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente B. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (C) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2; (TR) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP1.

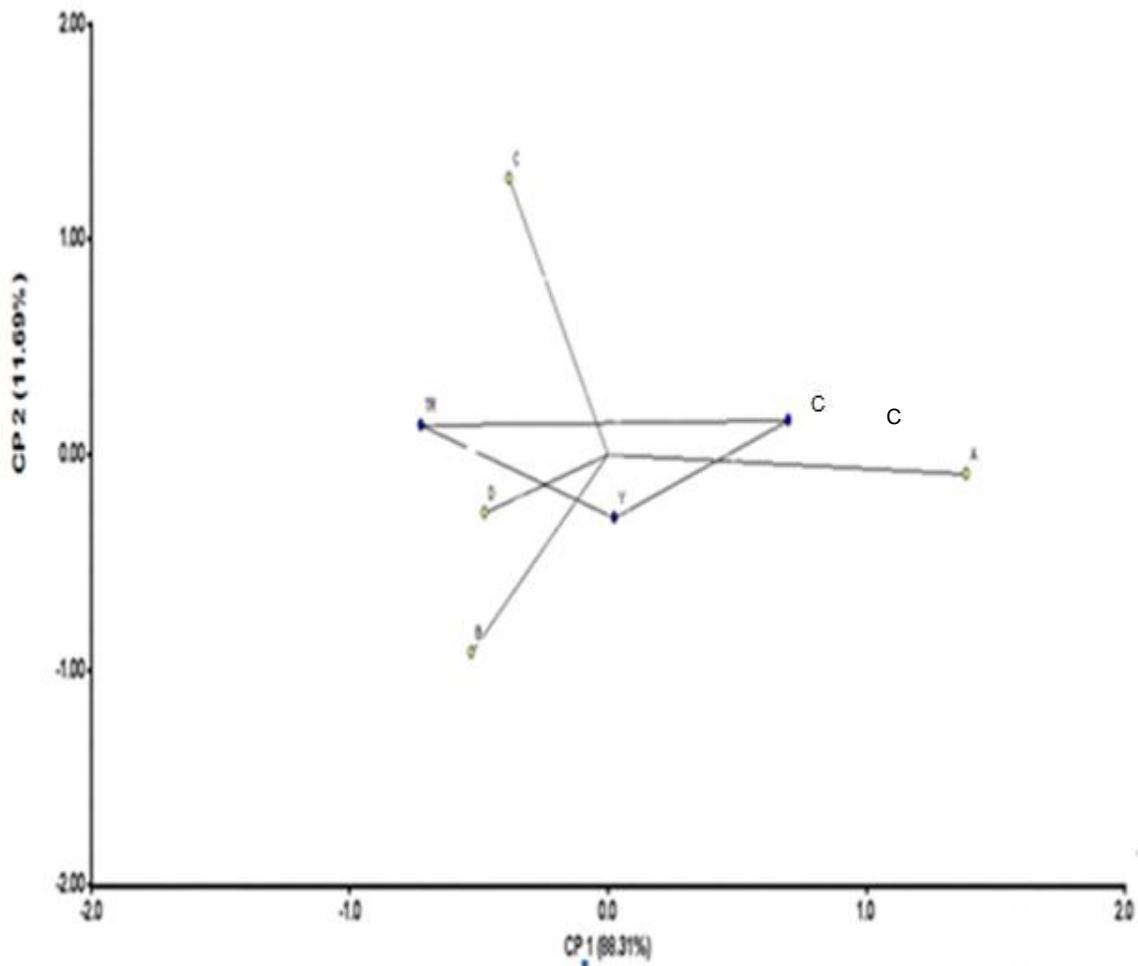


Figura 6. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de panza blanca evaluados en cuatro ambientes.

ParaPHIa IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 6. En ésta el primer componente representó el 99.65% de la varianza total y el segundo componente representó el 0.35%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente.

En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente C donde se destaca el genotipo (Y) como el más adaptado, en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (C) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente C con el genotipo (C) como el más adaptado. Así los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variables. Los genotipo más estable fue (Y) y TR en el ambiente C. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CPI, tuvieron un comportamiento similar.

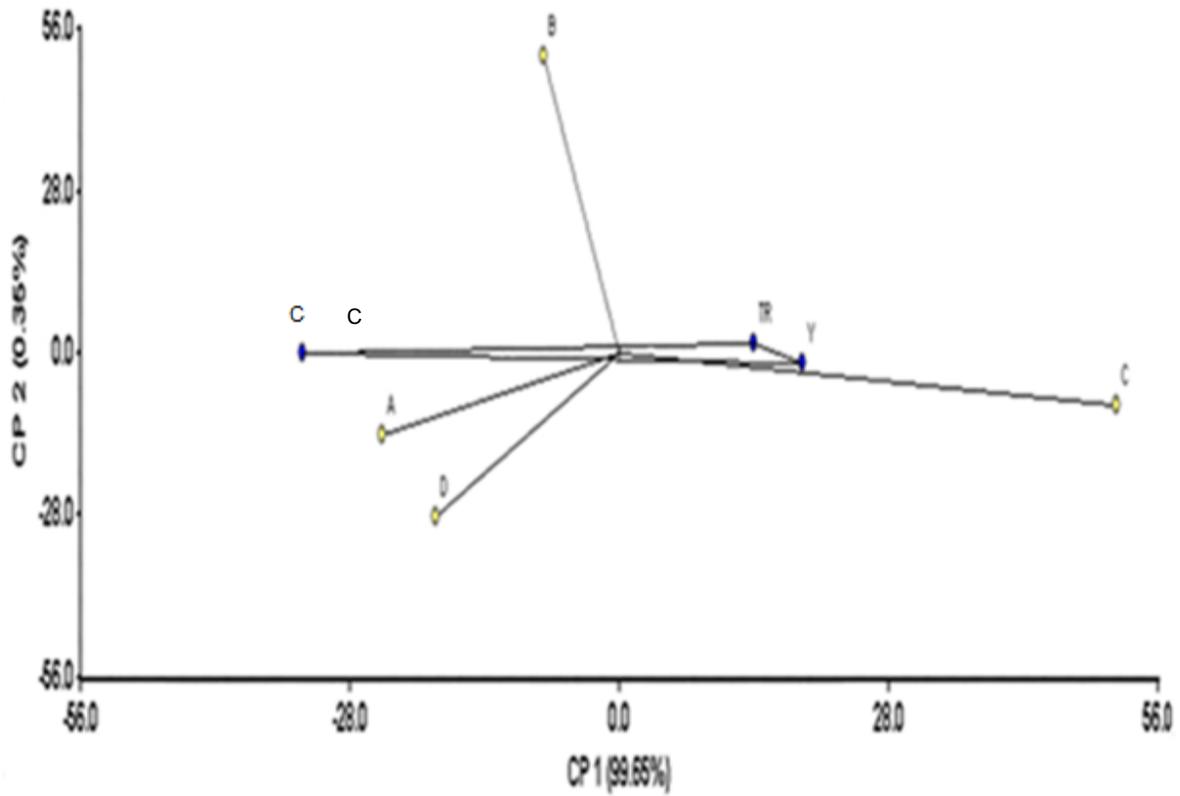


Figura 7. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de peso hectolítrico evaluados en cuatro ambientes.

Para ICla IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 8. En ésta el primer componente representó el 77.11% de la varianza total y el segundo componente representó el 22.89%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A y D donde se destaca el genotipo (C), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (TR) como el más adaptado. Los genotipo más estable fueron (Y), (C) y (TR) en el ambiente C, A y B respectivamente. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2; (TR) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP2.

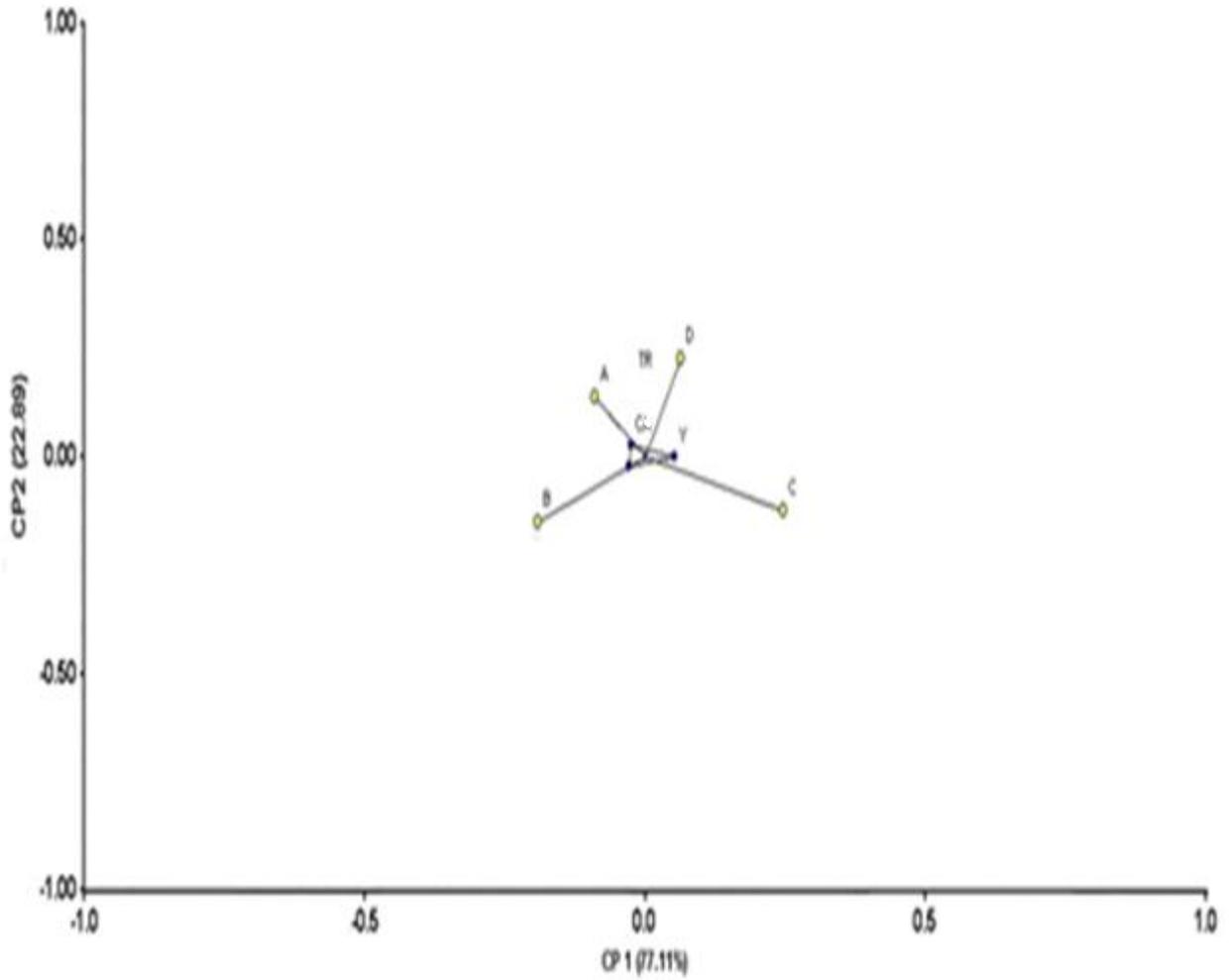


Figura 8. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de índice de cosecha evaluados en cuatro ambientes.

Para PG la IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 9. En ésta el primer componente representó el 99.5% de la varianza total y el segundo componente representó el 0.5%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A donde se destaca el genotipo (Y), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente C con el genotipo (C) como el más adaptado. Así los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variables. El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente A. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CPI; (Y) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP2.

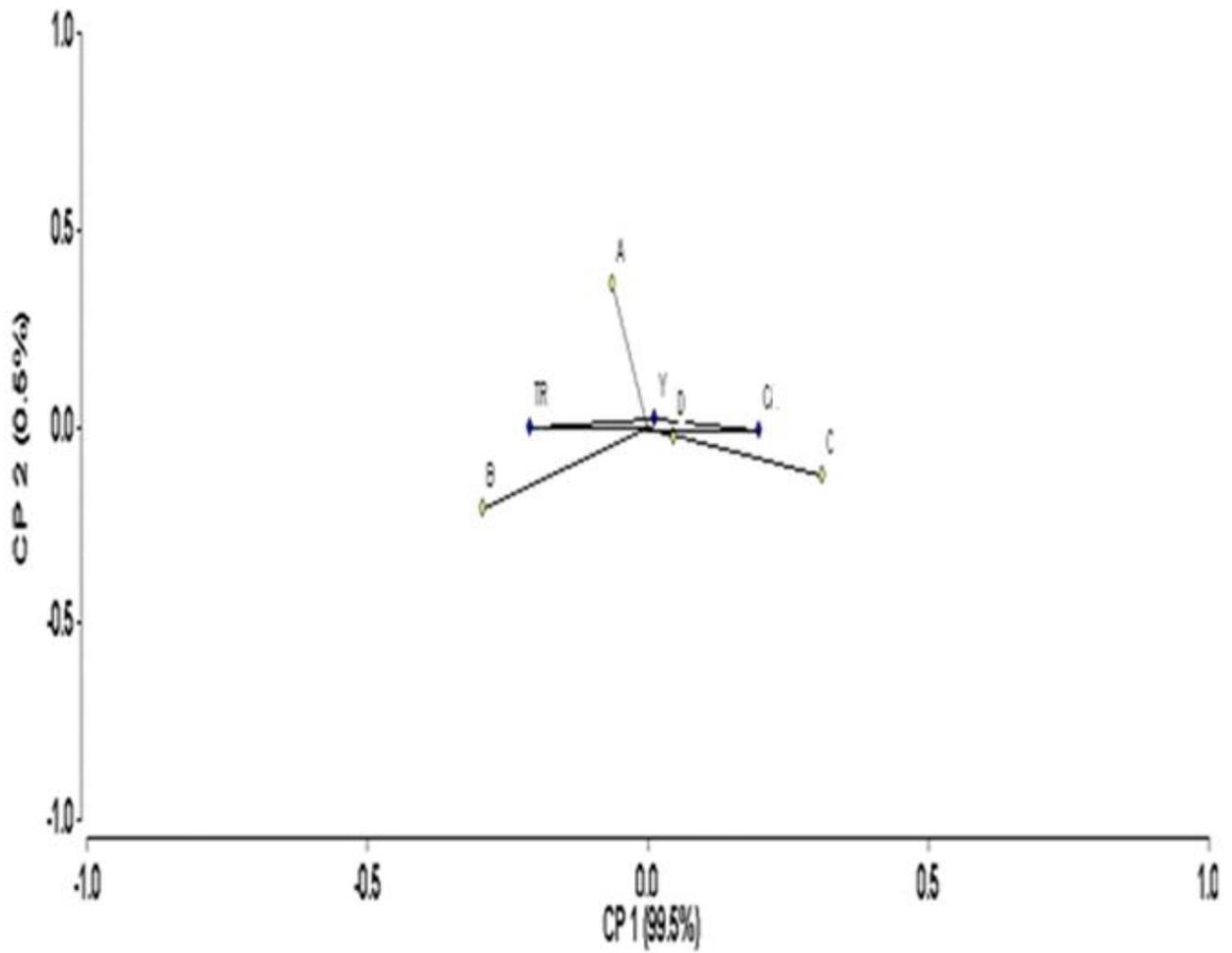


Figura 9. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de proteína en grano evaluados en cuatro ambientes.

Para W1a IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 10. En ésta el primer componente representó el 99.26% de la varianza total y el segundo componente representó el 4.73%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente C donde se destaca el genotipo (C), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente A con el genotipo (Y) como el más adaptado. El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente A. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (C) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2; (Y) y (TR) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP2.

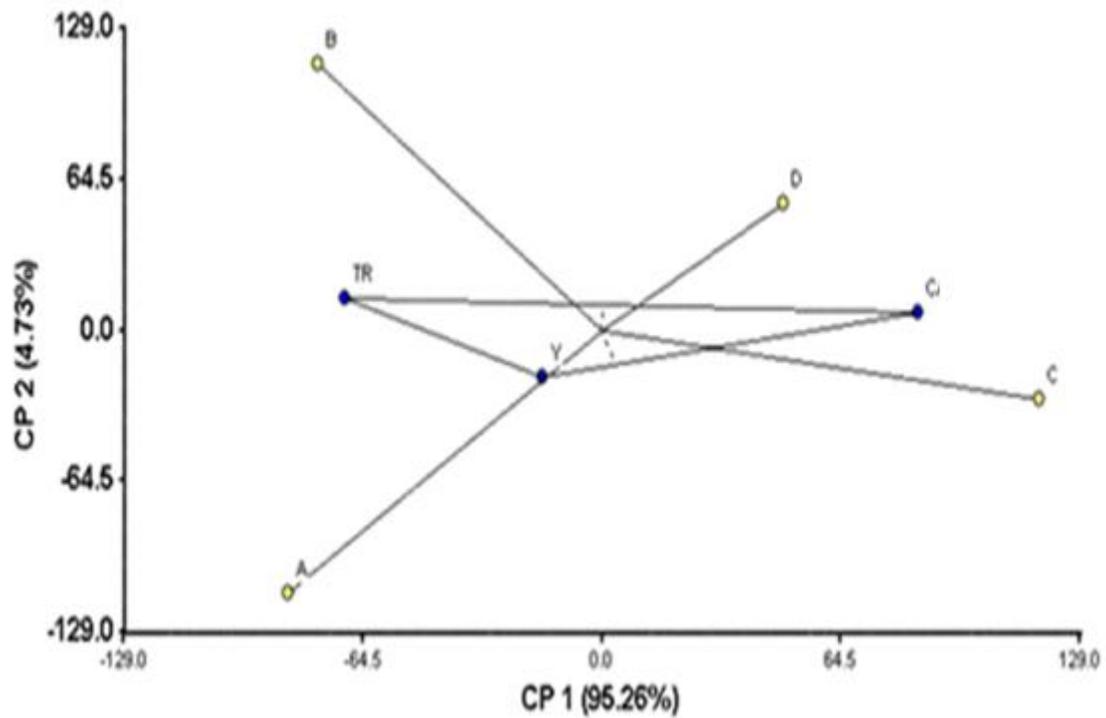


Figura 10. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de fuerza de gluten evaluados en cuatro ambientes.

5.5 TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMACION DE LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE.

El análisis estadístico resultó altamente significativo ($P < 0.01$) entre la presión y distancia, el número de puntos por embriones fue una función de la presión, mostrando un modelo diferente para cada distancia probada (Cuadro 9, Figura 11). La media del número de puntos bien definidos encontrados en los embriones (expresión de gen) la cual es mostrado en el cuadro 9. La media representa un total de tres replicas. El coeficiente de variación y determinación fueron 26.8 y 0.91% respectivamente. Los resultados muestran que la mejor respuesta fue observada a una distancia de 7.5cm y 1100 psi de presión.

La media entre esta distancia y presión, el daño celular fue disminuido y la expresión del gen fue maximizado β -glucuronidase (GUS)(Figura 11).

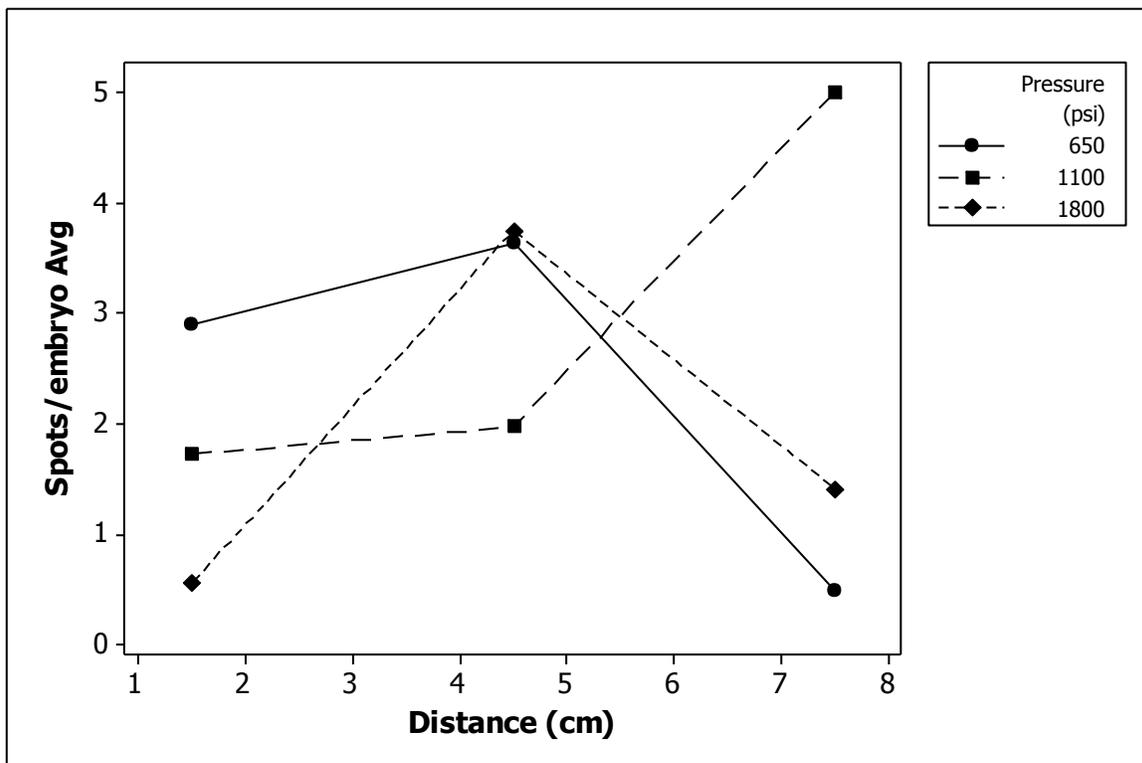


Figura 11. Media de la relación entre total de número de puntos y el número de embriones, como una función de la presión y distancia.

Por otra parte, baja respuesta fue obtenida con una combinación de presión y distancia de 650 psi y 7.5cm (Cuadro 9). Esta respuesta está asociada con alto daño celular. La distancia de 4.5cm y una presión de 1800 y 650 psi tienen también buenos resultados en cuanto a daño celular. Mientras que, a una presión de 1800psi y a una distancia (1.5 y 7.5 cm respectivamente) tuvieron severo daño celular.

El patrón encontrado a 7.5 cm puede ser el resultado del balance entre la aceleración de las partículas de oro necesarias para la inserción de gen, cuando las partículas alcanzan la superficie del embrión; y la máxima presión que el embrión puede soportar antes del daño al tejido, el cual es visto como grandes puntos azules sin una forma definida.

Sin embargo, el patrón mostrado por el número de puntos encontrados a 4.5 cm no puede ser explicado en términos de este. Más allá de distancia, el DNA del gen no es insertado en el embrión. Otra investigación encontró que los puntos fueron bien definidos a una presión de 1100 psi y a una distancia de 0.5cm(Pellegrineschi et al., 1998).

Estos resultados concuerdan con los encontrados en el presente estudio. Aún cuando, hay algunas diferencias entre ambos estudios en la concentración de cloruro de calcio y espermidina (0.16 M cloruro de calcio, 0.005 M espermidina en este presente estudio vs 0.5 M, 0.008 M). El número total máximo de puntos obtenido a condiciones óptimas fue de 248 puntos, el cual es más que 180 puntos (Pellegrineschi et al.,1998)(Cuadro 9).

Estas diferencias pueden ser explicadas en términos de la medida del área cubierta por las partículas de oro durante el bombardeo, la cual es proporcional a la distancia. Estos resultados sugieren que un incremento en la distancia /área no sacrifica el número de puntos bien definidos, se tiene en mente que la masa total de oro es muy pequeña, en ambos estudios fue similar. El proceso para la precipitación de DNA en los microproyectiles fue idéntico en ambos protocolos.

Rasco et al. (1999) mostró que la combinación entre el hueco y la distancia del objetivo en el plato(círculo), el rendimiento óptimo de la expresión del gen (GUS) fue a 2.5 and 5.5 cm. También, encontraron que una adecuada expresión fue obtenida con bajos niveles de presión de bombardeo (650-1100 psi), Lo cual, esto concuerda con la máxima presión para minimizar el daño celular de 1100 psi obtenido en este estudio.

Cuadro 9. Media de número de puntos por embrión en varios niveles de presión y distancia.

Presión (psi)	Distancia (cm)	Media de embriones	Media de puntos	Relación : puntos/embriones media \pm DS
1100	7.5	50	248	5.00 \pm 0.557 ^a
1800	4.5	31	116	3.76 \pm 0.921 ^{ab}
650	4.5	39	142	3.64 \pm 0.036 ^{ab}
650	1.5	26	76	2.91 \pm 0.282 ^{bc}
1100	4.5	35	68	1.97 \pm 0.305 ^{cd}
1100	1.5	31	52	1.73 \pm 0.339 ^{cde}
1800	7.5	50	71	1.41 \pm 1.287 ^{de}
1800	1.5	29	17	0.56 \pm 0.578 ^{de}
650	7.5	42	21	0.49 \pm 0.488 ^e

6 CONCLUSIONES

PARA ESTABILIDAD DE TRIGOS DE GLUTEN FUERTE

1. La interacción Genotipo x Ambiente resultó altamente significativa para las variables rendimiento de grano, sus componentes y calidad harinera evaluadas en cuatro ambientes.
2. En el rendimiento de grano y peso hectolítrico no se encontraron diferencias entre los genotipos (C) con respecto a (Y) y (TR) (7721.9, 7600, 7251.3 Kg ha⁻¹ y 80, 80, 79 Kg hL⁻¹, respectivamente), ni entre los genotipos (Y) y (TR).
3. En el rendimiento de paja y panza blanca, el genotipo (C) tuvo mayor rendimiento y porcentaje de panza blanca (9848.5 Kg ha⁻¹ y 2.31%, respectivamente) con respecto a (Y) y (TR), mientras que los genotipos (Y) y (TR) fueron similares (8624.8 Kg ha⁻¹ y 0.85%; 8463.8 Kg ha⁻¹ y 0.82%, respectivamente).
4. El índice de cosecha fue menor en el genotipo (C) (0.45) con respecto a (Y) y (TR), mientras que los genotipos (Y) y (TR) fueron similares para esta variable (0.4, 0.48, respectivamente).
5. El genotipo (TR) presentó mayor porcentaje de proteína en grano y fuerza de gluten (12.5% y 436.8 x 10⁻⁴J) con respecto a (Y) y (C). Además, (Y) fue mayor a (C) (12.1% y 367.8 x 10⁻⁴J; 11.4% y 338.8 x 10⁻⁴J, respectivamente).
6. Con el modelo de Eberhart y Russell, los genotipos (C), (Y) y (TR) fueron clasificados como estables para las variables de rendimiento de grano, sus componentes y fuerza de gluten, sin embargo, para panza blanca los genotipos (Y) y (TR) no fueron estables. Mientras que en el modelo AMMI, no resultó ser

más efectivo para caracterizar la respuesta de los genotipos. Existen diferencias entre los resultados obtenidos con el modelo de Eberhart y Russell que no son explicados por el Modelo AMMI y viceversa.

Es probable que no todas las variables de rendimiento de grano, sus componentes y fuerza de gluten puedan ser evaluada con el mismo modelo. Por lo tanto, en base a estas diferencias es necesario evaluar otros modelos que proporcionen mayor información tales como la metodología de la varianza de estabilidad de Shukla, Lin y Binns, regresión de Finlay y Wilkinson, índices de Eskridge, entre otros.

PARA TRANSFORMACION GENETICA PARA LA MAXIMACIÓN DE LA EXPRESION DEL GEN (GUS) EN TRIGOS DE GLUTEN FUERTE.

7. Un protocolo basado en el bombardeo de embriones con partículas de oro, el cual tiene interés en adherirlo a una superficie fue realizado. La mejor expresión del gen (GUS) fue conseguido a una máxima distancia (7.5cm) y un nivel medio de presión (1100 psi). Los resultados pueden ser usados para incrementar la probabilidad de inserción y expresión del gen durante la manipulación genética del trigo. Como resultado, usando este protocolo, perdidas de partículas de oro puede ser minimizado, así como el daño celular para futuras aplicaciones de bombardeo de embriones.

7. LITERATURA CITADA

- Avendaño, R. L., D. Álvarez, A.C. Calderón, S. S. Quintero, F. R. Acuña, J. V. Zárate, C. A. Flores y P.H. Robinson. 2007. Evaluación de un sistema de enfriamiento aplicado en el período seco de ganado lechero durante el verano. *Técnica Pecuaria México*. 45(2):209-225.
- Allard, R. W. 1960. *Principles of plant breeding*. John Wiley and Sons. New York.
- Allard, R. W., y A.D. Bradshaw. 1964. Implications of genotype environment interactions in applied plant breeding. *Crop Science*. 4:503-508.
- Allard, L. W. 1999. *Principles of Plant Breeding*. John Wiley and Sons. New York. 254pp.
- Baena, D., J.A. Escobar, y J.E. Muñoz. 1991. Metodologías para determinar la estabilidad y adaptabilidad. Mimeografiado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias agropecuarias, Palmira. 24p.
- Balbuena, M.A., González, H.A., Rosales. R.E., Domínguez, L.A., Franco, M.O, y Pérez, L.D. 2008. Identificación de genotipos sobresalientes de trigo en el Valle de Toluca. *Agricultura técnica en México*. 43(7):257-262.
- Barriga, B.P. 1974. Índice de cosecha en trigo de primavera. *Agro sur*. 2(1): 153-158.
- Becker, H.C.1981. Correlations among some statistical measures of phenotype stability. *Euphytica*. 30:835-840.
- Becker, H.C.1988. Stability analysis in plant breeding. *Plant Breed*.101:1-23.
- Canimolt, 2008. Camara nacional de la industria molinera de trigo 3: 1-48.
- Carballo, C. A., y S.F. Márquez. 1970. Comparación de variedades de maíz del Bajío y la Mesa Central por su rendimiento y estabilidad. *Agrociencia*. 1:129-146.
- Crossa, J., B. Wescott, y C. González. 1988. Analysing yield stability of maize genotypes using a spatial model. *Theoretical and Applied Genetics*. 75: 863-868.

- Crossa, J., H.G. Gauch, y R.W. Zobel. 1990. Additive main effects and multiplicative interaction analysis of two international maize cultivar trials. *Crop Science*. 30: 493-500.
- Crossa, J., P. N. Fox, W. H. Pfeiffer, S. Rajaram, y H. G. Gauch. 1991. AMMI adjustment for statistical analysis of an international wheat yield trial. *Theoretical and Applied Genetics*. 81:27-37.
- Crossa, J. 1996. Statistical analyses of multiplication trials. *Advances in Agronomy*. 44: 55-85.
- Chaves, L. J. 2001. Interacción genotipo por ambiente. Edición. Lourenço Nass, Afonso Celso Candelaria Valois, Itamar Soares de Melo, María Cléria Valadares Rondonópolis: Fundação MT. 673-713p.
- Christou, P., 1996. Transformation technology. *Trend in Plant Science* 1:423-431.
- Cubero, J.I., y F. Flores. 1994. Métodos estadísticos. Para el estudio de la estabilidad varietal en ensayos agrícolas. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla, España. 176p.
- Dyke, G. V., P. W. Lane, y J. F. Jenkyn. 1995. Sensitivity (stability) analysis of multiple variety trials with special reference to data expressed as proportions or percentages, *Exploration. Agricultural*. 31:75-87.
- Eberhart, S. A., y W.A. Russell. 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science*. 6:36-40.
- Eberhart, S.A., y W.A. Russell. 1968. Yield and stability for a 10-line diallel of single-cross and double-cross maize hybrids. *Crop Science*. 9: 357-361.
- Eberhart, S.A., y W.A. Russell. 1970. Factors effecting efficiencies of breeding methods. *Africa Soils*. 15: 655-667.
- Evenson, R.E., y Y. Kislev. 1975. *Agricultural Research and Productivity*, New Haven, CT, Yale University Press.

Inforural,2008:

www.inforural.com.mx/noticias.php?&id_rubrique=182&id_article=29295

Fabienne, D., Li Shirun, and Jacquemin. 2005. Calluses initiated from thin mature embryo fragments are suitable targets for wheat transformation as assessed by long-term GUS expression studies. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 139–149.

Finlay, K.W., y G.N. Wilkinson. 1963. The analysis of adaptation in a plant-breeding programme. *Australian Journal of Agricultural Research*.14: 742-754.

F, Víctor., S. Segovia, y E.Paterniani.1985. Estabilidad fenotípica para rendimiento en poblaciones de maíz sometido a la selección para prolificidad. *Agronomía tropical*. 35(1-2):33-41.

Fox, B. A., y A. G. Cameron. 1997. *Ciencia de los alimentos, nutrición y salud*. Primera reimpresión. Editorial Limusa. México. D. F. 122-128p.

García, E., 1985. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, 2a. México.D.F.

Gauch, H.G., y H. W. Zobel. 1988. Predictive and positive success of statistical analysis of yield trials. *Theoretical and Applied Genetics*. 79: 753-761.

Gauch, H.G.JR. 1992. *Statistical analysis of regional yield trials:AMMI analysis of factorial designs*.Elsevier Science Publisher.B.V.279p.

Gleenys, A., P. Monasterio, y R. Rea. 2006. Análisis de la interacción genotipo-ambiente para rendimiento de maíz en la región maicera del estado Yaracuy, Venezuela. *Agronomía Tropical*.56(3):369-384.

Gutiérrez, E.D., y H. Fraga. 1999. Comparación de respuestas de tres modelos de estabilidad aplicados a nueve genotipos de trigo ("Triticum Aestivum" L.) en cuatro ambientes de México. *ITEA. Producción Vegetal*. 95(1):31-40.

INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones forestales agrícolas y pecuarias.<http://www.inifap.gob.mx>

Hanson, W.D. 1970. Genotypic stability. *Theoretical and Applied Genetic*. 40: 226-231.

Heinrich, G. M., C. A. Francis, y J. D. Eastin. 1983. Stability of grain sorghum yield components across diverse environments. *Crop Sci*. 23: 209-212.

He, G.Y., and P. A. Lazzeri., 1998. Analysis and optimization of DNA delivery into wheat scutellum and tritardem inflorescence explants by tissue electroporation. *Plant Cell Reports* 18: 64–70.

JAOAC. 1968. *Journal Association of Official Analytical Chemists*. 51: 766-770.

Kramer, 1979. Environmental and genetic variation for protein content in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*. 28(2):209-218.

Klein, T.M., E.D.Wolf, T.Wu, and J.C.Sanford. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into plant cells. *Nature*. 327:70-73.

Laing, D. R. 1978. Adaptabilidad y estabilidad en el comportamiento de plantas de frijol común. Documento presentado en la reunión de discusión sobre viveros internacionales de rendimiento y adaptación de frijol. CIAT. 24p.

Lazzeri, P. A., and Shewry. P. R. 1993. Biotechnology of cereals. In: Tombs MP(ed) *Biotechnology and genetic engineering reviews*. vol II. Intercept, Andover, MD., 79-145p.

León, H.C., y C. Becker. 1988. Repeatability of Some Statistical Measures of Phenotypic Stability - Correlations between Single Year Results and Multi Years Results. *Plant Breeding*. 100 (2): 137–142.

Lin, C. S., M. R. Binns, y L.P. Lefkovitch. 1986. Stability analysis: where do we stand? *Crop Science*. 26:894-900.

- López, E., O. Cano, B. Villar, J. Cumpian, F. Ugalde, y V. López. 2001. Evaluación de líneas de frijol negro, en Veracruz y Chiapas, México. *Agronomía Mesoamericana*. 12(2):129-133.
- Lozano, A.J., V.M. Zamora, L. Ibarra, S.A. Rodríguez, C. Lázaro, M.R. Ibarra. 2009. Análisis de la Interacción genotipo-ambiente mediante el modelo AMMI y potencial de producción de Triticales Forrajeros (x Triticosecale Wittm). *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 25(31): 81-92.
- Nachit, M.N., G. Nachit, H. Ketata, H.G. Gauch, y R.W. Zobel. 1992. Use of AMMI and regression models to analysis genotype-environment interaction in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 83:597-601.
- Marín, 1995. Diseño muestral y análisis de encuestas para evaluar adopción de tecnología de producción de yuca en la costa Atlántica de Colombia. Centro internacional de agricultura tropical (CIAT).
- Mohan, M., K.M. Mohap, y D. Martino. 1997. Explorando altos rendimientos de trigo. INIA la estanzuela, Uruguay.
- Mooers, C.A. 1921. The agronomic placement of varieties. *Journal American Society of Agronomy*. 13:337-352.
- Murashige, T., And Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15:473-497.
- NMX-FF-036-1996. Productos alimenticios no industrializados, cereales, trigo (*Triticum aestivum* L y *Triticum durum*), especificaciones y métodos de prueba.
- Ortega, A. J., y O.S. Magaña. 1992. PARAM: Sistema de análisis de parámetros de estabilidad. Congreso Nacional de fitogenética. Tuxtla Gutierrez, Chiapas. Resumen. 363.
- Pandey, S., y J.E. Vargas. 1985. La interacción fenotipo-medio ambiente y su importancia en el mejoramiento intrapoblacional en las plantas cultivadas. Trabajo presentado en el VII Congreso Latinoamericano de Genética- I Congreso Colombiano de Genética. Mimeografiado. 38p.

- Pellegrineschi, A., S. Fennell, S. McLean, R. M. Brito, L. Velázquez, M. Salgado, J. Olivares, R. Hernández, and D. Hoisington. 1998. Routine transformation system for use with CIMMYT Wheat Varieties. Application of Biotechnologies to wheat Breeding. 111-120.
- Perkins, J.M., y J.L. Jinks. 1968. Environmental and genotype x environmental components of variability: III multiple lines and crosses. *Heredity*. Edinburgh. 23: 339-356.
- Pérez, J.C., H. Ceballos, E. Ortega, y J. Lenis. 2005. Análisis de la interacción genotipo por ambiente en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) usando el modelo AMMI. *Fitotecnia Colombiana*. 5(2):11-19.
- Pla, L. E. 1986. Análisis multivariado: Método de componentes principales. Universidad Nacional Experimental Francisco Miranda. *Crop Science*. 35: 1230-31.
- Puertas, M. J. 1992. *Genética fundamentos y pespectivas*. 1ª Ed. M.C. Graw. Hill, Interamericana de España.
- Pronespres. Programa Nacional de estimaciones de superficie, producción y rendimiento 2007-2008: <http://www.oeidrus-bc.gob.mx/sispro/trigobc/pronespre.html>
- Rasco, S., A. Gaunt, A. Riley, P. Barselo, P.A. Lazzeri. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Reports* 19: 118–127.
- Robinson, F.E., D.W. Cudney, W.F. Lehman. 1977. Yellow berry of wheat linked to protein content. *California Agriculture*. 31(3):16-17.
- Riggs, T.J., 1986. Collaborative spring barley trials in Europe 1980-1982: analysis of grain yield. *Plant Breeding*. (96):289-303.
- Serna, S., S.R.O. 1996. *Química, almacenamiento e industrialización de los cereales*, Editorial AGT S.A. México, D.F.

- Solís, E., y J.G. Díaz. 2001. Efecto de los factores controlables de la producción sobre el rendimiento y la panza blanca sobre el grano de trigo duro. *Terra Latinoamericana* 19(4):375-383.
- Shafii, B., K.A. Mahler, K.M. Pric, y J.F. Pederson. 1992. Genotype x environment interaction effects on winter rapeseed yield and oil content. *Crop Science*, 32:922-927.
- Simmonds, N. W.1979. *Principles of Crop Improvement*. Longman. NY. 408 p.
- Sivori, M., and E. Motaldi. 1980. *Fisiología Vegetal*. Editorial Hemisferio sur. Buenos Aires Argentina.
- Snedecor, G. N., y W.G. Cochran. 1980. *Statistical methods*. 7th ed. IOWA, State University Press. Ames, I.A
- Sparks, C, and D. Huw. 2003. Transformation of wheat by Biolistics. Chapper 2. *Transgenic crops of the world. Essential Protocols*. Edited by Lans S Curtis. Kluwer Academic Publishers.
- Sprague and Eberhart.1977. Cor breeding.In. *Corn and Corn improvement*. Ed. Sprague.G.K. Madison. American Society Agronomy.305-362.
- Syed,A. M., A. Rehana, y M. Ghulam. 2007.Yields stability analysis conferring adaptation of wheat to pre-and-post-anthesis drought conditions.*Pak. J. Bot.* 39(5): 1623-1637.
- Stelling, D.E., y W. Link. 1994. Yield stability in faba beans, *Vicia faba* L. 2. Effect. Of heterozygosity and heterogeneity. *Plant Breed.* 112: 30-39.
- Taylor, N.J., and C.M.Fauquet.2002. Micriparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology.*DNA and Cell Biology.* 2:963-977.
- Thomson, N.J., y R.B. Cunningham. 1979. Genotype x environment interactions and evaluations of cotton cultivars. *Australian Journal of Agriculture Research.* 30: 105-112.

- Yan, W., y M.S. Kang. 2003. GGE biplot analysis: a graphical tool for breeders, geneticists and agronomists. CRC press. USA, 1-19p.
- Yates, F., y W.C. Crochram. 1938. The analysis of groups of experiments. Journal of Agricultural science. 28: 556-580.
- Wallace, D.H., H.M. Munger. 1966. Studies of the physiological basis for yield differences. II. Variation in dry matter distribution among aerial organs for several dry bean varieties. Crop Science. 6: 503-507.
- Wang, Y.C., T.M. Klein, M. Fromm, J. Cao, J.C. Sanford, and R. Wu. 1998. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. Plant Molecular Biology 11: 433-439.
- Wricke, G. 1962. Cinc method Zer Ertussog der Okojogischen Streobrelte in Felder. Versoehen Z. Oflanzenzucht. 47: 92-96.
- Zadok, J.C., T.T. Chang, y F.C. Konzak. 1974. A decimal code for growth stages of cereals. Weed Res. 14: 415-421.
- Zepeda, B.R., C.A. Carballo, y A.C. Hernández. 2009. Interacción genotipo-ambiente en la estructura y calidad de nixtamal-tortilla del grano en híbridos de maíz. Agrociencia. 43(7): 124-128.
- Zobel, R.W., M.J. Wrigth, M.J. Gauch. 1988. Statistical analysis of a yield trial. Agronomy Journal. 80: 388-393.
- Zobel, R.W. 1990. A powerful statistical model for understanding genotype-by-environment interaction and plant breeding. 126-140. MS Kang ed. Proc. Genotype by environment interaction and plant breeding. Louisiana State University.

INTERACCIÓN GENOTIPO - AMBIENTE PARA LA ESTABILIDAD DE RENDIMIENTO EN TRIGO EN LA REGIÓN DE MEXICALI, B.C., MÉXICO

GENOTYPE-ENVIRONMENT INTERACTION TO THE YIELD STABILITY IN WHEAT IN MEXICALI, B.C., MÉXICO REGION

Rosario Esmeralda Rodríguez González¹; Juan Francisco Ponce Medina¹; Edgar Omar Rueda Puente²; Leonel Avendaño Reyes¹; Jesús Santillano Cazares¹ y Manuel Cruz Villegas¹

¹ Instituto de Ciencias Agrícolas Carretera a Delta s/n 21705 Ejido Nuevo León, Baja California, México.

² Departamento de Administración Agropecuaria, Universidad de Sonora. Carretera Internacional y Avenida 16 de septiembre s/n. C.P. 84600, Santa Ana, Sonora, México.

*Autor de correspondencia (erueda04@santana.uson.mx).

RESUMEN

Con la finalidad de evaluar la estabilidad del rendimiento de variedades comerciales de trigo Cachanilla F-2000 (C), Yécora F-70 (Y) y Triguenio F-00 (TR), en el Valle de Mexicali, Baja California, bajo cuatro ambientes de prueba, usando el modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa (AMMI), se desarrollaron ensayos en el período 2007-2008, bajo un diseño experimental de bloques al azar con cuatro (4) repeticiones. Los resultados encontrados en el análisis de la interacción Genotipo X Ambiente resultó altamente significativa ($P < 0.01$) para las variables de estudio. En la comparación de medias, para el rendimiento de grano y peso hectolítrico no se encontraron diferencias entre los genotipos (C) con respecto a (Y) y (TR), ni entre los genotipos (Y) y (TR). En el rendimiento de paja y panza blanca, el genotipo (C) tuvo mayor rendimiento y porcentaje de panza blanca con respecto a (Y) y (TR). El índice de cosecha fue menor en el genotipo (C) (0.45) con respecto a (Y) y (TR) (0.47 y 0.48 respectivamente). El genotipo (TR) presentó mayor porcentaje de proteína en grano y fuerza de gluten (12.5% y 436.8×10^{-4} J) con respecto a (Y) y (C). El modelo AMMI fue una herramienta útil para identificar variedades de alto rendimiento de trigo. Sin embargo, no todas las variables de rendimiento de grano, sus componentes y fuerza de gluten pueden ser evaluadas con el mismo modelo.

SUMMARY

With the finality to evaluate yield stability of varieties of wheat Cachanilla F-2000 (C), Yécora F-70 (Y) and Triguenio F-00 (TR), in El Valle de Mexicali, Baja California, under four environments of test, using the additive main effects and multiplicative interaction model (AMMI), was developed trials during the period from 2007 to 2008, with an experimental random block design with four (4) replicates. The results showed that the analysis of genotype x environment interaction was highly significant ($P < 0.01$) for the study variables. In the comparison of means, for grain yield and test weight were no differences between genotypes (C) with respect to (Y) and (TR), or between genotypes (Y) and (TR). Performance of straw and white belly, genotype (C) had greater percentage of white belly and over (Y) and (TR). The harvest index was lower in the genotype (C) (0.45) with respect to (Y) and (TR) (0.47 and 0.48 respectively). The genotype (TR) had a higher percentage of grain protein and gluten strength (12.5% and 436.8×10^{-4} J) with respect to (Y) and (C). The AMMI model was a useful tool to identify high-yielding varieties of wheat. However, not all variables grain yield, its components and gluten strength can be evaluated with the same model.

Palabras Clave: Zea mays L.; Interacción G x A; modelos multiplicativos; AMMI; trigo; estabilidad.

Key Words: Zea mays L.; G x E interaction; multiplicative models; AMMI; wheat; stability.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* y *T. durum* L.) es uno de los principales cultivos a nivel mundial, ya que se estimó una producción, en los años 2008 y 2009, de 683 millones de toneladas (Canimolt, 2008). La producción de trigo en México en el año 2008 fue de 3.3 millones de toneladas, de las cuales 1.9 millones fueron trigos cristalinos y 1.4 millones destinados para la panificación (INFORURAL, 2008). Este cultivo es uno de los principales granos para la alimentación mexicana, pues con él se elaboran varios productos de consumo masivo como panes, tortillas, pastas, galletas, atoles, papillas, obleas y pasteles. De igual forma, este cultivo es uno de los principales en la temporada otoño –invierno en el noroeste de México y forma parte de la cultura agrícola de los estados de Sinaloa, Sonora y Baja California. En este último, el Valle de Mexicali representa la zona de mayor producción, ya que en los últimos diez años, la superficie promedio sembrada en este Valle ha sido de 80,000 ha/año, con una producción superior a las 500 mil toneladas y un rendimiento medio de 6.2 ton ha⁻¹, beneficiando a más de 2000 productores y sus familias. En el año 2008, el estado de Baja California generó una producción de 532,450 ton (Pronespere, 2008).

La mayoría de los procesos de selección de germoplasma para la liberación comercial de semillas involucran generalmente varias variables productivas, sin embargo, en México estos procesos solo han enfatizado en el rendimiento de grano (González *et al.*, 2007; Lozano del Río *et al.*, 2009). En la mecánica de estos procesos, las semillas son sometidas a pruebas ricas en nutrientes y ambientes muy específicos. Sin embargo, cuando las semillas son liberadas, estas se siembran bajo diferentes condiciones de manejo como densidad y fecha siembra, fertilización, control de plagas, tipos de suelo, pH, duración de horas luz (fotoperiodo), temperatura, etc. Esto hace que al sembrarse en ambientes diferentes, su rendimiento varíe, lo cual se define como interacción genotipo x ambiente o estabilidad fenotípica. La estabilidad fenotípica del rendimiento ha tenido varias interpretaciones, siendo dos de ellas la biológica y la agronómica. La biológica es cuando el genotipo presenta mínima variación a través de los ambientes, mostrando un rendimiento constante en cualquier condición de producción. La agronómica es cuando existe una mínima interacción genotipo x ambiente, lo cual está asociado a la pretensión de obtener un incremento del rendimiento en respuestas para su evaluación, con una amplia variedad de condiciones para la obtención de genotipos estables (Becker, 1981).

En este sentido, para evaluar el comportamiento agronómico de los cultivares, generados de los programas de mejoramiento genético de cualquier rubro agrícola, es necesario medir la estabilidad relativa de los genotipos sometidos a la totalidad de los ambientes predominantes en una región potencial de adaptación. Las etapas finales de estos programas incluyen experimentos de evaluación en diferentes localidades durante varios años.

La ocurrencia a menudo de interacción genotipo ambiente (G x A) en este tipo de ensayos exige la realización de estudios adicionales con el propósito de precisar la selección de individuos con adaptabilidad general y específica. La interacción G x A es frecuentemente descrita como la inconsistencia del comportamiento entre genotipos desde un ambiente a otro, y cuando ésta ocurre en gran proporción reduce el progreso genético de la selección (Yang y Baker, 1991; Magari y Kang, 1993). Varios procedimientos estadísticos han sido usados para el análisis de la interacción G x A, incluyendo métodos univariados y multivariados (Hill, 1975; Lin *et al.*, 1986; Wescott, 1986; Crossa *et al.*, 1990; Flores *et al.*, 1998; Rea y De Sousa, 2002). Entre las diversas técnicas disponibles para realizar este tipo de estudios se ha elegido el método AMMI (Efectos principales aditivos e interacción multiplicativa) propuesto por Zobel *et al.* (1988); Gauch y Zobel (1988 y 1996). Hasta el presente, el método ha sido utilizado en muchos cultivos como oleaginosas, entre otros (Crossa *et al.*, 1990; Van Eeuwijk, 1995; Marín, 1995; Annicchiarico, 1997; Aulicinio *et al.*, 2000; Medina *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2004).

El método AMMI no sólo permite estimar estabilidad, sino, también evaluar localidades y como consecuencia clasificar los ambientes (Crossa *et al.*, 1990). El procedimiento AMMI consiste en combinar las técnicas del análisis de varianza y el análisis de componentes principales (CP) en un solo modelo, donde el análisis de varianza permite estudiar los efectos principales de los genotipos y ambientes y los análisis de CP la interacción G x A la cual es tratada de forma multivariada para su interpretación. Este modelo ha demostrado ser más eficiente que otras técnicas tradicionales de análisis donde es imprescindible discernir en detalle sobre las características de la interacción G x A (Kempton, 1984; Zobel *et al.*, 1988; Nachit *et al.*, 1992; Yan, 1995; Yan *et al.*, 2000).

Con base a lo anterior descrito y considerando que no existe información de investigación en variedades de trigo relacionada con rendimiento, sus componentes y la calidad harinera en estos sistemas de rotación hortalizas-trigo con regímenes de fertilidad residual y fertilización comercial, se realizó esta investigación con el objeto de evaluar la estabilidad de rendimiento de variedades comerciales de trigo Cachanilla F-2000, Yécora F-70 y Triguenio F-00, en Valle de Mexicali, Baja California, bajo cuatro ambientes de prueba, determinando la magnitud y naturaleza de la interacción G x A. y evaluando la estabilidad la estabilidad del

rendimiento, usando el modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa (AMMI), en el periodo 2007-2008.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de las localidades de los experimentos

Los experimentos se realizaron durante dos años consecutivos, en el ciclo otoño-invierno del año 2007-08, en terrenos de un agricultor cooperante del Ejido Mezquital que se localiza en el Valle de Mexicali, Baja California, México, a una latitud norte de $32^{\circ}24'40''$ y $115^{\circ}11'46''$ de longitud oeste. El clima es de tipo desértico y en verano se caracteriza por ser cálido, muy seco, con temperaturas promedio máximas y mínimas de 43 y 16 °C, respectivamente. La precipitación pluvial promedio anual es de 85 mm (García *et al.*, 1985).

Arreglo de tratamientos y diseño experimental

Los tratamientos del presente experimento fueron el uso de la fertilidad residual proveniente de un cultivo anterior (cebollín), y el otro fue la utilización de la fertilidad residual más fertilización comercial. La fertilidad residual más fertilización comercial fue ajustada de acuerdo a las recomendaciones para este cultivo de acuerdo a las recomendaciones para el valle de Mexicali (INIFAP, 2008). En ambos tratamientos se sembraron las tres variedades de trigo de gluten fuerte: Yécora F-70(Y), Cachanilla F-2000 (C) y Triguenio F-00 (TR).

La siembra se hizo en surcos con una densidad de (40 kg ha⁻¹) en cada año. El diseño experimental fue bloques completos al azar y cuatro repeticiones. El factor de bloqueo fue la heterogeneidad del suelo.

En los ciclos 2007-08 y 2008-09 previo a la siembra, se realizaron análisis de suelos en cada una de las 24 parcelas. Las muestras se obtuvieron a una profundidad de 30 cm de tres puntos de cada parcela, se obtuvo un promedio por parcela y éstos se utilizaron para obtener un promedio general del área del experimento 1. Se obtuvo un promedio de 147 kg de N ha⁻¹ y 27 kg de P₂O ha⁻¹. Estos valores se consideraron como fertilidad residual (FR).

La FR consistió en la no adición de fertilizante N y 29 kg de P₂O ha⁻¹ durante el periodo de desarrollo del cultivo, mientras que la FR+FC consistió en la adición de 185 kg de N ha⁻¹ y de 29 kg de P₂O ha⁻¹. Así, el tratamiento de FR tuvo una fertilización de 147-56-00, N, P y K, respectivamente, mientras que el tratamiento FR+FC tuvo una fertilización de 332-56-00, N, P y K, respectivamente.

La fuente de P₂O utilizada fue ácido fosfórico y se aplicó en el primer riego de auxilio, 45 días después de la siembra y primer riego de germinación en subfase Z 2.6 (Zadoks *et al.*, 1974). La fuente de N utilizada fue UAN-32 y fue fraccionada en cinco aplicaciones, comenzando con el primer riego de auxilio y terminando con el quinto riego de planta, cuando el trigo ya se encontraba en etapa de llenado de grano ó sub fase Z 7.1 (Zadoks *et al.*, 1974). En total se aplicaron seis riegos de auxilio, además del primero de germinación.

El 25 de Febrero se realizaron operaciones de control de malezas utilizando una mezcla de los productos comerciales "Axial" (2,2-ácido dimetil-propanoico 8-(2,6 dietil-4metilfenil)-1,2,4,5-tetrahidro-7-oxo-7H-pirazolo [1,2-d] [1,4,5] oxadiazepin-9-il ester (CA), "Adigor" (coadyuvante A12127R), "Amber" (Triasulfuron al 75.0%) y "Buffex", regulador del pH y dureza del agua a base de ácidos orgánicos en 42% y sales de ácidos orgánicos poli carboxílicos en 45%. No se realizó ninguna aplicación para el control de plagas o de enfermedades.

VARIABLES EVALUADAS

Las variables evaluadas fueron: Rendimiento de grano (RG) en Kg ha⁻¹ y sus componentes: Rendimiento de paja (RP) en Kg ha⁻¹, Panza blanca (PB), Peso hectolítrico (PH) en Kg hL⁻¹, (5) Índice de cosecha (IC), (6) Proteína en grano (PG) en %, y calidad harinera: Fuerza de gluten (W) y $W = R \times 10^{-4} J$, donde R= Valor cuantitativo y J= Joules, y , para los cuatro ambientes: Ambiente 1: fertilidad residual-2007 (FR), Ambiente 2: fertilidad residual+ fertilización comercial -2007(FR+FC) , Ambiente 3: fertilidad residual-2008 (FR) , Ambiente 4: Fertilidad residual+ Fertilización comercial -2008 (FR+FC).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se realizaron análisis de varianza de bloques completos al azar para estudiar el efecto de la interacción para las diferentes variables agronómicas (Cuadro 1), adicionalmente se corrieron contrastes ortogonales para evaluar posibles diferencias entre los genotipos para las variables: rendimiento de grano, sus componentes (panza blanca, peso hectolítrico, índice de cosecha, rendimiento de paja) y calidad harinera (Fuerza de gluten): contraste 1a: (C vs Y+TR) y el contraste 1b: (Y vs TR) para el rendimiento del grano, panza blanca, peso hectolítrico, índice de cosecha, rendimiento de paja, respectivamente. El contraste 2a: (YR vs C+Y) y el contraste 2b: (C vs Y) para proteína en grano, fuerza de gluten en los dos años y con los tratamientos con FR y FR+FC. Estos análisis se realizaron con un nivel de significancia de 0.05 utilizando el programa SAS (SAS, 2000).

Análisis estadísticos para evaluar parámetros de estabilidad

Para los análisis de estabilidad fenotípica se utilizó el Modelo de efectos principales aditivos e interacción multiplicativa (Modelo AMMI), el cual explica inicialmente los efectos principales de genotipos y ambientes mediante un análisis de varianza convencional y posteriormente describe la parte no aditiva correspondiente a la interacción genotipo x ambiente por medio de un análisis multivariado de componentes principales (CPI, CP2, CPn) (Crossa, 1990). A partir del primer componente principal y el resto de los componentes, en caso de representar un porcentaje aceptable de la interacción (60%), es posible generar un figura (biplot) con el programa infogen y representar las similitudes de genotipos o de ambientes.

El modelo AMMI está representado por la ecuación (Zobel *et al.*, 1998)

$$Y_{ij} = \mu + G_i + a_j + \sum_{k=1}^k \lambda_k \alpha_{ik} \gamma_{jk} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = es el rendimiento del i-ésimo genotipo en el j-ésimo ambiente

Los parámetros aditivos son: μ = media general; G_i = Efecto del i-ésimo genotipo; a_j = Efecto del j-ésimo ambiente; λ_k = Valor propio del componente principal K; $\alpha_{ik} \gamma_{jk}$ = Valor del componente principal k de genotipo y localidad

ε_{ij} = Error experimental

Para la representación gráfica del CPI en función de un variable se utilizaron las siguientes abreviaciones: (C)= Genotipo Cachanilla F-2000, (Y)= Genotipo Yécora F-70, (TR)= Genotipo Triguénio F-00, A= Fertilidad residual- 2007, B= Fertilidad residual+ Fertilización comercial-2007, C= Fertilidad residual -2008 y D= Fertilidad residual+ Fertilización comercial -2008.

RESULTADOS Y DISCUSION

Análisis de varianza combinado

La Interacción genotipo x Ambiente (IGA), resultó altamente significativa ($P < 0.01$) para las variables rendimiento de grano, sus componentes y calidad harinera, las cuales fueron evaluadas en cuatro ambientes de prueba durante dos años. Estos resultados demuestran que los genotipos tienen un comportamiento desigual en los diferentes ambientes probados (Cuadro 1). López *et al.* (2001) evaluaron la adaptación y rendimiento de 15 líneas avanzadas de frijol negro, así como un testigo local en 11 localidades bajo condiciones de riego, temporal y humedad residual, obteniendo diferencias entre las líneas estudiadas, localidades y para la interacción línea por localidad. Estos mismos resultados concuerdan con lo obtenido por Gleenys *et al.* (2006), quienes estudiaron la IGA en 16 híbridos experimentales de maíz de grano blanco, en varios ambientes del estado Yaracuy, Venezuela, en el período 2000-2001, logrando detectar diferencias para los efectos principales de genotipos y ambientes, así como en la IGA. Asimismo, Balbuena *et al.* (2008) estudiaron 20 genotipos de Maíz y Trigo para identificar los sobresalientes en rendimiento de grano y componentes de rendimiento en cuatro ambientes del valle de México, donde la IGA fue significativa para el rendimiento del grano. Estos mismo resultados coinciden con los obtenidos por Zepeda *et al.* (2009), quienes evaluaron 8 híbridos de maíz adaptados a la región de Valles Altos Centrales de México, y sus características físicas, estructurales y calidad del nixtamal-tortilla del grano obteniendo que la IGA fue significativa para la mayoría de las variables, pero para el rendimiento de tortilla fría un híbrido respondió diferente a los ambientes debido a sus características genéticas particulares y por su respuesta en cada año agrícola. Estos mismos autores también observaron significancia en la IGA al evaluar el índice de floración del grano en 10 genotipos de maíz en dos ambientes.

Comparación de medias entre genotipos

Rendimiento de grano. No se encontraron diferencias ($P > 0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (T) (7721.9, 7600, 7251.3 Kg ha⁻¹ respectivamente), ni entre los genotipos (Y) y (TR) ($P > 0.05$) (Cuadro 2). Estos mismo resultados concuerdan con los obtenidos por Syed *et al.* (2007), quienes evaluaron el análisis de estabilidad del trigo en pre y post anthesis bajo condiciones de estrés hídrico, los resultados indican que no se encontraron diferencias significativas entre el genotipo Rawal-87 y Potohar-93.

Rendimiento de paja. Se encontraron diferencias entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR) ($P < 0.05$), mientras que entre el genotipo (Y) y (TR) no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$; Cuadro

2). Estos resultados se deben principalmente a que el genotipo (C) es un genotipo de porte alto, es decir, presentó el rendimiento promedio más alto de $9848.5 \text{ Kg ha}^{-1}$, en el caso de (Y) es un genotipo clasificado como triple enano (tres genes para enanismo) y presentó un rendimiento promedio menor de $8624.8 \text{ Kg ha}^{-1}$, siendo similar a (TR) (Cuadro 5).

Panza blanca. Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR), mientras que entre el genotipo (Y) y (TR) no se encontraron diferencias ($P > 0.05$) (Cuadro 2). La media más alta de panza blanca fue observada en el genotipo (C), mientras que en (Y) y (TR) fue similar ($P > 0.05$) (2.31, 0.85 y 0.82 % respectivamente), lo que se puede atribuir a que el genotipo (C) tuvo también un mayor rendimiento de grano que los demás genotipos, por lo que tiene mayores necesidades de absorción de nitrógeno por su porte alto y, por ende, contiene menor contenido de proteína que (Y) y (TR) (11.4, 12.1 y 12.5% respectivamente). Se ha demostrado que el carácter de panza blanca está fuertemente asociado con una disminución del contenido de proteína en el grano (Robinson *et al.*, 1977; Solís *et al.*, 2001). También se reconoce que su expresión es debido a factores genético-ambientales (Sivori, 1980; Valenzuela, 1990).

Por otro lado, Sivori (1980) indica que si el tiempo de maduración de la semilla se prolonga más allá de lo normal por efecto de bajas temperaturas y alta humedad relativa, la planta no asimila suficiente nitrógeno, lo que eleva el contenido de hidratos de carbono y disminuye la proteína.

Peso hectolítrico. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR), ni tampoco entre (Y) y (TR) (Cuadro 2). El genotipo (C) presentó media similares a (Y) y (TR), siendo de 80, 80, 79 Kg hL^{-1} respectivamente, lo que significa que los genotipos tienen la capacidad de absorber la misma cantidad de agua para el llenado del grano. Valenzuela y Martínez (1992) encontraron un alto grado de asociación entre el peso de 1000 semillas y el peso hectolítrico, así también, observaron que el endospermo aumenta conforme aumenta el peso hectolítrico en diferentes fechas de siembra. Estos mismos autores encontraron que la disminución, se debe a las temperaturas máximas (32°C) que se presentan durante el periodo de floración-madurez fisiológica, lo cual repercute en el tamaño y peso de la semilla. Por consiguiente ellos recomiendan que la mejor época de siembra para producir semilla en donde la calidad sea menos afectada es durante el mes de diciembre. Es decir, las temperaturas de estas épocas otoño- invierno muestran condiciones más favorables para el desarrollo de las variedades de esta región.

Índice de cosecha. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el genotipo (C) con respecto a (Y) y (TR), mientras que entre genotipo (Y) y (TR) no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 2). Estos resultados se deben principalmente a que el genotipo (C) es de porte alto, es decir, tiene mayor rendimiento de paja ($9848.5 \text{ Kg ha}^{-1}$) y mayor rendimiento de grano ($7721.9 \text{ Kg ha}^{-1}$) con un índice de cosecha de 0.45. Se ha observado que las plantas de trigo desarrollan una estructura de hojas y tallos muy grande en relación al rendimiento de grano y que hay un desequilibrio entre el período de crecimiento vegetativo y el de madurez de los granos (Singh y Stoskopf, 1971). Caso contrario para el genotipo (Y) que es clasificado como triple enano (tres genes para enanismo), su porte es pequeño, es decir, presenta menor media de rendimiento de paja respecto a (C), $8624.8 \text{ Kg ha}^{-1}$, y con índice de cosecha de 0.47, no obstante tiene un comportamiento similar con (TR) con índice de cosecha de 0.48. Los índices de cosecha con valores mayores a 0.5 indican una mayor eficiencia de absorción de nitrógeno para el rendimiento de grano, lo que se debe principalmente a que las plantas tienen una mayor capacidad fotosintetizadora, con una mayor distribución de la asimilación en los granos y una menor en la paja (hojas y tallos) (Barriga, 1974). Los índices de cosecha menores a 0.5 indican mayores necesidades de nitrógeno para el rendimiento de grano. Syme (1970 y 1972) encontró una alta correlación entre el índice de cosecha y peso seco del grano (rendimiento).

Proteína en grano. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$), entre el genotipo (TR) con respecto a (C) y (Y), y entre el genotipo (C) con respecto a (Y) (Cuadro 2). La variedad (TR) presenta mayor porcentaje de proteína con respecto a (C) y (Y) (12.5, 11.4, 12.1 % respectivamente). En relación a esta variable, Kramer (1979) define que la variación en el contenido de proteína no solo se debe al genotipo, también a la influencia ambiental (fertilización nitrogenada, densidad de siembra, método de siembra, entre otros).

Fuerza de gluten. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el genotipo (TR) con respecto a (C) y (Y), mientras que entre el genotipo (C) con respecto a (Y) no encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 2). Esto resultados indican que el genotipo (C) presentó menor fuerza de gluten que (Y) y (TR) ($338.8, 367.8$ y $436.8 \times 10^{-4} \text{ J}$ respectivamente), y con un porcentaje de proteína de 11.4, 12.1 y 12.5% respectivamente. Esto se debe a las variaciones en el contenido total de proteína y las variaciones del contenido de gluten, en consecuencia, por eso a mayor cantidad y calidad de proteína mayor será la fuerza del gluten, siendo un parámetro de calidad importante para la comercialización (Mohan y Martino, 1997).

Modelo AMMI para rendimiento de grano y sus componentes

Los materiales experimentales (C), (Y) y (TR) son formados en ocasiones en ambientes muy particulares, que requieren probarse bajo las diferentes condiciones de manejo que prevalecen en una región antes de ser liberados para su explotación comercial, así como la selección de aquellos que muestren un mayor potencial de rendimiento y calidad bajo esas condiciones. Es necesario demostrar la estabilidad de producción de estas variedades en diferentes ambientes de prueba. Efectos significativos para IGA justifican la continuidad del análisis para determinar su interacción en el comportamiento de las diferentes variedades a través de ambientes.

En base a lo anterior, una de las metodologías más utilizadas actualmente para medir la estabilidad es el modelo AMMI se discute a continuación.

El análisis de varianza para el modelo AMMI de las variables estudiadas se presentan en los cuadros 3 y 4, en estos se observa los resultados de la IGA, para RG el cual fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 1. En ésta, el primer componente explica el 99.33 % de la varianza total y el segundo componente mostró el 0.67%, se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente C y D donde se destaca el genotipo (Y), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran C y B con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente D y A con el genotipo (C) como el más adaptado. Así, los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variable. El genotipo más estable fue (C) en el ambiente D. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2.

Para RP, la IGA fue significativa ($P > 0.05$). Esta interacción se puede observar en el biplot de la figura 2. En ésta el primer componente representó el 70.94% de la varianza total y el segundo componente representó el 29.06%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A donde se destaca el genotipo (TR), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran C y D con el genotipo (C) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente B y D con el genotipo (Y) como el más adaptado. El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente B. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP1; (TR) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP1.

Para PB la IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se aprecian en el biplot de la figura 3. En ésta el primer componente representó el 88.3% de la varianza total y el segundo componente el 11.69%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A donde se destaca el genotipo (C), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran C y D con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente B con el genotipo (Y) como el más adaptado. Así los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variable. El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente B. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (C) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2; (TR) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP1.

Para PH la IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 4. En ésta el primer componente representó el 99.65% de la varianza total y el segundo componente representó el 0.35%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente C donde se destaca el genotipo (Y) como el más adaptado, en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (C) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente C con el genotipo (C) como el más adaptado. Así los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variable. Los genotipo más estable fue (Y) y TR en el ambiente C. Respecto a los

componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CPI, tuvieron un comportamiento similar.

Para IC la IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 5. En ésta el primer componente representó el 77.11% de la varianza total y el segundo componente representó el 22.89%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A y D donde se destaca el genotipo (C), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (TR) como el más adaptado. Los genotipo más estable fueron (Y), (C) y (TR) en el ambiente C, A y B respectivamente. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2; (TR) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP2.

Para PG la IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 6. En ésta el primer componente representó el 99.5% de la varianza total y el segundo componente representó el 0.5%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente A donde se destaca el genotipo (Y), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente C con el genotipo (C) como el más adaptado. Así los genotipos más estables son los que se encuentran más cercanos al origen, y al alejarse de éste su comportamiento es más variables. El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente A. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (Y) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CPI; (Y) y (C) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP2.

Para W la IGA fue significativo ($P < 0.05$). Estas diferencias se pueden observar en el biplot de la figura 7. En ésta el primer componente representó el 99.26% de la varianza total y el segundo componente representó el 4.73%; se diferencian cuatro sectores delimitados por líneas con círculos de color amarillo, lo que representa a un ambiente. En los vértices del polígono se ubican los genotipos con mayor interacción y éstos se muestran con círculos de color negro, por lo tanto, mayor adaptación específica a los ambientes del sector correspondiente. Así, en el sector superior se ubica el ambiente C donde se destaca el genotipo (C), en el sector izquierdo los ambientes en los que se encuentran A y B con el genotipo (TR) como el más adaptado; en el sector inferior se ubica el ambiente A con el genotipo (Y) como el más adaptado. El genotipo más estable fue (Y) en el ambiente A. Respecto a los componentes principales, se puede observar que (C) y (TR) se encuentra en posición opuesta en relación con el CP2; (Y) y (TR) tuvieron comportamiento similar con referencia a CP2.

CONCLUSIONES

La interacción Genotipo x Ambiente resultó altamente significativa para las variables rendimiento de grano, sus componentes y calidad harinera evaluadas en cuatro ambientes. En el rendimiento de grano y peso hectolítrico no se encontraron diferencias entre los genotipos (C) con respecto a (Y) y (TR) (7721.9, 7600, 7251.3 Kg ha⁻¹ y 80, 80, 79 Kg hL¹, respectivamente), ni entre los genotipos (Y) y (TR). En el rendimiento de paja y panza blanca, el genotipo (C) tuvo mayor rendimiento y porcentaje de panza blanca (9848.5 Kg ha⁻¹ y 2.31%, respectivamente) con respecto a (Y) y (TR), mientras que los genotipos (Y) y (TR) fueron similares (8624.8 Kg ha⁻¹ y 0.85%; 8463.8 Kg ha⁻¹ y 0.82%, respectivamente). El índice de cosecha fue menor en el genotipo (C) (0.45) con respecto a (Y) y (TR), mientras que los genotipos (Y) y (TR) fueron similares para esta variable (0.4, 0.48, respectivamente). El genotipo (TR) presentó mayor porcentaje de proteína en grano y fuerza de gluten (12.5% y 436.8 x 10⁻⁴ J) con respecto a (Y) y (C). Además, (Y) fue mayor a (C) (12.1% y 367.8 x 10⁻⁴ J; 11.4% y 338.8 x 10⁻⁴ J, respectivamente). Con el modelo de AMMI, los genotipos (C), (Y) y (TR) no resultó ser más efectivo para caracterizar la respuesta de los genotipos. No todas las variables de rendimiento de grano, sus componentes y fuerza de gluten pudieron ser evaluadas con el mismo modelo. Por lo tanto, en base a estas diferencias es necesario evaluar otros modelos que proporcionen mayor información tales como la metodología de la varianza de estabilidad de Shukla, Lin y Binns, regresión de Finlay y Wilkinson, índices de Eskridge, entre otros.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por brindarme la oportunidad mediante el otorgamiento de una beca para la realización de los estudios de doctorado. Al Instituto de Ciencias Agrícolas, por brindar la oportunidad de apoyar los estudios y brindar recursos humanos con excelencia académica. Al Ph. D. Mike Giroux. por la oportunidad para realizar una estancia de investigación en Plant Science Department of Montana State University.

Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis combinado para trigos de gluten fuerte evaluados en cuatro ambientes para rendimiento, sus componentes y calidad harinera.

Fuente	RG Kg ha⁻¹	RP Kg ha⁻¹	PB (X+1)^{1/2}	PH Kg hL⁻¹	IC	PG (X)^{1/2}	W Joules
Genotipo x Ambiente	26327329.4*	6699574.7*	4.84**	1119.6**	0.008357*	0.0552**	10969.3**
CV (%)	11.13	7.91	50.85	16.17	7.73	1.58	9.07
R²	0.92	0.98	0.75	0.74	0.68	0.86	0.78

*Significativo (P= 0.01); **Altamente significativo (P= 0.0001); C.V.=Coeficiente de variación; R²=Coeficiente de determinación; RG=Rendimiento de grano; RP=Rendimiento de paja; PB= Panza blanca; PH= Peso hectolítrico; IC= Índice de cosecha; PG= Proteína en grano; W=Fuerza de gluten.

Cuadro 2. Comparación de medias para rendimiento de grano, sus componentes y calidad en tres genotipos de trigo de gluten fuerte durante los años 2007 y 2008.

Variables de estudio	Genotipos			Contrastes y valor de P		
	(C)	(Y)	(TR)	(C) vs (Y)+(TR)	(Y) vs (TR)	DE
RG	7721.9	7600.0	7251.3	0.25	0.25	837.64
RP	9848.5	9848.5	9848.5	<0.01	0.53	711.07
PB	2.31	0.85	0.82	0.05	0.96	0.77
PH	80	80	79	0.58	0.34	0.37
IC	0.45	0.47	0.48	0.04	0.91	0.036
PG	11.4	12.11	12.5	<0.01	<0.01	0.05
W	338.8	367.8	436.8	0.87	<0.01	34.56

(C)= Cachanilla F-2000; (Y)= Yécora F-70; (TR)= Triguenio F-00; RG=Rendimiento de grano Kg ha⁻¹; DE= Desviación estándar
 RP= Rendimiento de paja Kg ha⁻¹; PB= Panza blanca (%); PH= Peso hectolítrico Kg hL⁻¹; IC= índice de cosecha; PG= Proteína en grano
 (%); W= Fuerza de gluten x 10⁻⁴ J; Contrastes: (C) vs (Y)+(TR)= Cachanilla F-2000 contra Yécora F-70+ Triguenio F-00; (Y) vs (TR)=
 Yécora F-70 contra Triguenio-F00.

Cuadro 3. Análisis de varianza AMMI en trigos de gluten fuerte bajo fertilidad residual y complementaria durante los ciclos 2007 y 2008.

Fuente	gl	Proteína en grano			Rendimiento de paja Kg ha ⁻¹			Peso hectolítrico Kg hL ⁻¹			Rendimiento en grano %		
		SC	CM	%	SC	CM	%	SC	CM	%	SC	CM	%
Modelo	23	0.6514	0.0283**	—	738942608.91	32127939.51	—	13659.10	593.87*	—	297703264.58	12943620.19**	—
Repeticiones	12	0.0441	0.037 ^{ns}	—	1989406.49	165783.88	—	1343.92	111.99 ^{ns}	—	9847891.67	820657.64 ^{ns}	—
Ambientes (A)	3	0.778	0.0259**	—	710383691.41	236794563.81**	—	3532.06	1177.35**	—	277384539.58	92461513**	—
Variedad (G)	2	0.1930	0.0965**	—	18314340.042	9157170.02**	—	2199.09	1099.55*	—	167879.17	83939.58 ^{ns}	—
G X A	6	0.3364	0.0561**	—	8255170.95	1375861.82	—	6584.03	1097.34**	—	10302954.17	1717159.03*	—
Error	24	0.0650	0.0027	—	14812193	617174.71	—	3355.21	139.80	—	10280033.33	678334.72	—
Total	47	0.7174			753754801.91			17014.31			313983297.92		
Términos AMMI													
G X A	6	0.3364	0.0561**	—	8255170.95	1375861.82 ^{ns}	—	6584.03	1097.34**	—	10302954.17	1717159.03*	—
CP1	4	0.3349	0.0837**	99.5	5856191.94	1464047.99*	70.94	6561	1640.25**	99.65	10204035.90	255100897*	99.03
CP2	2	0.00156	0.00778	0.5	2398979.02	1199489.5 ^{ns}	29.06	23.03	11.25 ^{ns}	0.35	98918.27	49459.13 ^{ns}	0.97

SM, gl, CM, %, CP1, CP2 =Suma de cuadrados, Grados de libertad, Cuadrados medios, Porcentaje: Componente principal 1, Componente principal 2, respectivamente. *Significativo (P= 0.01), **Altamente significativo (P= 0.0001), ns=no significativa

Cuadro 4. Análisis de varianza AMMI en trigos de gluten fuerte bajo fertilidad residual y complementaria durante los ciclos 2007 y 2008.

Fuente	gl	Panza Blanca			Índice de cosecha			Fuerza de gluten Joules		
		SC	CM	%	SC	CM	%	SC	CM	%
Modelo	23	72.54	3.15*	–	0.1026	0.0044*	–	150225.00	6531.52*	–
Repeticiones	12	19.7053	1.6421**	–	0.01072	0.0009 ^{ns}	–	29562.83	2463.57*	–
Ambientes (A)	3	45.2398	15.6421**	–	0.0649	0.0217**	–	16062.50	5354.17*	–
Variedad (G)	2	2.2562	1.1281*	–	0.0055	0.0027 ^{ns}	–	55893.04	27946.52**	–
G X A	6	4.6161	0.7693*	–	0.0214	0.0036*	–	48706.63	8117.77*	–
Error	24	4.11	0.178	–	0.0334	0.0013	–	25459.67	1060.82*	–
Total	47	76.65			0.1361			175684.67		
G X A	6	4.6161	0.7693*	–	0.0214	0.0036*	–	48706.63	8117.77	–
CP1	4	4.0522	1.0131 ^{ns}	88.31	0.0165	0.0041*	77.11	46399.29	11599.82	95.26*
CP2	2	0.5362	0.2681 ^{ns}	11.69	0.0049	0.0024 ^{ns}	22.89	2307.33	1153.67	4.74

SM, gl, CM, %, ACP1, ACP2 =Suma de cuadrados, Grados de libertad, Cuadrados medios, Porcentaje de Componente principal 1, Componente principal 2, respectivamente.*Significativo (P= 0.01),

**Altamente significativo (P= 0.0001), ns=no significativa

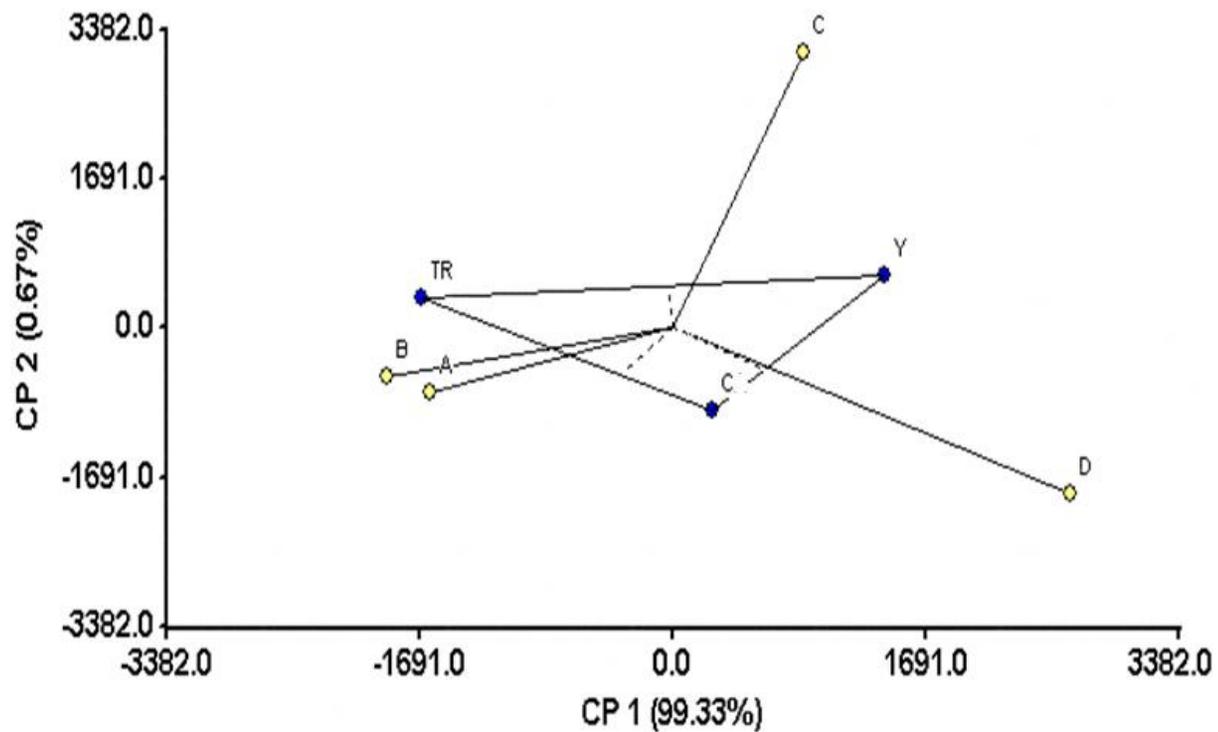


Figura 1. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de rendimiento de grano evaluados en cuatro ambientes.

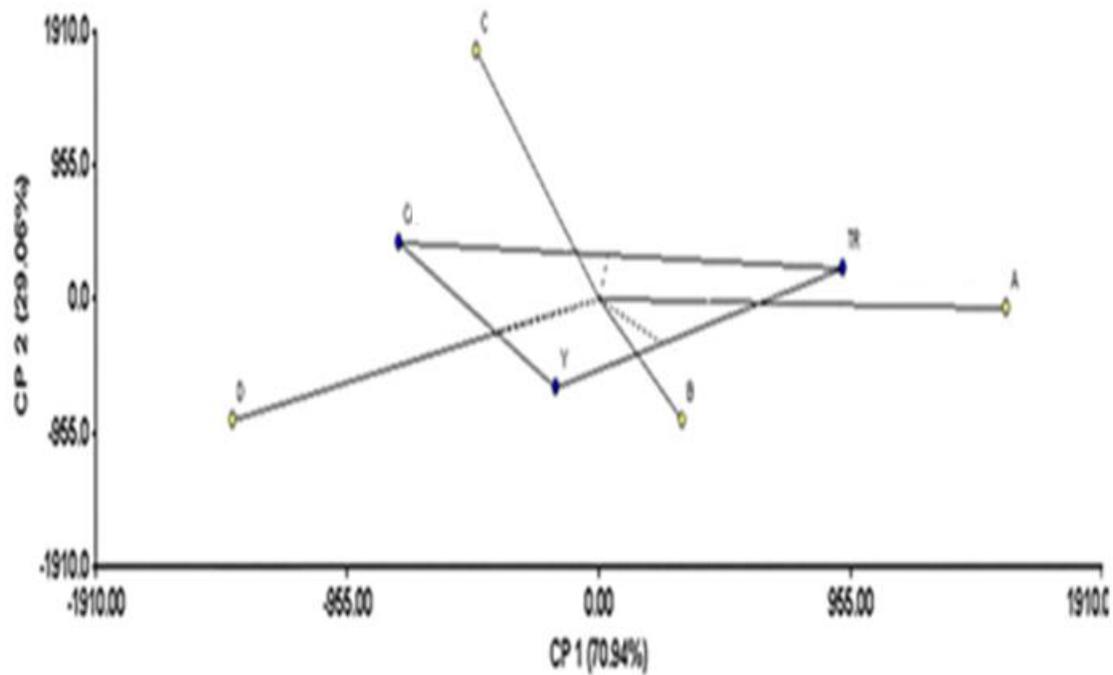


Figura 2. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de rendimiento de paja evaluados en cuatro ambientes.

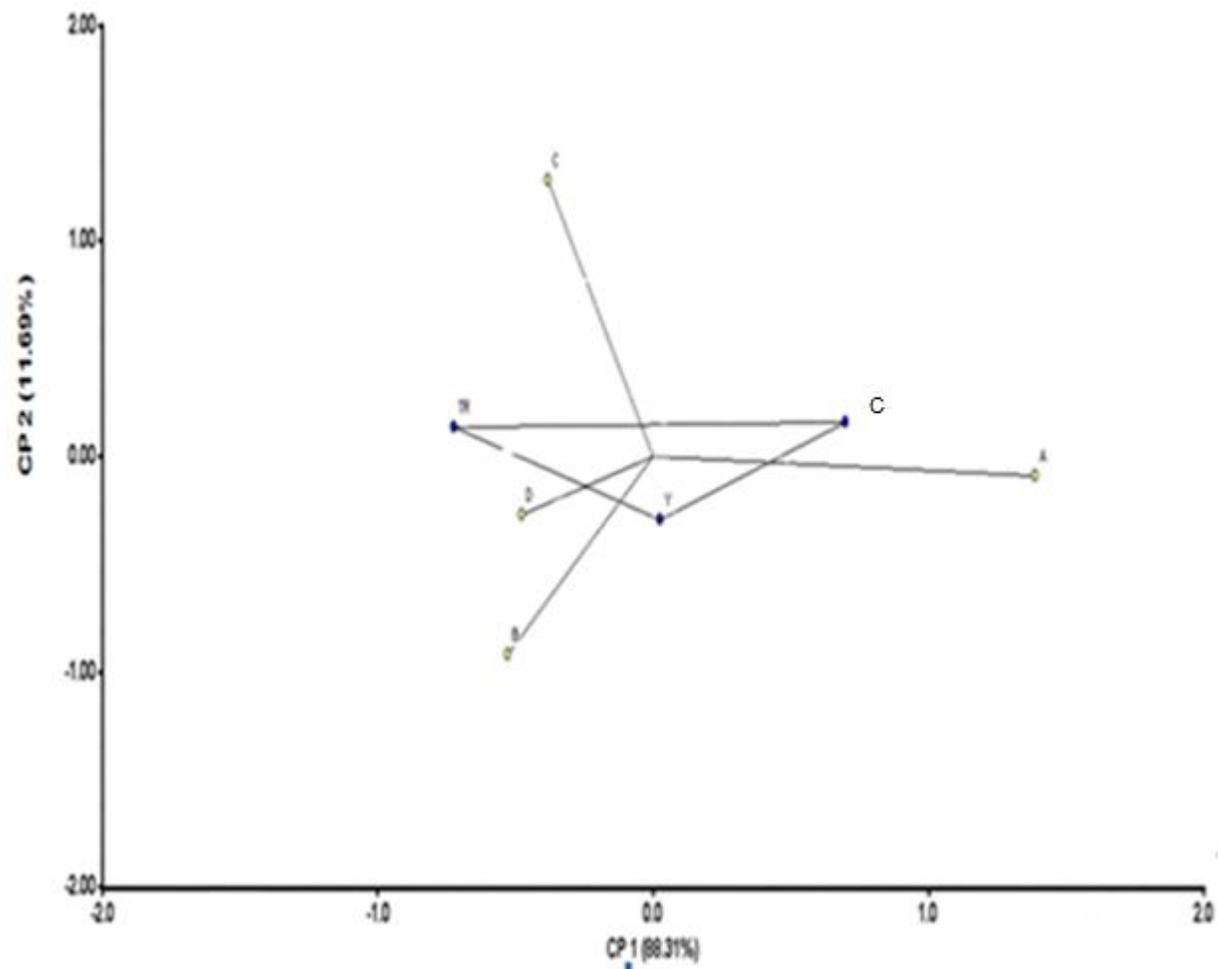


Figura 6. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de panza blanca evaluados en cuatro ambientes.

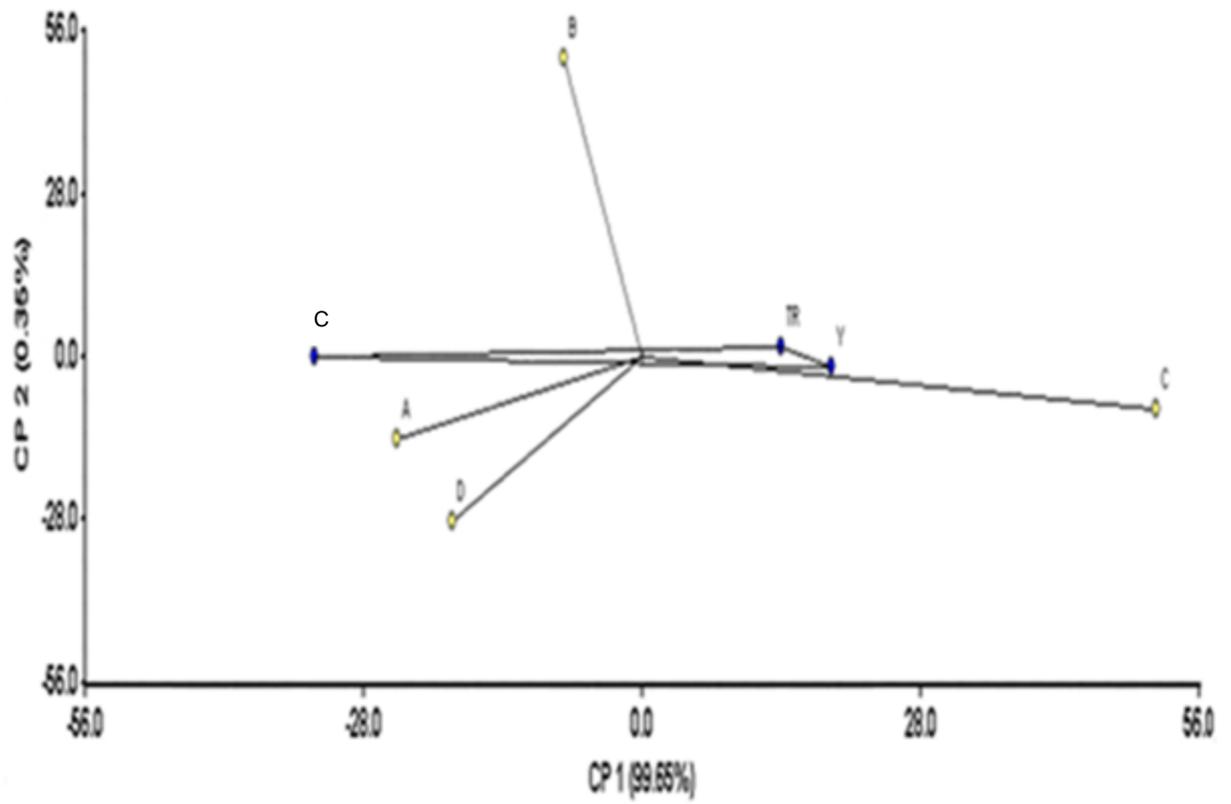


Figura 4. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de peso hectolítrico evaluados en cuatro ambientes.

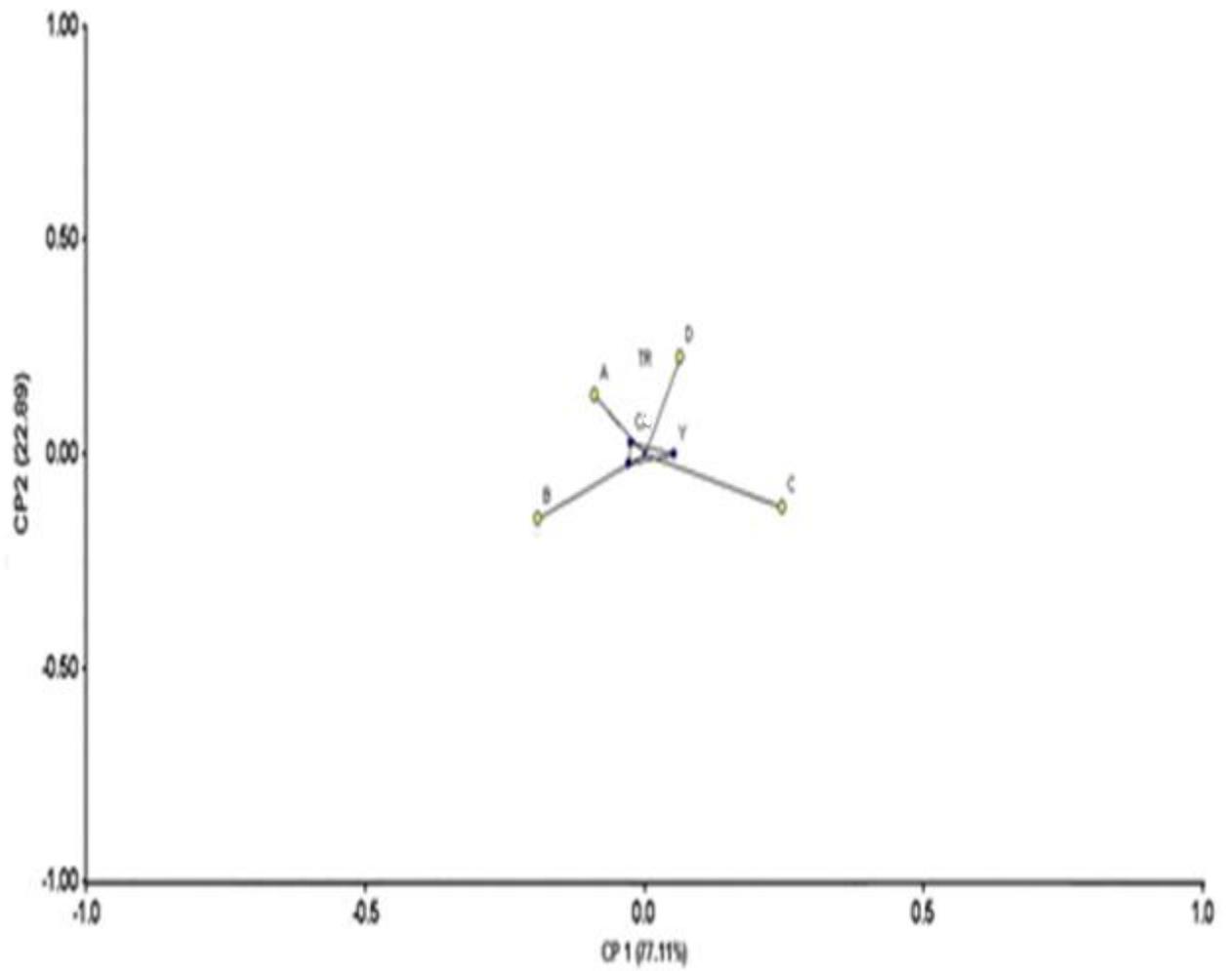


Figura 5. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de índice de cosecha evaluados en cuatro ambientes.

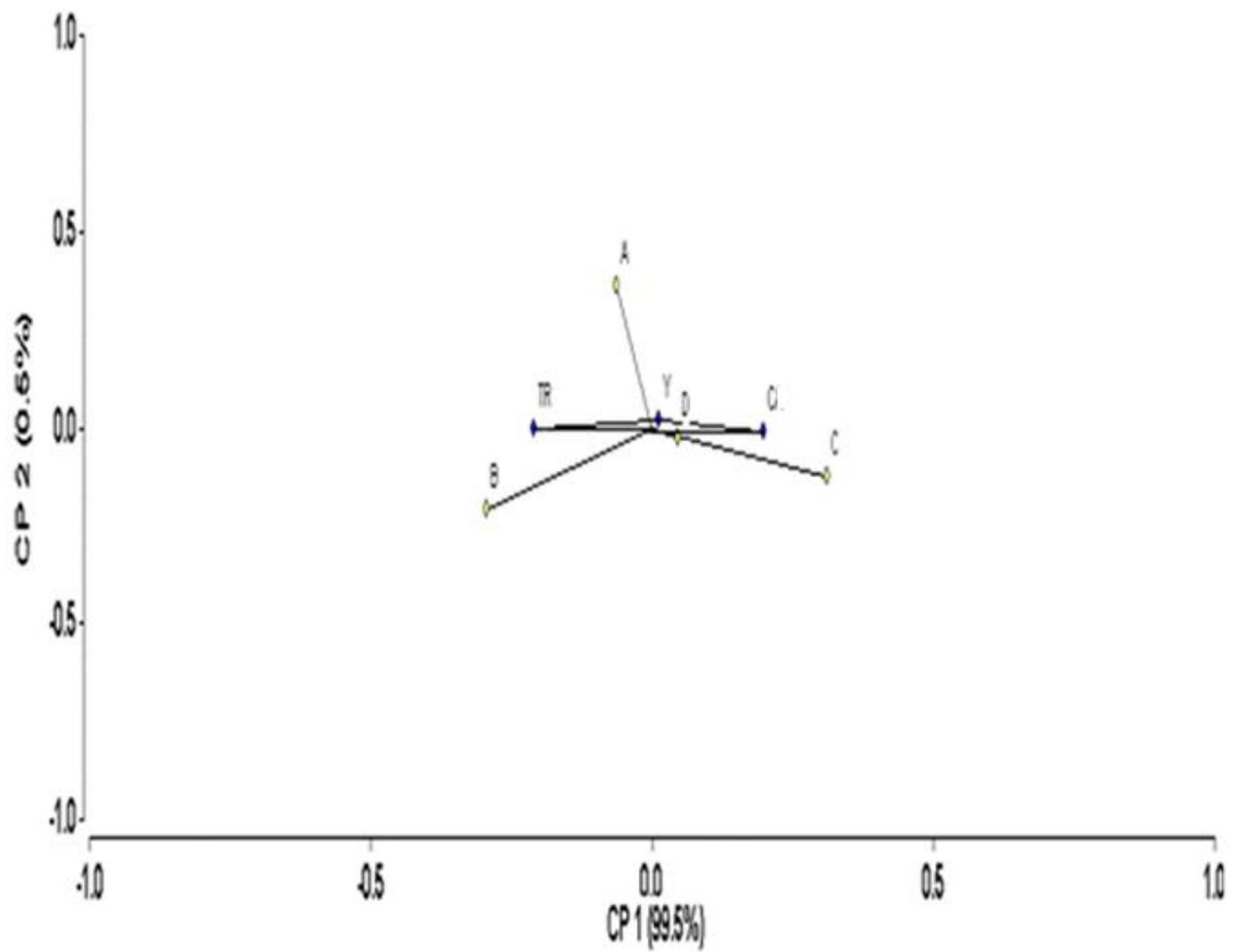


Figura 6. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de proteína en grano evaluados en cuatro ambientes.

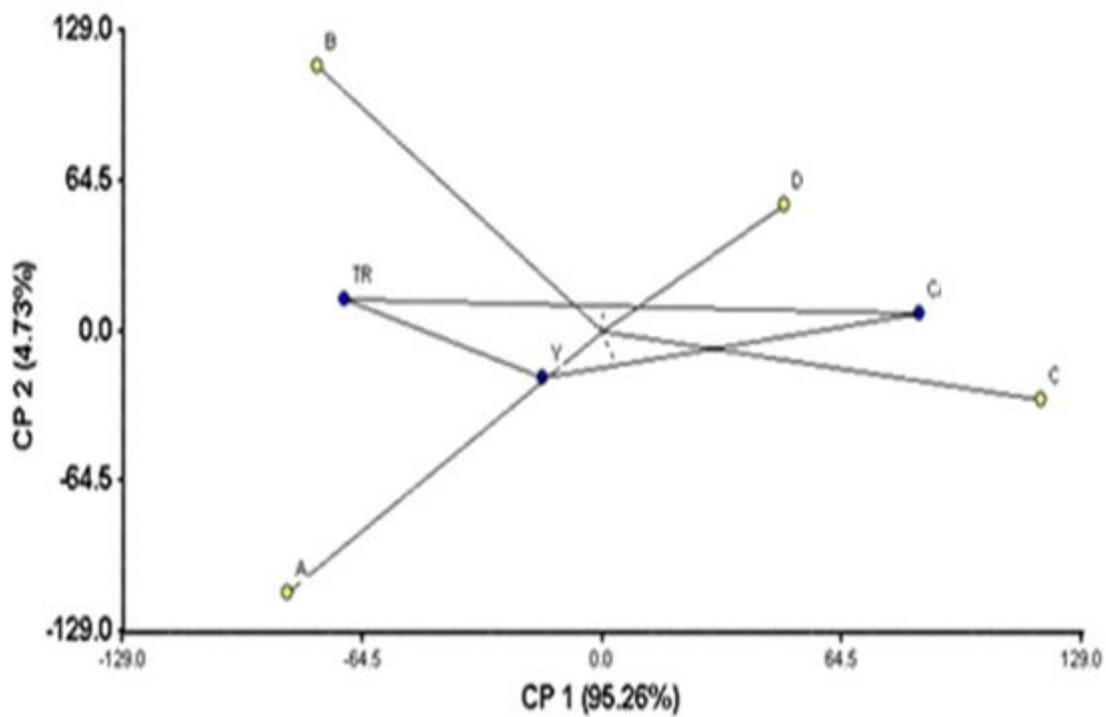


Figura 7. Representación gráfica de la asociación de los genotipos con los ambientes particulares respecto a los dos primeros ejes de componentes principales del análisis AMMI de fuerza de gluten evaluados en cuatro ambientes.

REFERENCIAS

- Allard, L. W. 1999. Principles of Plant Breeding. John Wiley and Sons. New York. 254pp.
- Allard, R. W. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley and Sons. New York.
- Allard, R. W., y A.D. Bradshaw. 1964. Implications of genotype environment interactions in applied plant breeding. *Crop Science*. 4:503-508.
- Annicchiarico, P. 1997. Joint regression vs. AMMI analysis of genotype-environment interactions for cereals in Italy. *Euphytica*. 94(1):53-62.
- Aulicinio, M., F. Laos, M. Arturi, A. Suárez Y C. Greco. 2000. Análisis de la interacción genotipo – ambiente para rendimiento forrajero en cebadilla criolla. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 15(3):169-180.
- Avendaño, R. L., D. Álvarez, A.C. Calderón, S. S. Quintero, F. R. Acuña, J. V. Zárate, C.
- Baena, D., J.A. Escobar, y J.E. Muñoz. 1991. Metodologías para determinar la estabilidad y adaptabilidad. Mimeografiado. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias agropecuarias, Palmira. 24p.
- Balbuena, M.A., González, H.A., Rosales. R.E., Domínguez, L.A., Franco, M.O, y Pérez, L.D. 2008. Identificación de genotipos sobresalientes de trigo en el Valle de Toluca. *Agricultura técnica en México*. 43(7):257-262.
- Barriga, B.P. 1974. Índice de cosecha en trigo de primavera. *Agro sur*. 2(1): 153-158.
- Becker, H.C.1981. Correlations among some statistical measures of phenotype stability. *Euphytica*. 30:835-840.
- Becker, H.C.1988. Stability analysis in plant breeding. *Plant Breed*. 101:1-23.
- Canimolt, 2008. Camara nacional de la industria molinera de trigo 3: 1-48.
- Carballo, C. A., y S.F. Márquez. 1970. Comparación de variedades de maíz del Bajío y la Mesa Central por su rendimiento y estabilidad. *Agrociencia*. 1:129-146.
- Chaves, L. J. 2001. Interacción genotipo por ambiente. Edición. Lourenço Nass, Afonso Celso Candelaria Valois, Itamar Soares de Melo, María Cléria Valadares Rondonópolis: Fundação MT. 673-713p.
- components across diverse environments. *Crop Sci*. 23: 209-212.
- Crossa, I., H. Gauch And R. Zobel. 1990. Additive main effect and multiplicative interaction analysis of two international maize cultivar trials. *Crop Sci*. 30:493-500.
- Crossa, J. 1996. Statistical analyses of multiplication trials. *Advances in Agronomy*.44: 55-85.
- Crossa, J., B. Wescott, y C. González. 1988. Analysing yield stability of maize genotypes using a spatial model. *Theoretical and Applied Genetics*. 75: 863-868.
- Crossa, J., P. N. Fox, W. H. Pfeiffer, S. Rajaram, y H. G. Gauch. 1991. AMMI adjustment for statistical analysis of an international wheat yield trial. *Theoretical and Applied Genetic* . 81:27-37.
- Crossa, J.,H.G. Gauch, y R.W. Zobel. 1990. Addive main effects and multiplicative interaction analysis of two international maize cultivar trials. *Crop Science*. 30: 493-500.
- Cubero, J.I., y F. Flores. 1994. Métodos estadísticos. Para el estudio de la estabilidad varietal en ensayos agrícolas. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla, España. 176p.
- Dyke, G. V., P. W. Lane, y J. F. Jenkyn. 1995. Sensitivity (stability) analysis of multiple variety trials with special reference to data expressed as proportions or percentages, *Exploration. Agricultural*. 31:75-87.
- Eberhart, S. A., y W.A. Russell. 1966. Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science*. 6:36-40.
- Eberhart, S.A., y W.A. Russell.1968. Yield and stability for a. 10-line diallel of single-cross and double-cross maize hybrids. *Crop Science*. 9: 357-361.
- Eberhart, S.A., y W.A. Russell.1970. Factors effecting efficiencies of breeding methods. *Africa Soils*. 15: 655-667.
- Evenson, R.E., y Y. Kisleev. 1975. *Agricultural Research and Productivity*, New Haven, CT, Yale University Press.
- F, Víctor., S. Segovia, y E.Paterniani.1985. Estabilidad fenotípica para rendimiento en poblaciones de maíz sometido a la selección para prolificidad. *Agronomía tropical*. 35(1-2):33-41.
- Finlay, K.W., y G.N. Wilkinson. 1963. The analysis of adaptation in a plant- breeding programme. *Australian Journal of Agricultural Research*. 14: 742-754.
- Flores, F., T. Moreno And J. Cubero. 1998. A comparison of univariate and multivariate methods to analyze G x E interaction. *Field Crops Res*. 47:117-127.
- Flores y P.H. Robinson. 2007. Evaluación de un sistema de enfriamiento aplicado en el período seco de ganado lechero durante el verano. *Técnica Pecuaria México*. 45(2):209-225.
- Fox, B. A., y A. G. Cameron. 1997. *Ciencia de los alimentos, nutrición y salud*. Primera reimpresión. Editorial Limusa. México. D. F. 122-128p.

- García, E., 1985. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, 2a. México. D.F.
- Gauch, H. And R. Zobel. 1988. Predictive and postdictive success of statistical analysis of yield trials. *Theor. Appl. Genet.* 79:753-761.
- Gauch, H. And R. Zobel. 1996. AMMI analysis of yield trials. **In:** M.S. Kang y H.G. Gauch. (eds.). *Genotype-by-Environment interaction*. CRC Press, Boca Ratón. pp. 85-122
- Gauch, H.G., y H. W. Zobel. 1988. Predictive and positive success of statistical analysis of yield trials. *Theoretical and Applied Genetic.* 79: 753-761.
- Gauch, H.G.JR. 1992. *Statistical analysis of regional yield trials: AMMI analysis of factorial designs*. Elsevier Science Publisher. B.V. 279pp.
- Gleenys, A., P. Monasterio, y R. Rea. 2006. Análisis de la interacción genotipo-ambiente para rendimiento de maíz en la región maicera del estado Yaracuy, Venezuela. *Agronomía Tropical.* 56(3):369-384.
- Gutiérrez, E.D., y H. Fraga. 1999. Comparación de respuestas de tres modelos de estabilidad aplicados a nueve genotipos de trigo ("*Triticum Aestivum*" L.) en cuatro ambientes de México. *ITEA. Producción Vegetal.* 95(1):31-40.
- Heinrich, G. M., C. A. Francis, y J. D. Eastin. 1983. Stability of grain sorghum yield genotype-environment interaction in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics.* 83(5):597-601.
- Hill, J. 1975. Genotype-environment interactions a challenge for plant breeding. *J. Agric. Sci., Camb.* 85:477-493.
- Inforural, 2008: www.inforural.com.mx/noticias.php?&id_rubrique=182&id_article=29295
- INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones forestales agrícolas y pecuarias. <http://www.inifap.gob.mx>
- Hanson, W.D. 1970. Genotypic stability. *Theoretical and Applied Genetic.* 40: 226-231.
- JAOAC. 1968. *Journal Association of Official Analytical Chemists.* 51: 766-770.
- Kempton, R. A. 1984. The use of biplots in interpreting variety by environment interactions. *Journal of Agricultural Sciences* 103:123-135.
- Kramer, 1979. Environmental and genetic variation for protein content in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica.* 28(2):209-218.
- Laing, D. R. 1978. Adaptabilidad y estabilidad en el comportamiento de plantas de frijol común. Documento presentado en la reunión de discusión sobre viveros internacionales de rendimiento y adaptación de frijol. CIAT. 24p
- León, H.C., y C. Becker. 1988. Repeatability of Some Statistical Measures of Phenotypic Stability - Correlations between Single Year Results and Multi Years Results. *Plant Breeding.* 100 (2): 137-142.
- Lin, C. S., M. R. Binns, y L.P. Lefkovich. 1986. Stability analysis: where do we stand? *Crop Science.* 26:894-900.
- Lin, C., M. Binns And P. Lefkovich. 1986. Stability analysis: Where do we stand? *Crop Sci.* 26:894-900.
- López, E., O. Cano, B. Villar, J. Cumpian, F. Ugalde, y V. López. 2001. Evaluación de líneas de frijol negro, en Veracruz y Chiapas, México. *Agronomía Mesoamericana.* 12(2):129-133.
- Lozano, A.J., V.M. Zamora, L. Ibarra, S.A. Rodríguez, C. Lázaro, M.R. Ibarra. 2009. Análisis de la Interacción genotipo-ambiente mediante el modelo AMMI y potencial de producción de Triticales Forrajeros(x *Triticosecale* Wittm). *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo.* 25(31): 81-92.
- Magari, R. And M. Kang. 1993. Genotype selection via a new yield stability statistic in maize yield trials. *Euphytica* 70:105-111.
- Marín, 1995. Diseño muestral y análisis de encuestas para evaluar adopción de tecnología de producción de yuca en la costa Atlántica de Colombia. Centro internacional de agricultura tropical (CIAT).
- Marín, C. 1995. Estimación y comparación de parámetros de estabilidad del rendimiento en cultivares de maíz (*Zea mays* L.) con fines de selección y recomendación en función de los ensayos regionales del FONAIAP, año 1992. Trabajo de Grado. Maracay, Ven. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 126 p.
- Marín, C., F. San Vicente Y V. Segovia. 2004. Métodos recientes para el análisis de la interacción genotipo-ambiente en pruebas regionales de cultivares de maíz (*Zea mays* L.). **In:** VI Jornada Científica del Maíz. Maracay (Venezuela). Fasc. 1:6 p.
- Medina, S., C. Marín, V. Segovia, A. Bejarano, Z. Venero, R. Ascanio Y E. Meléndez. 2002. Evaluación de la estabilidad del rendimiento de variedades de maíz en siete localidades de Venezuela. *Agronomía Trop.* 52(3):255-275.
- Mohan, M., K.M. Mohap, y D. Martino. 1997. Explorando altos rendimientos de trigo. INIA la estanzuela, Uruguay.

- Moore, C.A. 1921. The agronomic placement of varieties. *Journal American Society of Agronomy*.13:337-352.
- Nachit M., M., G. Nachit, H. Ketata, H. G. Gauch And R. W. Zobel. 1992. Use of AMMI and linear regression models to analyse
- Nachit, M.N., G. Nachit, H. Ketata, H.G. Gauch, y R.W. Zobel. 1992. Use of AMMI and regression models to analysis genotype-environment interaction in durum wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 83:597-601.
- NMX-FF-036-1996. Productos alimenticios no industrializados, cereales, trigo (*Triticum aestivum L y Triticum durum*), especificaciones y métodos de prueba.
- Ortega, A. J., y O.S. Magaña. 1992. PARAM: Sistema de análisis de parámetros de estabilidad. Congreso Nacional de fitogenética. Tuxtla Gutierrez, Chiapas. Resumen. 363.
- Pandey, S., y J.E. Vargas.1985. La interacción fenotipo-medio ambiente y su importancia en el mejoramiento intrapoblacional en las plantas cultivadas. Trabajo presentado en el VII Congreso Latinoamericano de Genética- I Congreso Colombiano de Genética. Mimeografiado. 38p.
- Pérez, J.C., H. Ceballos, E. Ortega, y J. Lenis. 2005. Análisis de la interacción genotipo por ambiente en yuca (*Manihot esculenta* Crantz) usando el modelo AMMI. *Fitotecnia Colombiana*. 5(2):11-19.
- Perkins, J.M., y J.L. Jinks. 1968. Environmental and genotype x environmental components of variability: III multiple lines and crosses. *Heredity*. Edinburgh. 23: 339-356.
- Pla, L. E. 1986. Análisis multivariado: Método de componentes principales. Universidad Nacional Experimental Francisco Miranda. *Crop Science*. 35: 1230-31.
- Pronespres. Programa Nacional de estimaciones de superficie, producción y rendimiento 2007-2008: <http://www.oeidrus-bc.gob.mx/sispro/trigobc/pronespre.html>
- Puertas, M. J. 1992. Genética fundamentos y perspectivas. 1ª Ed. M.C. Graw. Hill, Interamericana de España.
- Rea, R. And O. De Sousa. 2002. Genotype x environment interaction in sugarcane yield trials in the central-western region of Venezuela. *Interciencia* 27:620-624 Cary, NC.USA.
- Riggs, T.J., 1986. Collaborative spring barley trials in europe 1980-1982: analysis of grain yield. *Plant Breeding*. (96):289-303.
- Robinson, F.E., D.W. Cudney, W.F.Lehman.1977. Yellow berry of wheat linked to protein content. *California Agriculture*. 31(3):16-17.
- Serna. S., S.R.O.1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales, Editorial AGT S.A. México, D.F.
- Shafii, B., K.A. Mahler, K.M. Pric, y J.F. Pederson. 1992. Genotype x environment interaction effects on winter rapeseed yield and oil content. *Crop Science*, 32:922-927.
- Simmonds, N. W.1979. Principles of Crop Improvement. Longman. NY. 408 p.
- Sivori, M., and E. Motaldi. 1980. Fisiología Vegetal. Editorial Hemisferio sur. Buenos Aires Argentina.
- Snedecor, G. N., y W.G. Cochcran. 1980. Stadistical methods. 7th ed. IOWA, State University Press. Ames, IA
- Solís, E., y J.G. Díaz. 2001. Efecto de los factores controlables de la producción sobre el rendimiento y la panza blanca sobre el grano de trigo duro. *Terra Latinoamericana* 19(4):375-383.
- Sprague and Eberhart.1977. Cor breeding.In. *Corn and Corn improvement*. Ed. Sprague.G.K. Madison. American Society Agronomy.305-362.
- Stelling, D.E., y W. Link. 1994. Yield stability in faba beans, *Vicia faba L.* 2. Effect. Of heterozygosity and heterogeneity. *Plant Breed*. 112: 30-39.
- Syed, A. M., A. Rehana, y M. Ghulam. 2007. Yields stability analysis conferring adaptation of wheat to pre-and-post-anthesis drought conditions. *Pak. J. Bot.* 39(5): 1623-1637.
- Thomson, N.J., y R.B. Cunningham. 1979. Genotype x environment interactions and evaluations of cotton cultivars. *Australian Journal of Agriculture Research*. 30: 105-112.
- Van Eeuwijk, F. 1995. Linear and bilinear models for the analysis of multi-environment trials: I. An inventory of models. *Euphytica*. 84:1-7.
- Wallace, D.H., H.M. Munger.1966. Studies of the physiological basis for yield differences.II. Variation in dry matter distribution among aerial organs for several dry bean varieties. *Crop Science*.6:503-507.
- Wescott, B. 1986. Some methods of analyzing genotype-environment interaction. *Heredity* 56:243-253
- Wricke, G. 1962. Cinc method Zer Ertussog der Okojogischen Streobrelte in Felder. *Versochen Z. Oflanzenzucht*. 47: 92-96.
- Yan, S. 1995. Regression and AMMI analysis of genotype-environment interaction. An empirical comparison. *Agron. J.* 87:121-126.

- Yan, W. L., A. Hunt, Q. Sheng And Z. Szlavnic. 2000. Cultivars evaluation and mega-environment investigation based on GGE biplot. *Crop Sci.* 40:597-605.
- Yan, W., y M.S. Kang. 2003. GGE biplot analysis: a graphical tool for breeders, geneticists and agronomists. CRC press. USA, 1-19p.
- Yang, R. And R. Baker. 1991. Genotype – environment interactions in two wheat crosses. *Crop Sci.* 31:83-87.
- Yates, F., y W.C. Crochram. 1938. The analysis of groups of experiments. *Journal of Agricultural science.* 28: 556-580.
- Zadok, J.C., T.T. Chang, y F.C. Konzak.1974. A decimal code for growth stages of cereals. *Weed Res.* 14: 415–421.
- Zepeda, B.R., C.A. Carballo, y A.C.Hernández.2009. Interacción genotipo-ambiente en la estructura y calidad de nixtamal-tortilla del grano en híbridos de maíz. *Agrociencia.* 43(7): 124-128.
- Zobel, R., M. Wright And H. Gauch. 1988. Statistical analysis of a yield trial. *Agron J.* 80:388-393.
- Zobel, R.W., M.J. Wrigth, M.J. Gauch. 1988. Statistical analysis of a yield trial. *Agronomy Journal.* 80:388-393.
- Zobel, R.W. 1990. A powerful statistical model for understanding genotype-by environment interaction and plant breeding. 126-140. MS Kang ed. *Proc. Genotype by environment interaction and plant breeding.* Louisiana State University.

Effect of pressure and distance on cellular damage of embryogenic

Wheat tissue using β -glucuronidase (GUS) gene

Rodríguez-González Rosario Esmeralda ^a, Giroux Mike^b, Campbell Jackie^b,
Iñiguez-Monroy César Gonzalo^c, Avendaño-Reyes Leonel^a, Ponce-Medina
Juan Francisco^a, Muñoz- Salazar Raquel^d, Rueda-Puente Edgar Omar^{*e}, Paz-
Hernández Juan José^a, Cruz-Villegas Manuel^a, Santillan-Cazáres Jesus^a

^aInstituto de Ciencias Agrícolas-Universidad Autónoma de Baja California
Carretera a Delta s/n, Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California, México
Phone: 686-523-00-79. email: esmeraldarg5@hotmail.com

^bDepartment of Plant Sciences and Plant Pathology, Montana State University
Bozeman, MT 59717-3150, Phone: 406-994-7877, Lab: 406-994-1876,
FAX: 406-994-7600. email: mgiroux@montana.edu.

^cInstituto de Ingeniería-Universidad Autónoma de Baja California Calle de la
normal s/n y Bulevar Benito Juárez, Mexicali, Baja California, México
Phone: 686-566-41-50. email: iniguezmonroy@prodigy.net.mx

^dEscuela Ciencias de la Salud-Unidad Ensenada, Universidad Autónoma de
Baja California, México
Phone: 646-175-07-07, email: ramusal@yahoo.com.mx

^eUniversidad de Sonora-División de Ciencias Administrativas Contables y
Agropecuarias. Carretera Internacional y avenida 16 de septiembre s/n colonia
La Loma, ciudad Santa Ana, Sonora, México. C.P. 84600. Tel: 641-324-12-42,
email: erueda04@santana.uson.mx

*Corresponding author: Edgar Omar Rueda-Puente. Department of Agro -
Administration. Universidad de Sonora-Campus Santa Ana, Carretera
Internacional y Avenida 16 de septiembre s/n, Col. La Loma, Santa Ana,
Sonora, México. C.P. 84600. Tel-Fax. +52-641-324-1242.
erueda04@santana.uson.mx

Abstract

Triticum aestivum L. is a primary target for the application of genetic engineering in order to improve agronomic characteristics. Biolistics is based on the particle gene-gun transfer system, in which naked DNA is physically introduced into cells by microprojectile bombardment. The biolistic transformation efficiency of cereals has ranged from 0.15% to 0.5%. One of the most responsive materials be transformable are the sister lines of the 'Bobwhite' family. This genotype dependence is also evident in the development of alternative methods for wheat transformation, such as direct gene transfer to protoplasts. There are some bombardment parameters that have been examined in rice and wheat, such as the optimization of DNA, gun pressure, target distance, number of bombardments, and the usage of a focusing nozzle. Preliminary studies have found that elite wheat varieties are more susceptible to bombardment damage resulting in poor tissue culture response and inefficient transgenic plants recovery. Therefore, the objective of this study was to evaluate the optimum gun pressure and target distance applied during the bombardment process to maximize transgenic β -glucuronidase (GUS) expression in wheat. The results showed that the best transient expression of the GUS gene was achieved at the maximum target distance (7.5 cm) and at the middle pressure level (1100 psi). These results can be useful in order to increase the probabilities of insertion and expression of genes during wheat genetic manipulation. As a result, using this protocol, gold particle losses can be minimized as well as tissue damage for future applications of embryo bombardment.

keywords: Biolistic bombardment; cell wall; immature embryo; particle gene-gun transfer.

Abbreviations: MDEs-Microspore derived embryos, ScBv- Stands for sugarcane bacilliform virus, ADH I- Stands for Alcohol dehydrogenase I, ADN- Deoxyribonucleic acid, MS- Murashige and Skoog, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ - Copper sulfate pentahydrate, NaOH- Sodium hydroxide, CaCl_2 - Calcium chloride.

1. Introduction

Microspores of wheat can be induced to develop into somatic embryos through anther or microspore culture, producing either haploid or spontaneous doubled-haploid (dihaploid) plants. Spontaneous doubled-haploids are fertile and homozygous, allowing their exploitation into plant breeding programs without further treatment [1]. Haploid plants can also be utilized in breeding programs following exposure to a chromosome doubling agent, such as colchicine, to create fertile doubled-haploids. The in vitro production of haploid plants eliminates the need for selfing of hybrids over several generations to produce pure lines, permitting rapid phenotypic analysis and acceleration of breeding programs. Bombardment of microspore derived embryos (MDEs) integrates transformation procedures and haploid plant production. Since the production of chimeric plants could occur following the germination of bombarded MDEs, the preferred method would incorporate an intervening callus induction stage, as with immature embryo transformation systems [2,3,4], leading to the development of somatic embryos from transformed cells. Thus, the present study was designed to evaluate the optimum pressure and

distance applied during embryogenic wheat tissue bombardment to maximize β -glucuronidase (GUS) gene expression.

2. Methods

2.1 Plant material and seed surface sterilization

Bobwhite 56 wheat (*Triticum aestivum* L.) plants were grown in a greenhouse under controlled conditions with a 16 hour photoperiod, day temperatures of 24-28°C, and night temperatures of 15-18°C. Routine pesticide and fertilizing treatments were applied to the donor plants. Immature seeds were harvested 5-10 days post anthesis and 0.5-1.5 mm long immature embryos were immediately dissected from the seeds as per the protocol outline in [5]. Directly prior to embryo isolation the seeds were sterilized by washing for 15 min at room temperature in a solution of 15% sodium hypochlorite containing 0.1% Tween 80 (Merck), and then rinsed five times with sterile water as per protocols previously described [6,7,8].

2.2 Rupture disc and macrocarrier sterilization and tissue culture media

Rupture discs and macrocarrier holders were sterilized by dipping into a 100% ethanol solution and dried on a sterile petri plate [9]. The basic nutrient media was formulated according to [10], with the following modifications: 500 mL of distilled water, 4.32 g of MS salt [11] containing 150 mg of L. asparagine, 40 mg of thiamine, 150 g of maltose, 1 mL of 5mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Then, distilled water was added to complete a final volume of 700 mL and the pH was adjusted to 5.8 with NaOH prior to autoclaving for 30 min. Media was filtered through a

nylon membrane filter (0.45 μm) into a 1 L bottle containing 300 ml of autoclaved phytigel (2 g) solution.

2.3 Microprojectile sterilization and DNA bombardment

Gold microcarriers (0.6 μm) (BioRad, Hercules, CA) were sterilized with 1 mL of a 70% ethanol solution per 5 mg of gold in a 1.5 mL microcentrifuge tube for 15 min during which the suspension was continuously vortex to promote homogeneous particle suspension. Following suspension the particles were centrifuged for 5 seconds to collect and the supernatant was discarded. The ethanol washing step was repeated three times and then gold particles were suspended in 0.5 mL of 70% ethanol solution as previously described [5]. The pScBV-3m plasmid vector containing the bacterial β -glucuronidase (*GUS*) gene, under the control of the ScBV promoter driving the expression of a coding region containing the maize ADH intron I and GUS , was kindly provided by Neil Olszewski (Department of Plant Biology, University of Minnesota).

2.4 DNA precipitation on microprojectile, culture of immature embryos and 2.5 Microprojectile-DNA bombardment of embryos and histochemical GUS detection

The gold stock suspension was subjected to an ultrasonic bath for 10 sec, and then vortex for 13 sec. Precipitation reactions were prepared in 2 mL sterile tubes. Each bombardment consisted of 8.33 μL gold microprojectiles, 8.33 μL 2.5M CaCl_2 , 8.33 μL 0.1M spermidine-free base, 0.5 μL DNA (0.5 μg). After 5 min of continuous vortexing, the DNA coated microprojectiles were allowed to precipitate for 1 min on ice. The supernatant was discarded and 20

μL 70% ethanol was added. The microprojectiles were suspended by mixing in the pipette tip approximately 50 times followed by a 5 sec centrifugation. The suspension procedure was repeated and the microprojectiles were finally suspended in 15 μL of 100% ethanol. The microprojectiles were then pipetted onto a macrocarrier [5, 7] (Figure 2). Embryos (1-1.5 mm) were dissected out of developing seeds from seven day post-flowering heads in a laminar flow hood, and placed onto the center of a 35 mm diameter Petri plate containing culture media. The target distance was defined as the distance between the outlet of the focusing nozzle, and the target plate [7,12,13,14]. There were three different distances: 1) Between 65 and 87 embryos were placed in the center (6.8-7.5 cm target circle) for a target distance of 1.5 cm; 2) 120 embryos were placed in the center (8.8-9.5 cm target circle) for a target distance of 4.5 cm; 3) 115 embryos were placed in the center (12 cm target circle) for a target distance of 7.5 cm. The embryos were incubated on tissue culture media at 25°C in the dark for one day before bombardment.

Each bombardment consisted of, 10 μL of DNA-coated microprojectiles in ethanol placed into the middle region of macrocarriers (Figure 2) and allowed to dry. Prepared macrocarriers were kept in a sterile Petri dish. Bombardments were conducted at the described target distances (1.5, 4.5 and 7.5 cm) under vacuum using a PDS 1000/He microprojectile gun (Bio-Rad), with rupture discs at three different He pressure levels (650, 1100, and 1800 psi), each treatment was replicated twice. To increase the efficiency of the gene gun bombardment a focusing nozzle with a diameter of 7 mm and a length of 58 mm was used, as described by [14]. GUS expression was analyzed at two days post-bombardment by immersion into a filtered-sterilized histo-chemical staining

buffer (50mM NaH₂ PO₄ pH 7.2, 0.5% Triton X-100, 1mM 5-bromo-4-chloro-3 indolyl-β-D-glucuronide) as chromogenic substrate [15]. A partial vacuum (27 inches Hg) was applied for 25 min to infiltration of substrate into cells. The immersed embryos were incubated overnight at 37°C with agitation. The staining solution was removed and replaced with 70% ethanol until GUS expression was observed using a dissecting microscope. GUS activity was quantified by the number of blue spots per bombarded embryo. The quantification of the number of spots was determined by the observation of well defined spots defined as the number of spots without cellular damage.

2.5 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) with a completely randomized design in a factorial arrangement design 3x2. The factors considered were bombardment pressure (650, 1100, and 1800 psi) and the target distance between the stopping screen and the target plate (1.5, 4.5, and 7.5 cm). The dependent variable was the ratio of blue spots per bombarded embryos. Comparisons among means were detected using Duncan's Multiple Range test and a difference was considered significant at a P-value of 0.05. The analysis was performed using Proc GLM from SAS [16].

3. Results

The statistical analysis resulted in a significant interaction (P<0.01) between pressure and distance, that is, the number of spots per embryo was a function of pressure, showing a different pattern for every distance tested (Table 1, Figure 3). The average number of well defined spots found in every embryo (transient expression) which it is shown in Table 1. This average represented a total of three replicates. The coefficients of variation and determination were

26.8 and 0.91 % respectively. The results show that the best response was observed at a distance of 7.5 cm and 1100 psi of pressure. This means that at this distance and pressure, the cellular damage was diminished and that the expression of β -glucuronidase (GUS) gene was maximized (Figure 3). On the other hand, the lowest response was obtained with a combination of pressure and distance of 650 psi and 7.5 cm (Table 1). This response is associated with a higher cellular damage. Distance of 4.5 cm at pressures of 1800 and 650 psi had also good results regarding cellular damage. In addition, pressure of 1800 psi at distances of 1.5 and 7.5 cm had severe cellular damage. Figure 1 shows the trend of treatment combination across the experiment.

The patterns found at 7.5 cm could be the result of a balance between the gold particle acceleration needed for DNA injection when the particle reaches the embryo surface; and the maximum pressure that the embryo can withstand before tissue damage, which is seen as a big blue spot without a defined shape. However, the pattern shown by the number of spots found at 4.5 cm cannot be explained in the latter terms. Beyond a certain target distance, the DNA adhered to gene is not inserted into the embryo. Other research found that the spots were well defined and isolated at a pressure of 1100 psi and a target distance of 0.5 cm [5]. This result agrees with those found in the present study, even though there were some differences between both studies in the concentrations of calcium chloride and spermidine used (0.16 M calcium chloride, 0.005 M spermidine in the present study vs 0.5 M, 0.008 M). The maximum number of total spots obtained at optimum conditions was of 248 spots, which is higher than the 180 spots [5] (Table 1). This difference can be explained in terms of the size of the area covered by gold particles during

bombardment, which is proportional to target distance. These results also suggest that an increase in the target distance/area did not sacrifice the total number of well defined spots, having in mind that the total mass of gold in every shot was the same in both studies. The conditions for DNA precipitation on micro-projectile were identical in both protocols. Other study[7] shown that the combination of gap and target plate (circle) distance which yielded the optimum (GUS) gene expression were 2.5 and 5.5 cm. They also found that an adequate transient expression was obtained with lower levels of bombardment pressure (650-1100 psi), which is in accordance with the maximum pressure to minimize tissue damage of 1100 psi obtained in this study.

4. Discussion

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is a primary target for the application of genetic engineering in order to improve agronomic characteristics. Microprojectile or biolistic bombardment is currently the most widely applied technique for transferring genes to some *Agrobacterium* transformation recalcitrant species. Biolistics is based on the particle gene-gun transfer system, in which naked DNA is physically introduced into cells by microprojectile bombardment. This process involves high-velocity acceleration of gold microprojectiles carrying foreign DNA, penetration through the cell wall and membrane by microprojectiles, and DNA delivery into plant cells. The biolistic transformation efficiency of cereals has ranged from 0.15% to 0.5%. Recent studies have demonstrated consistent results using freshly initiated immature embryo-derived callus cultures. One of the most responsive materials reported to be transformable by several laboratories are the sister lines of the 'Bobwhite' family. This genotype dependence is also evident in the development of

alternative methods for wheat transformation, such as direct gene transfer to protoplasts.

There are some bombardment parameters that have been examined by different scientists in rice and wheat, such as the optimization of DNA, gun pressure, target distance, number of bombardments, amount of gold, gap distance, and the usage of a focusing nozzle. Preliminary studies have found that elite wheat varieties are more susceptible to bombardment damage resulting in poor tissue culture response and inefficient transgenic plants recovery.

The results obtained in this study show concordance with some previous studies [17]; regarding the maximization of transgenic β -glucuronidase (GUS) expression in wheat, by means of gun pressure and target distance evaluation. The effectiveness of DNA carrying microprojectiles penetration into the target tissue is essential for successful gene delivery. Shooting distance and rupture disc pressure effects observed in the present study are likely to reflect the relative velocity of the microprojectiles when they reach the surface of the explants.

In some plant transformation systems, successful microprojectile-mediated gene delivery has also been attributed to the osmoticum of the culture medium on which the explants are bombarded or maintained post-bombardment [17,18,19]. It has been suggested that the osmoticum induces cell plasmolysis and that the reduced turgor of plasmolysed cells prevents leakage of their protoplasm when cell walls are perforated by the microprojectiles. A comparison was made of the effect of the three osmotica,

myo-inositol, sorbitol with mannitol, and sucrose, in the embryo proliferation (EP) medium on which explants were maintained for either 24 h post-bombardment, or for 4 h prior to bombardment and for 24 h postbombardment. Supplementing EP medium by the addition of 0±25 m myo-inositol more than doubled GUS expression 48 h post-bombardment [20]. Preconditioning target explants on medium containing myo-inositol for 4 h before bombardment and for 24 h post-bombardment produced a greater increase in gene expression than when the osmoticum was applied for only 24 h post-bombardment [20]. In order to maximize transformation, all subsequent bombardments were undertaken using 9000 kPa rupture discs with a firing distance of 70 mm; explants were maintained on EP medium supplemented with 0±25 m myoinositol for 4 h prior to bombardment and for 24 h postbombardment.

Furthermore, the present study show agreement with results obtained in transgenic watermelon plants, regarding the minimization of cellular damage upon distance and pressure optimization [21]. Those experiments were carried out with DNA-coated gold particles to transform cotyledon sections including axillary meristem of *Citrullus vulgaris*, using the biolistic method in order to optimize the transformation parameters and eventually achieve the regeneration of putative transgenic watermelon plants.

Initially, five biolistic parameters namely helium pressure, macrocarrier to target tissue distance, explants ages, DNA concentrations and osmotic treatment were optimized using plasmid pRQ6 (carrying both gusA and hpt genes) [21]. The optimized biolistic parameters for cotyledon sections of *Citrullus vulgaris* explants were determined as follows: 1100 psi helium pressure, 6 cm target distance, 4-day-old explants, concentration of DNA at 1.2

µg/bombardment and osmotic treatment for 24 h on medium supplemented with 0.6 M mannitol prior to bombardment. [21] Using the optimized parameters, transformation of watermelon cotyledons was carried out using pAHG11, pCAMBIA 1301, co-transformation (pAHG11+pCAMBIA 1301) and pCambar plasmids. Bombarded tissues were selected on either 5 mg L⁻¹ hygromycin or 2 mg L⁻¹ PPT. Finally, the transformants produced were subjected to GUS histochemical assay [21].

Based on the results, a protocol based on the bombardment of embryos with gold particles, which had the gene of interest adhered to its surface, was performed. The best transient expression of the GUS gene was achieved at the maximum target distance (7.5 cm) and at the middle pressure level (1100 psi). These results can be useful in order to increase the probabilities of insertion and expression of genes during wheat genetic manipulation. As a result, using this protocol, gold particle losses can be minimized as well as tissue damage for future applications of embryo bombardment.

Acknowledgments

We wish to thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for the scholarship given to the first author during her doctorate studies. We acknowledge as well the assistance and financial support given by the Department of Plant Sciences and Plant Pathology of Montana State University. in developing the present study.

as the University of Montana for

References

- [1] S. Lütticke, D. Becker, R. Brettschneider, A. Jähne, H. Lörz, Genetic modification of cereal crops by direct gen transfer . In Proceedings FAO/IAEA International Symposium on the use of induced mutations and molecular techniques for crop improvement.IAEA. Viena (1995) 389-397.

- [2] F. Altpeter, V.Vasil, V. Srivastava, E.Stoger, I.K. Vasil, Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) plants, *Plant Cell Reports*. 16 (1996a) 12-17.
- [3] D. Becker, R. Brettschneider, H. Lorz, Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue, *The plant Journal*. 5 (1994) 299-307.
- [4] A. Blechl, E. Anderson, Expression of a novel high-molecular-weight glutenin subunit gene in transgenic wheat, *Nature Biotechnology*. 14 (1996) 875–879.
- [5] A. Pellegrineschi, S. Fennell, S. McLean, R.M. Brito, L. Velázquez, M.Salgado, J.Olivares, R. Hernández, D. Hoisington, Routine transformation system for use with CIMMYT Wheat Varieties, *Application of Biotechnologies to wheat Breeding*. (1998) 111-120.
- [6] N. Nehera, R.N. Chibbar, N. Leung, K. Caswell, C. Mallard, L. Steinhauer, M. Baga, K. Kartha, Self fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with two distinct gene constructs, *The Plant Journal*. 5 (1994) 285-297.
- [7] S. Rasco, A. Gaunt, A. Riley, P. Barselo, P.A. Lazzeri, Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues, *Plant Cell Reports*. 19 (1999) 118–127.
- [8] M. Shannon, Studies on a Transgenic approach to Decrease Gliadin Content in wheat. Thesis. Oregon State University (2006).
- [9] C. Sparks, D. Huw, Transformation of wheat by Biolistics. Chapper 2. *Transgenic crops of the world. Essential Protocols*. Edited by Lans S Curtis., Kluwer Academic Publishers (2003).
- [10] E.D. Smidansky, M.Clancy, F.D. Meyer, S.P. Lanning, N.K. Blake, L.E. Talber, M.J. Giroux, Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield, *Plant Biology*. 99(3) (2002) 1725-1729.
- [11] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Plant Physiology*. 15 (1962) 473-497.
- [12] F. Delporte, S. Li, J.M. Jacquemin, Calluses initiated from thin mature embryo fragments are suitable targets for wheat transformation as assessed by long-term GUS expression studies, *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 80 (2005) 139–149.
- [13] L.T. Jean, J.J. Bardou, S.L. Hoste, B. Mauchamp, A helium burst biolistic device adapted to penetrate fragile insect tissues, *Journal of Insect Science*. Available online: insectscience.org/1.9. (2001).

- [14] A. Libson, M. Riedel, G. Bronshtein, E. Narevicius, U. Even, M. G. Raizen, Towards coherent control of supersonic beams: a new approach to atom optics, *New Journal of Physics*. 8 (2006), 77-91
- [15] R.A. Jefferson, T.A. Kavanagh, M.W. Bevan, Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO Journal*. 6 (1987) 3901-3907.
- [16] SAS Institute, 2004: SAS/STAT User's Guide. Version 6.12 SAS Institute, Cary, NC.
- [17] E.M. Southgate, M.R. Davey, J.B Power, R. Marchant, Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment, *Biotechnology Advances*.(1995) 631-651.
- [18] P. Vain, M.D. McMullen, J.J. Finer, Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize, *Plant Cell Reports*.(1993) 84-88.
- [19] X. Ye, S.K. Brown, R. Scorza, J. Cordts, J.C. Sanford, Genetic transformation of peach tissues by particle bombardment, *Journal of the American Society for Horticultural Science*. (1994) 367-373.
- [20] R. Marchant, J.B. Power, J.A. Lucas, M.R. Davey, Biolistic Transformation of Rose (*Rosa hybrida* L.), *Annals of Botany*.(1998) 109-114.
- [21] F. Suratman, F. Huyop, A. Wagiran, Z. Rahmat, H. Ghazali, G.K.A. Parveez, Biolistic transformation of *Citrullus vulgaris* Schrad (Watermelon), *Biotechnology*. (2010) 119-130.