



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Abril 2013

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Departamento Nacional de Biotecnología

PROYECTO: “Desarrollo e innovación biotecnológica para la potenciación de rubros agrícolas de importancia en seguridad alimentaria, competitividad exportable y adaptación al cambio climático”

ACTIVIDAD: Estudio de la diversidad genética de cebada *Hordeum vulgare* L. en la colección del INIAP usando marcadores moleculares SSR.

UBICACIÓN: Estación Experimental Santa Catalina
Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía.

AUTOR: José Esteban Moreno Amores

COAUTORES: Eduardo Morillo
Luis Ponce

COLABORADORES: Programa de Cereales EESC

FECHA DE INICIO: Abril 2013

FECHA DE TERMINACIÓN: Marzo 2014

PRESUPUESTO: \$ 11.090,04

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: SENESCYT 88%
INIAP 12%

1. ANTECEDENTES

La cebada (*Hordeumvulgare*L.) es uno de los cultivos más ancestrales de la agricultura del Viejo Mundo, que fue domesticada hace 10.000 años en la región de la Media Luna Fértil – Oriente Próximo (Zohary y Hopf, 1993). La cebada en la actualidad ocupa el cuarto lugar entre los cereales de mayor producción a nivel mundial con 134 millones de toneladas y un área cosechada de 48 millones de hectáreas en el año 2011. Según cifras de la FAO (2013) para el periodo comprendido entre los años 2000 y 2009 la producción y el rendimiento promedio de cebada por año en el Ecuador fueron de 23.585 toneladas y 0,60 t/ha. respectivamente, colocando al país en el puesto número 82 en producción y 101 en rendimiento del ranking mundial de países productores de este cultivo.

La cebada ha sido un cultivo favorito para la experimentación genética desde el redescubrimiento de las leyes de la herencia de Mendel ya que es una especie diploide ($2n=2X=14$), de autofecundación, alto grado de variación natural, fácilmente hibridable, de amplia adaptabilidad y se requiere pocos espacios físicos (Slafer *et al.*, 2002). Comprende un genoma de más de 5.000 Mb del cual cerca del 80% de ADN es repetitivo (Flavell *et al.*, 1974).

Tradicionalmente la información sobre el pedigrí, los rasgos morfológicos, pruebas bioquímicas y citológicas eran usados para evaluar la diversidad genética y clasificar el germoplasma de cebada. Sin embargo, estos métodos están asociados a limitaciones de cantidad de marcadores disponibles o influencia ambiental por lo que dificultan conocer a fondo el germoplasma de cebada (Matus y Hayes, 2002).

En la actualidad hay nuevas herramientas que permiten conocer más a fondo el germoplasma para optimizar recursos y direccionar la investigación. Los marcadores moleculares han demostrado ser herramientas útiles para la valoración de la variación genética en las colecciones de germoplasma (Mohammadi y Prasanna, 2003). Entre los diversos tipos de marcadores moleculares disponibles en cebada, los marcadores microsatélite (SSR) han demostrado ser los marcadores de elección para estudios de diversidad genética (Varshney *et al.*, 2007).

Los marcadores (SSR) son repeticiones en tándem de secuencias de ADN de tan solo unos pocos pares de bases de longitud (1-6 bp). Entre las ventajas del uso de estos marcadores están su reproducibilidad, naturaleza multialélica, herencia codominante, relativa abundancia y buena cobertura de genoma (Powell *et al.*, 1996). Estos marcadores también tienen un alto potencial en el análisis genético de cultivos autógamos debido a su alto nivel de polimorfismo (Roder *et al.*, 1995) y Morgante y Olivieri (1993) los describieron como la herramienta más eficaz para la detección de la variación genética inter e intra-específica.

A la fecha aproximadamente 1.000 marcadores SSR para cebada han sido publicados y están en la base de datos en línea: http://germinate.scri.ac.uk/ssr/barley_s.html. Varshney *et al.*, (2005) publicaron un mapa genético de alta densidad integrando 775 loci SSR y Marcel *et al.*, (2007) construyeron un mapa con 3.258 marcadores de los cuales 503 fueron marcadores SSR y mostraron ser los de mayor nivel de polimorfismo.

La eficacia de los marcadores moleculares SSR en estudios de diversidad genética en germoplasma de cebada se ha demostrado en estudios como los realizados por Struss y Plieske (1998) que detectaron la diversidad entre cebadas silvestres y cultivadas, Pillen *et al.*, (2000) y Maestri *et al.*, (2002) estimaron la variación genética en cebadas cultivadas alemanas e italianas respectivamente, o el de Matus y Hayes (2002) que estudió la diversidad en tres grupos de germoplasma, incluyendo variedades y descendencias de cruzamientos.

En América Latina han habido esfuerzos por establecer programas de mejoramiento de cebada que comprenden estudios de caracterización genómica en Uruguay (Castro *et al.*, 2010), sin embargo no hay referencias de este tipo de estudios en este cultivo en los países andinos.

2. JUSTIFICACIÓN

La cebada ha sido y es en la actualidad uno de los principales rubros en la alimentación de los habitantes de las zonas altas de la región andina como fuente de almidón, proteínas, vitaminas y minerales, y tiene gran potencial para que se incremente su consumo en las zonas urbanas. Hoy en día la cebada, a pesar de la reducción en su superficie cultivada, es después del maíz el cereal de más amplia distribución en la región interandina y el que mejor se adapta a zonas de alturas superiores a los 3000 m.s.n.m.

Una de las aplicaciones de los marcadores moleculares en Biotecnología agrícola es el estudio de la diversidad y variabilidad genética en germoplasmas. Dentro de estos marcadores, los microsatélites (SSR) tienen una alta capacidad de detección de polimorfismos además que poseen característica codominante para discriminar individuos homo y heterocigotos en especies diploides como la cebada.

El germoplasma en estudio está compuesto por variedades mejoradas y acriolladas de cebada, del que no se tiene información molecular por lo que se propone para su caracterización a este nivel, el uso de marcadores moleculares SSR. Estos resultados se complementarán con los resultados que se obtengan de la caracterización morfoagronómica de los mencionados genotipos, y brindarán los insumos para que el Programa de Cereales cuente con una “colección de trabajo” que concentre la mayor cantidad de diversidad genética disponible y en cuya base se sustenten los procesos de generación de germoplasma con caracteres deseados que considere emprender dicho programa.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la diversidad genética de la colección de cebada del INIAP utilizando marcadores moleculares microsatélites.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Caracterizar la diversidad alélica y el nivel de polimorfismo de 174 accesiones de cebada con 21 marcadores SSR polimórficos distribuidos en los siete cromosomas del genoma.
2. Identificar genotipos duplicados de la diversidad genética en la colección de cebada del INIAP.
3. Estimar la base genética disponible en variedades acriolladas en relación a los genotipos de mejoramiento

4. HIPÓTESIS

H₀: No existe diversidad genética en la colección de cebada del INIAP utilizando los 21 marcadores moleculares SSR seleccionados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material vegetal

Los 174 genotipos que comprenden las accesiones de variedades acriolladas y las variedades mejoradas se detallan en el anexo 1.

5.1.2. Material de laboratorio, reactivos, equipos

Todos los materiales de laboratorio, reactivos y equipos que se utilizaran para la germinación de las semillas de cebada, extracción, cuantificación y amplificación de ADN; como para la electroforesis se detallan en el (Anexo 2).

5.2.METODOLOGÍA

5.2.1. Ubicación del experimento

La caracterización molecular se realizará en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP.

5.2.2 Análisis estadístico

5.2.2.1 Diversidad genética

La diversidad genética se calculará mediante el índice de Nei (1973). Además se calcularán parámetros como frecuencias alélicas, número efectivo de alelos, heterocigosis.

5.2.2.2 Análisis de agrupamiento

Hay diferentes posibles medidas de “distancia genética” entre poblaciones. La más conocida es la distancia genética de Nei, que refleja el número de sustituciones nucleotídicas en el ADN. A partir de la matriz de distancias que se calcule, se construirá un dendrograma con el método de agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (UPGMA).

5.2.2.3 Análisis molecular de varianza

El análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) que determina la diferenciación genética entre poblaciones comprenderá las variedades mejoradas y las “acriolladas”, mientras que la diferenciación dentro de las poblaciones comprenderá las variedades “acriolladas”.

5.2.2.4 Métodos multivariados

Dentro de estos métodos se encuentra el Análisis de Coordenadas Principales (PCO), Este análisis permite ilustrar mejor los ejes principales de variabilidad entre los genotipos de cebadas, reflejando su ordenación en el espacio.

5.2.2.5 Identificación de genotipos duplicados

A partir de la matriz genotípica, que contiene las tallas de los alelos, se identificará los genotipos duplicados usando una diferencia de por lo menos un alelo para comparar las tallas.

5.2.3 Manejo específico del experimento

5.2.3.1 Preparación del material vegetal

Las semillas de cada uno de los genotipos que componen la colección se sembrarán en vasos de plástico que contengan sustrato a base de tierra y turba, se mantendrán en

condiciones de invernadero. La colecta de hojas se realizará a partir de plántulas de cerca de 10 cm en alrededor de 21 días después de su germinación.

5.2.3.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizará el protocolo descrito por Pallotta *et al.*,(2003) (Anexo 3).

5.2.3.3 Cuantificación de ADN

Para la cuantificación de ADN genómico de cebada se utilizará el espectrofotómetro para microplacas EPOCH™ de Biotek®

5.2.3.3 Validación de las muestras

Para validar las muestras de ADN obtenidas, se realizará una amplificación con marcadores microsatélite de cebada, se seguirá la metodología descrita por Morillo y Miño (2011).

Los productos de PCR se visualizarán mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% y posteriormente se realizará la tinción de los mismos en una solución de bromuro de etidio (15 ppm) por un periodo de tiempo de 15-20 minutos en agitación continua. Los geles se visualizarán en el fotodocumentador *Dolphin View Wealtec*

5.2.3.4 Amplificación de marcadores microsatélites con la técnica M-13 tailing para el genotipaje de cebada en el Analizador Genético LI-COR 4300

Para realizar la amplificación con microsatélites en el LI-COR 4300, se realizarán pruebas de amplificación con PCR multiplex, con el objeto de combinar los marcadores seleccionados, y se realizarán las corridas en el genotipador LI-COR 4300S

Las pruebas de multiplex consistirán en amplificar dos *primers* en una misma reacción PCR. Para seleccionar los *primers* de cada combinación se tomará en cuenta que éstos tengan una temperatura de alineamiento lo más similar posible, que exista una diferencia de al menos 30 pb en los productos amplificados y que la marcación de fluorescencia M13 sea la misma.

Una vez realizadas las combinaciones, se comenzará con las amplificaciones, utilizando el coctel correspondiente.

5.2.3.5 Genotipaje

Se probarán 21 *primers* microsatélites seleccionados en base a la información reportada por Ramsay *et al.*, (2000), Wang *et al.*, (2010), Chen *et al.*, (2012) y Brantestam *et al.*,

(2012) que corresponden a 3 marcadores por cromosoma seleccionados por su índice de polimorfismo PIC y secuencia motivo (Anexo 4). Se utilizará la metodología del M13-tailing que consiste en añadir a uno de los *primers* una secuencia M13 para marcar las moléculas por fluorescencia y detectarlas a través de dos canales de detección (en 700 y 800 nm), sistema adaptado al genotipador LI-COR 4300S (LI-COR Biosciences).

Para este análisis los productos de PCR se diluirán en Blue Stop, en proporción 1:3 respectivamente, luego se denaturará a 95°C por 5 minutos y rápidamente se pasará a hielo y se dejará reposar por 5 minutos, siempre cubriéndolas muestras de la luz. Se preparará un gel de poliacrilamida al 6.5%, para lo cual se empleará 20 ml de Gel Matrix KB Plus al 6.5% (827-05607, LI-COR), 150 µl Persulfato de Amonio (APS) al 10% y 15 µl de TEMED, esta solución se la colocará entre dos placas de vidrio, previamente lavadas con el detergente y con isopropanol, se proseguirá a colocar el peine y se dejará polimerizar por 1 hora. Posteriormente, se ensamblará la placa de poliacrilamida en el equipo LI-COR 4300, para la corrida electroforética se utilizará el tampón TBE 1x KB Plus LI-COR.

Se iniciará la pre-corrida por 25 minutos. Una vez que la placa polimerice y termine la pre-corrida se cargará 1 µl de cada muestra en cada uno de los pocillos del peine, en el orden preestablecido, además se cargará 0,5 µl de marcador de peso molecular IRDye. La corrida electroforética durará aproximadamente 2 horas a 1200 voltios. El análisis de la imagen del gel y genotipaje se realizará con el programa SAGAGT, se marcará cada banda que represente un alelo con una "x", al confirmar el genotipaje se generará un reporte que muestra las tallas de los alelos de cada locus SSR en pares de bases y las frecuencias alélicas en porcentaje.

5.2.3.5 Análisis de datos

El software SAGA GT-SSR es un asistente de lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR. La matriz de datos obtenidos de SAGA es importada a MICROSOFT EXCEL, donde se la depura de acuerdo a los motifs de cada locus y para los casos de no presentarse amplificación se considerará como datos perdidos. Esta matriz genotípica será la base para los análisis en los distintos programas estadísticos.

Para determinar los parámetros de diversidad genética se utilizará el programa InfoGen (Balzarini y Rienzo, 2004). Los parámetros del análisis de agrupamiento se calcularán en los programas Gen AlEx ver. 6 (Peakall y Smousse, 2005) y Power Marker versión 3.0 (Liu y Muse, 2005). Para realizar el PCO se utilizó el software NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002). La identificación de duplicados se realizará con el complemento de Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001).

6. CRONOGRAMA

	Actividad	2013									2014		
		ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ENE	FEB	MAR
A1	Revisión de Literatura												
A2	Preparación y presentación del anteproyecto												
A3	Extracción ADN de población en estudio												
A4	Cuantificación y Validación de ADN genómico												
A5	Validación de polimorfismo de los marcadores												
A6	Estandarización del genotipaje en LI-COR 4300S												
A7	Genotipaje de 21 SSR en LI-COR 4300S (corridas)												
A8	Registro de datos del LI-COR 4300S												
A9	Análisis estadístico e interpretación												
A10	Redacción de tesis												

7. PRESUPUESTO

FASE DE LABORATORIO				
<i>Extracción de ADN</i>				
Rubro	Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)
Extracción de ADN método convencional	Lote de 18 u.	49,91	10	499,10
Cuantificación de ADN (floreescencia)	Lote de 24 u.	12,61	8	100,88
<i>Validación de ADN</i>				
Rubro	Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)
Amplificación marcadores SSRs	Lote de 48 u.	21,64	4	85,56
Visualización marcadores SSRs	Lote de 24 u.	8,73	7	69,84
<i>Genotipaje de 84 SSR en LI-COR 4300S</i>				
Rubro	Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)
SSR-método M13 Tailing (LI-COR 4300S)	Lote de 48 u.	23,36	79	1845,44
Corrida SSR (LI-COR 4300S) 1-56	Lote de 56 u.	16,03	68	1090,04
Subtotal				\$ 3690,86
<i>Primers</i>				
Rubro	Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)
Síntesis de 21 <i>primers</i>	Unidad	75,00		1452,64
Subtotal				\$1452.64
MATERIAL DE OFICINA				
Rubro	Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)
Impresión y copias	Unidad	0,05	1400	70,00
Empastados	Unidad	30,00	5	150,00
CDs	Unidad	5,00	5	25,00
Suministros de oficina	Unidad	15,00	5	75,00
Subtotal				\$ 320,00
PERSONAL				
Rubro		Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)
Becario		400	12	4800
Subtotal				\$ 4800

PRESUPUESTO GLOBAL	
Rubro	Monto (USD)
Fase de Laboratorio	\$ 5143,50
Material de Oficina	\$ 320,00
Personal	\$ 4.800,00
Otros y viáticos	\$ 400,00
Subtotal	\$ 10.663,50
Imprevistos(4%)	\$426,54
TOTAL	\$ 11.090,04

FUENTE DE FINANCIAMIENTO	
INIAP	14%
SENESCYT	86%

8. BIBLIOGRAFÍA

- Balzarini, M., Di Rienzo, J. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Brantestam, A., Rashal, I., Tuveesson, S., Weibull, J., von Bothmer, R. 2012. Genetic profiles and diversity of baltic spring barley material. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, Vol. 66
- Castro, A., Viega, L., Pritsch, C., Hoffman, E., Hayes, P., Gomez, B. 2010. Caracterización genómica del germoplasma de cebada, por variables de calidad maltera, agronómicas y sanitarias. Universidad de la República de Uruguay.
- Chen, Z., Lu, R., Zou, L., Du, Z., Gao, R., He, T., Huang, J. 2012. Genetic diversity analysis of barley landraces and cultivars in the Shanghai region of China. Genet. Mol. Res. 11 (1): 644-650.
- Excoffier, L., Smousse, P., Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479-491
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2013. Producción de Cebada en Ecuador (en línea). Consultado 12 Sep. 2012. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
- Flavell, R., Bennett, M., Smith, J., Smith, D. 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. Biochem Genet 12:257-269
- Liu, K. y Muse, S. 2005. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics, 21(9), 2128-2129.
- Maestri, E., Malcevschi, A., Massari, A., Marmioli, N. 2002. Genomic analysis of cultivated barley (*Hordeum vulgare*) using sequence-tagged molecular markers. Estimates of divergence based on RFLP and PCR markers derived from stress responsive genes, and simple sequence repeats (SSRs). Molecular Genetics and Genomics, 267: 186-201
- Marcel, T., Varshney, R., Barbieri, M., Jafary, H., de Kock, M., Graner, A., Niks, R. 2007. A high-density consensus map of barley to compare the distribution of

- QTLs for partial resistance to *Puccinia hordei* and of defence gene homologues. *Theor Appl Genet* 114:487–500
- Matus, I., Hayes, P. 2002. Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45(6):1095-1106. [doi:10.1139/g02-071]
- Mohammadi, S., Prasanna, B. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants – salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43, 1235–1248
- Morgante, M., Olivieri, A. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182.
- Morillo, E., Miño, G. 2011. “Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP”. Manual No. 91 Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina. Quito. 126 p.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70: 3321-3323.
- Pallotta, M., Warner, P., Fox, R., Kuchel, H., Jefferies, S., Langridge, P. (2003). Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium (1-6 September, 2003, Paestum, Italy)* p.789-791.
- Peakall, R. y Smouse, P. 2005. *Gen AlEx 6: Genetic Analysis in Excel*. The Australian National University, Canberra, Australia
- Pillen, K., Binder, A., Kreuzkam, B., Ramsay, L., Waugh, R., Förster, J., León, J. 2000. Mapping new EMBL-derived barley microsatellites and their use in differentiating German barley cultivars. *Theoretical & Applied Genetics*, 101:652-660.
- Powell, W., Machray, G., Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1: 215–222
- Ramsay, L., Macaulay, M., Ivanishevich, D., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, KJ., Tuveesson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmiroli, N., Sjakste, T., Ganal, M., Powell, W., Waugh, R. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156:1997–2005
- Roder, MS., Plaschke, J., König, SU., Börner, A., Sorrells, E., Tanksley, SD., Ganal M. 1995. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Genet.* 246: 327-333.
- Rohlf, J. 2002. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1*. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America
- Slafer, G., Molina-Cano, J., Savin, R., Araus, J., Romagosa, L. 2002. *Barley Science: Recent Advances from Molecular Biology to Agronomy of Yield and Quality*. Food Products Press, An Imprint of The Haworth Press Inc., NY, USA.
- Struss, D., Plieske, J. 1998. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical & Applied Genetics*, 97:308-315.
- Varshney, RK., Marcel, TC., Ramsay, L., Russell, J., Roder, MS., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Nix, RE., Graner, A. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theoretical and Applied Genetics*, 114:1091-1103
- Varshney, RK.; Graner, A.; Sorrells, ME. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23:48-55.

- Wang, J., Yang, J., Zhu, J., Jia, Q., Tao, Y. 2010. Assessment of genetic diversity by simple sequence repeat markers among forty elite varieties in the germplasm for malting barley. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*
- Yahiaoui, S. 2006. La colección nuclear española de cebada: diversidad genética y potencial agronómico. Tesis Doctoral. Zaragoza. España. Universidad de Lleida. p 21.
- Zohary, D., Hopf, M. 1993. *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press / Clarendon Press, Oxford.

ANEXOS

Anexo 1. Información de los genotipos que forman parte del estudio

Tabla 1. Datos de las accesiones de cebada del Banco de Germoplasma del INIAP escogidas para este estudio

Nº	Accesión	Nombre común
1	ECU-11765	Cebada cervecera
2	ECU-11766	
3	ECU-11767	Cebada de dos filas
4	ECU-11768	Cebada pelada
5	ECU-11769	Cebada común
6	ECU-11770	Cebada chilena
7	ECU-11771	Cebada pelada
8	ECU-11772	Cebada común
9	ECU-11773	Cebada dorada
10	ECU-11774	Cebada terum y dorada
11	ECU-11775	Cebada pelada
12	ECU-11776	Cebada
13	ECU-11777	Cebada
14	ECU-11778	Cebada franciscana
15	ECU-11779	Cebada comuna
16	ECU-11780	Cebada terán
17	ECU-11781	Cebada dorada
18	ECU-11782	Santa Anita
19	ECU-11783	Cebada
20	ECU-11784	Cebada macho
21	ECU-11785	Cebada macho
22	ECU-11786	Cebada dorada
23	ECU-11787	Cebada de dos filas
24	ECU-11788	Cebada
25	ECU-11789	Cebada
26	ECU-11790	Cebada común
27	ECU-11791	Cebada dorada
28	ECU-11792	Cebada grande
29	ECU-11793	Cebada peluda
30	ECU-11794	Cebada Rita
31	ECU-11795	Cebada temprana
32	ECU-11796	-
33	ECU-11797	-
34	ECU-11798	-
35	ECU-11799	Cebada pelada
36	ECU-11800	Cebada pelada
37	ECU-11801	Trensilla
38	ECU-11802	Cebada
39	ECU-11803	Cebada
40	ECU-11804	Cebada
41	ECU-11805	Cebada

42	ECU-11806	Cebada
43	ECU-11807	Cebada
44	ECU-11808	Cebada
45	ECU-11809	Cebada
46	ECU-11811	Cebada chilena
47	ECU-11812	Cebada
48	ECU-11813	Cebada
49	ECU-11814	Cebada
50	ECU-11815	Cebada
51	ECU-11816	Cebada
52	ECU-11817	Cebada Rita
53	ECU-11818	Cebada
54	ECU-11973	Cebada

Tabla2. Datos de las variedades de cebada de la prospección realizada en el Austro ecuatoriano y en la provincia de Imbabura.

N°	Accesión	Nombre Común
1	CJ001	Cebada
2	CJ002	Cebada cervecera
3	CJ003	Cebada pelada
4	CJ004	Cebada
5	CJ005	Cebada
6	CJ006	Cebada peruana
7	CJ007	Cebada
8	CJ008	Cebada
9	CJ009	Cebada
10	CJ010	Cebada pelada
11	CJ011	Cebada común
12	CJ012	Cebada Terán
13	CJ013	Cebada cervecera
14	CJ014	Cebada
15	CJ015	Cebada
16	CJ016	Cebada común
17	CJ017	Cebada
18	CJ018	Cebada
19	CJ019	Cebada pequeña
20	CJ020	Cebada trencilla
21	CJ021	Cebada
22	CJ022	Cebada trencilla
23	CJ023	Cebada
24	CJ024	Cebada
25	CT001	Cebada
26	CT002	Cebada
27	CT003	Cebada
28	CT004	Cebada

Tabla3. Datos de las variedades de la colección nacional de cebada del Programa de Cereales

Nº	Código del estudio	Código de la Variedad
1	CPC-001	CN V-1
2	CPC-002	CN V-2
3	CPC-003	CN V-3
4	CPC-004	CN V-4
5	CPC-005	CN V-5
6	CPC-006	CN V-11
7	CPC-007	CN V-12
8	CPC-008	CN V-13
9	CPC-009	CN V-14
10	CPC-010	CN V-15
11	CPC-011	CN V-16
12	CPC-012	CN V-17
13	CPC-013	CN V-18
14	CPC-014	CN V-19
15	CPC-015	CN V-20
16	CPC-016	CN V-21
17	CPC-017	CN V-22
18	CPC-018	CN V-23
19	CPC-019	CN V-24
20	CPC-020	CN V-25
21	CPC-021	CN V-26
22	CPC-022	CN V-27
23	CPC-023	CN V-28
24	CPC-024	CN V-29
25	CPC-025	CN V-30
26	CPC-026	CN V-31
27	CPC-027	CN V-32
28	CPC-028	CN V-33
29	CPC-029	CN V-34
30	CPC-030	CN V-35
31	CPC-031	CN V-36
32	CPC-032	CN V-37
33	CPC-033	CN V-38
34	CPC-034	CN V-39
35	CPC-035	CN V-40
36	CPC-036	CN V-41
37	CPC-037	CN V-42
38	CPC-038	CN V-43
39	CPC-039	CN V-44
40	CPC-040	CN V-45
41	CPC-041	CN V-46
42	CPC-042	CN V-47
43	CPC-043	CN V-48

44	CPC-044	CN V-49
45	CPC-045	CN V-50
46	CPC-046	CN V-51
47	CPC-047	CN V-6
48	CPC-048	CN V-7
49	CPC-049	CN V-8
50	CPC-050	CN V-9
51	CPC-051	CN V-10
52	CPC-052	CN V-52

Tabla 4. Datos de las variedades de cebada correspondientes a líneas promisorias en evaluación,

Nº	Código del estudio	Código de la Variedad
1	CLP-001	VP V-1
2	CLP-002	VP V-2
3	CLP-003	VP V-3
4	CLP-004	VP V-6
5	CLP-005	VP V-7
6	CLP-006	VP V-8
7	CLP-007	VP V-9
8	CLP-008	VP V-10
9	CLP-009	VP V-11
10	CLP-010	VP V-12
11	CLP-011	VP V-13
12	CCO-017	CORPOICA

Tabla5. Datos de las variedades de cebada de la feria de semillas organizada por el Programa de Cereales en Alausí en el año 2012.

Nº	Código de variedad
1	CCU1-S1
2	CCU2-S2
3	CCU3-S3
4	CCU4-S4
5	CCU5-S5
6	CCU6-S6
7	CCU7-S7
8	CCU8-S8
9	CCU9-S9
10	CCU10-S10
11	CCU11-S11
12	CCU12-S12
13	CCU13-S13
14	CCU14-S14
15	CCU15-S15
16	CCU16-S16
17	CCU17-S17

18	CCU18-S18
19	CCU19-S19
20	CCU20-S20
21	CCU21-S21
22	CCU22-S22
23	CCU23-S23

Anexo 2: Materiales de Laboratorio a utilizarse en la presente investigación

Equipos

Cámara de flujo laminar vertical	Vórtex
Autoclave	DNA Analyzer LI-COR 4300S
Termociclador	Foto documentador
Cámara de electroforesis horizontal	Microcentrífuga
Incubadora Baño María	Centrífuga de placas
Agitador Shaker	Máquina de hielo
Micropipetas	Micropipeta Hammlton
Refrigeradora	Espectrofotómetro de microplacas EPOCH™
Horno microondas	Balanza
Termobloque	Sellador de placas

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN de cebada(Pallotta *et al.*, 2003)

1. Preparar y macerar el tejido
 - 1.1. El tejido fresco es colectado en tubos estériles y mantenido a -80°C. Las muestras son maceradas en frío.
 - 1.2. El tejido es colectado en tubos estériles que contienen 0.25g de silica gel. Las muestras se secan a temperatura ambiente y luego son maceradas.
2. Precalentar el buffer de extracción a 65°C

Buffer de extracción (0.1M Tris-HCl pH 7.5, 0.05M EDTA pH 8.0, 1.25% SDS)

3. Añadir 500 µl del buffer de extracción a cada tubo, agitar vigorosamente. Incubar los tubos a 65°C por 30 minutos a 1 hora.
4. Enfriar los tubos a temperatura ambiente antes de añadir 250 µl de acetato de amonio 6M, el cual es almacenado a 4°C. agitar vigorosamente y dejar reposar los tubos a 4°C por 15 minutos.
5. Centrifugar los tubos a 5000 rpm por 15 minutos para separar las proteínas precipitadas y el tejido vegetal
6. Añadir a 600µl del sobrenadante 360µl de isopropanol. Agitar los nuevos tubos y dejar precipitar el ADN a -20°C por al menos 1 hora.
7. Centrifugar los tubos por 15 minutos a 5000 rpm para la formación del pellet de ADN y luego separar el sobrenadante. Secar los tubos por inversión sobre papel con cuidado de no perder el pellet de ADN
8. Lavar el pellet en 1000µl de etanol 70%
9. Centrifugar los tubos por 20 minutos a 5000 rpm y descartar el sobrenadante.
10. Repetir los pasos 8 y 9.
11. Lavar el pellet con 1000 µl de etanol 95%
12. Centrifugar los tubos por 20 minutos a 5000 rpm y descartar el sobrenadante.
13. Dejar secar los tubos por inversión por toda la noche.
14. Resuspender el pellet en 100µl de buffer TE 0.1M

4. Lista de los 21 marcadores microsatélite que se usarán en este estudio.

Primer Name	Cromosome	Position cM	Sequence		Motif	PIC	SIZE
Bmac0399	1H	28.86	Forward Sequence (5' -> 3')	CGATGCTTTACTATGAGAGGT	(AC)21	0.72	145
			Reverse Sequence (5' -> 3')	GGGTCTGAAGCCTGAAC			
Bmac213	1H	30.81	Forward Sequence (5' -> 3')	ATGGATGCAAGACCAAAC	(AC)23	nd	168
			Reverse Sequence (5' -> 3')	CTATGAGAGGTAGAGCAGCC			
EBmac0501	1H	64.84	Forward Sequence (5' -> 3')	ACTTAAGTGCCATGCAAAG	(AC)13	0,93	151
			Reverse Sequence (5' -> 3')	AGGGACAAAAATGGCTAAG			
Bmac0134	2H	10.87	Forward Sequence (5' -> 3')	CCAAGTGGATCGATCTCG	(AC)28	0.76	148
			Reverse Sequence (5' -> 3')	CTTCGTTGCTTCTCTACCTT			
Bmag0692	2H	46.23	Forward Sequence (5' -> 3')	GCAAGGTATCTCTGTATTTTG	(CT)19	0.72	182
			Reverse Sequence (5' -> 3')	TGGCATCTACAATCTAAAACA			
Bmag0125	2H	30.97	Forward Sequence (5' -> 3')	TCCAGCCGACAATTTCTTG	(GA)13	0,77	114
			Reverse Sequence (5' -> 3')	AGTACTCCGACACCACGTCC			
Bmag603	3H	54.55	Forward Sequence (5' -> 3')	ATACCATGATACATCACATCG	(AG)24	0.78	120
			Reverse Sequence (5' -> 3')	GGGGGTATGTACGACTAATA			
Bmac0209	3H	52.39	Forward Sequence (5' -> 3')	CTAGCAACTTCCCAACCGAC	(AC)13	0,64	176
			Reverse Sequence (5' -> 3')	ATGCCTGTGTGTGGACCAT			
Bmag0853	3H	144.10	Forward Sequence (5' -> 3')	ACAAGTATCCTGCAAACCTAA	(GA)15	0,64	183
			Reverse Sequence (5' -> 3')	CGACCTTCTTAATGGTTAGTG			
Bmag0384	4H	57.50	Forward Sequence (5' -> 3')	TGTGAGTAGTTCACCATAGACC	(AG)18	0.76	116
			Reverse Sequence (5' -> 3')	TGCCATTATCATTGTATTGAA			
EBmac0701	4H	96.17	Forward Sequence (5' -> 3')	ATGATGAGAACTCTCACCC	(AC)23	0.74	149
			Reverse Sequence (5' -> 3')	TGGCACTAAAGCAAAGAC			

EBmac0679	4H	94.50	Forward Sequence (5' -> 3')	ATTGGAGCGGATTAGGAT	(AC)22	0,8	148
			Reverse Sequence (5' -> 3')	CCCTATGTCATGTAGGAGATG			
Bmag0223	5H	86.88	Forward Sequence (5' -> 3')	TTAGTCACCCTCAACGGT	(AG)16	0.82	127
			Reverse Sequence (5' -> 3')	CCCCTAACTGCTGTGATG			
scssr02306	5H	6.13	Forward Sequence (5' -> 3')	TGCCTTGTTTATGTAATATCTTG	(AT)6 (CA)7	0.67	
			Reverse Sequence (5' -> 3')	GGCGTAAATAAGAGTGTCTTCAG			
Bmac0303	5H	53.10	Forward Sequence (5' -> 3')	CCTCCAAGATTAGATCTCTCTC	(AG)13(AC)21	0.68	138
			Reverse Sequence (5' -> 3')	CCGTATATTTAAGAAATGGTGA			
Bmac0040	6H	113.19	Forward Sequence (5' -> 3')	AGCCCGATCAGATTTACG	(AC)20	0.89	236
			Reverse Sequence (5' -> 3')	TTCTCCCTTTGGTCCTTG			
Bmac0316	6H	7.16	Forward Sequence (5' -> 3')	ATGGTAGAGGTCCCAACTG	(AC)19	0.69	135
			Reverse Sequence (5' -> 3')	ATCACTGCTGTGCCTAGC			
Bmac0127	6H	62.27	Forward Sequence (5' -> 3')	AACTATGTCCAGTCGTTCC	(AC)26	0,83	118
			Reverse Sequence (5' -> 3')	CTTGTCGTATCATCTTATTCAGA			
Bmag0007	7H	20.62	Forward Sequence (5' -> 3')	TGAAGGAAGAATAAACAACCAACA	(AG)16(AC)16	0.76	185
			Reverse Sequence (5' -> 3')	TCCCCTATTAAGTGACGGTGTG			
Bmag0217	7H	79.06	Forward Sequence (5' -> 3')	AATGCTCAAATATCTATCATGAA	(AG)19	0,69	196
			Reverse Sequence (5' -> 3')	GGGGCTGTCACAAGTATATAG			
Bmag0135	7H	147.51	Forward Sequence (5' -> 3')	ACGAAAGAGTTACAACGGATA	(AG)10GG(AG)12	0,87	161
			Reverse Sequence (5' -> 3')	GTTTACCACAGATCTACAGGTG			