

INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Diciembre 2012

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Departamento Nacional de Biotecnología

Programa Nacional de Cereales

PROYECTO: Desarrollo e innovación biotecnológica

para la potenciación de rubros agrícolas de importancia en seguridad alimentaria, competitividad exportable y adaptación al cambio climático (CODIGO SENESCYT

PIC-12-INIAP001)"

ACTIVIDAD: Identificación y mapeo de QTLs/genes de

resistencia a la roya amarilla y fusarium de la espiga de trigo a través de técnicas demapeo por asociación utilizando marcadores polimórficos en un solo nucleótido (SNPs) y microsatélites (SSRs)

SUBACTIVIDAD: Caracterización molecular de 297 genotipos

de trigo provenientes del CIMMYTpara

inferir su estructura genética

UBICACION: Estación Experimental Santa Catalina

AUTOR: Egdo. Miguel Eduardo Márquez Carrillo

COAUTORES: Dr. Eduardo Morillo/ Ing. Esteban Falconí

COLABORADORES: Programa Nacional de Cereales

FECHA DE INICIO: Julio2012

FECHA DE TERMINACIÓN: Diciembre 2013

PRESUPUESTO: \$ 25172,00

FUENTE DE FINANCIAMIENTO: SENESCYT 78.16% - INIAP21. 84%

1. ANTECEDENTES

Entre las plantas que proporcionan alimento para los seres humanos y los animales, uno de los más antiguos y más extendidos es el trigo (*Triticum aestivum L.*) (Paux *et ál.* 2008), después del arroz, es el principal alimento de consumo humano a nivel global(FAO, 2012), la producción mundial reportada en el 2010 por la FAO, alcanzó 653 654.525 toneladas. Actualmente, China es el mayor productor de trigo ya que aporta con el 17,62% de la producción global (FAO, 2012). En el Ecuador, el consumo per cápita y las importaciones han aumentado (CIMMYT, 2012) y para cubrir esta demanda, se importa el 98,45% de este cereal (INEC, 2011).

Históricamente en 1969 el país produjo 67.300 toneladas de trigo. Sin embargo, este cultivo se ha caracterizado por una constante disminución en el volumen, la misma que en el 2010 llegó a 7.605 toneladas (FAO, 2012). Esto se debe a que el cultivo es afectado por una serie de enfermedades y por problemas abióticos (Afonso y Perera, 2010). En el Ecuador, la roya amarilla (*Pucciniastriiformis f. sp.tritici*) y la fusariosis de la espiga producida por (*Fusarium graminearum*) son las mayores enfermedades del cultivo de trigo (Nuñez, 2010).

Las royas son hongos biotrofos que constituyen el grupo patógeno más importante en cereales ya que se presentan con frecuencia y provocan pérdidas (Gilchristet ál, 2006). Roelfset ál, (1992) mencionan: las pérdidas de rendimientos por granos arrugados y macollos dañados alcanzan el 50%, por otro lado las pérdidas de rendimiento causadas por Fusarium graminearum en variedades susceptibles pueden llegar al 50%, cuando existe precipitaciones frecuentes, temperatura ambiental de 25°C y humedad relativa ambiente superior al 85% durante la etapa de espigazón o floración de los cultivares (Bragachini, et ál.2012).

El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), a través del Programa Nacional de Cereales (PNC), es la institución encargada del desarrollo de nuevas variedades de trigo en Ecuador(Rivadeneira, 2005). El INIAP a partir de la evaluación en sus estaciones experimentales, del trigo de primavera proveniente del CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo) determina las líneas que presentan las mejores características de rendimiento, resistencia a enfermedades y adaptación a los sitios de producción en el país, éstas son empleadas por el PNC para el desarrollo de nuevas líneas o poblaciones de trigo. Sin embargo, el conocimiento del germoplasma en base a su respuesta fenotípica no es suficiente para el desarrollo eficiente de poblaciones mejoradas.

Consecuentemente, se necesita conocer el germoplasma a nivel genotípico, para ello se utilizan técnicas biotecnológicas como la caracterización molecular (Azofeifa, 2006) la cual pretende diferenciar los genotipos de una colección utilizando marcadores moleculares (Li, 2003). Para este tipo de estudios los más utilizados son los microsatélites (SSR) ya que son altamente reproducibles entre laboratorios, no requieren

alta concentración y calidad de ADN, son de base genética codominante y permiten detectar todos los alelos de un *locus*. (Mathias, 2007).

A partir de la caracterización molecular, la inferencia de la estructura de la población es uno de los métodos que permite agrupar una colección de germoplasma de trigo, en subpoblaciones con características genéticas comunes entre sí, mediante el uso de datos genotípicos provenientes de distintos *loci*, asociados a genes de resistencia a enfermedades. Según, (Pritchard, *et ál.* 2000) esta información, permite al litomejoradoragrupar a individuos/líneas en distintas subpoblaciones, o conocer si dichos individuos/líneas comparten genoma común de dos o más subpoblaciones para asídiseñar un bloque de cruzamientos, que involucren líneas distantes genéticamente para crear grupos heterocigóticos (Azofeifa 2006). Adicionalmente, el inferir la estructura genética de una población permite contar con datos necesarios para realizar estudios de genética de asociación, como por ejemplo: mapeo por desequilibrio de ligamiento ó mapeo por asociación (Falush, *et ál*, 2003).

En mejoramiento genético, la estimación de los componentes de varianza y la predicción de los valores genéticos son aspectos claves en el análisis genéticocuantitativo de características de importancia, los cuales pueden ser abordados por medio de métodos bayesianos. Tales procedimientos son utilizados para determinar las distribuciones marginales a *posteriori* de los parámetros, dando paso a la aplicación algoritmos que convergen a tales densidades marginales. La metodología bayesiana es considerada una herramienta importante en la evaluación genética, ya que lleva en consideración la variabilidad existente en todos los parámetros del modelo, en el sentido de que es posible caracterizarlos a través de la moda, mediana o el promedio de la distribución a *posteriori* (Mora 2007).

Respecto a estudios anteriores en trigo, Dreisigackeret ál, (2010) realizaron un estudio de la estructura de una población de trigo del CIMMYT diseminada durante 25 años a partir de ESWYT (Elite Spring WheatYield Trial), la colección comprendía 606 líneas avanzadas de trigo de primavera, ésta fue analizada con 83 marcadores DArT (DiversityArraysTechnology) distribuidos por todo el genoma, los datos fueron analizados por el programa STRUCTURE (Pritchard, et ál, 2000) dando un resultado de cinco subpoblaciones. Al ser un trabajo muy similar al que se pretende realizar, nos da una pauta acerca de posibles resultados. Paraletamente, se estánrealizando estudios de la estructura poblacional utilizando otro tipo de marcadores denominados SNPs (Polimorfismos de nucleótido único) (Falconí E. comunicación personal). Estos marcadores son muy abundantes en la secuencia de ADN por ende idóneos para determinar el genotipo de una población obteniendo así un gran número de marcadores útiles para mapeo genético, genética de poblaciones, y estudios de asociación (Ravel. 2006).

Los 297 genotiposhan sido seleccionados bajo algunos criterios técnicos, desarrollados por varios años por fitomejoradores del CIMMYT:

3

- 1. Variación en la reacción a enfermedades como fusarium de la espiga, Roya del tallo y roya amarilla (resistencia-susceptibilidad). En una población de mapeo por asociación o en una población biparental (mapeo tradicional), es necesariocontar con líneas con reacciones contrastantes a la enfermedad. Estas han sido evaluadas en diferentes ambientes durante varios años.
- 2. Pedigrí complejo (diversidad genética dentro de las colecciones de CIMMYT es una manera empírica de selección, pero muy válida).
- 3. Presentan adaptación a zonas ecuatoriales. Esta es una característica típica en germoplasma CIMMYT.
- 4. Poca variabilidad en días de floración (florecen entre 70-90 días después de la siembra). Este es un criterio muy importante, ya que se trata de minimizar la varianza que puede generar la exposición de la planta a más o menos días en campo.(Falconí E., comunicación personal,)

2. JUSTIFICACIÓN

El Ecuador importa cerca del 90% del trigo que consume el paísdebido a la baja producción interna del cereal, causada entre otros factores, por la susceptibilidad que presentan las variedades a problemas fitosanitarios como la roya amarilla (Pucciniastriiformis f. sp.tritici) y la fusariosis de la espiga (Fusarium graminearum)tornándose en un problema de interés nacional; razón por la cual instituciones como el INIAP desarrolla nuevas variedades de trigo, con resistencia a enfermedades y alto rendimiento, ya que es la manera más eficiente de mejorar la productividad del cultivo en Ecuador.

En la actualidad una de lasherramientas biotecnológicas más eficientes para desarrollar variedades mejoradas, es utilizar la técnica del mapeo por asociación, que permite al investigador detectar QTLs (*Quantitative Trait Loci*-locus de un carácter cuantitativo) que confieran resistencia a las enfermedades antes mencionadas. Cuando se incluye a la estructura de la población en el análisis de asociaciónentre marcadores y QTLs, solo se tomarán en consideración aquellas asociaciones muy fuertes, que indican que se tendrá alta confiabilidad de que el marcador está cerca del QTL.

Por éstas razones el Programa Nacional de Cereales y el Departamento Nacional de Biotecnología han propuesto esta investigación para disponer de información de la caracterización molecular de la colección de 297 genotipos de trigo e inferir su estructura genética, como estudio previo a la identificación de QTLs para la resistencia a la roya amarilla y fusariosis de la espiga en este germoplasma utilizando la técnica de mapeo por asociación.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Caracterizar molecularmente 297 genotipos de trigo provenientes del CIMMYTpara inferir su estructura genética

3.2. ESPECIFICOS:

- Realizar el genotipaje de 297 genotipos de trigo con al menos 50 marcadores microsatélites mapeados utilizando la tecnología M13-Tailing en el LI-COR 4300S.
- 2. Inferir estructura poblacional utilizando métodos estadísticos bayesianos.
- Correlacionar los resultados obtenidos con la estructura obtenida a partir de marcadores SNPs en la misma población con los resultados obtenidos del genotipaje con marcadores SSRs.

4. HIPÓTESIS

Ho. La población en estudio no está estructurada genéticamentea nivel de 50 marcadores SSR mapeados

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

- **5.1.1. Material vegetal:** Colección CIMMYT de 297 genotipos de trigo de primavera (Anexo 1).
- **5.1.2.** Laboratorio: Los materiales a ser usados en el laboratorio se encuentran detalladosa continuación:

5.1.2.1. Equipos

- Cámara de flujo laminar vertical
- Autoclave
- Termociclador
- Cámara de electroforesis horizontal
- Foto documentador

- Microcentrífuga
- Baño María
- Vórtex
- DNA Analyzer LI-COR4300

5.1.2.2. Material de Laboratorio

- Micro pipetasTubos Eppendorf
- Placas PCR

- Probetas
- Erlenmeyer
- Gradillas

5.1.2.3. Reactivos

- Etanol 75%
- Etanol 100%
- Isopropanol
- Alcohol Isoamílico
- Taq polimerasa
- dNTPs
- Agua ultra pura
- Cloroformo
- Agarosa

- Tris Base
- Cloruro de Sodio
- Blue Juice 10X
- CTAB
- PVP
- NaCl
- EDTA
- LowMassLadder
- 100 bpDNA Ladder

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Características del laboratorio

La presente investigación se llevará a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP, en la Estación Experimental Santa Catalina, ubicada en la Panamericana Sur Km I parroquia Cutuglagua, cantón Mejía. Pichincha, Ecuador.

5.2.1.1. Características geográficas y ambientales del sitio experimental.¹

Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía

Parroquia: Cutuglagua
Altitud: 3058 msnm

 Longitud:
 78°33′14″ Ceste

 Latitud:
 0°22′00″ Sur

Humedad Relativa: 79.63%

Temperatura promedio anual: 12.38°C

Precipitación promedio anual: 1430 mm

¹Datos proporcionados por la Estación Meteorológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2010

5.2.2. Fase experimental

5.2.2.1. Factores en estudio

Se analizarán 297 genotipos de trigo (Ver Anexo1). Esta colección posee ejemplares que a partir de observación fenotípica, presentan susceptibilidad y resistencia confirmada a roya amarilla y fusarium del tallo, mismas que vamos a utilizar como controles, además de poseer líneas mejoradas.

5.2.2.2. Análisis de Datos

Los 297 genotipos serán visualizados con el analizador de ADN LI-COR, el cual mediante el software SAGA GT-SSR,que es un asistente de lectura de imágenes, proporcionará datos del tamaño de los fragmentos amplificados con cada marcador SSRs. La matriz de datos obtenidos de SAGA GT-SSR se exportará a EXCEL, posteriormente se realizará la inferencia de la estructura de las poblaciones mediante el uso de procedimientos estadísticos o matemáticos, como son: Análisis de Coordenadas Principales (PCO) o modelos bayesianos.

La asignación de los genotipos a poblaciones predeterminadas, se realizará con el programa *Structure* desarrollado por (Pritchardet ál, 2000), este software utiliza metodologías de agrupación y asignación poblacional basadas en algoritmos de agrupamiento Bayesianos. El teorema de Bayes, expresa la probabilidad condicional de que un evento aleatorio "A" suceda después de un evento dado "B" (Molinero, 2002). El programa*Structure*(Pritchardet ál., 2000), basado en el método mencionado, asume un modelo de K subpoblaciones (que para la presente investigación, se considerarán entre 1 a 5), cada una caracterizada por un set de frecuencias de alelos para cada locus. Los individuos en la muestra son asignados probabilísticamente a dichas subpoblaciones, o asignados a dos o más subpoblaciones en función de las similitud de sus genotipos (Martínez-Castillo et ál., 2007).

Para la realización de los análisis, se utilizará la opción Admixture Model. Esta opción genera valores más reales cuando una población noestá claramente definida (Pritchardet ál., 2000). El concepto de población que utiliza Structureno está basado en el origengeográfico, sino en la frecuencia de alelos que presenten lasmuestras, este programa es bastante útil cuando las poblaciones no están discretamente distribuidas y por lo tanto no tienen una estructura genética definida (Evanno et ál., 2005)

Los métodos factoriales como el Análisis de Coordenadas Principales (PCO) tienen por objetivo detectar estructuras fuertes en una población desprendiéndose en lo posible de los efectos individuales. La PCO es una

técnica de análisis multivariado que permite detectar los ejes mayores de variación. Este método es homólogo al análisis de Componentes Principales pero aplicado no a datos derivados de observación sino a una matriz de similitud de estas observaciones entre los individuos analizados.Para el análisis PCO se utilizará el software NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002).

Adicionalmente, para la correlación de datos obtenidos a partir del genotipaje con SNPs vs. SSRs, se realizara un test de Mantel que consiste en probar la significancia de la correlación entre dos o más matrices por una permutación que permite obtener la distribución empírica del coeficiente de correlación (Mantel, 1967). Para realizar el test de Mantel de utilizará el programa ARLEQUIN ver. 2.000.

5.2.3. Manejo específico del experimento

5.2.3.1. Preparación del material vegetal

Se sembrarán en invernadero, dos semillas de cada una de los 297 genotipos de trigo, en bandejas de 128 pocillos con turba, luego de 20 días se obtendrán plántulas de aproximadamente 10 cm.

La siembra se realizará en lotes, cada semana se sembraran 64 genotipos, y se harán dos repeticiones para tener respaldos del material vegetal

5.2.3.2. Extracción de ADN

Se utilizará el propuesto por (Ferreira y Grattapaglia, 1998) modificado por (Pazmiño, 2012), ver Anexo 2.

5.2.3.3. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizará mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v), aplicando el marcador de talla y peso LowMassLadder marca Invitrogen Catálogo Nº10068-013. Las condiciones de la corrida electroforética serán de un voltaje de 100V en un tiempo de 30-35 min. Posteriormente, se realizará la tinción de los geles en una solución de Bromuro de Etidio a una concentración de 15 ppm por un periodo de tiempo de 15-20 min en agitación continua. Los geles se visualizarán en el foto documentador Dolphin View Wealtec (Anexo 3).

Adicionalmente, para las muestras que no se logre cuantificar con precisión con el método cualitativo, se realizará la cuantificación por fluorometría utilizando el equipo denominado QUBITTM (Anexo 4) para posteriormente

diluir los ADN obtenidos a una concentración determinada y prepararlos para el método de amplificación por PCR (Morillo y Miño, 2010).

5.2.3.4. Validación de las muestras

Con el objetivo de verificar que el ADN extraído se encuentra en condiciones adecuadas para la amplificación de los marcadores moleculares, se realizara la validación de las muestras mediante PCR propuesta por Vinueza (2011). Los productos de PCR serán visualizados 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 unfotodocumentador Dolphin View Wealtec.

5.2.3.5. Amplificación con Microsatélitesmediante la técnica M-13 tailing para genotipaje en el Analizador Genético LI-COR 4300

Se realizará laamplificación con microsatélites en el LI-COR 4300, para lo cual se diseñarálas pruebas de duplexaje correspondientes, para realizar la mayor cantidad de combinaciones de *primers* posibles. Las pruebas de duplexaje consisten en agrupar a los *primers* por temperatura de alineamiento similar, y que adicionalmente produzcan síntesis de fragmentos con diferentes tamaños. El LI-COR 4300 trabaja a 700 y 800 nm. por lo que se verificará la longitud de onda adecuada para los *primers* en estudio

5.2.3.6. Genotipaje

Para este análisis los productos de PCR se diluiránen *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. La información requerida para la corrida electroforética se ingresará en el programa SAGAGT-SSR, esta información incluye las tallas del marcador de peso molecular IRDye 700 u 800 nm, rango de tamaño esperado, marcaje

y combinaciones de los *loci*SSR y los nombres de las muestras a genotiparse, así como, su posición en el gel. Posteriormente, se creará un gel donde se especifique en que pocillo se encuentra cada muestra, el marcador de peso molecular y el locus o dúplex de *loci* que seempleará.

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 durara 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.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

	A CURTATURA A					_					N	1ES							
	ACTIVIDAD	part	2	3	d.	5	6	77	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Al	Revisión de Literatura											1							
A2	Preparación y presentación del anteproyecto																		
A3	Entrenamiento en laboratorio		-																
A4	Validación de polimorfismo de primers SSR		7-838 (-184)																5 to and
A5	Extracción ADN de población en estudio																		
A6	Validación ADN extraído								= \\	-15									
A7	Estandarización del genotipaje en LI-COR 4300S con primers seleccionados									Andrew State of the State of th									
A8	Genotipaje de 84 SSR en LI- COR 4300S (corridas)											:							
A9	Registro de datos del LI-COR 4300S																		
A10	Análisisestadísticos																		
All	Redacción de tesis																		

7. PRESUPUESTO

Tabla N°. 1. Presupuesto de Tesis

FASE DE LABORATOR	OI						
		E	xtracción de AL)N			
Rubro		Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)	Contraparte INIAP (USD)	
Extracción de ADN mé convencional	todo	Lote de 18 u.	32,90	17	559,30	289,17	
Cuantificación de ADN (florescencia)		Lote de 24 u.	4,55	13	59,15	104,78	
		\overline{V}	alidación de AL	DN .			
Rubro		Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)	Contraparte (USD)	
Amplificación marcadores SSRs		Lote de 48 u.	12,76	7	89,32	62.16	
Visualización marcadores SSRs		Lote de 24 u.	4,09	13	53,17	60.32	
	G	^l enotipaje	de 84 SSR en LI	-COR 4300S			
Rubro		Unidad	Costo (USD)	Cantidad	Monto (USD)	(USD)	
SSR-método M13 Tailing COR 4300S)	(LI-	Lote de 48 u.	14,17	310	4392,70	2848,9	
Corrida SSR (LI-COR 430 1-56)0S)	Lote de 56 u.	8,01	266	2130,66	2133,32	
Subtotal					7284,30	5498,65	
			Primers				
Rubro	U	nidad	Costo (USD)	Cantidad	Moi	ito (USD)	
Síntesis de 84primers	U	Inidad	75,00	84	6300,00		
Subtotal					6	300,00	
MATERIAL DE OFICII	VA_	,					
Rubro		Unidad	Costo (USD)	Cantidad		ito (USD)	
Impresión y copias		Unidad	0,05	1400		70,00	
Empastados		Unidad Unidad	30.00	5		150,00	
CDs			5,00	5		25,00	
Suministros de oficina		Unidad	15,00	5	75,00		
Subtotal						320,00	
PERSONAL							
Rubro		Co	sto (USD)	Cantidad	Mol	nto (USD)	
Becario			400	12	·	4800	
Subtotal					-	4800	

Tabla N° . 2.Presupuesto Global

PRESUPUESTO GLOBAL	
Rubro	Monto (USD)
Fase de Laboratorio	19082.95
Material de Oficina	320,00
Personal	4800,00
Subtotal	\$ 24.202,95
Imprevistos(4%)	968,12
TOTAL	\$ 25.172,00

Fuente de financiamiento

Fuente	USD	Porcentaje (%)
SENACYT	19673,35	78,16%
INIAP	5498,65	21,84%

8. BIBLIOGRAFIA CITADA

- Afonso, D. y Perera, S. 2010. *Plagas y enfermedades en el cultivo de Trigo.* Recuperado el 26 de Sep. de 2012, de Servicio Tecnico de Agricultura y Desarrollo Rural, Tenerife
 - España:http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/otro_263_T_PLA_E NFER_TRIGO 2010.pdf
- Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del tropico. Agronomia Mesoamericana 17(2) 221-242
- Bragachini, M., Von Martini, A., y Méndez, A. 2012. Regulación de la cosechadora en trigos con fuerte ataque de Fusarium. Recuperado el 4 de Oct. de 2012, de Regulando su cosechadora para Fusarium. Deere&Company: http://www.deere.com/wps/dcom/es_LA
- Centro Internacional de Mejoramieto de Maiz y Trigo "CIMMYT". 2012. El resurgimiento del trigo en Ecuador . Recuperado el 2012 de Octubre de 5, de http://www.cimmyt.org/es/boletin/231-2010/872-ecuadors-wheat-awakening
- Dreisigacker, S. Shewayrga, H. Crossa, J.et ál. 2010. Genetic structures of the CIMMYT international yield trial targeted to irrigated environments. Mol Breeding (2012) 29:529–541
- Evanno, G. Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology: 14:74–75.
- Falush, D. Stephens, M. y Pritchard, J. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data:Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. Genetics 164: 1567–1587
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. Brasil: EMBRAPA-CENARGEN. 1 ed.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations "FAO". 2012. *Producción de Trigo en Ecuador*. Recuperado el 2012 de Septiembre de 25, de FAOSTAT: http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#ancor
- Gilchrist, L. Matínez, C. Duveiller, E. y García, I. 2006. Guía Práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. México: AlmaMc.Nab. 2ed.pag 19,21
- Instituto Nacional de Estadistica y Censos "INEC". 2011. Boletin Agropecuario Mensual Septiembre. Recuperado el 27 de Diciembre de 2012, de Ecuador en cifras:http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/pdfs/agro14.pdf
- Li, Y-C. Fahima, T.Röder, M. Kirzhner, V. et ál. 2003. Genetic effects on microsatellite diversity in wild emmer wheat (Triticum dicoccoides) at the Yehudiyya microsite, Israel. Heredity (2003) 90, 150–156.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res 27:209-220.
- Martínez-Castillo, J. Zizumbo-Villarreal, D. y Gepts, P. 2007. Structure and Genetic Diversity of Wild Populations of Lima Bean from the Yucatan Peninsula. Mexico. Crop Science: 46, 1071–1080.
- Mathias, M. Sagredo, B y Kalazich, J.2007. Uso de marcadores SSR para identificación de germoplasma de papa en el programa de mejoramiento de INIA de Chile. Agricultura Técnica (Chile) 67(1):3-15.
- Molinero, L. 2002. *El método bayesiano en la investigación médica*. Asociación de la sociedad Española de Hipertencion. Recuperado el 27 de Diciembre de 2012, de SEH-LELHA: http://www.seh-lelha.org/bayes1.htm#TOP

- Mora, F. Perret, S. 2007. Aplicación de técnicas bayesianas en el análisis genético de árboles forestales. Bosque 28(3): 198-206, 2007
- Morillo, E. y Miño, G. 2010. Protocolos de marcadores moleculares. Quito-Ecuador: Departamento Nacional deBiotecnología, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Nuñez, M. 2010. Caracterización del sistema de producción de Trigo (Triticum aestivum L.) en las provincias de Chimborazo y Bolívar. Riobamba-Ecuador: Escuela Superior Politécnica el Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales. Tesis 78p
- Paux, E. Sourdille, P. Salse, J. et ál. 2008. A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. Science 322, 101-104
- Pazmiño, S. 2012. Evaluación de la respuesta del germoplasma de trigo (Triticum aestivum L.) del INIAP a la aplicación de dos métodos biotecnológicos para la obtención y selección de plantas resistentes a roya amarilla. Quito-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida.
- Pritchard, J. Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data*. Genetics 155: 945–959.
- Ravel, C. Praud, S. Murigneux, A. et ál. 2006. Single-nucleotide polymorphism frequency in aset of selected lines of bread wheat (Triticumaestivum L.). Genome 49: 1131–1139
- Rohlf, J. 2002. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. 1:20
- Rivadeneira, M. 2005. *Inventario Tecnológico del Programa de Cereales*. Quito-Ecuador: Programa de Cereales, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.
- Roelfs, A. Singh.R. y Saari, E. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. México, D.F.: CIMMYT. 81 pp.
- Vinueza, R. (2011). Validación de Protocolos para la amplificación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a Roya Amarilla de Trigo. Quito-Ecuador: Universidad de los Hemisferios.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Genealogía de la colección de 297 genotipos de Trigo del CIMMYT

CLAVE: I= Inmune

R= Resistente

MR= Moderadamente Resistente MS= Moderadamente Susceptible

S= Susceptible

ENTRAD A	PEDIGRÍ	REACCIÓN A ROYA ²
1	CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/7/KRONSTAD F2004	MS
7	TUKURU//BAV92/RAYON*2/3/PVN	MR
3	PBW343*2/KUKUNA*2//FRTL/PIFED	R
4	FRET2/TUKURU//FRET2/3/MUNIA/CHTO//AMSEL/4/FRET2/TUKURU//FRET2	MR
5	ROLF07*2/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
6	WBLL1*2/4/BABAX/LR42//BABAX/3/BABAX/LR42//BABAX	R
7	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/MURGA	MR
8	WBLL1*2/CHAPIO*2//MURGA	R
9	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES/5/REH/HARE//2*BCN/3/CROC_I/AE.SQUARROSA (213)//PGO/4/HUITES/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	I
10	ATTILA*2/PBW65*2//W485/HD29	S
11	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/CROC_1/AE.SQUARROSA (224)//KULIN/3/WESTONIA	MS
12	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUTTES/5/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/3/SASIA/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUTTES	R
13	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/GONDO/TNMU	MR

Elinformación tomada de libros de campo de la Estación Experimental Santa Catalina 2011

14	MUNAL#I/FRANCOLIN#I	S
15	PFAU/SERI.1B//AMAD/3/WAXWING/4/BABAX/LR42//BABAX*2/3/KURUKU	R
16	BECARD/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
17	TRCH/6/HPO/TAN//VEE/3/2*PGO/4/MILAN/5/SSERH	R
18	TRCH/KBIRD	MS
19	ROLF07/MUU	MS
20	PBW343*2/KUKUNA/3/PGO/SERI//BAV92	R
21	NAC/TH.AC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/2*PASTOR/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	I
22	YAV 3/SCO//JO69/CRA/3/YAV79/4/AE.SQUARROSA (498)/5/LINE 1073/6/KAUZ*2/4/CAR//KAL/BB/3/NAC/5/KAUZ/7/KRONSTAD F2004/8/KAUZ/PASTOR//PBW343	R
23	WAXWING/4/BL 1496/MILAN/3/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/5/FRNCLN	MS
24	WAXWING*2/HEILO	R
25	KIRITA'TI/4/2*BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES	S
26	KZA//WH 542/2*PASTOR/5/BAV92/3/OASIS/SKAUZ//4*BCN/4/PASTOR	S
27	KFA/5/2*KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	I
28	QUAIU#1	R
29	PASTOR//HXL7573/2*BAU/3/WBLL1	R
30	KLDR/PEWIT1//MILAN/DUCULA	MS
31	PUB94.15.1.12/FRTL	R
32	FRET2*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ*2/5/BOW/URES//2*WEAVER/3/CROC_1/AE.SQUARROSA (213)//PGO	I
33	ATTILA*2/PBW65//WBLL1*2/VIVITSI	R
34	ALTAR 84/AE.SQUARROSA (221)//3*BORL95/3/URES/JUN//KAUZ/4/WBLL1/5/REH/HARE//2*BCN/3/CROC_1/AE.SQUARROSA (213)//PGO/4/HUITES	R
35	MURGA//WAXWING/KIRITATI	R
36	MURGA/KRONSTAD F2004	I
37	ATTILA*2/PBW65//MURGA	S
38	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES/6/ALD/CEP75630//CEP75234/PT7219/3/BUC/BJY/4/CBRD/5/TNMU/PF85487	R
39	WBLL1*2/CHAPIO//HEILO	R
40	WBLL1*2/CHAPIO//HEILO	R
41	WAXWING*2/4/BOW/NKT//CBRD/3/CBRD	MR

42	ROLF07*2/3/PRINIA/PASTOR/HUTTES	MS
43	ROLF07*2/4/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//BORL95/3/2*MILAN	R
44	WBLL1*2/KUKUNA/5/PSN/BOW//SERI/3/MILAN/4/ATTILA/6/WBLL1*2/KKTS	I
45	WAXWING*2/DIAMONDBIRD	R
46	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/MILAN/KAUZ//CHIL/CHUM18	R
47	BAV92//IRENA/KAUZ/3/IIUITES*2/4/PVN	MR
48	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/TNMU	MR
49	WBLL1/DIAMONDBIRD//WBLL1*2/VIVITSI	MR
50	CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/7/YANAC/8/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR	MR
51	CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/7/KIRITATI/8/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR	R
52	CS/TH.SC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/URES/JUN//KAUZ/5/HUITES/6/YANAC/7/CS/TH.SC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/MILAN/5/TILHI	R
53	FINSI/METSO//FH6-1-7/3/FINSI/METSO	R
54	INQALAB 91*2/KUKUNA*2//PVN	I
55	UP2338*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ/5/MILAN/KAUZ//CHIL/CHUM18/6/UP2338*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ	R
56	UP2338*2/KKTS*2//YANAC	MS
57	WAXWING/2*ROLF07	MR
58	WBLL1*2/5/CNO79//PF70354/MUS/3/PASTOR/4/BAV92	R
59	ATTILA*2/PBW65*2//MURGA	R
60	WBLL1/FRET2//PASTOR*2/3/MURGA	R
61	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES/5/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//BORL95/3/2*MILAN/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
62	CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/7/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//BORI.95/3/2*MILAN/8/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR	R
63	ROLF07*2/4/CROC_1/AE.SQUARROSA (224)//KULIN/3/WESTONIA	MR
64	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES*2/5/CHUM18/BORL95//CBRD	MR
65	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES/5/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/3/SASIA/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	I
66	CAL/NH//H567.71/3/SER//4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR*2/7/CNDO/R143//ENTE/MEXI_2/3/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER/5/2*PASTOR	R
67	ATTILA*2/PBW65*2/4/BOW/NKT//CBRD/3/CBRD	R

68	BAV92//IRUNA/KAUZ/3/HUTTES/4/FN/2*PASTOR/5/BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUTH S	MS
69	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUTTES/4/FN/2*PASTOR/5/BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUTTES	MR
70	ROLF07*2/4/BOW/NKT//CBRD/3/CBRD	R
71	WBLL1/4/BOW/NKT//CBRD/3/CBRD/5/WBLL1*2/TUKURU	MS
72	WBLL1*2/4/YACO/PBW65/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ*2/5/GONDO	MR
73	PFAU/WEAVER*2//BRAMBLING/3/KAUZ//TRAP#1/BOW/4/PFAU/WEAVER*2//BRAMBLING	S
74	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES*2/5/CHIL/CHUM18	1
75	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES*2/5/CHIL/CHUM18	1
76	CAL/NII//II567.71/3/SERI/4/CAL/NII//II567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/7/ACIITAR*3//KANZ/KS85-8- 4/8/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR	I
77	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/YUNMAI 47	MR
78	WAXWING/KIRITATI*2/3/C80.1/3*BATAVIA//2*WBLL1	S
79	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/WHEAR	S
80	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES*2/5/WHEAR	R
81	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUTTES/5/C80.1/3*BATAVIA//2*WBLL1/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUTTES	1
82	CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/7/WHEAR/8/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR	R
83	FRNCLN/BFCARD	MR
84	PAURAQ/3/KIRITATI//PRL/2*PASTOR	MS
85	QUAIU/5/FRET2*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ	MR
86	BECARD/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
87	FRANCOLIN #1/5/HE1/3*CNO79//2*SERJ/3/ATTILA/4/WH 542	R
88	FRNCLN/3/PGO/SERI//BAV92	R
89	TRCH/6/HPO/TAN//VEE/3/2*PGO/4/MILAN/5/SSERI1	R
90	QUAIU/3/PGO/SERI//BAV92	I
91	KBIRD//WBLL1*2/KURUKU	S
92	KBIRD/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	1
93	WAXWING/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ/5/PGO//CROC_1/AF.SQUARROSA (224)/3/2*BORI 95/4/CIRCUS	S
94	WAXWING/4/SNETRAP#U3/KAUZ*2/TRAP/KAUZ/5/PGO/SERI/BAV92	MR
95	PBW343*2/KUKUNA/3/PGO/SERI//BAV92	R

96	WBITT*2/BRAMBITNG TN*2*PASTOR	-1 $-S_{-}$
97	QUAIU #3//MILAN/AMSEL	1
98	ATTILA*2/PBW65//MUU #1/3/FRANCOLIN #1	MS
99	ATTILA*2/PBW65*2//TOBA97/PASTOR	MS
100	WBLL1*2/VIVITSI//PRINIA/PASTOR/3/WBLL1*2/BRAMBLING	MR
101	CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/7/REH/HARE//2*BCN/3/CROC_1/AE.SQUARROSA (213)//PGO/4/HUITES/8/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	MS
102	MUU #1//PBW343*2/KUKUNA/3/MUU	S
103	WBLL1*2/KURUKU/6/CNDO/R143//ENTE/MEXI_2/3/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER/5/2*JANZ/7/WBLL1*2/KURUKU	S
104	TÜKURÜ//BAV92/RAYON*2/7/YAV_3/SCÖ//JŌ69/CRA/3/YAV79/4/AE.SQUARROSA (498)/5/LINE 1073/6/KAUZ*2/4/CAR//KAL/BB/3/NAC/5/KAUZ	MR
105	NG8675/CBRD//FN/2*PASTOR/4/THELIN/3/2*BABAX/LR42//BABAX	I
106	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUTTES/4/GONDO/TNMU/5/BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUTTES	MR
107	CONI#1/6/2*HPO/TAN//VFF/3/2*PGO/4/MILAN/5/SSERII	R
108	PGO/SERI//BAV92/3/2*WAXWING	R
109	KBIRD//WH 542/2*PASTOR/3/WBLL1*2/BRAMBLING	MR
110	MUU/5/TRAP#1/BOW/3/VEF/PJN//2*TU1/4/BAV92/RAYON/6/MILAN/S87230//BAV92	MS
111	KFA/3/PFAU/WEAVER//BRAMBLING/4/PFAU/WEAVER*2//BRAMBLING	MS
112	ATTILA*2/PBW65//KRONSTAD F2004	R
113	WBLL1*2/TUKURU//KRONSTAD F2004	MS
114	CHIL/CHUM18//GONDO	I
115	WBLL1*2/KUKUNA//KIRITATI/3/WBLL1*2/KUKUNA	MR
116	NORM/WBLL1//WBLL1/3/TNMU/4/WBLL1*2/TUKURU	I
117	PBW343*2/KIIVAKI*2//YANAC	MR
118	FRANCOLIN #1/4/BABAX/LR42//BABAX*2/3/KURUKU	MR
119	PANDORA//WBLI 1*2/BRAMBLING	MR
120	WBLL1*2/BRAMBLING//JUCHI	MS
121	WBLL1*2/KKTS//KBIRD	MR
122	TACUPETO Γ2001/WBLL1*2/KKTS/3/WBLL1*2/BRAMBLING	MR
123	WBLL1/KUKUNA//TACUPETO F2001/3/KRONSTAD F2004/4/ROLF07	MS

124	ATULA*2/PBW65*2/5/REH/HARE#/2*BCN/3/CROC_L/AE.SQUARROSA (213)//PGO/4/HUITES	MR
125	HEILO/7/IVAN/6/SABUF/5/BCN/4/RABI//GS/CRA/3/AE.SQUARROSA (190)/8/VORB/FISCAL	R
126	KSW/7/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR/8/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/PASTOR	S
127	KAUZ/PASTOR//PBW343/3/KRONSTAD F2004	MS
128	REH/HARE//2*BCN/3/CROC_1/AE.SQUARROSA (213)//PGO/4/HUITES/5/KRONSTAD F2004	S
129	PRL/2*PASTOR//VORB	MR
130	TRCH*2/3/WUH1/VEE#5//CBRD	R
131	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MH.AN/KAUZ/4/HUTTES/5/SHA3/SERI//SHA4/LIRA/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUTTES	R
132	PBW343/PASTOR*2/6/TURACO/5/CHIR3/4/SIREN//ALTAR 84/AE.SQUARROSA (205)/3/3*BUC	R
133	WBLL1*2/BRAMBLING/4/BABAX/LR42//BABAX*2/3/KURUKU	R
134	FRANCOLIN #1/KIRITATI	S
135	BABAX/LR42//BABAX*2/3/KUKUNA/4/TAM200/PASTOR//TOBA97	MR
136	MURGA/KRONSTAD F2004//QUAIU #3	S
137	KENYA NYANGUMI/3/2*KAUZ/PASTOR//PBW343	R
138	PARUS/PASTOR//INQALAB 91*2/KUKUNA	R
139	CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/3/SASIA/4/TROST	R
140	CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/3/SASIA/4/TROST	R
141	PFAU/MILAN//SOVA/3/PBW65/2*SERI.1B	R
142	PASTOR/KAUZ/6/CNDO/R143//ENTE/MEX1_2/3/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER/5/2*KAUZ	R
143	PASTOR/3/VORONA/CNO79//KAUZ/4/MILAN/OTUS//ATTILA/3*BCN	R
144	PASTOR/3/VORONA/CNO79//KAUZ/4/MILAN/OTUS//ATTILA/3*BCN	MR
145	CHIBIA/WEAVER/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUTTES	R
146	CHIBIA/WEAVER/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	MR
147	PRINIA/PASTOR//HUITES/3/MILAN/OTUS//ATTILA/3*BCN	
148	C80.1/3*BATAVIA//2*WBLL1/3/TOBA97/PASTOR	R
149	WHEAR/3/PBW343/PASTOR//ATTILA/3*BCN	R
150	PBW343/HUITES/3/MILAN/OTUS//ATTILA/3*BCN	R
151	WBLL1*2/KURUKU//KRONSTAD F2004	MR
152	WBLL1*2/TUKURU//KRONSTAD F2004	MR

153	PBW 343*2 KUKUNA: PBW345*2 KUKUNA: 3/PBW343	1
154	WHEAR/2*KRONSTAD F2004	S
155	C80.1/3*BATAVIA//2*WBLL1/3/2*KRONSTAD F2004	S
156	C80.1/3*BATAVIA//2*WBLL1/3/2*KRONSTAD F2004	S
157	SUMAI #3	S
158	GAMENYA	S
159	FALCIN/AE.SQUARROSA (312)/3/THB/CEP7780//SHA4/LIRA	MS
160	GONDO/CBRD	R
161	HEILO	MS
162	PICUS/3/KAUZ*2/BOW//KAUZ/4/KKTS/5/HEILO	1
163	HPO/TAN//VEE/3/2*PGO/4/MILAN/5/SSERH/6/GONDO	R
164	HPO/TAN//VEE/3/2*PGO/4/MILAN/5/SSERH/6/GONDO	R
165	KAUZ/mazar 99//PBW343/3/HEILO	I
166	FRET2/WBI L1//TACUPETO F2001/3/HEILO	R
167	WBLI 1*2/4/YACO/PBW65/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ/5/GONDO	R
168	WBLL1*2/CHAPIO//HEJLO	R
169	WBLLI*2/KURUKU//HEILO	R
170	WBLL1*2/KURUKU//HEILO	R
171	WBLL1*2/VIVITSI//GONDO	MR
172	ATTILA/2*mazar 99//FN/2*mazar 99	S
173	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES/5/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/3/SASIA/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
174	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES/5/CROC_1/AF.SQUARROSA (205)//KAUZ/3/SASIA/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	1
175	CAL/NII//II567.71/3/SERI/4/CAL/NH//II567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99*2/7/CNDO/R143//ENTE/MEXI_2/3/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER/5/2*mazar 99	MS
176	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/GONDO/TNMU	R
177	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES*2/4/GONDO/TNMU	MR
178	FRET2*2/KUKUNA*2//SHA4/CHIL	S
179	WBLL1*2/KURUKU*2//TNMU	MR
180	WBLL1*2/TUKURU//WUH1/BOW/3/WBLL1*2/TUKURU	S

INIAP - Estación Experimental Santa Catalina

181	WBL1.1/FRLT2//mazar 99*2/3/GONDO	R
182	PFAU/WEAVER*2//BRAMBLING/7/IVAN/6/SABUF/5/BCN/4/RABI//GS/CRA/3/AE.SQUARROSA (190)/8/PFAU/WEAVER//BRAMBLING	R
183	TRCII*2/TNMU	R
184	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES*2/5/CHIL/CHUM18	R
185	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES*2/5/CHIL/CHUM18	1
186	CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99/7/TNMU/8/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99	R
187	PRINIA/PASTOR//CHIL/CHUM18/3/PRINIA/PASTOR	R
188	PBW343*2/KHVAKI*2//CHIL/CHUM18	MR
189	PBW343/mazar 99*2/6/TURACO/5/CHIR3/4/SIREN//ALTAR 84/AE.SQUARROSA (205)/3/3*BUC	MR
190	PBW343/mazar 99*2/3/WUH1/VEE#5//CBRD	R
191	PBW343/mazar 99*2/3/WUHI/VEE#5//CBRD	R
192	PBW343/mazar 99*2/3/WUH1/VEE#5//CBRD	R
193	NG8675/CBRD/7/IVAN/6/SABUF/5/BCN/4/RABI//GS/CRA/3/AE.SQUARROSA (190)/8/WBLL1*2/CHAPIO	MS
194	NG8675/CBRD/7/IVAN/6/SABUF/5/BCN/4/RABI//GS/CRA/3/AE.SQUARROSA (190)/8/WBLL1*2/CHAPIO	R
195	SHA3/CBRD//TNMU/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/ITUITES	R
196	FN/2*mazar 99//GONDO/TNMU/3/FRANCOLIN #1	R
197	HEILO//GONDO/TNMU/3/WBLL1*2/BRAMBLING	MR
198	CBRD/FILIN	ì
199	CBRD/FILIN	R
200	CHIL/CHUM18//GONDO	R
201	CAL/NH//H567,71/3/SER1/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99/7/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/3/ATTILA/8/CAL/NH//H567.71/3/SER1/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99	MS
202	WAXWING/KIRITATI*2/3/SHA3/SERI//SHA4/LIRA	MR
203	CNO79//PF70354/MUS/3/PASTOR/4/BAV92*2/5/SHA3/SERI//SHA4/LIRA	R
204	FRET2/TUKURU//FRET2/3/WUH1/VEE#5//CBRD/4/FRET2/TUKURU//FRET2	R
205	WBLL1/FRET2//mazar 99/3/SHA3/SERI//SHA4/LIRA/4/WBLL1/TACUPETO F2001//mazar 99	R
206	PFAU/WEAVER*2//BRAMBLING/7/IVAN/6/SABUF/5/BCN/4/RABI//GS/CRA/3/AE.SQUARROSA (190)/8/PFAU/WEAVER//BRAMBLING	S
207	PFAU/WEAVER//BRAMBLING*2/3/SHA3/SERI//SHA4/LIRA	S
208	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES/5/SHA3/SERI//SHA4/LIRA/6/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R

209	PRINTA PASTOR/CHIL CHUMI83/PRINTA/PASTOR	R
210	KETUPAY 2/mazar 99/6/TURACO/5/CHIR3//ESIREN/ALTAR 84/AE.SQUARROSA (205)/3/3*BUC/7/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUTES	R
211	CHII /CHUM18//FN/2*mazar 99/3/PRL/2*mazar 99	R
212	CHIL/CHUM18//GONDO/3/WBLL1*2/KURUKU	MR
213	SHA3/CBRD//TNMU/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	MR
214	FN/2*mazar 99//GONDO/TNMU/3/FRANCOLIN #1	R
215	NG8675/CBRD//FN/2*mazar 99/4/THELIN/3/2*BABAX/LR42//BABAX	R
216	HEILO/7/IVAN/6/SABUF/5/BCN/4/RABI//GS/CRA/3/AE.SQUARROSA (190)/8/VORB/FISCAL	R
217	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES/4/DOLL	S
218	TRCH/SRTU/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
219	PRI/2*mazar 99//SRTU/3/PRINIA/PASTOR	R
220	WAXWING*2/3/PASTOR//HXL7573/2*BAU	R
221	ATTILA*2/PBW65*2//TNMU	MR
222	SERLIB//KAUZ/HEVO/3/AMAD*2/4/KIRITATI	R
223	WBLL1*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MIL.AN/KAUZ/4/IIUITES	R
224	WBLL1*2/4/YACO/PBW65/3/KAUZ*2/FRAP//KAUZ/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
225	FRET2*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ/5/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/HUITES	R
226	FRET2*2/KUKUNA//PRINIA/PASTOR	I
227	FRET2/KIRITATI/5/NAC/TH.AC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/2*mazar 99	MR
228	FRET2/KIRITATI/5/NAC/TH.AC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/2*mazar 99	MR
229	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/7/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99	I
230	KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/MILAN/KAUZ/4/OTUS/TOBA97	S
231	CAL/NH//H567.71/3/SLRI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99/7/KAUZ/mazar 99//PBW343	MR
232	NG8675/CBRD//MILAN/7/CAL/NH//H567.71/3/SERI/4/CAL/NH//H567.71/5/2*KAUZ/6/mazar 99/8/CNDO/R1-13//ENTE/MEXI_2/3/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WFAVER/5/2*mazar 99	MR
233	ATTILA/3*BCN//BAV92/3/TILHI/4/SHA7/VEL#5//ARIV92	R
234	ATTILA/3*BCN//BAV92/3/TILHI/4/SHA7/VEE#5//ARIV92	R
235	BABAX/KS93U76/BABAX/3/ATTILA/3*BCN//TOBA97/4/WBLL1*2/KURUKU	R
236	ATTILA*2/PBW65//KRONSTAD F2004	MS

237	KANZ*4/KS85-8-4//2*WBLL1*2/KURUKU	MR
238	FRET2/KUKUNA//FRET2/3/PASTOR//HXL7573/2*BAU/5/FRET2*2/4/SNI/TRAP#1/3/KAUZ*2/TRAP//KAUZ	MR
239	PRL/2*mazar 99//PARUS/5/NAC/TILAC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/2*mazar 99	MS
240	WAXWING*2/JUCHI	MS
241	FUNDACEP 30	S
242	SHANGHAI#8	S
243	VOROBEY	MR
244	CPI8/GEDIZ/3/GOO//ALB/CRA/4/AE.SQUARROSA (208)/5/HAHN/2*WEAVER/6/SKAUZ/BAV92	R
245	CPI8/GEDIZ/3/GOO//ALB/CRA/4/AE.SQUARROSA (208)/5/IIAHN/2*WEAVER/6/SKAUZ/BAV92	R
246	CPI8/GEDIZ/3/GOO//ALB/CRA/4/AE.SQUARROSA (208)/5/HAHN/2*WEAVER/6/SKAUZ/BAV92	R
247	NING MAI 96035/FINSI//HEILO	R
248	NING MAI 96035/FINSI//HEILO	R
249	ATTILA/HEILO	R
250	ATTILA/HEILO	R
251	WAXWING//PFAU/WEAVER	MS
252	BABAX/LR42//BABAX*2/3/KURUKU	R
253	ND643//2*PRL/2*mazar 99	MS
254	VOROBEY	MR
255	BABAX/LR42//BABAX/3/ER2000	R
256	OASIS//TC14/2*SPER/3/ATTILA/4/WBLL4	MR
257	FILIN/3/CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//KAUZ/4/FILIN/5/VEF/MJI//2*TUI/3/mazar 99	R
258	T.DICOCCON PI94625/AE.SQUARROSA (372)//3*PASTOR	R
259	PASTOR/4/WEAVER/TSC//WEAVER/3/WEAVER/5/URES/PRI//BAV92	R
260	SW94.2690/SUNCO	R
261	SW94.2690/SUNCO	MR
262	VEE/MJI//2*TUI/3/mazar 99/4/BERKUT	MR
263	BERKUT/3/ATTILA*2//CHIL/BUC	MR
264	TAN//TEMPORALERA M 87/AGR/3/TRET2/4/URES.PRL//BAV92	R
265	A93324S.7197.29/4/KAUZ//ALTAR 84/AOS/3/KAUZ/5/PASTOR	R

266	OASIS TC112*SPLR 3/ATTILA 19.ATTILA*2 9.KTBAGETENTO BZAGTERM 5/M DAN 6 SERE7.VEL*10/8/OPATA	R
267	MEX94.27.1.20/3/SOKOLL//ATHLA/3*BCN	R
268	KS82W418/SPN//WBLL1/3/BERKUT	R
269	CNDO/R143//ENTE/MEXI75/3/AE.SQ/4/2*FCT/5/KAUZ*2/YACO//KAUZ/6/BERKUT	R
270	SOKOLL/EXCALIBUR	MR
271	PASTOR/SLVS//FRAME	R
272	PASTOR/SLVS//FRAME	MR
273	BAXTER*2/4/CHEN/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)//BCN/3/BAV92	MS
274	BERKUT/3/ALTAR 84/AE.SQUARROSA (219)//SERI	MR
275	MILAN/DUCULA//SUNCO/2*PASTOR	MS
276	SW89-5124*2/FASAN//PARUS/PASTOR	MS
277	SOKOLI.//SUNCO/2*PASTOR	MR
278	CROC_1/AE.SQUARROSA (224)//OPATA/3/ALTAR 84/AE.SQ//2*OPATA	R
279	SUNSTATE/SD 3195//SOKOLL	R
280	SOKOLL*2/GLE	MR
281	TEMPORALERA M 87/ROMO96/3/ATTILA/BAV92//mazar 99/4/PRL/2*mazar 99	MR
282	FINSI/3/ATTILA/BAV92//PASTOR/4/PBW343*2/KUKUNA	R
283	CO99W329/2*BERKUT	MS
284	PSN/BOW//MILAN/3/2*BERKUT	R
285	CROC_1/AE.SQUARROSA (224)//OPATA/3/RAC655/4/SLVS/PASTOR	MR
286	SLVS/PASTOR/3/mazar 99//MUNIA/ALTAR 84	R
287	YAV79//DACK/RABI/3/SNIPE/4/AE.SQUARROSA (460)/5/2*EXCALIBUR/6/VEE/LJRA//BOW/3/BCN/4/KAUZ	R
288	CNDO/R143//ENTE/MEXI_2/3/AEGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER/5/2*JANZ/6/D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA (320)/3/CUNNINGHAM	S
289	CROC_1/AE.SQUARROSA (205)//BORL95/3/KENNEDY/6/CNDO/R143//ENTL/MEXL_2/3/ALGILOPS SQUARROSA (TAUS)/4/WEAVER/5/2*JANZ	S
290	D67.2/P66.270//AE.SQUARROSA (320)/3/CUNNINGHAM/4/PASTOR/SLVS	S
291	CALINGIRI/SOKOLI	R
292	SOKOLL//SLVS/PASTOR.3/ATTILA*2/CHIL/BUC	S
293	BERKUT/HTG	MR

INIAP - Estación Experimental Santa Catalina

294	SOKOLI/TRAMI	MS
295	SOKOLI/SLVS	R
296	ASTREB*2/NING MAI 9558	MR
297	ASTREB*2/3/WUH1/VEE#5//CBRD	MR

ANEXO 2: Extracción de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998)modificado por (Pazmiño, 2012).

- 1. Colocar muestras de tejido foliar en un tubo Eppendorf
- 2. Añadir 500 µL del buffer de extracción sobre la muestra
- 3. Realizar la extrusión mecánica del tejido con un pistilo, hasta obtener una pasta verdosa
- 4. Adicionar 200 μL más del buffer de extracción
- 5. Incubar en baño maría a 65 °C por 60 minutos.
- 6. Posteriormente centrifugar a 1300 rpm por 10 minutos.
- 7. El sobrenadante es transferido a nuevos tubos.
- 8. En la cámara de gases, se coloca un volumen similar al sobrenadante de C.I.A. 24·1.
- 9. Agitar por inversión durante 5 min.
- 10. La mezcla obtenida, centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos
- 11. Extraer la fase acuosa (fase superior) cuidadosamente a un nuevo tubo Eppendorf
- 12. Repetir la adición de CIA y la centrifugación
- 13. Adicionar (2/3 del volumen extraído) de isopropanol a -20°C.
- 14. Mezclar por inversión
- 15. Almacenar las muestras a -4°C toda la noche.
- 16. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 min.
- 17. Descartar el sobrenadante
- 18. Agregar 500 μL de etanol al 70% a -20°C
- 19. Centrifugar 5 min a velocidad máxima
- 20. Eliminar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente por 2 horas
- 21. Suspender el ADN con *buffer* TE, mediante la incubación en baño maría por 5 min. A 65°C.

22.

Soluci<mark>ones necesarias:</mark>

Buffer de extracción: 100 mM Tris HCl

20 mM EDTA 1.4 MNaCl 1 % PVP 1% CTAB

4% 2-mercaptoetanol

TE: 10 mM Tris HC1 1 mM EDTA, pH 8

ANEXO 3: Cuantificación de ADN en geles de agarosa

- 1. Ensamblar la cubeta de electroforesis
- 2. Preparar el gel de agarosa de acuerdo a la concentración y tamaño deseado
- 3. Preparar las muestras a cuantificar en un pedazo de Parafilm: 4 μl de DNA a cuantificar + 1 μl de *bluejuice*, mezclar bien y cargar 2 μl de esta mezcla en los pozos del gel.
- 4. Cargar en el primer pozo del gel 2 μl de DNA LowMassLadder(Invitrogen).
- 5. Correr a 50 100 V o 60 mA por 10 25 min.
- 6. Llevar a la cámara UV. focalizar bien la imagen (intensidad de luz y tiempo de exposición) e imprimir en papel térmico.
- 7. Cuantificar la concentración de ADN en ng/μl comparando la intensidad de sus bandas con respecto a las del marcador(Morillo y Miño, 2010)

ANEXO 4: Cuantificación de ADN por fluorometría

1. Para preparar el *buffe*r de cuantificación, utilizamos el siguiente cóctel:

1 x n μl de *Quant-it Reagent* 199 x n μl de *Quant-it Buffer*

- 2. Mezclar bien el mix de cuantificación.
- 3. En tubos Eppendorf de 60 μ l colocar 10 μ l de los estándares 0 ng/μ l y 100 ng/μ l, así como el ADN de las muestras a cuantificar, con las respectivas etiquetas.
- 4. Adicionar 190 μl del *buffer* de cuantificación a cada muestra, dar un vórtex y un punto de centrifuga y esperar 2 minutos antes de empezar a cuantificar. Las muestras deben permanecer siempre bajo oscuridad.
- 5. Una vez transcurrido el tiempo, empezar primero por la calibración del fluorímetro con los estándares 0 ng/μl y 100 ng/μl, seguidamente cuantificar las muestras de ADN.
- 6. El fluorímetro presenta dos tipos de lectura, la HS (ng/ml) y la BR (μg/ml).
- 7. Para calcular la concentración de las muestras, se usa la siguiente ecuación:

Concentración de la muestras = Valor QFx (200 / X)

Donde:

Valor QF= El valor dado por el fluorímetro

X= El volumen final de la muestra a cuantificar

8. Esta ecuación genera un resultado con las mismas unidades que son dadas por el fluorímetro (Morillo y Miño, 2010).

^{*}n es el número de muestras que se va a cuantificar en el fluorímetro