

UNIVERSIDAD DE LOS HEMISFERIOS

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

TRABAJO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
GRADO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA CON ÉNFASIS  
AGRO INDUSTRIAL

TRABAJO REALIZADO BAJO EL AUSPICIO DEL “PLAN DE  
REACTIVACIÓN DEL CULTIVO DE TRIGO (*Tritú vum aestivum* L.) EN EL  
ECUADOR”, CÓDIGO: 2100069001/ACTIVIDAD 001.

“VALIDACIÓN DE PROTOCOLOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES  
MOLECULARES LIGADOS A GENES DE RESISTENCIA A ROYA AMARILLA DE  
TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

ELABORADO POR:

RODRIGO GUILLERMO VINUEZA GAVILANES

QUITO, ABRIL DEL 2011

INIAP - Estación Experimental Santa Catalina

## Resumen

La generación de nuevas variedades vegetales a través de métodos de mejoramiento convencional puede resultar ser un proceso muy extenso. En el Ecuador, la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Westend.) es la enfermedad más importante del trigo y su presencia tiene efectos en el rendimiento y en la calidad panificadora del grano. Por tanto, el Programa de Cereales del INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) tiene como objetivo la generación y liberación de nuevas variedades de trigo con resistencia duradera a este patógeno. El uso de nuevas herramientas en el mejoramiento de plantas como el mejoramiento asistido por marcadores moleculares (MAS, 'Marker Assisted Selection') procura complementar este proceso para que sea dinámico y eficaz. Hasta el año de 2009, los estudios indican que dos genes mayores de resistencia a roya amarilla, el *Yr5* y el *Yr15*, no son afectados por las razas locales de este patógeno. Existen marcadores moleculares disponibles ligados a ambos genes, el marcador molecular STS-7/STS-8, ligado al gen *Yr5* (0.3 cM) y el marcador microsatélite *Xbarc-8*, ligado al gen *Tr15* (9.1 cM). El presente estudio consistió en la validación de los protocolos para la amplificación de estos marcadores frente a 14 líneas y/o variedades que actuaron como testigos al no portar estos genes. El análisis del marcador STS-7/STS-8 se realizó en geles de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata, teniéndose como resultado que la línea portadora del gen de resistencia *Yr5* (*yr5/6\*Avocet*) tiene un amplicón de un peso de 473.67 pb ( $\pm 3.75$ ). Las líneas que presentaron un amplicón comigrante fueron Catbird, Milán y Chapio, sugiriendo que sean descartadas como posibles parentales recurrentes en un programa de cruzamiento que involucre este gen de resistencia. El peso del amplicón para las líneas y/o variedades testigo fue de 468 pb ( $\pm 3.76$ ). El análisis de presencia/ausencia del fragmento de amplificación para el marcador STS-7/STS-8 determinó que la línea portadora del gen de resistencia *Yr5* presenta un amplicón de 474 pb, al igual que las líneas Milán, Catbird y Chapio, pues presentaron un amplicón comigrante. Las líneas y/o variedades no portadoras del gen resistencia presentaron un fragmento de amplificación de un peso de 468 pb. El análisis del marcador microsatélite *Xbarc-8* se realizó en geles de agarosa estándar, teñidos con bromuro de etidio, teniéndose como resultado que la línea portadora del gen de resistencia *Yr15* (*YH 5/6 \* A vocet*) tuvo un amplicón de peso de 234.44 pb ( $\pm 1.41$ ). De un total de 14 líneas y/o variedades testigo para este marcador, todas presentaron un amplicón de peso distinto al de la línea que porta el gen de resistencia, a excepción de la línea Tinamou, que presentó un amplicón de peso similar 231.55 pb ( $\pm 0.41$ ), sugiriendo que sea descartada como posible parental recurrente en un programa de cruzamiento que involucre este gen de resistencia. El análisis de presencia/ausencia del amplicón para el marcador microsatélite *Xbarc-8* indicó que la línea portadora del gen de resistencia *Tr15* (*Tr15/6\*Avocet*) presentó un amplicón de 234 pb, mientras que las 14 líneas y/o variedades restantes presentaron amplicones de peso variado, distinto al peso del alelo de 234 pb, vinculado con la línea portadora del gen de resistencia *Yr15*.

## Abstract

The development of new cultivars through conventional breeding tends to be an extensive process. In Ecuador, stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* Westend) is the most important disease of wheat and its presence has an effect on both yield and bakery quality. For the reasons mentioned above, the Cereals Program from INIAP (National Institute for Agricultural Research) has the objective to develop and release new wheat cultivars with durable resistance to this pathogen. The use of new tools in wheat breeding, such as Marker Assisted Selection (MAS) attempts to make the breeding process dynamic and efficient. Until the year 2009, there has been studies showing that two major resistance genes to stripe rust. *YrS* and *Yr15* are not affected by local races of this pathogen. There are molecular markers available for both genes, the molecular marker STS-7/STS-8 linked to the *YrS* gene (0.3 cM) and the microsatellite marker *Xbarc-H* linked to the *Yr15* gene (9.1 cM). The present study involved the validation protocols of these markers, including 14 lines and/or varieties that did not have these genes. The analysis for the STS-7/STS-8 marker was done in polyacrilamide gels, silver stained and had the following results, the line carrying the *YrS* gene (7076\*Avocet) had an amplified:fragment of 473.67 bp ( $\pm 3.75$ ). The lines Catbird, Milan and Chapio had the same migration pattern as the line carrying the *YrS* gene, showing that these lines must not be included as recurrent parents in a crossing program that involves this gene. The rest of the lines that did not carry the gene had an amplified fragment of 468 ( $\pm 3.76$ ). The presence/absence analysis for the STS- 7/STS-8 marker showed that the line carrying the *YrS* gene had the presence of an amplified fragment of 474 pb. The presence of the same fragment was observed for the lines Milan, Chapio and Catbird. The lines that did not carry the gene had the presence of an amplified fragment of 468 pb. The analysis for the microsatellite marker was done in standard agarose gels, stained with ethidium bromide. The results showed that the line carrying the *Yr15* gene (7r15/6\*Avocet) had an amplified fragment of 234.44 pb ( $\pm 1.41$ ). From the 14 lines and/or varieties that did not carry the gene, all of them had an amplified fragment with a different weight from the line carrying the »15 gene, except the line Tinamou that had a similar weight of 231.55 pb ( $\pm 0.41$ ). These results indicate that this line must not be included as a recurrent parent in a crossing program including this gene.

The presence/absence analysis showed that the line carrying the *YrS* gene had an amplified fragment of 234 pb, while the other lines and/or varieties did not have the allele of such size.

3.- ¿Los marcadores moleculares validados pueden ser utilizados en el programa de mejoramiento convencional a roya amarilla que realiza el Programa de Cereales?