



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS**

ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA

FECHA DE PRESENTACIÓN: Septiembre 2010

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Programa de Cereales/Departamento Nacional de Biotecnología

PROYECTO: “Plan de recuperación y fomento del Cultivo de Trigo en Ecuador, mediante el desarrollo y producción de semillas con énfasis en difusión de variedades mejoradas, transferencia de tecnología y capacitación.”

ACTIVIDAD: **Obtención y selección de plantas doble haploides de trigo (*Triticum aestivum* L.) resistentes a roya amarilla.**

UBICACIÓN: Provincia: Pichincha
Cantón: Mejía
Parroquia: Cutuglagua

AUTORA: Egda. Verónica Salomé Pazmiño Ibarra

COAUTORA: Ing. Jacqueline Benítez (Dpto. Nacional de Biotecnología)

COLABORADORES: Dr. Eduardo Morillo (Dpto. Nacional de Biotecnología)

DURACIÓN: 12 meses

FECHA DE INICIO: 2010-09-01

FECHA DE TERMINACIÓN: 2011-09-31

PRESUPUESTO: USD \$ 6.268,27

FINANCIAMIENTO: INIAP (100%)

1. ANTECEDENTES

El trigo (*Triticum aestivum* L.) a nivel mundial es uno de los cereales más importantes en la dieta de la población debido a su aporte energético, así en el Ecuador el consumo nacional de este cereal per cápita es de 37.92 kg/persona/año (FAO, 2007). Sin embargo, la capacidad productiva (11.314 toneladas según la FAO, 2009) no satisface la demanda de consumo nacional y de sus derivados, convirtiéndose nuestro país en un importador de trigo (SIGAGRO, 2009).

Una de las posibles causas de la baja productividad son las enfermedades que atacan los cultivos durante todo el año, entre las que se encuentra la roya amarilla causada por el hongo *Puccinia striiformis f. sp. tritici* West. que disminuye el rendimiento hasta en un 96% (Ochoa *et al.*, 1997) y deteriora la calidad del grano (Huerta y Singh, citado Villaseñor *et al.*, 2009). Por lo cual, los investigadores han encaminado sus esfuerzos al desarrollo de nuevas variedades de trigo con buenas características agronómicas y resistentes a enfermedades mediante los programas de mejoramiento convencional.

Con este fin, el Programa de Cereales de la Estación Experimental Santa Catalina (E.E.S.C.) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en base a los datos del informe anual (2009) seleccionó poblaciones segregantes que poseen genes de resistencia a roya amarilla, conociendo que en el Ecuador los genes *Yr5*, *Yr15* y *Yr18* no presentan factores de virulencia para esta enfermedad (Ochoa *et al.*, 2007).

Sin embargo el mayor inconveniente del mejoramiento mediante retrocruzas se presentan por el largo periodo de tiempo, aproximadamente 10 años (Ramírez *et al.*, 2007, Polci *et al.*, 2005), que se necesita para producir una variedad mejorada por este método.

Una herramienta de apoyo a los métodos convencionales de mejoramiento es la utilización de técnicas biotecnológicas de fitomejoramiento como es el cultivo *in vitro*. Actualmente, las técnicas más utilizadas con este fin es la producción de plantas doble haploides (DH) por cultivo *in vitro* de anteras y/o por cruce intergenérico de trigo X maíz (Liu *et al.*, 2002, Polci *et al.*, 2005), con los cuales, se puede obtener líneas homocigotas en menor tiempo, ya que se evita varios ciclos de autofecundación para lograr homocigosis (Ramírez *et al.*, 2007, Polci *et al.*, 2005), ventaja que permite adicionalmente reducir costos, recursos y espacio (Polci *et al.*, 2005, Jobet *et al.*, 2003, CIAT, 1993).

Con el cultivo *in vitro* de anteras potencialmente cada microspora puede originar una planta (Bhojwani y Razdan, citado Polci *et al.*, 2005); esta capacidad depende de varios factores como el genotipo, las interacciones con el ambiente, la fase de desarrollo de las microsporas al iniciarse el cultivo y los reguladores de crecimiento suplementados al medio de cultivo (Ramírez *et al.*, 2007, CIAT, 1993).

La metodología descrita anteriormente se puede encaminar a la obtención de líneas homocigotas con características de resistencia utilizando poblaciones F_2 que son producto de las cruces de parentales que poseen los genes *Yr5* y *Yr15*, esta combinación da como resultado un alto nivel de resistencia debido a los efectos aditivos de los genes.

Por otro lado el gen *Yr18* que presenta resistencia a roya amarilla en planta adulta (McIntosh *et al.*, 1995).

La utilización de generaciones F_2 favorece la recombinación genética y permite realizar una selección de caracteres de interés antes de la producción de doble haploides (Jobet *et al.*, 2003).

En Argentina, se realizó una evaluación del cultivo *in vitro* de anteras, con el objetivo de obtener plantas doble haploides en cultivares argentinos de trigo harinero. Los resultados

más relevantes fueron con plantas que crecieron en campo, utilizando pre tratamiento con frío y en medio líquido suplementado con Ficoll. El porcentaje de callos embriogénicos formados fue en promedio de 9.93%, de plantas verdes regeneradas de 2.47% y un porcentaje de plantas albinas de 0.74%. Sin embargo cinco genotipos resultaron recalcitrantes (Polci *et al.*, 2005).

En un estudio realizado por Kondié *et al.* (2008) se seleccionaron aleatoriamente genotipos heterocigotos de trigo con el objetivo de estudiar la eficiencia de la producción espontánea de DH mediante cultivo *in vitro* de anteras. Los resultados incluyen la obtención de un 47.2% de callos y la regeneración de 582 plantas verdes a partir de 6.000 anteras cultivadas, de las cuales el 47.9% fueron doble haploides espontáneamente.

En su investigación Ramírez *et al.* (2007), obtuvieron mayor cantidad de callos embriogénicos y plantas verdes regeneradas cuando se trabajó con anteras de plantas que fueron cultivadas a cielo abierto y se determinó que la dosificación de ácido húmico previa a la recolección de las espigas incrementó de 3 a 5 veces la formación de callos embriogénicos y redujo el porcentaje de albinismo comparado con las plantas testigo.

Adicionalmente, el Programa de Cereales tiene en ejecución un estudio que incorpora herramientas moleculares utilizando Mejoramiento Genético Asistido con Marcadores Moleculares, para la selección de genotipos de interés, genotipos de trigo que presenten los genes *Yr5* y *Yr15* de resistencia a roya amarilla (Falconí, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Con el fin de superar el inconveniente del bajo rendimiento productivo en cultivos de trigo ecuatorianos por causa del hongo de *Puccinia striiformis f. sp. tritici* West causante de la enfermedad denominada "roya amarilla", existe la necesidad de obtener a corto plazo nuevas variedades de este cereal con mejoras genéticas que presenten resistencia a este hongo.

La obtención de genotipos doble haploides de trigo que contengan genes de resistencia a roya amarilla, facilitará en el futuro la generación de material genético élite que podrá funcionar como virtual material progenitor en el programa de mejoramiento y la posterior liberación de variedades de trigo con resistencia a roya amarilla.

La utilización de genotipos con genes piramidados es una estrategia efectiva para incrementar la durabilidad y la eficiencia de la resistencia a un patógeno, obteniendo líneas más estables. Esta estrategia se hace aún más eficiente si se añade el uso de marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia ya que se puede seleccionar únicamente los genotipos de interés, es decir aquellos que presenten los genes de resistencia.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtener plantas doble haploides de trigo (*Triticum aestivum* L.) y seleccionar plántulas resistentes a roya amarilla a partir de poblaciones F₂.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el estado fenológico de cada genotipo de trigo, en el que prevalezcan el mayor número de microsporas en etapa uninucleada en fase media a tardía.

- Evaluar la capacidad androgénica de los genotipos élite de trigo.
- Inducir la regeneración de plantas doble haploides de cada genotipo y población F₂ de trigo a partir de microcallos.
- Seleccionar plantas doble haploides dentro de poblaciones F₂ que posean genes de resistencia a roya amarilla mediante la utilización de marcadores moleculares ligados a los genes *Yr5* y *Yr15*.
- Realizar un comparación económica de la producción de líneas homocigóticas mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras vs. los programas de mejoramiento convencional.

4. HIPÓTESIS:

H₀: Los genotipos y poblaciones F₂ de trigo no generan plantas doble haploides resistentes a roya amarilla.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1 Material Vegetal

Ocho genotipos de trigo y dos poblaciones F₂ (Cuadro 1).

Cuadro 1. Genotipos y poblaciones F₂ de trigo empleados para la obtención y selección de doble haploides mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras, EESC-INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

GENOTIPOS DE TRIGO	Código
INIAP-QUILINDAÑA 94	g ₁
INIAP-ZHALAO 2003	g ₂
INIAP-COJITAMBO 92	g ₃
INIAP-VIVAR 2010	g ₄
Waxwing	g ₅
<i>Yr5/6*Avocet</i>	g ₆
<i>Yr15/6*Avocet</i>	g ₇
<i>Yr18/3*Avocet</i>	g ₈
POBLACIONES F₂	
<i>Yr5/6*Avocet// Yr15/6*Avocet</i>	g ₉
<i>Yr18/3*Avocet// INIAP-QUILINDAÑA 94</i>	g ₁₀

Los genotipos de trigo fueron seleccionados con la finalidad de evaluar su capacidad androgénica y su consecuente regeneración a plantas.

Las poblaciones F₂ de trigo fueron obtenidas por el método de mejoramiento convencional, las cuales fueron seleccionadas por su resistencia a roya amarilla con base en los datos presentados en el informe anual (2009) por el Programa de Cereales. Estas poblaciones son producto de las cruces de parentales que poseen los genes *Yr5* y *Yr15*; y, por otro lado el gen *Yr18*.

5.1.2 Materiales a emplearse en la siembra

Los materiales para la siembra en invernadero y en campo se detallan en el Anexo 1.

5.1.3 Materiales, reactivos y equipos de laboratorio

En el Anexo 2 se describe los materiales, reactivos y equipos que se utilizarán durante la ejecución del proyecto.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Características del sitio experimental

5.2.1.1 Ubicación

El presente estudio se realizará en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), parroquia Cutuglagua, cantón Mejía en la provincia de Pichincha.

La primera fase del proyecto se realizará tanto en invernadero como en los campos experimentales de la estación. La fase correspondiente a laboratorio, se ejecutará en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos y Biología Molecular, pertenecientes al Departamento Nacional de Biotecnología (DNB).

5.2.1.2 Características del lugar

En el Cuadro 2 se describen las condiciones geográficas y ambientales del sitio experimental.

Cuadro 2. Características geográficas y ambientales del sitio experimental, EESC-INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

CARACTERÍSTICAS GEOGRÁFICAS Y AMBIENTALES ¹	
Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Latitud	00°22'00'' S
Longitud	79° 32'00'' O
Altitud	3058m
Humedad Relativa	79.63%
Temperatura promedio anual	12.38°C
Precipitación promedio anual	1430 mm

5.2.1.3 Condiciones ambientales en invernadero

En el Cuadro 3 se describen las condiciones ambientales en las que se desarrollará el cultivo durante la fase de siembra bajo invernadero.

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

Cuadro 3. Condiciones ambientales de invernadero, EESC-INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

CONDICIONES AMBIENTALES	
Rango de temperatura	10 – 25°C
Humedad relativa	80%

5.2.1.4 Condiciones experimentales específicas de laboratorio para el cultivo *in vitro* de anteras de trigo.

En el Cuadro 4 se describen las condiciones específicas que se utilizará en la fase de cultivo *in vitro* de anteras.

Cuadro 4. Condiciones Experimentales, EESC-INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	
Incubación de anteras en medio de inducción	
Temperatura promedio	29°C ± 1°C
Humedad relativa	80%
Tiempo	4 semanas
Regeneración de plantas	
Temperatura promedio	26°C
Humedad relativa	50%
Tiempo	4 semanas
Fotoperiodo	
Horas luz	16 horas
Oscuridad	8 horas
Intensidad de luz	62.5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

5.2.2 Fases de desarrollo del proyecto

Los siguientes puntos de la metodología son descritos para cada fase en la que se dividió el proyecto: la fase de cultivo *in vitro* de anteras y la fase de selección asistida con marcadores moleculares.

FASE I: Fase de cultivo *in vitro* de anteras

5.2.2.1 Factores en estudio

a. Genotipos de trigo

En el Cuadro 1 se detalla los genotipos y poblaciones F₂ de trigo que se utilizarán en la obtención y selección de doble haploides mediante la técnica de cultivo *in vitro* de anteras en el presente estudio.

b. Medios de cultivo

En el Cuadro 5 se presentan los medios de inducción de callos que se utilizarán para el desarrollo de la fase de cultivo *in vitro* de anteras en el presente estudio.

Cuadro 5. Medios de inducción de callos para el cultivo *in vitro* de anteras, EESC- INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

MEDIOS DE CULTIVO*	Código
Medio W14	m ₁
Medio de Papa-2	m ₂
Medio W14mal	m ₃

* Anexos 3, 4 y 5

5.2.2.2 Tratamientos

Treinta tratamientos producto de la interacción entre los genotipos (g) y los medios de cultivo (m) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Tratamientos para el cultivo *in vitro* de anteras de los genotipos de trigo con tres medios de cultivo de inducción, EESC- INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

SÍMBOLO	INTERACCIÓN	TRATAMIENTO
t ₁	g ₁ m ₁	Anteras del genotipo INIAP-QUILINDAÑA 94 esparcidas en el medio W14 de inducción.
t ₂	g ₁ m ₂	Anteras del genotipo INIAP-QUILINDAÑA 94 esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t ₃	g ₁ m ₃	Anteras del genotipo INIAP-QUILINDAÑA 94 esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t ₄	g ₂ m ₁	Anteras del genotipo INIAP-ZHALAO 2003 esparcidas en el medio W14 de inducción.
t ₅	g ₂ m ₂	Anteras del genotipo INIAP-ZHALAO esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t ₆	g ₂ m ₃	Anteras del genotipo INIAP-ZHALAO esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t ₇	g ₃ m ₁	Anteras del genotipo INIAP-COJITAMBO 92 esparcidas en el medio W14 de inducción.
t ₈	g ₃ m ₂	Anteras del genotipo INIAP-COJITAMBO 92 esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t ₉	g ₃ m ₃	Anteras del genotipo INIAP-COJITAMBO 92 esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t ₁₀	g ₄ m ₁	Anteras del genotipo INIAP-VIVAR 2010 esparcidas en el medio W14 de inducción.
t ₁₁	g ₄ m ₂	Anteras del genotipo INIAP-VIVAR 2010 esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t ₁₂	g ₄ m ₃	Anteras del genotipo INIAP-VIVAR 2010 esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t ₁₃	g ₅ m ₁	Anteras del genotipo Waxwing esparcidas en el medio W14 de inducción.
t ₁₄	g ₅ m ₂	Anteras del genotipo Waxwing esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t ₁₅	g ₅ m ₃	Anteras del genotipo Waxwing esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t ₁₆	g ₆ m ₁	Anteras del genotipo Yr5/6*Avocet esparcidas en el medio W14 de inducción.

Cuadro 6. Continuación

t_{17}	$g_6 m_2$	Anteras del genotipo <i>Yr5/6*</i> Avocet esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t_{18}	$g_6 m_3$	Anteras del genotipo <i>Yr5/6*</i> Avocet esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t_{19}	$g_7 m_1$	Anteras del genotipo <i>Yr15/6*</i> Avocet esparcidas en el medio W14 de inducción.
t_{20}	$g_7 m_2$	Anteras del genotipo <i>Yr15/6*</i> Avocet esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t_{21}	$p_7 m_3$	Anteras del genotipo <i>Yr15/6*</i> Avocet esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t_{22}	$g_8 m_1$	Anteras del genotipo <i>Yr18/3*</i> Avocet esparcidas en el medio W14 de inducción.
t_{23}	$g_8 m_2$	Anteras del genotipo <i>Yr18/3*</i> Avocet esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t_{24}	$g_8 m_3$	Anteras del genotipo <i>Yr18/3*</i> Avocet esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t_{25}	$g_9 m_1$	Anteras de la población F_2 <i>Yr5/6*</i> Avocet// <i>Yr15/6*</i> Avocet esparcidas en el medio W14 de inducción.
t_{26}	$g_9 m_2$	Anteras de la población F_2 <i>Yr5/6*</i> Avocet// <i>Yr15/6*</i> Avocet esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
t_{27}	$g_9 m_3$	Anteras de la población F_2 <i>Yr5/6*</i> Avocet// <i>Yr15/6*</i> Avocet esparcidas en el medio W14mal de inducción.
t_{28}	$g_{10} m_1$	Anteras de la población F_2 <i>Yr18/3*</i> Avocet// INIAP- QUILINDAÑA 94 esparcidas en el medio W14 de inducción.
t_{29}	$g_{10} m_2$	Anteras de la población F_2 <i>Yr18/3*</i> Avocet// INIAP- QUILINDAÑA 94 esparcidas en el medio Papa-2 de inducción.
T_{30}	$p_{10} m_3$	Anteras de la población F_2 <i>Yr18/3*</i> Avocet// INIAP- QUILINDAÑA 94 esparcidas en el medio W14mal de inducción.

5.2.2.3 Unidad experimental

La unidad experimental estará formada por una caja Petri de vidrio de 60 mm de diámetro que contiene 30 anteras de cada genotipo o población F_2 (Cuadro 1) y uno de los medio de cultivo de inducción (Cuadro 5).

5.2.2.4 Diseño experimental

Para determinar la respuesta androgénica de cada genotipo y población F_2 en los tres medios de cultivo de inducción se conducirá un experimento dispuesto en un Diseño Completamente al Azar en arreglo factorial $g \times m$, donde g son los genotipos de trigo y m son los medios de cultivo.

5.2.2.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos durante el proceso experimental serán analizados con el paquete estadístico InfoStat.

El ADEVA se presenta en el Cuadro 7:

Cuadro 7. ADEVA para la evaluación de respuestas androgénicas en 30 tratamientos resultantes de la interacción de los genotipos de trigo con tres medios de cultivo de inducción, EESC-INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

Fuente de Variación (FV)	Grados de Libertad (G L)
Total	299
Tratamientos	29
Genotipos de trigo (g)	9
Medios de cultivo (m)	2
g x m	18
Error experimental	270

5.2.2.6 Análisis funcional

Las fuentes de variación que resulten significativas serán analizadas mediante la prueba de Tukey al 5% para establecer rangos de significación. El coeficiente de variación (CV) se expresará en porcentaje.

5.2.2.7 Variables y métodos de evaluación

1. Número total de callos embriogénicos

A los 30 días de incubadas las anteras se cuantificará el número total de callos embriogénicos de color amarillo pálido y consistencia compacta que se han formado por cada genotipo y población F₂ de trigo.

2. Número total de callos embriogénicos con pseudo-raíces

Además se tomará datos a los 30 días de los callos embriogénicos que presenten pseudo-raíces, con la finalidad de determinar si los callos que presentan estas estructuras poseen mayor probabilidad de regeneración a plántula.

3. Porcentaje de plantas verdes regeneradas

A los 10, 20 y 30 días de transferidos los callos embriogénicos al medio 190-2 de regeneración (Anexo 6) se tomará datos del número total de plántulas verdes regeneradas. Se tomarán los datos en los tres tiempos determinados, para evaluar el tiempo mínimo que requiere cada genotipo y población F₂ de trigo en regenerar a plántulas.

4. Porcentaje de plantas albinas

A los 30 días de transferidos los callos embriogénicos al medio 190-2 de regeneración (Anexo 6) se tomará datos del número total de plántulas albinas regeneradas.

FASE II: Fase de selección asistida con marcadores moleculares

5.2.2.1 Factores en estudio

a. Genotipos de trigo.

En el Cuadro 8 se detallan genotipos de trigo que se analizará molecularmente en el presente estudio.

Cuadro 8. Genotipos y población F₂ de trigo utilizados para la selección asistida con marcadores moleculares, EESC-INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

POBLACIONES F ₂	Código
Yr5/6*Avocet// Yr15/6*Avocet	g ₁
GENOTIPOS DE TRIGO	
Yr5/6*Avocet	g ₂
Yr15/6*Avocet	g ₃
Avocet (Control negativo)	g ₄
INIAP-VIVAR 2010 (Control negativo)	g ₅
INIAP-COJITAMBO 92 (Control negativo)	g ₆

b. Marcadores moleculares.

En el Cuadro 9 se describen los marcadores moleculares empleados para determinar resistencia a roya amarilla en el presente estudio.

Cuadro 9. Marcadores moleculares para resistencia a roya amarilla, EESC-INIAP, Cutuglagua – Pichincha 2010.

MARCADORES MOLECULARES	GEN	Código
STS-7/STS-8	Yr5	y ₁
Xbarc8	Yr15	y ₂

5.2.2.2 Tratamientos

Los tratamientos empleados son producto de la interacción entre los genotipos y población F₂ (g) y los marcadores moleculares (y).

5.2.2.3 Unidad experimental

La unidad experimental estará conformada por un tubo eppendorf que contienen la muestra de ADN extraída de 3g de tejido foliar de cada plántula regenerada de los genotipos y población F₂ de trigo descritos en el Cuadro 8.

5.2.2.4 Análisis estadístico

En la fase molecular se realizará un análisis de la Presencia/Ausencia de los marcadores asociada con Resistencia/Susceptibilidad del genotipo analizado.

5.2.2.5 Variables y métodos de evaluación

1. Presencia/ausencia de la banda de amplificación para Yr5

Esta variable se registrará como presencia o ausencia de una banda a 478pb (Chen *et al.*, 2003), producto de la amplificación del set de marcadores STS-7/STS-8 ligado al gen Yr5.

2. Interpretación de alelos de amplificación para Yr15

Esta variable se registrará por la interpretación de alelos de una banda a 200-300pb en el software SAGA-GT versión 3.1, producto de la amplificación del marcador microsatélite Xbarc8 para el gen Yr15.

5.3 MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

El experimento se dividirá en dos fases:

- La primera fase consta de la siembra de semillas de cada genotipo en invernadero y en campo para la obtención del material vegetal, inoculación e incubación de anteras de trigo en un estado de desarrollo óptimo; además se realizará la regeneración de plantas a partir de microcallos.
- La segunda fase corresponde a la selección molecular de las plantas regeneradas de trigo, fase que incluye la amplificación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a roya amarilla.

FASE I: Fase de cultivo *in vitro* de anteras

5.3.1 Siembra del material vegetal

Previamente se desinfectarán las semillas con Carboxin y Captan.

En invernadero las semillas de cada genotipo de trigo serán sembradas en macetas de plástico de 2 kg de capacidad. La siembra se realizará utilizando tierra desinfectada. En cada maceta se sembrarán de 6 a 7 semillas a una profundidad aproximada de 1.5cm. La siembra en invernadero se realizará semanalmente.

La siembra en campo se realizará a mano en parcelas de 0.50 m² separadas 50 cm entre ellas. Las parcelas estarán formadas por tres líneas de siembra separadas 15 cm con una densidad de 4 semillas por línea. La siembra en campo se realizará cada 15 días durante cinco meses.

El control de plagas y enfermedades en invernadero y campo se realizará de acuerdo a la incidencia.

5.3.2 Muestreo del material vegetal

Las espigas de cada genotipo de trigo (Cuadro 1) se recolectarán en diferentes estados de desarrollo vegetativo, se realizará una revisión previa de la espiga mediante el tacto, y se efectuarán diferentes distancias de corte asociando la distancia entre la penúltima hoja y la hoja bandera, con el propósito de establecer una relación entre el estado de desarrollo del trigo y la etapa uninucleada en fase media a tardía de las microsporas; ya que es la etapa óptima para el cultivo *in vitro* de anteras.

Esta relación se reportará mediante la escala decimal de Zadoks *et al.*, (1974) (Anexo 14).

5.3.3 Determinación del estado de desarrollo del polen

Los estadios uninucleado medio y tardío son los más adecuados para obtener respuesta androgénica al cultivo *in vitro* de anteras de trigo, para comprobar que las microsporas se encuentren en esta etapa se realizará una observación al microscopio mediante la tinción de la microspora con acetocarmin al 2% (Maluszynski *et al.*, 2003).

El protocolo seguido será una adaptación de Michelangeli *et al.*, (2002) descrito en el Anexo 7.

5.3.4 Desinfección de espigas

Las espigas una vez recolectadas serán esterilizadas en una cámara de flujo laminar por inmersión en una solución de Hipoclorito de Sodio al 20% por 30 minutos.

Transcurrido este tiempo, las espigas deben ser lavadas dos veces con agua estéril y finalmente transferidas a cajas petri estériles (Maluszynski *et al.*, 2003).

5.3.5 Aislamiento e inoculación de las anteras

Las anteras se aislarán con una pinza esterilizada con la ayuda del estereomicroscopio. Las anteras extraídas se colocaran inmediatamente en una caja petri de 60mm que contiene un volumen establecido del medio de cultivo de inducción, 6 ml de medio de cultivo de inducción W14, 3ml de medio líquido de cultivo Papa-2 o 2ml del medio líquido de cultivo W14mal, cada uno con 8 Hidroxiquinolina, sin sobrepasar las 30 anteras por caja (Maluszynski *et al.*, 2003).

Las cajas serán selladas con parafilm para evitar la contaminación.

La composición del medio de inducción W14, Papa-2 y W14 mal se detalla en los Anexos 3, 4 y 5, respectivamente. En esta fase los medios de inducción contiene 8-Hidroxiquinolina, reactivo colocado por filtración en los medios inducción estériles, en una concentración de 40mg/L. La filtración se realizará con un Filtro MILLIPORE de 0,22µm en una cámara de flujo laminar (Maluszynski *et al.*, 2003).

Las anteras de trigo colocadas en los medios de inducción con 8-Hidroxiquinolina se incubarán por 3 días a 29° C en la oscuridad, tratamiento en el que el genoma se duplicará a través de divisiones mitóticas de las microsporas. (Maluszynski *et al.*, 2003).

El reactivo 8-Hidroxiquinolina es, al igual que la colchicina, un inhibidor de la división celular, detienen la mitosis en metafase o en anafase, evitando el reparto de los cromátidas de un cromosoma durante la mitosis, provocando la poliploidía de la célula filial, ya que aunque no haya separación, sí hay duplicación del material genético (Valladolid *et al.*, s.f.).

5.3.6 Incubación de anteras, inducción de androgénesis y formación de microcallos

Transcurridos los 3 días de incubación de las anteras en los medios de inducción con 8-Hidroxiquinolina, las anteras serán transferidas al correspondiente medio de cultivo libre de este compuesto para el desarrollo androgénico, es decir a los medios de inducción W14, Papa-2 y W14mal correspondientes a los Anexos 3, 4 y 5.

Las condiciones experimentales de incubación se describen en el Cuadro 4, condiciones con las que se espera ocurra la multiplicación de las microsporas y consecuentemente la formación de callos embriogénicos. Este fenómeno ocurrirá completamente transcurridos 30 días de incubación (Maluszynski *et al.*, 2003).

5.3.7 Regeneración de plantas a partir de microcallos embriogénicos

Terminadas las cuatro semanas de incubación, los microcallos formados de color amarillento y consistencia compacta serán transferidos al medio de cultivo de regeneración 190-2 descrito en el Anexo 6.

Los microcallos serán observados en un estereomicroscopio antes de ser transferidos. Aquellos que presenten formación de pseudo-raíces serán transferidos individualmente a tubos que contendrán 5ml de medio de regeneración estéril, y aquellos que presenten formación de embriones a cajas petri con 10ml del medio de regeneración estéril, colocando nueve microcallos por caja.

Las condiciones experimentales de incubación se describen en la Cuadro 4, condiciones que deben ser mantenidas por cuatro semanas.

Transcurridas las cuatro semanas, las plántulas regeneradas, serán transplatadas a un medio nuevo de regeneración 190-2 sin fitohormonas y con una concentración de sucrosa reducida en 1.5% bajo las mismas condiciones de incubación por el lapso de una semana (Maluszynski *et al.*, 2003).

FASE II: Fase de selección asistida con marcadores moleculares

5.3.8 Colecta del material vegetal

Las plántulas regeneradas de la fase de cultivo *in vitro*, son la base para realizar el análisis molecular.

La colecta del material se realizará en la cámara de flujo laminar en condiciones estériles. Se tomará con una pinza aproximadamente 3 g de tejido foliar de las plántulas y se colocarán en tubos eppendorf estériles y etiquetados.

Los tubos eppendorf con las muestras serán trasladados en hielo al Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología.

5.3.9 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizará mediante el protocolo de extracción casera de Anderson (s.f) con algunas modificaciones, descrito en el Anexo 8.

5.3.10 Cuantificación de ADN

Previa a la cuantificación se determinará la calidad de ADN mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

La concentración de ADN de las muestras se determinará con el fluorómetro Qubit, cuyo protocolo se detalla en el Anexo 8.

5.3.11 Amplificación con marcadores moleculares

La amplificación de los marcadores moleculares se realizará mediante el uso de la PCR, tanto para el gen *Yr5* del tipo STS (Sequence-Tagged Site) que son fragmentos cortos de ADN de copia única con ubicación conocida, como para el gen *Yr15* el marcador microsatélites SSRs (Simple Sequence Repeats) que son secuencias cortas de ADN en tándem. (Nuez y Carrillo, s.f).

La amplificación se realizará a partir del ADN cuantificado y diluido de ser necesario. La dilución se realizará en una cámara de flujo laminar esterilizada con luz UV por 5 minutos con agua de tartrazina 1M hasta llegar a una concentración de 15 ng/ μ l.

5.3.11.1 Amplificación para el gen *Yr5*

La amplificación del gen se realizará con la combinación de primers tipo STS que se describen en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Set de marcadores STS y secuencias de los primers ligados al gen *Yr5* (Wheat Cap, 2009, Chen *et al.*, 2003).

PRIMER	SECUENCIA	PRODUCTO DE AMPLIFICACIÓN	
STS - 7	5'- GTA CAA TTC ACC TAG AGT -3'	478pb	Sense
STS - 8	5'- GCA AGT TTT CTC CCT ATT -3'		Anti Sense

La amplificación se realizará con las muestras de ADN diluidas previamente utilizando el coctel de amplificación para el marcador STS – 7 STS – 8, citado el Anexo 9. El programa de amplificación utilizado será el señalado en el Anexo 10.

Terminada la amplificación, los productos amplificados se separarán en un gel de agarosa al 2% (p/v) que será teñido en bromuro de etidio 15ppm, el gel teñido se visualizará en un fotodocumentador “Dolphin View”.

Posteriormente, se realizará la digestión del producto amplificado con la enzima *Sau3AI*, incubada en el termociclador a 37°C por 4 horas. Posteriormente se realizará la inactivación de la enzima a 65°C por 15 min. (Chen *et al.*, 2003).

El corte específico de la enzima de restricción es 5'...GATC...3' que permitirá identificar la presencia o no del gen (Chen *et al.*, 2003).

El producto digerido y amplificado se cargará en un gel de agarosa al 2.8% que será teñido en una solución de bromuro de etidio 15ppm, sobre un bandeja en rotación, el gel teñido se visualizará en un fotodocumentador “Dolphin View”.

5.3.11.2 Amplificación para el gen *Yr15*

Para la amplificación del gen *Yr15* se realizará utilizando el marcador microsatélite, detallado en el Cuadro 11:

Cuadro 11. Información del marcador microsatélite *Xbarc8* (Graingenes, 2010).

MOTIFS	SECUENCIA	Temp. de alineamiento
TTA	5' GCGGGAATCATGCATAGGAAAACAGAA 3'	52.8°C
15+11	5' GCGGGGCGAAACATACACATAAAAACA 3'	

La amplificación se realizará mediante genotipaje del locus *Xbarc8* con la metodología M13 tailing. La amplificación se realizará con las muestras de ADN diluidas previamente utilizando el coctel de amplificación para el marcador microsatélite, citado el Anexo 11. El programa de amplificación utilizado será el señalado en el Anexo 12.

La solución Blue Stop se añadirá al producto de amplificación y se denaturará las muestra en el termociclador a 95°C por 5 min. Inmediatamente las muestras se colocarán sobre hielo.

La visualización de los productos se realizara en el LI-COR DNA Analyzer 4300S, con el marcaje de 700nm, se cargará 0.8ul de cada muestra en un gel de poli(acrilamida) al 6.6%.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	DURACIÓN (meses)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Revisión bibliográfica.	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
2. Escritura del anteproyecto.	X	X										
3. Ajustes y aprobación del proyecto.		X										
4. Siembra de semillas de los genotipos de trigo.		X	X	X	X							
5. Recolección de las espigas.				X	X	X	X					
6. Determinación del estado del polen.				X	X	X	X	X				
7. Cultivo de anteras en medio de inducción.				X	X	X	X	X				
8. Regeneración de plantas a partir de microcallos embriogénicos.					X	X	X	X	X			
9. Extracción de ADN.									X	X		
10. Amplificación con marcadores moleculares.										X	X	
11. Análisis de resultados.						X	X	X				X
12. Redacción de tesis.					X	X	X	X	X	X	X	X

7. PRESUPUESTO

Cuadro 12: Costos del proyecto

MATERIALES DE FASE DE SIEMBRA				
RUBRO	UNIDAD	PRECIO UNITARIO	CANTIDAD	TOTAL
Semillas	kg	0,70	1	0,70
Jornales	jornal	7,00	7	49,00
Etiquetas plásticas	caja	4,00	1	4,00
Sustrato	saco 50 kl	4,50	5	22,50
Mascarilla.	unidad	0,25	5	1,25
Gafas protectoras	unidad	3,50	1	3,50
SUBTOTAL				77,45

MATERIALES Y REACTIVOS DE LABORATORIO				
RUBRO	UNIDAD	PRECIO UNITARIO	CANTIDAD	TOTAL
Tubos de ensayo 20cm	unidad	0,90	100	90,00
Cajas petri 60mm	unidad	0,50	100	50,00
Pinzas grandes	unidad	15,00	2	30,00
Mechero	unidad	4,00	1	4,00
Papel aluminio	paquete	4,00	3	12,00
Bisturís	caja	18,00	2	36,00
Jabón líquido	galón	8,00	2	16,00
Papel toalla	unidad	1,50	8	12,00
Rollo plástico	unidad	3,20	2	6,40
Mascarillas	unidad	0,25	20	5,00
Fundas plásticas	unidad	0,01	150	1,50
Guantes quirúrgicos XS	caja	6,50	4	26,00
Guantes de nitrilo	caja	18,00	1	18,00
Reactivos	varios	-	-	61,23
Extracto de papa	kilo	10,50	1	10,50
Etanol	galón	8,50	5	42,50
SUBTOTAL				421,13

PRESUPUESTO ANÁLISIS MOLECULAR				
RUBRO	UNIDAD	PRECIO UNITARIO	CANTIDAD	TOTAL
Extracción de DNA	análisis	15,00	7	105,00
Visualización en agarosa	análisis	15,00	6	90,00
Cuantificación de ADN (floreescencia)	análisis	1,00	100	100,00
Amplificación PCR primer específicos 120RX	análisis	191,00	4	764,00
Visualización SST	análisis	6,00	34	204,00
Corrida Licor SSR	análisis	56,00	3	168,00
SUBTOTAL				1.431,00

MATERIALES DE OFICINA				
RUBRO	UNIDAD	PRECIO UNITARIO	CANTIDAD	TOTAL
Hojas de papel bond	paquete	5,00	3	15,00
Tinta para impresión	recarga	4,00	3	12,00
Cinta adhesiva	unidad	2,00	3	6,00
Marcadores	unidad	2,00	3	6,00
SUBTOTAL				39,00

OTROS				
RUBRO	UNIDAD	PRECIO UNITARIO	CANTIDAD	TOTAL
Copias	unidad	0,05	500	25,00
Empastado	unidad	15,00	6	90,00
Becario	mes	323,85	12	3.886,20
SUBTOTAL				4001,20

COSTO TOTAL DE PROYECTO	
RUBRO	TOTAL
MATERIALES DE FASE DE SIEMBRA	77,45
MATERIALES Y REACTIVOS DE LABORATORIO	421,13
PRESUPUESTO ANÁLISIS MOLECULAR	1.431,00
MATERIALES DE OFICINA	39,00
OTROS	4.001,20
SUBTOTAL	5.969,78
Imprevistos 5%	298,49
TOTAL	6.268,27

Cuadro 13: Financiamiento del proyecto.

Fuentes de financiamiento		
Instituciones	USD	Porcentaje (%)
INIAP	6.268,27	100

8. BIBLIOGRAFIA

1. Chen, W; Soria, M; Yan, G; Sun, J; Dubcovsky, J. 2003. Development of sequence tagged site and cleaved amplified polymorphic sequence markers for wheat stripe rust resistance gene *Yr5*, *Crop science*, Vol. 43: 2058-2064.
2. Chuang, C. C; Ouyang, T. W; Chia, H; Chou, S. M; Ching, C. K. 1978. A set of potato media for wheat anther culture. In: *Proc. Symp. on Plant Tissue Culture*, p. 51—56.
3. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1993. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones (en línea)*. Roca, W; Mroginski, L. Ed. Cali, CO. p. 272-293. Consultado 14 sep. 2010. Disponible en http://webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo11.pdf
4. Falconí, E. 2010. *Desarrollo del proyecto de tesis: Marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a roya amarilla de trigo. (Comunicación personal)*. Quito, EC. Prog. de Cereales. Estación Experimental Santa Catalina.
5. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics). 2009. *Production quantity Ecuador Wheat (en línea)*. Consultado 13 sep. 2010. Disponible en <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=567&lang=es#anchor>
6. FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics). 2007. *Food supply quantity Ecuador Wheat (en línea)*. Consultado 13 sep. 2010. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/609/DesktopDefault.aspx?PageID=609#anchor>
7. GrainGenes. *Marker Report: Xbarc8-3D (en línea)*. Consultado 2 jul. 2010. Disponible en <http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/graingenes/report.cgi?class=marker&name=Xbarc8-3D>.
8. INAMHI (Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología). 2010. *Estación Meteorológica Izobamba*.
9. Jobet, C; Zuñiga, J; Campos, H. 2003. *Plantas doble haploides generadas por cruza intergenérica de trigo x maíz. Agricultura Técnica - Vol. 63 – Nº3: 323-328*.
10. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Quito (Ecuador). *Estación Experimental Santa Catalina, Prog. de Cereales. 2009. Informe anual. Quito EC. 142 p.*
11. Kondić, A; Kobiljski, B; Hristov, N. 2008. *Efficiency of anther cultura technique in the production of wheat double haploids. Proc. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad, no. 115: 35 -40.*

12. Liu, W; Zheng, M; Polle, E; Konzak C. 2002. Highly Efficient Doubled-Haploid Production in Wheat (*Triticum aestivum* L.) via Induced Microspore Embryogenesis. *Crop Sci.* 42: 686-692.
13. Maluszynski, M; Kasha, K; Forster, B.P, Szarejko, I. 2003. Doubled Haploid Production in Crop Plants: A manual. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 65 – 69.
14. McIntosh, RA; Wellings, CR; Park, RF. 1995. Wheat Rust: an atlas of resistance genes. CSIRO Australia. p. 155, 165, 166, 168 - 170.
15. Michelangeli, C; Medina, A; Artioli, P; Mata, J. 2002. Microsporogénesis y microgametogénesis de onoto (*bixa orellana* l.). *ACV*.vol.53. no.3: 171-175.
16. Nuez, F; Carrillo J.M. s.f. Los Marcadores Genéticos en la mejora vegetal. Editorial UPV. Universidad Politécnica de Valencia. p.130 – 145.
17. Ochoa, J. 1997. La roya amarilla del trigo en el Ecuador aspectos epidemiológicos y de resistencia. Ed. D Danial. Primer Taller de Preduza en Resistencia Duradera en Cultivos Altos en la Zona Andina Quito, EC. p. 45-52.
18. _____; Danial, D; Paucar, B. 2007. Virulence of wheat yellow rust races and resistance genes of wheat cultivars in Ecuador. *Euphytica* (153): 287 – 293.
19. Otani, M; Shimada, T. 1995. Effect synthetic medium on pollen embryo formation of common wheat and tetraploid wheat species. *Bull. RIAR, Ishikawa Agr. Coll.* 4: 45-51.
20. Polci, P; Conti, V; Aldao, H; Miranda, R; Echenique, V. 2005. Obtención de plantas haploides de cultivares argentinos de trigo pan (*Triticum aestivum* L.) por cultivo de anteras y cruzamientos con maíz. *Argentina. RIA*, 34(3): 151-176.
21. Ramírez, R; Borodanenko, A; Ochoa, N; Pérez, L; Barrera, J; Gordon H. 2007. Efecto del genotipo, ambiente y ácido húmico en el cultivo *in vitro* de anteras de trigo. *Rev. Fitotec. México*. Vol 30 (2): 159 -165.
22. SIGAGRO (Sistema de Información Geográfica y Agropecuaria). 2009. Comercio exterior - principales productos de importación (en línea). Consultado 29 oct. 2010. Disponible en http://sigagro.flunal.com/charts/comext_pp_importacion.htm
23. Valladolid, A; Blas, R; González, R. s.f. Introducción al recuento de cromosomas somáticos en raíces andinas.
24. Villaseñor, O; Huerta, J; Leyva, G; Villaseñor, H; Singh, R; Sandoval, S; Espitia, E. 2009. Genética de la resistencia a roya amarilla en plantas adultas de trigo harinero. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 32 (3): 217 – 223.

25. Wheat CAP (Wheat Applied Genomics). 2010. Disease Resistance. Stripe Rust Resistance Gene *Yr5* (en línea). Consultado 26 jun. 2010. Disponible en <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/yr5/index.htm>.
26. Wheat CAP (Wheat Applied Genomics). 2010. Disease Resistance. Stripe Rust Resistance Gene *Yr15* (en línea). Consultado 26 jun. 2010. Disponible en <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Yr15/index.htm>.
27. Yan, G.P; Chen, X.M; Line, R.F; Wellings, C.R. 2002 Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the YR5 gene for resistance to wheat stripe rust. *Theor Appl Genet* 106: 636–643.
28. Zadoks, J.C.; Chang, T; Konzak, C.1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Res.* 14: 415-421.

9. ANEXOS

Anexo 1: Materiales de la fase de siembra

- Macetas plásticas
- Urea (fertilizante)
- Pala
- Etiquetas plásticas
- Sustrato
- Vitavax (Captan + Carboxin)
- 11-52-0
- Sulpomag

Anexo 2: Materiales, reactivos y equipos de laboratorio

Materiales de Laboratorio

- Material de vidrio: probetas, matraces, vasos de precipitación.
- Tubos de ensayo
- Cajas Petri 60mm
- Filtro (MILLIPORE 0.22 μ m)
- Cinta indicadora autoclave
- Cooler de tubos eppendorf.
- Tubos eppendorf de 0.6ml, 1.5ml, 2.0ml.
- Morteros.
- Pistilos de maceración.
- Plástico para envolver
- Placas PCR.
- Flotadores para tubos eppendorf

Reactivos para cultivo *in vitro* de anteras

- Nitrato de Potasio (KNO₃)
- Fosfato diácido de Amonio (NH₄H₂PO₄)
- Sulfato de Magnésio Heptahidratado (MgSO₄ X 7H₂O)
- Cloruro de Calcio Dihidratado (CaCl₂ X 2H₂O)
- Sulfato de Potasio (K₂SO₄)
- Fosfato diácido de Potasio (KH₂PO₄)
- Sulfato de Amonio ((NH₄)₂SO₄)
- Nitrato de Calcio Tetrahidratado (Ca(NO₃)₂ X 4H₂O)
- Cloruro de Potasio (KCl)
- Sulfato de Zinc Heptahidratado (ZnSO₄ X 7H₂O)
- Yoduro de Potasio (KI)
- Sulfato de Manganeso Tetrahidratado (MnSO₄ X 4H₂O)
- Acido Bórico (H₃BO₃)
- Molibdato de Sodio Dihidratado (Na₂MoO₄ X 2H₂O)
- Sulfato Cúprico Pentahidratado (CuSO₄.X 5H₂O)
- Cloruro de Cobalto Hexahidratado (CoCl₂ X 6H₂O)
- EDTA Sal de Sodio (Na₂EDTA)
- Sulfato ferroso Heptahidratado (FeSO₄ X 7H₂O)
- Ácido nicotínico
- Piridoxina HCl
- Tiamina HCl
- Myo-Inositol

- Ácido 2,4-Dichlorofenoxiacético (2,4-D)
- Kinetina
- Glicina
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Sucrosa
- Sacarosa
- Maltosa
- Agar

- 8-Hidroxiquinolina
- Hipoclorito de Sodio
- Carmín
- Extracto de papa
- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Ácido Clorhídrico (HCl)
- Agua destilada
- Etanol

Reactivos para el análisis molecular

- Kit de cuantificación para el Fluorómetro Qubit Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kits.
- Blue juice/blue stop.
- Agarosa.
- Poliacrilamida.
- Tris TAE.
- MgCl₂ 25mM.
- Buffer Gotaq. 5XPCR
- dNTP's.
- Primers SSR (*Xbarc8*) y STS (STS-7/STS-8).
- Taq polimerasa.
- Go Taq.
- Agua ultrapura.

- Aceite mineral.
- Agua destilada.
- Bromuro de etidio.
- Tartrazina.
- EDTA
- Tris HCl
- Cloruro de Sodio (NaCl)
- Dodecilsulfato sódico (SDS)
- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Bisulfito de Sodio
- Marcador de peso molecular 100pb.

Equipos de laboratorio

- Dispensador de medios
- Microscopio
- Estereomicroscopio
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Microondas
- Balanza analítica
- Plato de calentamiento y agitación
- pHmetro
- Incubadora
- Equipo de Baño María "Memmert".
- MicroCentrifuga
- Fluorómetro "Qubit"
- Vortex
- Refrigerador -4 °C.
- Congelador -20 °C.
- Transiluminator UV.

- Termocicladores a Gradiente "BIOMETRA".
- Cámara de electroforesis Horizontales
- Extractor de gases
- Shaker (tinción con bromuro de etidio).
- Timer.
- Microcentrifuga.
- Micropipetas

Anexo 3: Composición del Medio de inducción W14, Maluszynski *et al.*, 2003.

Componentes del Medio	Inducción de Medio W14 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	2000
NH ₄ H ₂ PO ₄	380
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200
CaCl ₂ x 2H ₂ O	140
K ₂ SO ₄	700
Micro Elementos	
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3
KI	0.5
MnSO ₄ x 4H ₂ O	8
H ₃ BO ₃	3
Na ₂ MoO ₄ X 2H ₂ O	0.005
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Fuente de Hierro	
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.8
Vitaminas	
Ácido Nicotínico	0.05
Piridoxina HCl	0.05
Tiamina HCl	2
Hormonas	
2,4 – D	2
Kinetina	0.5
Otros Componentes	
Glicina	2
Sucrosa	100,000
Agar	6,000
pH	5.8

Nota: Esterilizar por autoclavado por 20 min a 120° y 90kPa.

Anexo 4: Composición del Medio líquido de inducción Papa-2, Chuang *et al.*, 1978

Componentes del Medio	Inducción de Medio Papa-2 (mg/L)
Macro elementos	
(NH ₄) ₂ SO ₄	100
KNO ₃	1000
KH ₂ PO ₄	200
MgSO ₄ x 7H ₂ O	125
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	100
KCl	35
Fuente de Hierro	
FeEDTA	42,1
Vitaminas	
Tiamina HCl	1
Hormonas	
2,4 D	1,5
Kinetina	0,5
Otros Componentes	
Sucrosa	90,000
Extracto de papa	100,000
pH	5.8

Nota: Esterilizar por autoclavado por 20 min a 120° y 90kPa.

Anexo 5: Composición del Medio líquido de inducción W14mal, Otani y Shimada, 1995.

Componentes del Medio	Inducción de Medio W14 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	2000
NH ₄ H ₂ PO ₄	380
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200
CaCl ₂ x 2H ₂ O	140
K ₂ SO ₄	700
Micro Elementos	
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3
KI	0.5
MnSO ₄ x 4H ₂ O	8
H ₃ BO ₃	3
Na ₂ MoO ₄ X 2H ₂ O	0.005
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0.025
Fuente de Hierro	
FeEDTA	42.1
Vitaminas	
Ácido Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	2
Hormonas	
2,4 - D	2
Kinetina	0.5
Otros Componentes	
Glicina	2
Maltosa	93.683,2
pH	5.8

Nota: Esterilizar por autoclavado por 20 min a 120° y 90kPa.

Anexo 6: Composición del Medio de regeneración 190-2, Maluszynski *et al.*, 2003.

Componentes del Medio	Medio de regeneración 190-2 (mg/L)
Macro elementos	
KNO ₃	1000
MgSO ₄ x 7H ₂ O	200
KH ₂ PO ₄	300
(NH ₄) ₂ SO ₄	200
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	100
KCl	40
Micro Elementos	
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3
KI	0.5
MnSO ₄ x 4H ₂ O	8
H ₃ BO ₃	3
Fuente de Hierro	
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27.8
Vitaminas	
Acido Nicotínico	0.5
Piridoxina HCl	0.5
Tiamina HCl	1
Myo-Inositol	100
Hormonas	
Kinetin	0.5
ANA	0.5
Otros Componentes	
Glicina	2
Sucrose	30,000
Agar	6,000
pH	6.0

Nota: Esterilizar por autoclavado por 20 min a 120° y 90kPa

Anexo 7: Protocolo de tinción de la microspora con acetocarmin al 2%, Michelangeli et al., 2002.

1. De cada espiguilla extraer las anteras y colocar sobre un portaobjeto
2. Añadir una gota del colorante acetocarmin al 2%.
3. Pasar por el mechero el portaobjetos con el propósito de fijar la muestra, y extraer el exceso de colorante con papel absorbente. Este proceso se repetirá tres veces.
4. Agregar nuevamente una gota de colorante y presionar cuidadosamente las anteras para permitir la salida de las microsporas, pero evitar dañar el tejido.
5. Con una pinza extraer los restos de antera hasta dejar solamente la masa de células (tejido esporógeno), tejido al que se le añade una gota más de colorante; eliminar el exceso.
6. Transcurrido de 20-30 minutos presionar con el cubre objetos.
7. Observar la muestra en un microscopio óptico a 40x de aumento, y se tomar fotografías.

Anexo 8: Protocolo de extracción casera de ADN, Anderson, s.f.

1. Preparar el buffer de extracción se describe en el siguiente cuadro:

Cuadro 14. Componentes y concentración del buffer de extracción de ADN (100, 51 ml).

COMPONENTE	CONCENTRACION SOLUCIONES STOCK	VOLUMEN FINAL O MASA FINAL	CONCENTRACION FINAL
Agua destilada	----	61,26 ml	----
EDTA	0.5 M	10 ml	0.05 M
Tris HCl	1.0 M	10 ml	0.1 M
NaCl	5.0 M	10 mi	0.5 M
SDS	20 %	6.2 ml	1.24%
NaOH	10 M	3.04 ml	0.304 M
Bisulfito de sodio	----	0.38 g	0.38%

2. Preparadas las soluciones stock tomar el volumen final de cada componente, el volumen de la solución de EDTA añadir al final de mezclar todo y aforar con agua destilada autoclavada a un volumen final de 100, 5 ml.
3. Homogenizar el buffer de extracción a 65°C en una plancha de calentamiento.

4. Una vez que la disolución esta completamente disuelta, incubar a 65 °C en un equipo de baño maría.
5. Añadir a cada muestra del tubo eppendorf 100µL del Buffer de extracción a 65°C; y realizar la extrusión mecánica del tejido con un pistilo desinfectado (mediante tratamiento que incluirá inmersión en etanol al 50% y radiación UV en la cámara de flujo horizontal - vertical de 3- 5min).
Continuar la maceración sobre el vórtex, a una velocidad adecuada hasta observar una pasta verdosa de cada muestra. Almacenar en la congeladora.
6. Una vez terminadas de macerar todas las muestras, retirar de la congeladora y se añadir 600µl más de buffer de extracción
7. Incubar a baño maría en un flotador eppendorf a 65 °C por 30 minutos los tubos eppendorf con el material vegetal lisado. Durante este tiempo, cada cinco minutos mezclar por inversión los tubos.
8. Terminada la incubación centrifugar cada microtubo a 10.000 r.p.m durante 10 minutos. Transferir cuidadosamente el sobrenadante claro de cada muestra a un nuevo tubo eppendorf estéril de 1,5 ml.
9. En una sorbona, añadir a cada muestra 700µL de una solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (CIA), y se mezclar vigorosamente por 20 segundos en el vórtex, a alta velocidad.
10. Centrifugar los tubos eppendorf que contienen la solución CIA a 10 000 r.p.m durante 10 minutos. Se observarán tres fases en esta mezcla, la fase inferior u orgánica, conformada principalmente por proteínas, una interfase, donde se ubicó un exceso de proteínas y la fase superior u acuosa, en la que se ubicó el ADN.
11. Extraer aproximadamente 500µL de la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf etiquetado.
12. A cada muestra añadir 1000µL de etanol absoluto almacenado a -20° C, y mezclar suavemente por inmersión por cinco ocasiones. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar los tubos eppendorf a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y descartar el sobrenadante.
14. Una vez eliminado el etanol absoluto añadir 1000µL de etanol al 75%. Mezclar por inversión y se centrifugar por 1 minuto a 10.000 r.p.m.
15. Eliminar el sobrenadante y dejar secar los tubos eppendorf que contiene el pellet de ADN sobre papel absorbente a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas.
16. Transcurrido este tiempo añadir 150µL de buffer TE e incubar en baño maría a 65° C durante dos horas. En los primeros treinta minutos verificar la estabilidad del pellet, puesto que si este ya se hubiera disuelto, ello habría sido un indicio de una alta contaminación por proteínas. Además, cada media hora mezclar por inmersión cinco veces.
17. Almacenará el ADN disuelto en una congeladora a-20 °C.

Anexo 9: Protocolo de cuantificación del ADN por fluorimetría

1. Preparar el buffer de cuantificación, colocando 1µl de Quant-it Reagent y 199µl de Quant –it Buffer, cada uno por n número de muestras que se va a cuantificar en el fluorímetro.
2. Mezclar en un vortéx el buffer de cuantificación.
3. Preparar los estándares: El Estándar I con 190µL del buffer de cuantificación y 10 µL de Quant-iT™ dsDNA standard #1 (0 ng/µl) y el Estándar II con 190µL del buffer de cuantificación y 10 µL Quant-iT™ dsDNA standard #2 (100 ng/µl).
4. Colocar en tubos eppendorf entre 180 µL y 199 µL del RT y entre 20 µL y 1 µL de ADN, completando una solución de 200µl.
5. Mezclar en un vortex con posterior punto de centrifuga y esperar en la oscuridad 2 minutos antes de empezar a cuantificar.
6. Transcurrido el tiempo, calibrar primero el fluorímetro con los dos estándares, seguidamente leer cada muestra de ADN. La lectura se registra en µg/ml.
7. Calcular la concentración de ADN se obtendrá con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de la muestra} = \frac{\text{Lectura registrada}}{\text{Lectura estándar}} \times \text{Concentración estándar}$$

Donde X varía dependiendo de la cantidad de ADN que se incluya en cada tubo.

Anexo 10: Coctel PCR para el marcador STS-7 y STS-8, Wheat Cap, 2010.

Componente	Concentración Final
dNTPs	0,2 mM
Cloruro de magnesio	4 mM
Primer STS-7	0,4 µM
Primer STS-8	0,4 µM
Taq DNA polimerasa (Go Taq) (Promega)	0,3 U
Buffer 5X (Promega) libre de magnesio	1X
ADN (cada muestra)	15 ng

Anexo 11: Programa de amplificación del marcador STS (Wheat Cap, 20100, Yan *et al.*, 2002).

Temperatura (°C)	Tiempo (s o min)	Información Adicional
94	5 min	Número de ciclos: 40
94	30 s	
49	30 s	
72	45 s	
72	7 min	

Anexo 12: Coctel PCR para el Marcador *Xbarc8*.

Componente	Concentración Final
dNTPs	0,2 mM
Cloruro de magnesio	4 mM
Primer forward M13	0,51 μ M
Primer reverse	0.51 μ M
Marcaje (700 nm)	0.20 nM
Taq DNA polimerasa (Go Taq) (Promega)	0,09 U
Buffer 5X (Promega) libre de magnesio	1X
ADN (cada muestra)	15 ng

Anexo 13: Programa de amplificación del marcador *Xbarc8*, Wheat Cap, 2010, Chen *et al.*, 2003).

Temperatura (°C)	Tiempo (s o min)	Información Adicional
94	5 min	Número de ciclos: 40
94	45 s	
52.8	30 s	
72	45 s	
72	7 min	

Anexo 14: Fases de desarrollo según la Escala decimal Zadoks (Z)

Código de Zadoks		Descripción	Código
Estado principal	Estado secundario		Feekes
0		Germinación	
	0	Grano seco	
	1	Principio de la imbibición (absorción de agua)	
	5	Emergencia de la radícula	
	7	Emergencia del coleoptilo	
	9	Hojas en la punta del coleoptilo	
1		Desarrollo de la plántula	1
	0	Primera hoja a través del coleoptilo	
	1	Emergencia al menos del 50% de la primera hoja	
	2	Emergencia al menos del 50% de la segunda hoja	
	3	Emergencia al menos del 50% de la tercera hoja	
	4	Emergencia al menos del 50% de la cuarta hoja	
	5	Emergencia al menos del 50% de la quinta hoja	
2		Crecimiento de las cañas	
	0	Brote principal solo	
	1	Brote principal más 1 caña visible	2
	2	Brote principal más 2 cañas visibles	
	3	Brote principal más 3 cañas visibles	
	4	Brote principal más 4 cañas visibles	
	5	Brote principal más 5 cañas visibles	3
3		Elongación del tallo	
	1	Primer nudo detectable	6
	2	Segundo nudo detectable	7
	3	Tercer nudo detectable	
	7	Hoja bandera recién nacida	8
	9	Hoja bandera collar just visible	9
4		Bota	
	1	Lámina de hoja bandera en crecimiento	
	3	Bota justo antes del hinchado	
	5	Hinchado de la bota	10
	7	Apertura de la lámina de la hoja bandera	
	9	Primeras aristas visibles	
5		Aparición de la inflorescencia	
	1	Primera espiguilla o cabeza visibles	10.1
	3	Un cuarto de cabeza emergida	10.2
	5	La mitad de la cabeza emergida	10.3
	7	Tres cuartos de la cabeza emergida	10.4
	9	Emergencia de la cabeza completa	10.5
6		Floración (no visible realmente en cebada)	
	1	Comienzo de la floración	10.5.1

	5	La mitad de las floretas han florecido	10.5.2
	9	Floración completa	10.5.3
7		Desarrollo de grano lechoso	
	1	Maduración acuosa del grano	10.5.4
	3	Lechoso temprano	
	5	Lechoso medio	11.1
	7	Lechoso tardío	
8		Desarrollo de grano pastoso	
	3	Pasta temprana	
	5	Pasta suave	11.2
	7	Pasta dura, la cabeza pierde color verde	
	9	Aproximación madurez fisiológica	
9		Maduración	
	1	Endurecimiento del grano	11.3
	2	Grano totalmente maduro	11.4