



INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS

Fecha de presentación: 2009 - 07 - 20

Estación Experimental: Santa Catalina

Departamento/Programa: Programa de Cereales

Proyecto: Código: 2100069001/Actividad 001  
Título: "Plan de recuperación y Fomento del Cultivo de Trigo (*Triticum aestivum* L.) en Ecuador".

Resultado: Número:  
Título: Generación de tecnologías agronómicas para el control de roya en el cultivo de trigo.

Actividad: Título: "Validación de Protocolos para la Amplificación de Marcadores Moleculares Ligados a Genes de Resistencia a Roya Amarilla de Trigo"

Ubicación: Provincia (s): Pichincha  
Cantón: Mejía  
Parroquia: Cuti glagua

Autor: Rodrigo Guillermo  
Vinuesa Gavilanes.

Coautor: Ing. Esteban Falconí C.

Colaborador (es): Departamento Nacional de Biotecnología

Fecha de inicio: 2009 - 07 - 01

Fecha de terminación: 2010 - 06 - 01

Presupuesto: US\$ 3.925,14

Fuente(s) de financiamiento: Fondos Fiscales

Organización o Persona	% Aporte
- Proyecto Código: 2100069001 (reactivos, transporte, impresiones, imprevistos)	31,39
- INIAP (Contraparte en Equipos y Laboratorios del Departamento Nacional de Biotecnología)	5,00
- Contraparte Estudiante	63,61
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

## 1. ANTECEDENTES

El trigo ha sido un rubro históricamente importante para la sociedad ecuatoriana. Los Planes de Desarrollo Agrícola que fueron planificados anteriormente en el Ecuador, lo ubicaban como un producto primordial en la alimentación de los ecuatorianos, posiblemente debido a la tendencia constante de incremento del consumo per cápita (Rivadeneira, 2005). En la actualidad, el consumo de trigo per cápita supera los 34 kg/año (ASEMOL, 2008; SIGAGRO, 2008). Sin embargo, la producción local es incipiente y en la actualidad logra satisfacer tan solo el 2 ó 3% de la demanda local, (FAOSTAT, 2007; Rivadeneira, 2005; ASEMOL, 2008), por lo que el 98% restante (ASEMOL, 2008) se suple mediante la importación de trigo de países como Canadá, Estados Unidos y Argentina (Rivadeneira, 2005). El Ecuador ha importado más de 450 000 t de trigo por año, en los últimos tres años (2006, 2007 y hasta agosto 2008) (ASEMOL, 2008).

La caída vertiginosa del cultivo de trigo en el Ecuador se debe tanto a factores externos como internos. Algunos factores externos son los bajos precios del producto en los países exportadores y la apertura crediticia otorgada a la industria nacional. Entre los factores internos, se puede destacar, el casi nulo incremento del rendimiento, el hecho de que la producción nacional esté mayormente representada por agricultores de subsistencia, la deficiente calidad y uniformidad del producto nacional, el bajo precio del producto nacional en el mercado (Rivadeneira, 2005) y probablemente, el factor más relevante es la incidencia de determinadas enfermedades en la planta, que tiene un efecto directo en la reducción del rendimiento (Ochoa *et al.*, 2007) y en la disminución de la calidad panadera del grano (Feuillet y Keller, 2004).

En el Ecuador, el cultivo de trigo ha sido afectado principalmente por el hongo biótrofo *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Westend, agente causal de la enfermedad comúnmente conocida como roya amarilla, cuyo efecto en los campos de trigo del país, junto con la falta de cultivares resistentes, ha provocado drásticas reducciones del área cultivada y pérdidas en el rendimiento de hasta el 96% (Ochoa, 1997).

La mayoría de cultivares liberados en el Ecuador por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) presentaron resistencia a roya amarilla, basada principalmente en genes mayores (*Yr*). Sin embargo, las poblaciones ecuatorianas del patógeno han logrado vencer estos genes de resistencia (Ochoa *et al.*, 2007), lo cual ha dado como resultado que los cultivares de trigo disponibles para los agricultores y productores del país ya no presenten resistencia genética efectiva para el control de roya amarilla (Falconi, 2009). Por lo general, se menciona que el tipo de resistencia que brindan los genes mayores es de tipo cualitativo y de raza específica, poco durable en el tiempo y por tanto, inefectiva a largo plazo. El tipo de resistencia parcial, como han mencionado ciertos autores, suele ser menos intensa, pero más efectiva que la resistencia basada en genes mayores (Feuillet y Keller, 2004).

Una estrategia utilizada en fréjol y aplicable en trigo consistiría en combinar dos genes mayores o más en una sola línea, lo que daría como resultado una alternativa efectiva, siempre y cuando los genes agrupados (piramidados), juntos entre todos, cubran un amplio espectro de virulencia del patógeno en cuestión (Kelly y Vallejo, 2004).

En el caso particular del Ecuador, se han realizado estudios de virulencia de las razas de roya amarilla y se ha tenido como conclusión que, al menos, hasta el año 2007 no existen factores de virulencia contra ciertos genes de carácter cualitativo, como son el *Yr5* y el *Yr15* (Ochoa *et al.*, 2007). Además, algunas investigaciones realizadas

incluyeron el desarrollo de marcadores moleculares específicos ligados a los genes antes mencionados (Wheat Cap, 2009).

Los programas de fitomejoramiento procuran incluir nuevas tecnologías disponibles, para acelerar los procesos de generación de variedades mejoradas con resistencia a enfermedades. Una de las tecnologías más empleadas y efectivas para el desarrollo acelerado de variedades mejoradas es el Mejoramiento Asistido por Marcadores Moleculares (MAS, por sus siglas en inglés) (Bariana *et al.*, 2002). Los marcadores moleculares disponibles para detectar rasgos específicos del genoma han aumentado de forma significativa en las dos últimas décadas (Feuillet y Keller, 2004).

## 2. JUSTIFICACIÓN:

En vista de que la roya amarilla (*P. striiformis* f. sp. *tritici* Westend) es uno de los principales problemas que afectan la producción de trigo en el país y debido a que la generación de variedades resistentes, a través de métodos convencionales, es un proceso que toma mucho tiempo, el INIAP, a través del Programa de Cereales, busca la incorporación de métodos complementarios a los procesos tradicionales que aceleren la generación de variedades de trigo superiores a las existentes. En este sentido, el uso de marcadores moleculares que permitan seleccionar líneas de trigo que contengan genes de interés debe ser considerado.

En vista de lo manifestado, el presente estudio busca constituirse en el punto de partida, para el que el Programa de Cereales incorpore esta tecnología en los programas de fitomejoramiento propuestos y que a futuro se disponga de una alternativa más certera y eficaz de selección de genotipos superiores, y a su vez que permita reconocer la inclusión de genes mayores (*Yr5* y *Yr15*) en una sola línea de trigo.

La investigación toma como premisa, que en el Ecuador no existen razas de roya amarilla patogénicas para los genes antes indicados, y que existe la disponibilidad de marcadores moleculares específicos ligados a estos genes.

## 3. OBJETIVO

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Validar protocolos de amplificación de marcadores ligados a genes de resistencia a roya amarilla de trigo.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Validar el protocolo de amplificación del marcador STS (STS-7/STS-8) ligado al gen de resistencia *Yr5*.
- ✓ Validar el protocolo de amplificación del marcador microsatélite (*Xbarc8*) ligado al gen de resistencia *Yr15*.

## 4. HIPÓTESIS

H<sub>0</sub> = No existe polimorfismo entre las líneas y cultivares analizados mediante el uso de marcadores moleculares específicos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

## **5.1. MATERIALES**

### **5.1.1. Material Vegetal**

Se trabajará con cinco líneas y ocho cultivares de trigo. La lista de éstos se detalla en el Anexo 1.

### **5.1.2. Reactivos, Equipos e Instalaciones**

Los materiales, reactivos y equipos utilizados para la siembra, extracción de ADN, cuantificación de ADN, amplificación STS y SSR y electroforesis se detallan en el Anexo 2.

## **5.2. METODOLOGÍA**

### **5.2.1. Características del Sitio Experimental**

La fase de invernadero se llevará a cabo en el Programa de Cereales y la de laboratorio en el Departamento de Biotecnología del Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicado en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC).

El análisis molecular se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) en la EESC del INIAP.

### **5.2.2. Localización Geográfica<sup>1</sup>**

Provincia: Pichincha.  
Cantón: Mejía y Quito.  
Parroquia: Cutuglagua.  
Altitud: 3058 m.s.n.m.  
Longitud: 78°33'W.  
Latitud: 00°22'S.

### **5.2.3. Factor en Estudio**

Los factores en estudios considerados serán los siguientes:

- Marcador Molecular:
  - o Xbarc8
  - o STS-7/STS-8
- Material Vegetal
  - o Líneas
    - Yr5/6\*Avocet
    - Yr8/6\*Avocet
    - Yr10/6\*Avocet
    - Yr15/6\*Avocet
    - Yr18/3\*Avocet
  - o Cultivares

---

<sup>1</sup> Estación Meteorológica del INIAP Santa Catalina

- INIAP - Cojitambo 92
- INIAP – Altar 82
- Berkut
- Milan
- Sokoll/Excalibur
- Catbird
- Chapio
- Morocco

#### **5.2.4. Tratamientos**

La combinación entre las líneas y cultivares utilizados en el estudio (Anexo 1), junto con los marcadores STS-7/STS-8 y *Xbarc8* (SSR) para el gen *Yr5* y *Yr15* respectivamente.

#### **5.2.5. Unidad Experimental**

Las unidades experimentales serán las muestras de ADN extraídas de 3 g de tejido vegetal proveniente de las hojas de cada línea o cultivar (ver Anexo 1). Además se realizarán 3 observaciones a partir de cada planta.

#### **5.2.6. Análisis Estadístico**

En el análisis estadístico se utilizará un Análisis de Correlación entre Presencia/Ausencia de Marcador con Resistencia/Susceptibilidad de Genotipo. El paquete estadístico que se va a usar es el InfoStat®.

#### **5.2.7. Variables y Métodos de Evaluación**

La variable en estudio será la amplificación de banda de ADN, registrado como presencia o ausencia de la misma.

#### **5.2.8. Manejo Específico del Experimento**

##### **5.2.8.1. Desinfección de Semillas y Germinación**

El protocolo de desinfección y siembra que se utilizará está detallado en el Anexo 3.

##### **5.2.8.2. Extracción de ADN**

La toma de muestras de hoja se realizará en etapa de plántula (Smith *et al.*, 2006). Estas deberán ser verdes, sanas y completamente extendidas (Sun, *et al.*, 2002; Smith, *et al.*, 2006; Wang, *et al.*, 2008).

Para la extracción de ADN se utilizará el protocolo detallado en el Anexo 4.

##### **5.2.8.3. Cuantificación de ADN**

La determinación de la concentración de ADN se realizará mediante el fluorómetro Qubit. El kit que contiene los reactivos requeridos para la cuantificación es el Quant-iT™ dsDNA BR Assay. El reactivo de trabajo se preparará según la cantidad de muestras de ADN que se tenga. El protocolo de cuantificación de ADN se detalla en el Anexo 5.

## 5.2.8.4. Amplificación con Marcadores Moleculares

### 5.2.8.4.1. Validación de Protocolos de Amplificación

Para la validación de los protocolos de amplificación de los marcadores ligados a los genes de resistencia *Yr5* y *Yr15*, se emplearán las líneas/cultivares descritos en el Anexo 1.

El tipo de marcadores moleculares que presentará el siguiente estudio serán del tipo PCR y son los STS (sequence tagged-site) que son secuencias de copia única en el ADN, de ubicación conocida y que están distribuidos en cualquier sitio del genoma y los microsatélite (SSRs), secuencias simples repetidas ó secuencias discretas (NCBI).

#### i. Amplificación para el gen *Yr5*

El set de marcadores STS-7/STS-8 ligado al gen *Yr5* se incluye en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Set de marcadores STS y secuencias de los primers ligados al gen *Yr5* (Wheat Cap, 2009).

Set	Primer	Secuencia
STS-7/STS-8	STS - 7	5'- GTA CAA TTC ACC TAG AGT -3'
	STS - 8	5'- GCA AGT TTT CTC CCT ATT -3'

#### ii. Amplificación para el gen *Yr15*

Para la amplificación del gen *Yr15*, se tomará en cuenta el marcador microsatélite *Xbarc8* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Información del marcador microsatélite *Xbarc8* (Graingenes).

Secuencia	Motifs	Temp. de alineamiento (°C)
5' GCGGGAATCATGCATAGGAAAACAGAA 3'	TTA	50
5' GCGGGGGCGAAACATACACATAAAAACA 3'	15+11	

En el Anexo 6 se detalla el protocolo de amplificación para el marcador STS-7/STS-8 ligado al gen *Yr5* y el marcador *Xbarc8* ligado al gen *Yr15*.

## 6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	Duración (Meses)											
	jul	ago	sep	oct	nov	dic	ene	feb	mar	abr	may	jun
1. Revisión bibliográfica	■	■										
2. Escritura del anteproyecto		■	■	■								
3. Elaboración del presupuesto				■								
4. Ajustes y aprobación del anteproyecto					■	■						
4. Siembra de semillas en invernadero							■					
4. Extracción de ADN							■					
5. Amplificación con marcadores moleculares								■	■	■		
6. Registro de datos							■	■	■	■		
7. Análisis de resultados									■	■	■	
8. Elaboración informe Final									■	■	■	■
9. Entrega informe final												■

## 7. PRESUPUESTO

Concepto	Unidad	Cantidad	\$/Unidad	\$/Total
<b>Germinación y Muestreo de Plantas</b>				
Semilla	Semilla	---	---	40,00
Muestreo	Plántulas	10	1,50	15,00
<b>Análisis Moleculares*</b>				
Extracción de ADN	1	20	3,08	61,60
Cuantificación de ADN	1-20	20	15,06	15,06
PCR	1	240 Rx	1,08	259,20
Visualización Marc. Moleculares	1-50	5	17,42	87,10
<b>Material de Oficina</b>				
Papelería, flash memory, esferos, otros	Diverso	---	200,00	200,00
<b>Otros</b>				
Capacitación	Curso	4	100,00	400,00
Copias	Hojas	1000	0,02	20,00
Fotografías	Fotos	50	4,50	225,00
<b>Contraparte Estudiante (Alimentación, sueldo)</b>				2 496,77
Subtotal				3. 820,00
Imprevistos (5%)				105,14
<b>Total</b>				<b>3. 925,14</b>



**Fuente de Financiamiento**

<b>Organización o Persona</b>	<b>% Aporte</b>
- Proyecto Código: 2100069001 (reactivos, transporte, impresiones, imprevistos)	31,39
- INIAP (Contraparte en Equipos y Laboratorios del Departamento Nacional de Biotecnología)	5,00
- Contraparte Estudiante	63,61
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

## 8. LITERATURA CITADA

- ASEMOL (Asociación Ecuatoriana de Molineros). 2008. Industrias Molineras: Asociación Ecuatoriana de Molineros. "ASEMOL" (en línea). Consultado 18 abr. 2008. Disponible en: [www.alim2008.com.ve/formatos/ECUADOR%20ALIM%202008.ppt](http://www.alim2008.com.ve/formatos/ECUADOR%20ALIM%202008.ppt).
- Bariana, H; Brown, G; Ahmed, N; Khatkar, S; Conner, R; Wellings, C; Haley, S; Sharp, S; Laroche, A. 2002. Characterization of *Triticum vavilovii* –derived stripe rust resistance using genetic, cytogenetic and molecular analyses and its marker-assisted selection *Theoretical Applied Genetics* (104): 315- 320.
- CIMMYT (Centro Internacional de Maiz y Trigo). 2009. GenericBWNames MEXJan09.xls (en línea). Consultado 12 ago. 2009. Disponible [www.cimmyt.org/english/wps/.../GenericBWNamesMEXJan09.xls](http://www.cimmyt.org/english/wps/.../GenericBWNamesMEXJan09.xls).
- Coronel, J; Rivadeneira, M; Urbano, J; Díaz, N; Abad, S. 2008. INIAP – COJITAMBO 92. Variedad de Trigo para el Austro. SECC de Comunicación del INIAP. Reimpresión del año de 1993. Quito. Ecuador. pp 1-6. Reimpreso no.130.
- Falconí, E. 2009. Programa de Cereales. Estación Experimental Santa Catalina (Comunicación personal). Quito, EC. Estación Experimental Santa Catalina.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics) 2008. Yield (Hg/Ha) Ecuador. Wheat. (2007) (en línea). Consultado. 15 abr. 2009. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Feuillet, C; Keller, B. 2004. Molecular Markers for Disease Resistance: The Example of Wheat. Eds. H Lörz y G Wenzel. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (55)353 – 370.
- GrainGenes. Prob: BARC8 (en línea). Consultado 5 may. 2009. Disponible en: <http://www.graingenes.org/cgi-bin/ace/tree/graingenes?name=BARC8&class=Probe>.
- Invitrogen, 2007. Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kits MP 32850. For use with the Qubit™ fluorometer (en línea). Consultado 31 jul. 2009. Disponible en: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp32852.pdf>.
- Invitrogen, 2004. PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit. For purification of DNA from plant. Catalog no. K1830-01 Version A 11 October 2004 25-0757 (en línea). Consultado 20 abr. 2009. Disponible en: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink\\_plant\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/purelink_plant_man.pdf).
- Huerta, J. 2009. Técnico del CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo). (Comunicación Personal). Quito, EC. Estación Experimental Santa Catalina.
- Kelly, JD; y Vallejo,VA. 2004. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. *Horticultural Science* (39):1196-1207.

- McIntosh, RA; Wellings, CR; Park, RF. 1995. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. Melbourn, AU. Ed. K Jeans; A Cloud-Guest A. CSIRO Publications. pp.155, 159-160, 161-163, 165-166, 168-170.
- NCBI. Sequence – Tagged Sites (STS) (en línea). Consultado 6 may. 2009. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechSTS.shtml>.
- Ochoa, J. 1997. Primer Taller de Predusa en Resistencia Duradera en Cultivos Altos en la Zona Andina: La roya amarilla del trigo en el Ecuador aspectos epidemiológicos y de resistencia. Ed. D Danial. Quito, EC. p. 52.
- Ochoa, JB; Danial, DL; Paucar, B. 2007. Virulence of wheat yellow rust races and resistance genes of wheat cultivars in Ecuador. *Euphytica* (153):287 – 293.
- Rivadeneira, M. 2005. Inventario Tecnológico del Programa de Cereales. Rubro Trigo (*Triticum aestivum* L.) Quito, EC, INIAP. pp. 27-39.
- SIGAGRO. 2008. Trigo y Molinería (en línea). Consultado 15 abr. 2009. Disponible en: <http://www.sica.gov.ec/cadenas/trigo/>.
- Skovmand, B; Villareal, R; van Ginkel M; Rajaram, S; Ortiz-Ferrara, G. 1997. Semidwarf Bread Wheats: Names, Parentages, Pedigrees, and Origins. México D.F., MX. pp. 18, 36.
- Smith, PH; Hadfield, J; Hart, NJ; Koebner, RMD; Boyd LA. 2006. STS markers for wheat yellow rust resistance gene *Yr5* suggest a NBS – LRR-type resistance gene cluster. *Genome* (50):259-265.
- Sun, Q; Wei, Y; Ni, Z; Xie, C; Yang, T. 2002. Short Communication Microsatellite marker for yellow rust resistance gene *Yr5* in wheat introgressed from spelt wheat. *Plant Breeding* (121):519-521.
- Urbano, J; Tola, J. 1984. INIAP ALTAR-82: Nueva Variedad de Trigo para La Sierra Ecuatoriana. Boletín Divulgativa no. 145. Ed. G Heredia. Quito, EC. pp. 1-3.
- Wang, Ch; Zhang, Y; Dejun, H; Zhensheng, K; Guiping, L; Aizhong, C; Peidu, Ch. 2008. SSR and STS markers for wheat stripe rust resistance gene *Yr26*. *Euphytica* (159):359-266.
- Wheat CAP (Wheat Applied Genomics). 2009. Disease Resistance. Stripe Rust Resistance Gene *Yr5* (en línea). Consultado 21 abr. 2009. Disponible en: <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/yr5/index.htm>.
- Wheat CAP (Wheat Applied Genomics) 2009. Disease Resistance. Stripe Rust Resistance Gene *Yr15* (en línea). Consultado 21 abr. 2009. Disponible en: <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Yr15/index.htm>.

## 9. ANEXOS

**Anexo 1.** Cultivares y líneas de trigo empleados en la validación de protocolos de amplificación (Urbano y Tola, 1984; McIntosh *et al.*, 1995; Skovmand *et al.*, 1997; Coronel *et al.*, 2008; Huerta, 2009; CIMMYT, 2009).

Variedad ó línea	Pedigrí u Origen	Característica
Yr5/6*Avocet	<i>Triticum spelta album</i> <sup>a</sup> /Avocet	Resistencia a roya amarilla de tipo específica
Yr8/6*Avocet	<i>Triticum comosum</i>	Resistencia a roya amarilla de tipo específica Gen menor
Yr10/6*Avocet	<i>Triticum spelta</i> 415	Resistencia a roya amarilla de tipo específica
Yr15/6*Avocet	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>dicoccoides</i> <sup>b</sup> Kornd /Avocet	Resistencia a roya amarilla de tipo específica
Yr18/3*Avocet	<i>Triticum aestivum</i>	Gen menor de planta adulta. Ligado al gen <i>Lr34</i>
Berkut	Irena/Babaxi/Pastor	Incluido en el programa de cruzamientos del Programa de Cereales
Catbird	Chum18/Bac	Presenta caracteres agronómicos e incluido en programa cruzamientos del Programa de Cereales
Chapio	Carianca 422/Anahuac f 75/Yaco/3/Kauz*2/Trapf/Kauz	Porta cinco genes menores
INIAP Altar '82	Tezanos Pinto Precoz - Sonora 64A /Desconocido - Trocor	Resistencia parcial a roya amarilla
INIAP-Cojitambo '92	Bonanza/Yecora/3/F.3575/Kalian-Zona/Bluebird	Resistencia parcial a roya amarilla
Milan	VS73.600/MRL/3/BOW//YR/TRF	Presenta el gen <i>Yr17</i>
Morocco	—	Control susceptible
Sokol/Excalibur	Sokol/Excalibur	Presenta caracteres agronómicos e incluido en programa cruzamientos del Programa de Cereales

a: Donante del gen *Yr5*

b: Donante gen *Yr15*

## **Anexo 2. Materiales, Reactivos y Equipos Requeridos.**

### **- MATERIAL DE OFICINA**

- Computadora con internet.
- Hojas.
- Flash Memory.
- Cámara fotográfica.
- Esferos.

### **- FASE DE INVERNADERO: Germinación Semillas y Muestreo del Material Vegetal**

- Semillas.
- Sobres para semillas.
- Vitabax.
- Recipiente plástico.
- Macetas plásticas.
- Palas pequeñas.
- Agua corriente.
- Etiquetas plásticas.
- Sustrato desinfectado.
- Urea.
- Guantes.
- Insecticida Nimrod.
- Fungicida Thiodan.
- Bomba de aspersion.
- Mascarilla.
- Gafas protectoras.
- Traje impermeable.
- Marcador permanente para vidrio y plástico.
- Etanol.
- Transiluminador.
- Pinzas.
- Tubos Eppendorf.
- Guantes quirúrgicos.
- Cooler de tubos Eppendorf.
- Hielo.

### **- FASE DE LABORATORIO: Extracción, Cuantificación y Amplificación**

#### **Reactivos**

- Kit de Extracción: Pure Link Plant Total DNA Purification Kit de Invitrogen®.
- Kit de cuantificación: para el Fluorómetro Qubit Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kits.
- Blue juice/blue stop.
- Agarosa.
- Poliacrilamida.
- Tris TAE.
- MgCl<sub>2</sub> 25mM.
- 5XPCR buffer Gotaq.
- dNTP's

- Primers SSR (*Xbarc8*) y STS (STS-7/STS-8).
- Taq polimerasa.
- Go Taq.
- Agua ultrapura.
- Aceite mineral
- Marcador de peso molecular.
- Agua destilada.
- Bromuro de etidio.
- Low Mass Ladder
- Tartrazina.
- Marcador de peso molecular 100 bp.

### **Equipos e Instalaciones**

- Equipo de Baño María "Mettler".
- Centrifuga Eppendorf "5415D".
- Fluorómetro "Qubit".
- Vortex "Labnet Vx 1000N".
- Refrigerador -4 °C.
- Congelador -20 °C.
- Transiluminador UV Sistema de fotodocumentación de geles "Dolphin View".
- Termocicladores a Gradiente "BIOMETRA".
- Cámaras electroforéticas Horizontales Marca "LABNET".
- Plato agitador- calentador.
- Extractora de gases (Sorbona).
- Balanza analítica.
- Fuente de poder.
- Horno microondas.
- Shaker (tinción con bromuro de etidio).
- Cámara de flujo laminar vertical.
- Timer.
- Microcentrífuga.

### **Materiales**

- Tubos Eppendorf 0.6 ml, 1.5 ml, 2.0 ml.
- Morteros.
- Pistilos de maceración.
- Gradillas.
- Puntas 1ml, 200 ul, 1000 ul.
- Papel parafilm.
- Papel aluminio.
- Juego de micro-pipetas.
- Placas PCR
- Espátula.
- Taras.
- Flotadores para tubos Eppendorf.
- Matraz erlenmeyer.
- Probeta.
- Vaso de precipitación.
- Guantes de nitrilo.
- Guantes quirúrgicos

- Papel absorbente

### Anexo 3. Protocolo de Desinfección y Siembra del Material Vegetal.

Antes de realizar la siembra se deberá proceder a desinfectarlas con el producto Vitabax, el mismo que será usado en una concentración de 2 g por cada kilogramo de semilla. El tiempo de desinfección será de aproximadamente 3 min.

A continuación se procederá con la siembra de las semillas en cada maceta según indica el procedimiento

- 1) Se llenarán, de manera uniforme, 15 macetas de 2 kilos de capacidad con sustrato autoclavado, que tenga alto contenido de materia orgánica (~3%). La tierra de las macetas se irrigará con agua corriente hasta capacidad de campo.

Se identificarán y enumerarán las macetas de cada línea y cultivar mediante etiquetas plásticas. Las semillas previamente desinfectadas serán sembradas en el sustrato a una profundidad de 1.5 cm, en una cantidad de 15 semillas por maceta. Las macetas se ubicarán sobre la plataforma de cemento del invernadero, alineadas en filas y columnas.

El sensor de temperatura del invernadero será calibrado en el rango de temperatura de 22 -27 °C.

- 2) El riego de las macetas se realizará una vez por día, durante todo el ciclo del trigo. En caso de que sea un día caluroso es posible que se requiera regar al menos dos veces diarias.
- 3) La incorporación de urea se hará de forma particionada (3 g/maceta). Por este motivo, a los 30 días después de la siembra se agregará 1 g de urea y lo restante se añadirá en las semanas subsiguientes.
- 4) En caso de ser necesario, para el control del hongo Oidio (*Erysiphe graminis*) y áfidos (*Aphididae* spp.), se aplicará Nimrod (bupirinato, en una dosis de 1,5 ml por litro de agua y Thiodan® (endosulfán), en una dosis de 1,5 ml por litro de agua, respectivamente. La aplicación de este producto se realizará con una bomba de aspersion y además se utilizará mascarilla, gafas protectoras, botas y un traje impermeable.



#### **Anexo 4. Muestreo y Extracción de ADN.**

El aislamiento de ADN genómico vegetal se realizará a partir de las líneas y cultivares antes mencionados.

Algunos trabajos realizados que involucraron la participación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a roya amarilla en trigo presentaron ciertas recomendaciones en la etapa de muestreo del material vegetal. Algunas consideraciones incluyen que la toma de muestras se realice en etapa de plántula (Smith *et al.*, 2007). En relación a las hojas, éstas deben ser verdes, sanas, completamente extendidas (Sun, *et al.*, 2002; Smith, *et al.*, 2006; Wang, *et al.*, 2008).

- 1) Bajo condiciones asépticas, se trasladará desde el laboratorio hacia el invernadero de trigo un cooler de tubos Eppendorf, pinzas desinfectadas con etanol al 50% y tubos Eppendorf estériles.
- 2) Para el muestreo, se tomará en cuenta las pautas antes indicadas y se evitará dañar la planta, luego, con guantes estériles y pinza desinfectada, se tomará aproximadamente 100 mg de tejido de hoja y se los ubicará en los tubos Eppendorf. Se identificará cada tubo y se anotará la procedencia del tejido vegetal (YR5/6\*Avocet y YR15/6\*Avocet para las líneas resistentes, Morocco, Cojitambo y Altar para los testigos. Los tubos Eppendorf se trasladarán al laboratorio, ubicándolos en la gradilla refrigerada.

La extracción de ADN de cada línea o cultivar se realizará con el Kit de Extracción de ADN Purelink Plant Total DNA Purification Kit de Invitrogen®. El protocolo llevado a cabo es el sugerido por Invitrogen (2004) con ciertas modificaciones.

La siguiente parte de la metodología será llevada a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular.

A partir de las muestras de material vegetal resistente y susceptible se realizará lo siguiente:

- 1) A cada muestra del tubo Eppendorf, se añadirán 250  $\mu$ L de "Buffer" (R2).

Luego se realizará 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) para cada muestra. Este paso se realizará con prolijidad hasta que se observe una especie de pasta verdosa.

- 2) Posteriormente, para homogeneizar el tejido se transferirá cada tubo Eppendorf al vortex durante unos segundos (modelo Labnet Vx 1000N). Una vez finalizado este paso, se depositarán los pistilos usados en un vaso de precipitación. Se añadirán 15  $\mu$ L de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% y 15  $\mu$ L de RNase A (20 mg/ml) a cada tubo Eppendorf.

- 3) Se dispondrán los tubos que contienen el material vegetal lisado en un flotador Eppendorf, y se los incubará a baño maría (Memmert), a una temperatura de 55 °C por 15 min. Cuando transcurran 7.5 min, se deberá golpear ligeramente la base de los tubos y luego ubicarlos nuevamente en la gradilla hasta que termine el periodo de incubación.

A continuación se centrifugará cada tubo (Centrífuga Eppendorf 5415D) a 13 000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min.

4) Al culminar la centrifugación, se transferirá el sobrenadante claro a un microtubo Eppendorf estéril de 1,5 ml. Cuando este paso se realice, se deberá tener la precaución de no alterar el pellet.

5) Posteriormente, se añadirán 100  $\mu$ L de "Precipitation Buffer" (N2) a cada microtubo de 1,5 ml, primero se lo mezclará por inversión y luego serán sometidos a un ligero vortex. Posteriormente, se incubarán las muestras por 5 min en la congeladora a una temperatura de  $-20^{\circ}$  C.

Los tubos se centrifugarán a 13 000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.

6) Se transferirán 250  $\mu$ L del lisado de cada tubo a un nuevo microtubo estéril de 1,5 mL y se añadirán 375  $\mu$ L del "Binding buffer" (B4) que contiene etanol, y se mezclará bien.

#### - **"Binding" ADN**

1) El contenido de los microtubos del paso 6 del procedimiento anterior serán transferidos a los tubos de columna del kit.

2) Los tubos se centrifugarán a 10 000 rpm por 1 min, a temperatura ambiente.

Luego, se descartará el sobrenadante depositándolo en un vaso de precipitación.

#### - **Lavado de ADN**

1) Se añadirán 500  $\mu$ L de "Wash Buffer" (W4) a cada tubo de columna.

Posteriormente, se centrifugarán los tubos a 10 000 rpm por 1 min a temperatura ambiente y se descartará el sobrenadante de cada tubo de lavado.

Luego, se ubicará cada columna nuevamente en el tubo.

2) Se añadirán 500  $\mu$ L de "Wash Buffer" (W5) que contiene etanol a cada columna.

3) Posteriormente, se centrifugará cada Cartucho de Centrífuga a 10 000 rpm por 1 min a temperatura ambiente y se descartará el sobrenadante del tubo de lavado. Los pasos 3 y 4 se repetirán una vez más.

4) Se centrifugará cada Cartucho de Centrífuga a 13 000 rpm, por 2 min, a temperatura ambiente para eliminar cualquier residuo de "Wash Buffer" (W5) y se descartará cada tubo de lavado.

#### - **"Eluting" y almacenamiento de ADN**

1) Se ubicará cada Cartucho de Centrífuga en un microtubo de centrifuga de 1,5 mL libre de DNasa A.

Posteriormente, se añadirán 100  $\mu$ L de "Elution Buffer" (E1), en la mitad de la membrana sin tocar el tubo.

2) Se procederá a incubar los microtubos por 1 min, a temperatura ambiente. Luego se los centrifugará a 13 000 rpm por 1 min.

Para recuperar más ADN se añadirán 100 µL de "Elution Buffer" (E1). Este paso se lo podrá realizar en el mismo tubo de elusión o en uno diferente.

El tubo de elusión contendrá el ADN purificado. Finalmente, se descartará y desechará el cartucho.

3) Cuando se vaya a utilizar el ADN en un lapso de tiempo corto se lo almacenará en una congeladora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Si se lo va a usar posteriormente, se lo almacenará con "Elution Buffer" (E1) a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Anexo 5. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizará mediante el fluorómetro Qubit de Invitrogen® y según lo que indica Invitrogen para cuantificar con el kit Quant-iT™ dsDNA BR Assay (Invitrogen, 2007). Se procederá de la siguiente manera.

- 1) Los tubos serán etiquetados según la cantidad de muestras de ADN que se requiera cuantificar. Este ensayo requiere la preparación de dos estándares.
- 2) Luego, se preparará el reactivo de trabajo en un tubo Eppendorf de 0,5 µL, limpio y seco. El reactivo de trabajo (RT) contendrá una solución que incluya 1 µL del Quant-iT™ dsDNA BR reagent y 199 µL del Quant-iT™ dsDNA BR buffer (1:200). La cantidad de cada uno de los componentes del RT dependerá del número de muestras de ADN que se requiera cuantificar. Sin embargo, siempre deberá estar en la concentración antes mencionada.
- 3) En dos tubos Eppendorf identificados como SI y SII (Estándar I y Estándar II) se transferirán 190 µL del RT y se añadirán 10 µL Quant-iT™ dsDNA BR standard #1 y Quant-iT™ dsDNA BR standard #2 respectivamente.
- 4) En los tubos Eppendorf correspondientes a las muestras se procederá a ubicar cualquier volumen de RT entre 180 µL y 199 µL y de 20 µL a 1 µL de ADN. Se deberá tomar en consideración que el volumen final de cada tubo deberá ser 200 µL.
- 5) Todos los tubos se llevarán al vortex por durante 2 – 3 s y se evitará la formación de burbujas.
- 6) A continuación se encenderá el fluorómetro y se trabajará en la función Quant-iT™ DNA, BR. En primera instancia se ubicará el tubo Eppendorf que corresponde al Estándar I y posteriormente se las instrucciones que indica el equipo. La pantalla del equipo registrará la lectura de concentración de cada muestra de ADN en µg/ml.
- 7) Finalmente, se utilizará la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de la muestra} = \text{Valor } (\mu\text{g/ml}) \text{ Registrado c/muestra} * (200/x)$$

Nota: El valor de x variará según la cantidad de ADN que se incluya en cada tubo, al igual que el valor de 200, que corresponde a la cantidad de µL de RT.

## Anexo 6. Protocolos de Amplificación para los Marcadores STS y SSR.

### A. Protocolo de Amplificación del Marcador STS-7/STS-8.

A partir de la cantidad de ADN cuantificada es posible que se requiera diluir las muestras. Para ello se va a realizar lo siguiente:

- 1) Se encenderá la cámara de flujo laminar y se va a esterilizar por 3 – 5 min con UV el interior de la cámara y el material que va a ser usado (tips, pipetas, entre otros). Una vez que transcurra este lapso de tiempo se activa el flujo de la cámara y se trabaja en asepsia.
- 2) Según la cantidad de ADN cuantificado se deberá diluir las muestras a una concentración de 30 ng/µl. Para ello se diluye con el agua de tartrazina 1M.
- 3) Una vez realizado ello se procederá a realizar la amplificación del marcador STS para el gen Yr5.

A continuación se detalla el coctel de amplificación para el marcador STS – 7 STS – 8.

Cuadro 1. Coctel PCR para el Marcador STS-7 y STS-8 (Wheat Cap, 2009).

Componente	Concentración Final
dNTPs	0,2 mM
Cloruro de magnesio	5 mM
Primers	0,4 µM (cada uno)
Taq DNA polimerasa (Go Taq) (Promega)	0,6 U
Buffer 10X (Promega) libre de magnesio	1,5 µL
ADN (cada muestra)	30 ng

El volumen final de la reacción será de 15 µl.

Cuadro 2. Programa de amplificación del marcador STS (Wheat Cap, 2009).

Temperatura (°C)	Tiempo (s o min)	Información Adicional
94	5 min	Número de ciclos: 45 <sup>b</sup>
94 <sup>a</sup>	30 s	
45 <sup>a</sup>	30 s	
72	45 s	
72	7 min	

Nota: según recomendación el "ramp time" deberá realizarse en el menor tiempo posible

a: entre estos pasos se usa un "ramp time" de 2,5 min

b: el número de ciclos podrá reducirse a 40, si se utiliza un sistema de detección más sensible

Una vez finalizada la amplificación con los marcadores moleculares, los productos amplificados se separarán en un gel de poliacrilamida al 6% y serán teñidos en Bromuro

de Etidio 1X durante 25 minutos. Finalmente, el gel teñido se visualizará en un fotodocumentador marca "Dolphin View".

**B. Protocolo de Amplificación del Marcador SSR *Xbarc8*.**

- 1) Se encenderá la cámara de flujo laminar y se va a esterilizar por 3 – 5 min con UV el interior de la cámara y el material que va a ser usado (tips, pipetas, entre otros). Una vez que transcurra este lapso de tiempo se activa el flujo de la cámara y se trabaja en asepsia.
- 2) Según la cantidad de ADN cuantificado se deberá diluir las muestras.
- 3) Una vez realizado ello se procederá a realizar la amplificación del marcador SSR para el gen *Yr15*.

A continuación se detalla el coctel de amplificación para el marcador SSR *Xbarc8*.

Cuadro 3. Coctel PCR para el Marcador *Xbarc8*.

Componente	Concentración Final
dNTPs	0,2 mM
Cloruro de magnesio	5 mM
Primers (Fw/Rv)	0,4 µM (cada uno)
Taq DNA polimerasa (Go Taq) (Promega)	0,5 U
Buffer 10X (Promega) libre de magnesio	1,5 µL
ADN (cada muestra)	30 ng

El volumen final de la reacción será de 15 µl.

Cuadro 4. Programa de amplificación del marcador *Xbarc8*. (Wheat Cap, 2009; Grain Genes).

Temperatura (°C)	Tiempo (s o min)	Información Adicional
94	5 min	Número de ciclos: 45 <sup>b</sup>
94 <sup>a</sup>	45 s	
50 <sup>a</sup>	30 s	
72	45 s	
72	7 min	

Nota: según recomendación el "ramp time" deberá realizarse en el menor tiempo posible

a: entre estos pasos se usa un "ramp time" de 2,5 min

b: el número de ciclos podrá reducirse a 40, si se utiliza un sistema de detección más sensible

Una vez finalizada la PCR, los productos amplificados se separarán en un gel de poliacrilamida al 6% teñido en bromuro de etidio. El gel es será visualizado en el fotodocumentador marca "Dolphin View".