



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTOR: MÁRQUEZ CARRILLO, MIGUEL EDUARDO

**TEMA: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 297
GENOTIPOS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)
PROVENIENTES DEL CENTRO INTERNACIONAL DE
MEJORAMIENTO DE MAÍZ Y TRIGO E INFERENCIA DE
SU ESTRUCTURA GENÉTICA.**

DIRECTORA: M.Sc. MARÍA FERNANDA LOAYZA VILLA

CODIRECTORA: B.Sc. LOURDES KARINA PONCE

SANGOLQUÍ, ENERO 2014

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, MIGUEL EDUARDO MÁRQUEZ CARRILLO

Declaro que:

El proyecto de grado denominado “Caracterización molecular de 297 genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo e inferencia de su estructura genética”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, cuyas fuentes se incorporan en referencias bibliográficas. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 20 de Enero del 2014

Miguel Eduardo Márquez Carrillo

AUTORIZACIÓN

Yo, MIGUEL EDUARDO MÁRQUEZ CARRILLO

Autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución, de la tesis de grado titulada: “Caracterización molecular de 297 genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo e inferencia de su estructura genética”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 20 de Enero del 2014

Miguel Eduardo Márquez Carrillo

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sr. MIGUEL EDUARDO MÁRQUEZ CARRILLO como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

20 de Enero del 2014

Fecha

MSc. María Fernanda Loayza Villa

DIRECTORA

B.Sc. Lourdes Karina Ponce Loaiza

CODIRECTORA

DEDICATORIA

A mi hijo, que es el combustible que me mueve cada día,

A mi esposa, mi otra mitad,

A mis padres quienes cuidan de todos nosotros,

A mis hermanos, que alegran mi día a día,

Miguel

AGRADECIMIENTOS

En principio, deseo expresar mi sentimiento de gratitud al Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en especial al Dr. Eduardo Morillo por haber confiado en mí, y sobre todo por toda la paciencia que me tuvo durante este periodo.

Al Ingeniero Esteban Falconí, quien siempre estuvo preocupado del avance y la calidad de mi trabajo y me ayudó mucho con la guía y asesoramiento de la investigación. También a la Ing. Johana Buitrón, ya que la considero como mi mentora y pilar importante de esta investigación, a la Lcda. Katerine Orbe por extenderme la mano cuando lo necesite, a Sory, Señor Mary y Doña Geo, por haber amenizado mi estancia en el Laboratorio y la ayuda brindada. A mi amigo José, que me enseñó el verdadero sentido del compañerismo, a Naty y Liz, por compartir junto a mi esta experiencia.

A mi Directora M.Sc. María Fernanda Loayza y mi Codirectora B.Sc. Karina Ponce, su ayuda fue muy importante para cristalizar este trabajo, me faltan palabras para agradecerles por la gestión desinteresada por mí.

A mis compañeros (as) y amigos (as) de laboratorio de biotecnología, quienes a diario me brindaron su amistad y ayuda.

A mis amigos de la universidad, que me acolitaron durante la etapa de estudios, compartiendo deberes, pruebas y proyectos apoyándonos unos con otros, en especial

a Javier, Andrea, Elius, Boris, Juanes, Grace, los chachos y todos los que nunca me permitieron rendirme y me incentivaron a acabar y salir por la puerta grande.

A mi esposa, que todos los días me cuida y me alienta con su entusiasmo y amor, a mi hijo, por quien doy mi vida, aún recuerdo el día que me dijo, “papi, quiero ser doctor de plantas como tú”, y encendió la chispa para que todo esto se consume.

A mis padres que con su ejemplo me mostraron el camino correcto siempre confiaron en mí y me permiten ser el ejemplo de mis hermanos.

A todas las personas que me extendieron su mano incondicionalmente les puedo decir.

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema	2
1.3. Objetivo.....	4
1.3.1. Objetivo General	4
1.3.2. Objetivos Específicos	4
1.4. Marco Teórico.....	5
1.4.1. Generalidades del Trigo	5
1.4.1.1. Descripción botánica.....	5
1.4.1.2. Genética del trigo.....	6
1.4.2. Impacto económico y social del cultivo de trigo.....	7
1.4.3. Plagas que afectan el cultivo de trigo: “roya y fusariosis”	9
1.4.4. Mejoramiento genético del trigo	9
1.4.5. Caracterización molecular	10
1.4.6. Marcadores Moleculares	11
1.4.6.1. Secuencias de Repetición Simple ó Microsatélites.....	13
1.4.7. Análisis bioinformático	14
1.4.7.1. Métodos bayesianos	14
1.5. Hipótesis	15
CAPÍTULO II	16
MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Participantes	16
2.1.1. Instituciones:	16
2.1.2. Personas:.....	16
2.2. Zona de estudio	17
2.3. Período de investigación	17
2.4. Estadística	18
2.5. Procedimientos.....	18
2.5.1. Material vegetal	18
2.5.2. Caracterización molecular	19
2.5.2.1. Extracción de ADN.....	19

2.5.2.2.	Cuantificación de ADN	20
2.5.2.3.	Validación de ADN	20
2.5.2.4.	Validación de polimorfismo de <i>primers</i> SSR.....	22
2.5.2.5.	Estandarización del genotipaje en LI-COR 4300S con <i>primers</i> seleccionados.....	22
2.5.2.6.	Genotipaje de marcadores seleccionados SSR en LI-COR 4300S (corridas).....	23
2.5.2.7.	Registro de datos del LI-COR 4300S y Análisis Estadísticos	24
2.5.2.7.1.	Selección de datos para análisis de Asignación genética	24
2.5.2.7.2.	Análisis de diversidad genética.....	25
2.5.2.7.3.	Asignación genética.....	26
2.5.2.7.4.	Determinación del número de subpoblaciones	27
2.5.2.7.5.	Análisis multivariados	27
2.5.2.7.6.	Correlación con datos fenotípicos.....	28
CAPÍTULO III		29
RESULTADOS.....		29
3.1.	Extracción y cuantificación de ADN	29
3.2.	Validación de muestras de ADN.....	30
3.3.	Validación de polimorfismo de <i>primers</i> SSR	30
3.4.	Estandarización del genotipaje en LI-COR 4300S con <i>primers</i> seleccionados.....	35
3.5.	Genotipaje de marcadores seleccionados SSR en LI-COR 4300S (corridas).....	36
3.6.	Registro de datos del LI-COR 4300S y análisis estadísticos	39
3.6.1.	Asignación genética	41
3.6.2.	Correlación de datos fenotípicos	47
CAPÍTULO IV		48
DISCUSIÓN		48
CAPÍTULO V		53
CONCLUSIONES		53
CAPÍTULO VI.....		55
RECOMENDACIONES		55
CAPÍTULO VII		56
REFERENCIAS		56
ANEXOS		66

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. 1 Clasificación taxonómica del trigo <i>Triticum aestivum</i>.....</i>	<i>5</i>
<i>Tabla 2. 1 Características geográficas y ambientales del sitio experimental</i>	<i>17</i>
<i>Tabla 2. 2 Programa de amplificación de SSR BARC10 en trigo.....</i>	<i>20</i>
<i>Tabla 2. 3 Cóctel de reacción para amplificación de microsatélites de trigo.</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 3. 1 Temperatura de annealing descrita para cada primer.....</i>	<i>31</i>
<i>Tabla 3. 2 Detalle de primers seleccionados para la caracterización molecular.</i>	<i>32</i>
<i>Tabla 3. 3 Combinaciones de primers para genotipaje.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabla 3. 4 Marcadores SSRs utilizados en análisis de estructura.</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 3. 5 Análisis de diversidad genética de 28 marcadores.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3. 6 Porcentajes individuales y acumulados de la varianza para 2 coordenadas, en el análisis de 297 materiales con 3700 SNPs.</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 3. 7 Frecuencia relativa de individuos con características fenotípicas asociadas a la resistencia o susceptibilidad a los fitopatógenos en las subpoblaciones encontradas.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 3. 8 Frecuencia relativa de individuos con características fenotípicas reportadas asociadas a las subpoblaciones encontradas.....</i>	<i>47</i>

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<i>Ilustración 3. 1 Cuantificación de muestras de ADN genómico en un gel de agarosa al 1%.....</i>	<i>29</i>
<i>Ilustración 3. 2 Productos de amplificación del marcador BARC10 en un gel de agarosa al 2% (M: Marcador de peso molecular 100 pb).....</i>	<i>30</i>
<i>Ilustración 3. 3 Productos de amplificación de varios marcadores en un gel de poliacrilamida en LI-COR 4300.....</i>	<i>32</i>
<i>Ilustración 3. 4 Localización de 33 primers seleccionados en el genoma de trigo, para la caracterización molecular.....</i>	<i>35</i>
<i>Ilustración 3. 5 Amplificación de la placa 3 con el primer.....</i>	<i>37</i>
<i>Ilustración 3. 6 Amplificación de la placa 1 con el primer.....</i>	<i>37</i>
<i>Ilustración 3. 7 Amplificación de la placa 2 con el primer WMC728 y WMC658 en Li-COR 4300 s.....</i>	<i>38</i>
<i>Ilustración 3. 8 Amplificación de la placa 3 con el primer WMC111 y WMC773 en Li-COR 4300 s.....</i>	<i>38</i>
<i>Ilustración 3. 9 Distribución de valores ΔK basados en el análisis de estructura poblacional de 297 accesiones de trigo originadas en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) con 28 marcadores SSRs en el programa Structure vs. 2.3.4.....</i>	<i>41</i>
<i>Ilustración 3. 10 Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de 297 accesiones de trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a una subpoblación determinada. En el eje de las “x” están las muestras desde la 1 hasta la 297 y en el eje “y” los coeficientes de pertenencia (verde de pertenecer a la subpoblación 1 y rojo de pertenecer a la subpoblación 2).....</i>	<i>42</i>
<i>Ilustración 3. 11 Distribución de valores ΔK basados en el análisis de estructura poblacional de 297 accesiones de trigo originadas en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Con 28 marcadores SSRs + 45 marcadores SNPs en el programa Structure vs 2.3.....</i>	<i>43</i>

<i>Ilustración 3. 12 Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de cada una de las 297 accesiones de trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a una subpoblación determinada. En el eje de las “x” están las muestras desde la 1 hasta la 297 y en el eje “y” la probabilidad (verde de pertenecer a la subpoblación 1, rojo de pertenecer a la subpoblación 2 y azul la probabilidad de pertenecer a la subpoblación 3).....</i>	<i>43</i>
<i>Ilustración 3. 13 Gráfico de barras ordenado en función de los coeficientes de pertenencia de cada una de las 297 accesiones de trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a una subpoblación determinada.....</i>	<i>44</i>
<i>Ilustración 3. 14 Distribución de las muestras de la subpoblación 1 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2.....</i>	<i>45</i>
<i>Ilustración 3. 15 Distribución de las muestras de la subpoblación 2 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2.....</i>	<i>46</i>
<i>Ilustración 3. 16 Distribución de las muestras de la subpoblación 3 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2.</i>	<i>46</i>

ABREVIATURA UTILIZADA

cm: centímetros

cM: centiMorgan

CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

EESC: Estación Experimental Santa Catalina

g: gramos

INIAP: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias

Kg: kilogramos

MAS: Selección asistida por marcadores moleculares (Marker Assisted Selection)

mg: miligramos

L: litro

mL: mililitros

M: molar

mM: mili molar

mm: milímetros

ng: nano gramos

nm: nano metros

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PCO: Análisis de coordenadas principales (principal coordinate analysis)

ppm: partes por millón

QTL: *locus* de un carácter cuantitativo (Quantitative Trait Loci)

r.p.m: revoluciones por minuto

SSR: Secuencias de repetición simple (Simple Sequence Repeats)

μL : micro litros

μM : micro molar

V: voltios

RESUMEN

Debido a sus características nutritivas, el trigo es el segundo producto agrícola de mayor consumo en el Ecuador. En la actualidad el cultivo local se ve afectado por dos enfermedades como son la roya amarilla y fusariosis de la espiga, razón por la cual instituciones como INIAP desarrollan programas de mejoramiento, para los cuales es necesario contar con información genotípica para mantener e incrementar el acervo genético de las variedades disponibles. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar molecularmente 297 muestras de una colección de líneas avanzadas de trigo de primavera originadas en el (CIMMYT), utilizando inicialmente 84 marcadores microsatélites marcados con fluorescencia mediante la técnica M13-Tailing para inferir su estructura poblacional. Primero, se extrajo el ADN de las muestras, luego se las validó utilizando PCR, posteriormente, se validó el polimorfismo de los *primers*. Finalmente, las muestras fueron amplificadas con los SSRs seleccionados mediante PCR y después se genotiparon en el analizador de ADN LI-COR 4300s. El análisis de estructura poblacional incorporó 28 marcadores SSR y 45 SNP distribuidos en todo el genoma. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa *Structure* ver. 2.3.4. Para determinar el número de subpoblaciones, se utilizó la técnica de Evanno, adicionalmente, se analizó los Componentes Principales con el programa *Eigensoft* ver. 4.2 se. Los resultados revelaron la existencia de tres subpoblaciones y una gran diversidad alélica en la colección de líneas elite de trigo, presentando en promedio de 4,46 alelos/*locus*.

Palabras claves: Caracterización molecular, genotipaje, microsatélites, estructura poblacional.

ABSTRACT

Because of its nutritive properties, wheat is the second most consumed agricultural product in Ecuador. At present the local culture is affected by two diseases such as yellow rust and scab, for this reason, institutions like INIAP develop breeding programs for which genotypic information is needed to maintain and increase the gene pool of available varieties. The objective of this research was to molecularly characterize 297 samples from a collection of advanced lines of spring wheat originating in (CIMMYT), initially using 84 fluorescently labeled microsatellite markers by M13 -tailing technique to infer population structure. First, the sample DNA was extracted, then validated using PCR, subsequently polymorphism *primers* validated so is selecting the appropriate for this study. Finally, the samples were amplified by PCR with the selected SSRs and then genotyped DNA Analyzer 4300S LI - COR. The analysis of population structure incorporated 28 SSR and 45 SNP markers distributed throughout the genome. Statistical analysis was performed using the program *Structure* ver. 2.3.4. To determine the number of subpopulations, Evanno method, additionally Principal Component Analysis was performed by *Eigensoft* ver. 4.2. The results revealed the existence of three subpopulations and allelic diversity in a collection of elite wheat lines, presenting on average about 4.46 alleles / *locus*.

Keywords: molecular characterization, genotyping, microsatellite, population structure.

Caracterización molecular de 297 genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo e inferencia de su estructura genética.

CAPÍTULO I

1.1. Formulación del problema

Uno de los cultivos de mayor antigüedad y extensión entre las plantas alimenticias para los seres humanos y animales, es el trigo, cuyo nombre científico es *Triticum aestivum* L. (Paux *et al.*, 2008). Junto con el arroz, maíz y cebada, son los principales alimentos de consumo humano a nivel nacional (Garófalo, Ponce-Molina, & Abad, 2011). Para el 2012, la producción mundial reportada de este cereal alcanzó 674'884.372 toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). Actualmente, China, la India, Estados Unidos, Francia y Rusia aportan con el 53% de la producción mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). En el Ecuador, el consumo de trigo corresponde a 38.6 Kg/persona/año (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, 2012) y para cubrir esta demanda, se importa el 98,45% del cereal (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2011).

Los datos históricos de producción de trigo, publicados en la base de datos de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) describen que el Ecuador produjo 94.099 toneladas en el año de 1969, siendo este el año de mayor

producción. Sin embargo, la disminución de su volumen ha sido una constante periódica, así, para el 2012, se registró en 7.450 toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). Esto se debe a que el cultivo es afectado por una serie de enfermedades y problemas abióticos (Afonso & Perera, 2010). En el Ecuador, la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) y la fusariosis de la espiga producida por *Fusarium graminearum*, son las afecciones de mayor impacto, ocasionando hasta el 50% de la pérdidas de rendimiento (Nuñez, 2010).

Desde los orígenes de la agricultura el hombre de manera empírica ha realizado mejoramiento genético (Castañon, 2002), sea mediante selección de materiales promisorios o por cruce de distintas variedades (Sala, Echarte, Bulos, Vrdoljak, & Paulucci, 2005). Estos métodos tradicionales requieren de un considerable tiempo de selección y uso extenso de recursos económicos (Olmos, 2004). Frente a tendencias pronosticadas de necesidad para el abastecimiento de alimentos, los métodos tradicionales son insuficientes para obtener variedades mejoradas (Pazmiño, 2012). La biotecnología se ha convertido en un excelente complemento para los programas de mejoramiento aportando con diversas herramientas como el cultivo de tejidos y la biología molecular. (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp, & Mroginski, 2010), que optimizan los recursos disponibles acelerando los procesos (Castañon, 2002).

1.2. Justificación del problema

El Ecuador importa el 98% del trigo que se consume debido a la baja producción interna del cereal. Las causas más importantes consisten en la susceptibilidad que

presentan las variedades locales a problemas fitosanitarios como la “roya amarilla” y “la fusariosis de la espiga” tornándose en un tema de interés nacional. El Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), está en la obligación de desarrollar nuevas variedades de trigo, con resistencia a enfermedades y alto rendimiento, como una estrategia eficiente para mejorar la productividad del cultivo en el país.

Uno de los métodos de selección de mayor impacto es la detección, mapeo y estimación del efecto de QTLs (Quantitative Trait Loci) en los cultivos. Esta estrategia molecular consiste en el mapeo por asociación, que permite al investigador detectar regiones en el genoma asociadas con resistencia de la planta a las enfermedades. Sin embargo, los resultados de los análisis de asociación son afectados por la estructura genética de cada población, si no se toma en cuenta la estructura poblacional, se pueden encontrar un gran número de falsos positivos, lo que quiere decir, variedades con genotipos aparentemente resistentes y cuyo fenotipo demuestra susceptibilidad ante la plaga. Por esta razón, es importante determinar con precisión si la población de estudio es genéticamente estructurada y, si este es el caso, determinar el número de subpoblaciones existentes.

La caracterización molecular de una colección facilita la obtención de información que se utiliza como covariable de base para los análisis de asociación, incrementando la confiabilidad y facilitando la estimación de la diversidad genética que existe en la población de estudio. De esta forma se describe la diversidad de las líneas que son seleccionadas, asegurando que la selección no limite la base genética en el “Programa de Cereales”.

Considerando estos argumentos, fue necesario establecer un protocolo que facilite la caracterización molecular de los cultivos de trigo para seleccionar con precisión plantas de alta eficiencia. El INIAP, actualmente, mantiene una colección de 297 genotipos de trigo provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

1.3. Objetivo

1.3.1. Objetivo General

Caracterizar molecularmente 297 genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo para inferir su estructura genética

1.3.2. Objetivos Específicos

- Genotipar las 297 muestras de ADN validado de trigo con 50 marcadores microsatélites mapeados utilizando la tecnología M13-Tailing en el LICOR 4300S.
- Inferir estructura poblacional de la colección utilizando el programa Structure vs. 2.3.4.
- Comparar los resultados obtenidos con la estructura obtenida a partir de marcadores SNP's en la misma población con los resultados obtenidos del genotipaje con marcadores SSR's.

1.4. Marco Teórico

1.4.1. Generalidades del Trigo

1.4.1.1. Descripción botánica.

El trigo (*Triticum* spp.), al igual que el arroz, maíz y caña de azúcar, pertenece a la familia Poaceae (Phylum: Antophyta) (Molina & Zulma, 2006). Las variedades nacionales más destacadas son San Jacinto, Vivar y Mirador (Garófalo *et al.*, 2011). En la tabla 1.1 se detalla su clasificación taxonómica.

Tabla 1. 1 Clasificación taxonómica del trigo *Triticum aestivum*

Reino:	Plantae
Sub-reino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Commelinidae
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Género:	<i>Triticum</i>
Especie:	<i>aestivum</i>

Fuente: (Gramene Triticum, 2010, citado por Pazmiño, 2012).

El trigo puede alcanzar hasta 150 cm de altura y en relación a su morfología, se puede distinguir el sistema radical y aéreo (Martos, 1998).

El sistema radical es de tipo fascicular, compuesto por raíces primarias o seminales, y por raíces secundarias o adventicias, que sustituyen a las seminales de

forma progresiva. (Martos, 1998). Tiene forma de cabellera y alcanza longitudes hasta de 25cm. (Montenegro, 2012).

Según Martos (1998) el sistema aéreo consta de tres partes principales (1) tallo, que al inicio de la germinación se encuentra dentro del nudo de ahijamiento, del cual posteriormente se observan brotes axilares que originarán los tallos hijos (Vinueza, 2011), su crecimiento se produce por el alargamiento del tejido de los entrenudos (Montenegro, 2012), que son las únicas estructuras sólidas que confieren estabilidad.(2) Las hojas que son largas y estrechas, constan de dos partes la vaina y el limbo, entre ambas existe una estructura que se llama cuello (Montenegro, 2012), del cual surgen prolongaciones llamadas aurículas, adicionalmente la separación entre el limbo y el tallo se llama lígula. (Vinueza, 2011). (3) La inflorescencia o espiga se encuentra en el extremo del tallo envuelta por la última hoja, (Vinueza, 2011) está formada por un eje principal llamado raquis, donde emergen las espiguillas que contienen de 2 a 4 flores fértiles de carácter hermafrodita. (Martos, 1998). (4) Finalmente la semilla que es un fruto seco de tipo cariósipide, monospermo, e indehiscente, formado por tres partes principales: el pericarpio (capa protectora), embrión y endospermo (Vinueza, 2011).

1.4.1.2. Genética del trigo

El trigo para panificación es un alohexaploide, compuesto por tres genomas AABBDD, (Olmos, 2004) el primer trigo cultivado fue *Triticum monococcum* ($2n=14$), donante del genoma AA, este a su vez se fusionó con *Aegilops speltoides* ($2n=14$, genoma BB) para formar *Triticum turgidum* ($2n=28$), que tiene el genoma

AABB. Adicionalmente, el genoma DD resulta de la hibridación de *Aegilops tauschii* con *Triticum turgidum* formando así a *Triticum aestivum* AABBDD (Khan, Khaliq, Shah, & Irshad, 2005).

1.4.2. Impacto económico y social del cultivo de trigo.

El trigo es, después del arroz, el cereal de mayor consumo a nivel mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). Constituye una fuente de almidón, carbohidratos y proteínas (Gambarotta, 2005). Este cultivo fue domesticado desde hace más de 10.000 años en medio oriente (Martos, 1998).

A nivel local, el trigo y sus derivados son productos importantes para la economía. En el año de 2004, el Ecuador fue uno de los países de la Comunidad Andina de Naciones (CAN) que registró mayor consumo de derivados de trigo. Algunos factores que posiblemente motivaron este hecho fueron: el rápido crecimiento de la población, el cambio en el hábito de consumo y el precio accesible de sus derivados (Rivadeneira, 2005).

Entre enero de 2006 y agosto de 2008, el Ecuador importó más de 450,000 t/año del cereal (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013). Los proveedores más representativos fueron Canadá, Estados Unidos y Argentina. La importación de trigo desde Estados Unidos se ha visto favorecida por medidas políticas como subsidios de importación y producción, lo que ha incentivado directamente el crecimiento de la industria molinera ecuatoriana (Rivadeneira, 2005).

El hecho de que la importación es más rentable que la producción y las zonas destinadas al cultivo del cereal se reducen a pequeñas parcelas en Imbabura, Pichincha, Bolívar y Chimborazo (Rivadeneira, 2005) contribuyen para que la producción nacional, sea la más baja de Latinoamérica con 0,7 t/ha (Garófalo *et al.*, 2011) obligando al gobierno a importar el 98% (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2011) del trigo necesario para satisfacer la demanda interna.

Considerando la demanda per cápita, el gobierno de la República del Ecuador ha logrado mantener estable el precio del quintal de harina, ya que desde el 2011 estableció un subsidio para la harina de trigo importada, fijando su precio en 35 USD por 50Kg (Lara, 2012) favoreciendo a la industria de la panificación y productores artesanales, llegando así al objetivo de disminuir el precio de venta al público ya que, las panaderías fueron obligadas a elaborar un pan de 50g cuyo precio oficial es de 0,12USD (Cevallos, 2011).

Lo antes mencionado establece la necesidad de disponer de alternativas tecnológicas que permitan que el cultivo de trigo sea atractivo para los productores nacionales. Además, mediante la reactivación de la producción local, el consumidor ecuatoriano podrá tener mayor certeza en cuanto a la disponibilidad de los derivados de este producto, considerados como indispensables en la canasta básica.

1.4.3. Plagas que afectan el cultivo de trigo: “roya y fusariosis”

Las “royas” son hongos biotrofos que constituyen el grupo patógeno más importante en cereales, su hallazgo es frecuente y provocan pérdidas de hasta el 50% en el rendimiento del cultivo (Gilchrist, Matínez, Duveiller, & García, 2006). Roelfs, Singh y Saari (1992), describieron que la afección más frecuente son los granos arrugados y macollos dañados. Las pérdidas de rendimiento causadas por *Fusarium graminearum* en variedades susceptibles también pueden llegar al 50%, (Garófalo *et al.*, 2011) sobre todo cuando la frecuencia en las precipitaciones aumenta acompañada de una temperatura ambiental de 25°C y humedad relativa superior al 85% durante la etapa de espigazón o floración de los cultivares (Bragachini, Von Martini, & Méndez, 2012).

1.4.4. Mejoramiento genético del trigo

El desarrollo de nuevas variedades, con resistencia a enfermedades y alto rendimiento, es la manera más eficiente de mejorar la productividad del cultivo de trigo en Ecuador, considerando que el sistema de producción nacional está condicionado a la temporalidad y se ve limitado en insumos (Rivadeneira, 2005).

Para desarrollar variedades superiores de trigo, el fitomejorador necesita conocer a profundidad el germoplasma con el que trabaja (Levitus *et al.*, 2010), a través de la caracterización molecular de colecciones de genotipos variados con el fin de desarrollar análisis de la estructura genética de poblaciones a través de sus frecuencias alélicas (Gomes, Marques, Ferreira, & Gonçalves, 2013)

Con estos métodos de análisis, es factible seleccionar las mejores cepas parentales para ampliar la base genética de las poblaciones de un programa de mejoramiento (Sala *et al.*, 2005). Otra ventaja es que permiten evaluar la relación entre pares de individuos que componen una colección de germoplasma y así dar una idea al mejorador del grado de similitud entre dos accesiones (Li *et al.*, 2003).

Finalmente, la estimación de la estructura genética de una población permite incrementar la confiabilidad de estudios de mapeo por asociación, al incluir esta información como una covariable dentro del análisis estadístico (Falconí, 2012. comunicación personal).

1.4.5. Caracterización molecular

El objetivo principal del fitomejoramiento es seleccionar fenotipos superiores (Levitus *et al.*, 2010), sin embargo, existen dificultades al ubicar a los individuos estrechamente emparentados (misma especie, subespecie, variedad, línea, etc.), ya que no presentan fenotipos distinguibles (Valadez, Kahl, Ramser, Hüttel, & Rubluo, 2001).

Para la selección de variedades se utilizan rasgos morfo-agronómicos, los cuales en los programas de mejoramiento cada vez tienen menos espacio debido al creciente desarrollo de técnicas moleculares (Kohli, Díaz, & Castro, 2003) de reconocimiento, asociadas al rendimiento y la resistencia contra agentes patógenos o estrés. Esta metodología se denomina “huellas de ADN” (Levitus *et al.*, 2010). Con los mapas

genéticos resultantes se pueden conducir programas de mejoramiento genético más eficientes (Valadez *et al.*, 2001).

La caracterización molecular pretende encontrar todos los alelos posibles de un *loci* para lo cual existen varias estrategias regidas por el tipo de marcador molecular que se utilice (Kohli *et al.*, 2003), adicionalmente se debe considerar la heterocigosidad y el grado de ploidía de la población. Para el caso particular del trigo que es una especie alohexaploide, el nivel de ploidía puede afectar la variación observada provocando “complicaciones” analíticas (Ríos del Prado, 2005). Estas “complicaciones” pueden sobresalir y ser reveladas con las estrategias basadas en microsatélites.

La caracterización molecular es el inicio para obtener datos como estructura de la población, que en la actualidad es información que debe ser incluida en el análisis de asociación entre marcadores y QTLs, porque así solo se tomarán en cuenta las asociaciones más fuertes, lo que garantizará los resultados con una alta confiabilidad de que el marcador este cerca del QTL (Falush, Stephens, & Pritchard, 2003).

1.4.6. Marcadores Moleculares

Son todas aquellas moléculas (proteínas, ADN, ARN) capaces de discriminar un genotipo específico, hasta llegar a la identificación parcial o total del mismo (Kohli *et al.*, 2003). Generalmente los marcadores moleculares son diseñados para asociar una característica fenotípica a un patrón genotípico determinado (Montaldo, 1994) como resultado de la observación de su presencia o ausencia. (Levitus *et al.*, 2010).

Según Levitus *et al.*, (2010), la caracterización molecular se vuelve más eficiente cuando se utiliza un marcador con las siguientes características: (1) altamente polimórfico para cada *locus* estudiado de los individuos de una población segregante, (2) mostrar rasgos de heredabilidad de tipo mendeliano no epistático, (3) no tener influencia ambiental, (4) codominante, (5) útil para realizar el análisis en fases tempranas del desarrollo de la planta siempre que sea posible obtener suficiente cantidad de ADN. Adicionalmente, otros autores como Ferreira y Grattapaglia (1998) describen otros atributos adicionales, (6) no presentar modificaciones por efectos de tipo fenotípico o pleitrópico, (7) amplia cobertura del genoma, (8) facilidad en el análisis de la expresión por su simplicidad de interpretación.

Por lo general, los marcadores moleculares se pueden agrupar en cuatro grupos dependiendo de la metodología empleada para su detección (Levitus *et al.*, 2010). En el primero, se encuentran los marcadores basados en la hibridación del ADN, como los RFLPs (Polimorfismo de longitud del fragmento de restricción) y VNTR (número variable de repeticiones en tándem). En el segundo grupo, están los basados en amplificación arbitraria o semi arbitraria, para lo cual se utiliza PCR (reacción en cadena de la polimerasa), de dos maneras: (1) amplificación de fragmentos de ADN que han sido previamente cortados con enzimas de restricción como los AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados), (2) amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). El tercer grupo reúne técnicas de amplificación sitio-específica a partir de síntesis enzimática de secuencias de ADN, usando dos *primers* que hibridan ambos lados del ADN blanco como los STS (Sitios

Marcados por Secuencias) y SSRs (Secuencias de repetición simple) ó microsatélites (Kohli, *et al.*, 2003). En el cuarto grupo de marcadores se distinguen aquellos que se basan en la secuenciación de ADN o en chips, por ejemplo, los SNP's (Polimorfismo de un solo nucleótido), que pueden localizarse en regiones codificantes o no del genoma, son de naturaleza bialélica, y altamente dependientes de herramientas bioinformáticas de análisis, ya que son extremadamente abundantes en el genoma (Gupta, Varshney, Sharma y Ramesh 1999; Levitus *et al.*, 2010).

1.4.6.1. Secuencias de Repetición Simple ó Microsatélites

Los marcadores microsatélites son secuencias de nucleótidos repetidas en tándem (López, 2004) distribuidas al azar a lo largo del genoma de la mayoría de especies eucariotas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Para obtener información del polimorfismo generado es necesaria tres fases: extracción ADN muestra, amplificación mediante PCR y visualización en geles de agarosa o acrilamida (Rosero, Garzón, & Morillo, 2013). Una vez extraído, el ADN genómico se amplifica con dos *primers* (cadenas cortas de nucleótidos) que flanquean el *locus* microsatélite (Powell, Machray, & Provan, 1996). Es posible analizar más de un *locus* por vez, con métodos denominados “múltiplex”, siempre y cuando, los *primers* utilizados amplifiquen fragmentos de tamaños diferentes y bajo las mismas condiciones PCR (Basantes, 2012).

La detección se realiza por visualización de los fragmentos amplificados en geles de poliacrilamida o agarosa especial con una resolución de hasta 2 pares de bases (Morillo & Miño, 2011). La coloración se realiza de dos maneras: utilizando

intercalantes de ADN como bromuro de etidio o nitrato de plata revelados con luz ultravioleta (Ferreira & Grattapaglia, 1998), o mediante técnicas semi-automatizadas basadas en principios de fluorescencia, las cuales permiten mediante la utilización de *primers* fluoromarcados la interpretación digital del polimorfismo generado por los marcadores (Gomes *et al.*, 2013)

1.4.7. Análisis bioinformático

1.4.7.1. Métodos bayesianos

Para un programa de fitomejoramiento, la estimación de los elementos de varianza fenotípica a partir de la evaluación genotípica (Kohli *et al.*, 2003), pueden ser abordados por medio de métodos bayesianos (Mora & Perret, 2007), determinando las distribuciones marginales a *posteriori* de los parámetros en el análisis. La metodología bayesiana determina la variabilidad existente en todos los parámetros del modelo, de los cuales se puede describir moda, mediana y el promedio de la distribución (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000).

Entre los programas informáticos de uso común se menciona a “*Structure*” (Pritchard *et al.*, 2000) que utilizando datos a *priori*, asigna porcentajes de pertenencia de cada individuo a distintas subpoblaciones que al principio son escogidas de un rango asumido por el investigador. Una vez realizado los análisis, y basados en el algoritmo desarrollado por Evanno, Regnaut y Goudet (2005), se puede determinar con certeza el número real de subpoblaciones que tiene el universo de datos ingresados.

Los datos que ingresan al análisis, se obtienen de la caracterización molecular de las distintas variedades de las plantas en estudio (Azofeifa, 2006; Li *et al.*, 2003) a partir de marcadores moleculares como los microsatélites (SSR), ya que según Mathias, Sagredo, Kalazich (2007), “*estos presentan reproducibilidad entre laboratorios, no requieren alta concentración y calidad de ADN, son de base genética codominante y permiten detectar todos los alelos de un locus*”.

La inferencia de la estructura de la población permite agrupar una colección de germoplasma, en subpoblaciones con características genéticas comunes entre sí. Según Pritchard *et al.*, (2000), esta información permite al fitomejorador agrupar a individuos/líneas en distintas subpoblaciones, o conocer si comparten genoma común de dos o más subpoblaciones, para así diseñar un bloque de cruzamientos, que involucren líneas distantes genéticamente creando grupos heterocigóticos (Azofeifa, 2006). Adicionalmente, al inferir la estructura genética de una población se puede realizar estudios de genética de asociación, como por ejemplo: mapeo por desequilibrio de ligamiento ó mapeo por asociación (Falush *et al.*, 2003).

1.5. Hipótesis

La colección de 297 genotipos de trigo, proveniente del centro internacional de mejoramiento de maíz y trigo, no está estructurada genéticamente.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

2.1.1. Instituciones:

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP):

- Estación Experimental Santa Catalina (EESC) – Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) – Laboratorio de Biología Molecular (LBM).

El proyecto de investigación se realizó en las instalaciones del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) como parte del proyecto **“Desarrollo e innovación biotecnológica para la potenciación de rubros agrícolas de importancia en seguridad alimentaria, competitividad exportable y adaptación al cambio climático”**

2.1.2. Personas:

- Directora del proyecto: María Fernanda Loayza MSc.
- Codirectora del proyecto: Karina Ponce B.Sc.
- Tesista: Miguel Eduardo Márquez Carrillo
- Colaboradores científicos (INIAP): Dr. Eduardo Morillo, Líder del DNB;
Ing. Esteban Falconí Líder del Programa Nacional de Cereales (PNC).
 - Personal Departamento Nacional de Biotecnología:

- Ing. Johana Buitrón (Técnica del Laboratorio de Biología Molecular)
- Lcda. Katerine Orbe (Técnica del Laboratorio de Biología Molecular)

2.2. Zona de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, ubicada en la Panamericana Sur Km 1, parroquia Cutuglagua, cantón Mejía, provincia de Pichincha, Ecuador.

En el Tabla 2.1 se describen la localización geográfica y las características ambientales de la estación (INAMHI, 2010, citado por Pazmiño, 2012).

Tabla 2. 1 Características geográficas y ambientales del sitio experimental

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

2.3. Período de investigación

La investigación tuvo un tiempo de duración de 18 meses.

2.4. Estadística

Para analizar los datos generados se utilizaron los programas: PowerMarker versión 3.0 (Liu & Muse, 2005), Structure versión 2.3.4. desarrollado por Pritchard *et al.*, (2000) y Eigensoft versión 4.2.

Además para estimar otros parámetros adicionales se utilizaron otros paquetes como Genetics v. 1.3.8.1 desarrollado bajo lenguaje R, y Excel.

2.5. Procedimientos

2.5.1. Material vegetal

Las semillas de *Triticum aestivum* L. utilizadas fueron parte de una colección mantenida en el CIMMYT. Consta de 297 variedades recolectadas de varios países, caracterizadas por una amplia gama de reacciones de resistencia o susceptibilidad a roya amarilla y/o fusariosis.

Las semillas fueron sembradas en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología de la estación experimental Santa Catalina del INIAP, en vasos plásticos previamente etiquetados. El sustrato fue turba Promix, suplementado con vermiculita.

La siembra se realizó en lotes semanales de 64 variedades. Se hicieron tres repeticiones por siembra. En el anexo A, se describe el “pedigree” de las plantas utilizadas.

2.5.2. Caracterización molecular

2.5.2.1. Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo descrito por Ferreira y Grattapaglia (1998). Se tomó 0,5g de muestra y se maceró en tubos de 1,7mL de base cónica con un pistilo designado para cada muestra. Posteriormente, la muestra se incubó 1 hora con soluciones detergentes a 65°C. Se separó la fase líquida de la mezcla con centrifugación a 13000 rpm por 10 minutos. Para precipitar las proteínas, se utilizó una solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1). Se agitó vigorosamente y se repitió la centrifugación con las condiciones mencionadas. La fase acuosa fue separada como blanco del proceso de precipitación de ADN con etanol al 100% a -20°C durante toda la noche. Finalmente se volvió a centrifugar con las condiciones establecidas para formar a partir de los fragmentos suspendidos, un pellet de ADN, el cual se eluyó en solución TE 0.1M para su posterior cuantificación. El protocolo ampliado y el detalle de las soluciones utilizadas, se describen en el Anexo B.

Además se realizaron pruebas de extracción de ADN a partir de muestra seca con el mismo protocolo. La muestra fue previamente tratada utilizando fundas de cierre hermético con silica gel para secar hojas de plantas jóvenes.

2.5.2.2. Cuantificación de ADN

La cuantificación de ADN se realizó con electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v). Se utilizó el marcador de talla y peso *Low Mass Ladder*. Las condiciones de la corrida electroforética fueron (100V; 30-35min). Los geles se colorearon en una solución de bromuro de etidio (15 ppm) durante 15-20 min en agitación continua. Los geles se visualizaron en un foto documentador Dolphin View Wealtec (Anexo C). Se ajustó la concentración de cada muestra a 5 ng/ μ L diluyendo en agua de “Tartrazina”.

2.5.2.3. Validación de ADN

Una vez estandarizada la PCR (Tabla 2.1), se validó la calidad de ADN extraído (Morillo & Miño, 2011), amplificándolo en base al marcador SSR BARC10, el cual genera fragmentos de 300pb a 51°C. El cóctel de reacción empleado se detalla en la Tabla 2.2.

Tabla 2. 2 Programa de amplificación de SSR BARC10 en trigo

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización inicial	94 °C	5 minutos	
Desnaturalización cíclica	94 °C	45 segundos	} 30 ciclos
<i>Annealing</i>	51°C	1 minuto	
Elongación cíclica	72 °C	2 minutos	
Elongación final	72 °C	7 minutos	
Estabilización	10 °C	5 minutos	

(Morillo y Miño, 2011).

Tabla 2. 3 Cóctel de reacción para amplificación de microsatélites de trigo

Reactivo	Concentración de reactivos	Cantidad
ADN	5 ng/ μ L	2 μ L
<i>Colorless GoTaq Flexi Buffer</i> (Promega)	5x	1.5 μ L
MgCl ₂ (Promega)	25 mM	0.6 μ L
dNTP's (Invitrogen)	5 mM	0.38 μ L
Primer Fw	10 μ M	0.375 μ L
<i>Primer Rv</i>	10 μ M	0.375 μ L
Agua	Ultra pura	2.175 μ L
Taq	5U/ μ L	0,10 μ L
Volumen Total		7.5 μ L

En cada amplificación se incluyó un control negativo, el cual contenía todos los componentes del cóctel de PCR, excepto el ADN. El control positivo consistió en un ADN de trigo previamente validado. Se agregó 15 μ L de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras durante la amplificación en el termociclador.

La electroforesis de los productos de amplificación se realizó en un gel de agarosa al 2% en Buffer de corrida TAE 1X.

Antes de la electroforesis, se prepararon las muestras mezclando 4 μ L de producto amplificado con 2 μ L de Buffer de carga “Blue Juice 1X” para posteriormente ser cargadas en los pocillos del gel. Para la determinación del tamaño de fragmento, se utilizó 2 μ L de marcador de peso molecular 100 pb DNA depositado en el primer pocillo de cada carril. Se dejó correr la electroforesis a 100 voltios

durante 35 minutos. La tinción de los geles de agarosa se efectuó con bromuro de etidio (15 ppm) por aproximadamente 30 minutos.

2.5.2.4. Validación de polimorfismo de *primers* SSR

Se contó inicialmente con 84 *primers* SSRs, para los cuales se determinó la temperatura de *annealing* con las condiciones de amplificación ya descritas. Para estos ensayos se utilizó el termociclador Biometra II, ya que cuenta con tecnología que permite realizar PCR con gradiente de temperatura. Una vez determinadas las temperaturas de cada *primer*, se realizó un *screening* utilizando la tecnología M13 *tailing*, en el equipo LI-COR 4300s. De esta forma se caracterizó la variedad de polimorfismo, la presencia de patrones de bandas genotipables, y el rango de amplificación.

Una vez determinados las condiciones de PCR y la explotabilidad de los *primers*, se optimizaron las condiciones de genotipaje.

2.5.2.5. Estandarización del genotipaje en LI-COR 4300S con *primers* seleccionados

Para la detección de los microsatélites se empleó el método M13- *Tailing*, en el cual al momento de sintetizar el *primer forward*, se añadió en el extremo 5' la secuencia 5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3', que es un fragmento estándar .

Durante la PCR, en el extremo añadido se une el marcador IRDye-labeled M13 *primer*, identificable por la emisión de fluorescencia infrarroja que responde a 700 u 800 nm. De esta manera, los productos de amplificación SSRs se marcaron y al ser separados por electroforesis, son detectados simultáneamente por el láser del genotipador, generándose dos imágenes de corrida en tiempo real, una en 700 nm y otra en 800 nm (Morillo & Miño, 2011).

Con los *primers* SSRs seleccionados como aptos para el estudio, se realizaron varias pruebas de agrupamiento, amplificando varias muestras con dos marcadores. Se observó que las temperaturas de *annealing* fueran similares, mientras que los tamaños de los productos amplificados fueran distintos. También se verificó el tipo de marcaje M-13 en 700 u 800 nm, para lograr generar dúplex cargado. Todo este procedimiento se realizó para optimizar las corridas en el equipo LI-COR 4300s. El cóctel y el programa de amplificación se describen en el anexo D.

2.5.2.6. Genotipaje de marcadores seleccionados SSR en LI-COR 4300S (corridas).

Los productos de PCR amplificados bajo condiciones descritas, se diluyeron en una solución de carga (Blue Stop), en proporción 1:3. Luego se denaturaron a 95°C por 5 minutos y rápidamente se incubaron en hielo durante 5 minutos, protegiendo las muestras de la luz. Se utilizaron geles de poliacrilamida al 6.5%, para ello se emplearon 20 mL de Gel Matrix KB Plus al 6.5%, 150 µL Persulfato de Amonio (APS) al 10% y 15 µL de TEMED. Esta solución fue dispensada entre dos placas de

vidrio, previamente lavadas con detergente e isopropanol. Se colocó un peine para formar los pocillos de carga y se dejó polimerizar por 1 hora. Posteriormente, se ensambló la placa de poliacrilamida en el equipo LI-COR 4300s. Para la corrida electroforética se utilizó el tampón TBE 1X KB Plus LI-COR. Los datos del marcador de peso molecular IRDye 700 u 800 nm, rango de tamaño de amplificación de cada marcador SSR, y los nombres de las muestras se ingresaron en el programa SAGAGT-SSR para identificación del gel.

Antes de efectuarse la corrida, se realizó una pre-corrida por 25 minutos. Una vez que la placa polimerizó y terminó la pre-corrida, se cargó 1 μ L de cada muestra en cada uno de los pocillos del peine, en el orden preestablecido, además cada 15 pocillos se cargó 0,5 μ L de marcador de peso molecular IRDye 50-350pb según el caso (700 u 800 nm). Cada corrida electroforética duró aproximadamente una hora y media a 1500 voltios. El análisis de la imagen del gel y genotipaje se realizó con el programa SAGAGT, se marcó cada banda que representó un alelo con una “x”, al confirmar el genotipaje se generó un reporte que mostró las tallas de los alelos de cada *locus* SSR'S en pares de bases y las frecuencias alélicas en porcentaje.

2.5.2.7. Registro de datos del LI-COR 4300S y Análisis Estadísticos

2.5.2.7.1. Selección de datos para análisis de Asignación genética

Para estimar el equilibrio de ligamiento entre marcadores se utilizó el paquete Genetics v. 1.3.8.1 desarrollado bajo lenguaje R, el cual proporciona el coeficiente de

correlación de las frecuencias entre dos *loci*. El valor máximo de r^2 aceptado para seleccionar los marcadores para el análisis con *Structure* fue 0.5.

2.5.2.7.2. Análisis de diversidad genética

Para los análisis de diversidad genética se utilizaron los siguientes parámetros:

- Número de observaciones: Es el número de genotipos observados para los materiales en cada *locus*. Si existen datos perdidos, disminuye el número de observaciones.
- Tamaño de la muestra: Es el número de materiales analizados.
- Frecuencia de alelos: Se refiere al número de veces que un alelo, se encuentra presente en relación con el número total de alelos de la población en estudio para un *locus*. Se expresa sólo en proporción.
- Genotipos: Número de genotipos generados.
- Número de alelos: Cantidad de alelos generados por un *locus*.
- Contenido de información de polimorfismo: Conocido como (PIC) por sus siglas en inglés, "Polymorphism Information Content". Es la medida de la capacidad de información que un marcador genético puede otorgar y depende del número de alelos para ese *locus* y de sus frecuencias relativas (Basantes 2012; García, *et al.*, 2013).

El análisis de la diversidad genética se realizó en el programa Power Marker versión 3.0 (Liu & Muse, 2005), para lo cual previamente, se generó una matriz a partir del genotipaje con SAGAGT en Microsoft Office Excel. Dicho archivo se guardó en formato de texto plano regido por la extensión "*.txt".

2.5.2.7.3. Asignación genética

La asignación de los genotipos a poblaciones predeterminadas, se realizó con el programa *Structure* vs. 2.3.4. desarrollado por Pritchard *et al.*, (2000). En este software se agrupó y asignó la población basada 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*, asume un modelo de “k” subpoblaciones (para la presente investigación, se consideró entre 1 y 10), cada una caracterizada por un set de frecuencias de alelos para cada *locus* (García, 2008). El programa *Structure* asignó a los individuos a una o más subpoblaciones dependiendo de las similitud entre genotipos registrados de la caracterización molecular (Martínez-Castillo, Zizumbo-Villarreal, Gepts, Delgado-Valerio, & Colunga-García, 2007).

Se utilizó la opción *Admixture Model* en el análisis debido a que no se trabajó con una sola población de mapeo, sino con una colección internacional (Pritchard *et al.*, 2000), por esta razón el programa *Structure* fue muy adecuado, ya que no utiliza el origen geográfico de las muestras para agruparlas sino la frecuencia de alelos (Evanno *et al.*, 2005). El número de veces que se corrió el programa con los valores de K asignados fue de 10 veces. Las demás opciones de corrida como *burning length* (Valor que indica que tan larga debe ser la simulación antes de ingresar los datos para minimizar el efecto de configuración inicial) y *run length* (Valor que indica cuanto debe correr la simulación luego de que se han ingresado los parámetros

requeridos) fueron las predefinidas por el programa en 10.000 y 100.000 respectivamente (Pritchard *et al.*, 2000 citado por Basantes, 2012).

2.5.2.7.4. Determinación del número de subpoblaciones

Para determinar el número real de subpoblaciones se utilizó el método de Evanno *et al.* 2005, el cual se basa en datos obtenidos de *Structure*. El número de grupos genéticos más probable se encontró determinando el valor máximo del estadístico ΔK .

2.5.2.7.5. Análisis multivariados

Cuando se maneja bases de datos generadas a partir de muchas variables (multivariadas), es adecuado utilizar herramientas de interpretación estadística como el Análisis de Componentes Principales (De la Fuente, 2011), que es una técnica de síntesis de información, o reducción del número inicial de variables correlacionadas a otro menor de variables independientes (Fita, 2013).

Las nuevas variables obtenidas (también denominadas valores eigen) son combinaciones lineales de las anteriores e independientes entre sí que se van construyendo según el orden de importancia en cuanto a la variabilidad total que recogen (Fita, 2013). Un aspecto clave en ACP es la interpretación de la información generada, ya que ésta, al momento de graficar debe ser comparada con las variables

iniciales (De la Fuente, 2011). Para el análisis PCA se utilizó el software *Eigensoft* ver. 4.2.

2.5.2.7.6. Correlación con datos fenotípicos

Una vez determinada la asignación de cada accesión a una subpoblación, se correlacionaron los datos hallados con los fenotípicos reportados de resistencia a roya amarilla. Para ello se realizó una tabla de doble entrada en Excel.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Extracción y cuantificación de ADN

La concentración de ADN obtenida aplicando la estrategia de extracción descrita, fue de 400ng/μL en promedio. En algunos casos se evidenció la extracción conjunta de ARN, sin embargo, no fue necesario eliminarlo con ARNasa, ya que no interfirió en la PCR. La concentración de ADN se observó en gel de agarosa al 1% (Figura 3.1).

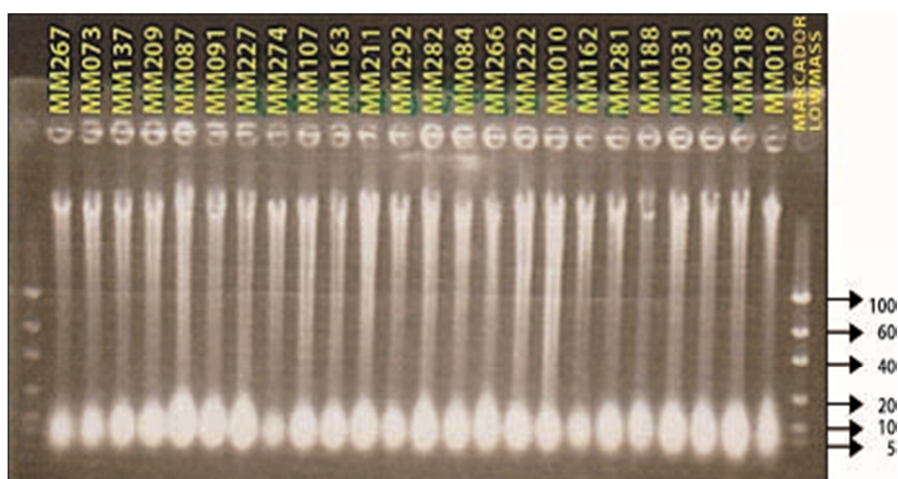


Ilustración 3. 1 Cuantificación de muestras de ADN genómico en un gel de agarosa al 1%.

Para mayor precisión en la cuantificación se utilizó un método espectrofotométrico (EPOCH). Los datos de absorbancia y concentración de las muestras se observan en el anexo E.

A partir de muestra seca, la concentración de ADN extraído en promedio fue de 100ng/μL. La calidad del ADN extraído fue similar a la obtenida de muestra fresca.

3.2. Validación de muestras de ADN

Los productos amplificados en base al marcador SSR BARC10 generó fragmentos entre 300 y 350 pb (Figura 3.2). Las muestras en las que no se observó amplificación, fueron sujetas de un nuevo proceso de cuantificación, dilución y amplificación hasta obtener productos válidos.

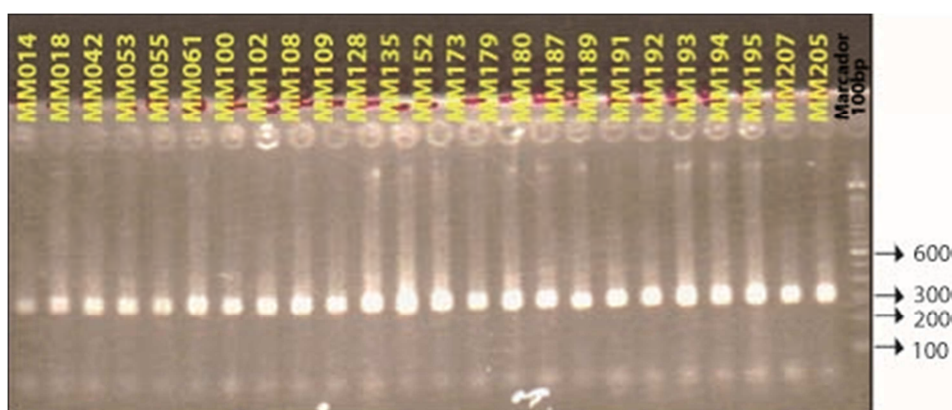


Ilustración 3. 2 Productos de amplificación del marcador BARC10 en un gel de agarosa al 2% (M: Marcador de peso molecular 100 pb).

3.3. Validación de polimorfismo de *primers* SSR

Después de trabajar con los 84 *primers* descritos inicialmente, se verificó y estableció las condiciones de PCR de 82 de ellos, ya que los *primers* SNF-A2 y CFD35, no fueron amplificables. La temperatura de *annealing* de cada *primer* se detalla en la tabla 3.1.

Tabla 3. 1 Temperatura de annealing descrita para cada *primer*

Nº	PRIMER	T (°C)	Nº	PRIMER	T (°C)
1	CFD41	65	43	GWM636	56
2	GDM132	65	44	WMC109	56
3	BARC19	64	45	WMC619	56
4	WMC581	64	46	BARC204	55
5	GDM33	62	47	BARC71	55
6	WMC602	62	48	GDM136	55
7	WMC11	61	49	GWM121	55
8	WMC111	61	50	GWM174	55
9	WMC121	61	51	GWM259	55
10	WMC14	61	52	GWM261	55
11	WMC233	61	53	GWM297	55
12	WMC331	61	54	GWM301	55
13	WMC405	61	55	GWM314	55
14	WMC44	61	56	GWM350	55
15	WMC453	61	57	GWM359	55
16	WMC549	61	58	GWM456	55
17	WMC606	61	59	GWM654	54
18	WMC622	61	60	WMC658	54
19	WMC629	61	61	GDM153	53
20	WMC720	61	62	GWM205	53
21	WMC74	61	63	WMC617	53
22	WMC773	61	64	BARC130	52
23	BARC83	60	65	WMC656	52
24	CFA2149	60	66	WMC728	52
25	CFD175	60	67	BARC10	51
26	CFD183	60	68	BARC101	51
27	CFD2	60	69	BARC119	51
28	CFD23	60	70	BARC124	51
29	CFD49	60	71	BARC133	51
30	GWM130	60	72	BARC145	51
31	GWM146	60	73	BARC62	51
32	GWM161	60	74	CFD76	51
33	GWM469	60	75	GWM37	51
34	GWM493	60	76	WMC492	51
35	GWM533	60	77	WMC631	51
36	CFD84	59	78	WMC89	51
37	GWM325	59	79	BARC196	50
38	WMC216	59	80	GWM437	50
39	WMC764	59	81	GWM624	50
40	BARC228	58	82	BARC187	48
41	CFA2129	58	83	CFD35	
42	GWM147	57	84	SNF-A2	

Se realizó un *screening* de los marcadores para verificar el polimorfismo y patrón de amplificación de cada *primer* con 15 muestras por *primer*, como se muestra en la figura 3.3

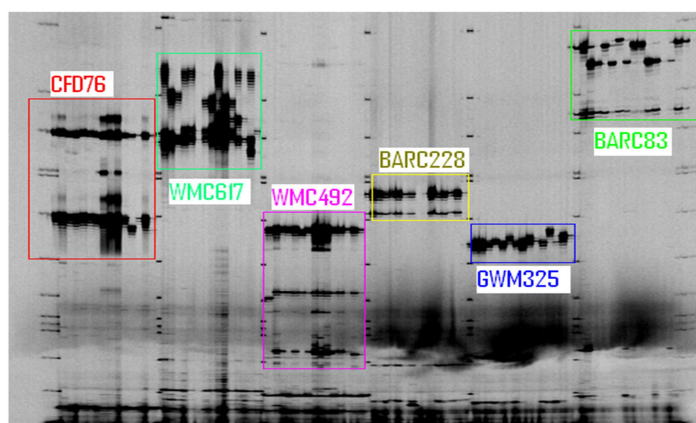


Ilustración 3. 3 Productos de amplificación de varios marcadores en un gel de poliacrilamida en LI-COR 4300.

Se determinó la idoneidad de 33 *primers* para la caracterización molecular. Los 49 *primers* restantes fueron monomórficos o inespecíficos y se consideraron poco informativos. El listado detallado de los *primers* utilizados se observa en la tabla 3.2.

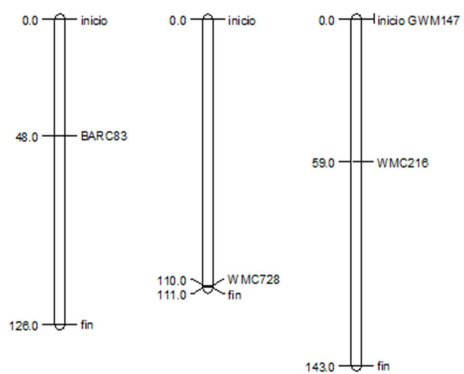
Tabla 3. 2 Detalle de *primers* seleccionados para la caracterización molecular.

<i>PRIMER</i>	<i>DESDE</i>	<i>HASTA</i>	<i>MOTIF</i>
BARC19	104	145	(TAA)18
WMC720	120	160	
GWM533	115	165	(CT)18(CA)20
GWM493	150	215	(CA)43IMP
CFA2149	220	250	(TG)20
WMC331	140	160	(CA)13 56 TO 81, (CT)10 36 TO 55
CFD84	190	210	(GA)26
GWM297	160	190	(GT)12(GA)18
GDM153	260	280	(CA)22

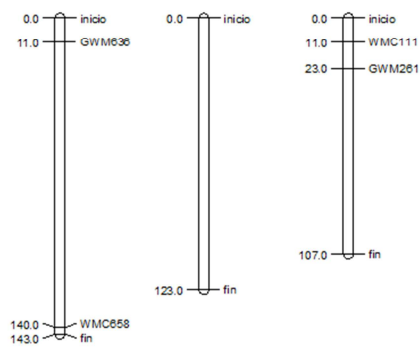
<i>PRIMER</i>	<i>DESDE</i>	<i>HASTA</i>	<i>MOTIF</i>
GWM261	180	220	(CT)21
BARC130	280	300	(CT)8(CA)9
BARC124	195	220	(CT)19
BARC133	120	160	(CT)24
GWM437	107	145	
WMC492	160	180	(CA)8 260 TO 275, (CA)8 278 TO 293, (CA)9 296 TO 313
WMC728	254	304	
WMC658	198	230	
BARC204	164	188	(ATT)15
BARC71	120	137	(TAGA)7(TA)2
GWM121	135	170	
GWM314	180	226	
GWM456	140	160	
GWM636	114	133	
GWM147	158	174	
GWM325	143	170	(CT)16
WMC216	104	151	(GT) 22 42 TO 85.
BARC83	238	295	(CAT)9
CFD49	177	250	(GA)33
GWM161	100	180	(CT)15
GWM469	180	206	
WMC111	250	268	(CA)9 152 TO 169, (CA)15 176 TO 205
WMC773	120	180	
GDM132	160	180	(CT)24

La ilustración 3.4 muestra la localización en centiMorgan de los marcadores seleccionados en el genoma de trigo

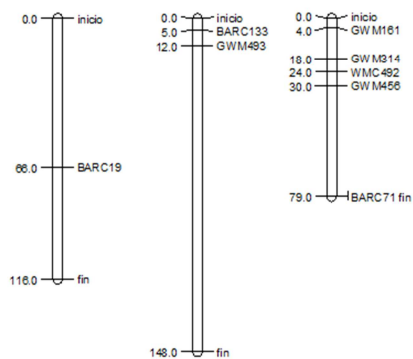
Cromosoma_1A Cromosoma_1B Cromosoma_1D



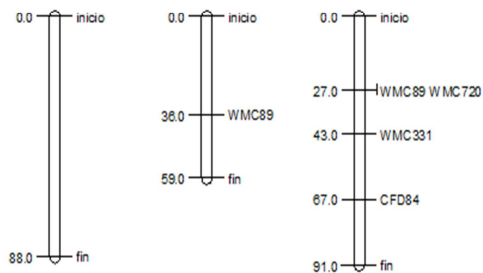
Cromosoma_2A Cromosoma_2B Cromosoma_2D



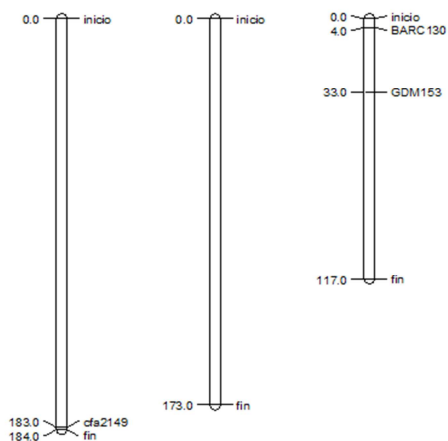
Cromosoma_3A Cromosoma_3B Cromosoma_3D



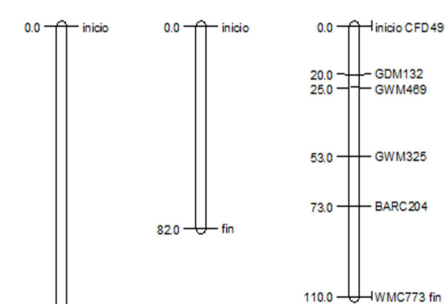
Cromosoma_4A Cromosoma_4B Cromosoma_4D



Cromosoma_5A Cromosoma_5B Cromosoma_5D



Cromosoma_6A Cromosoma_6B Cromosoma_6D



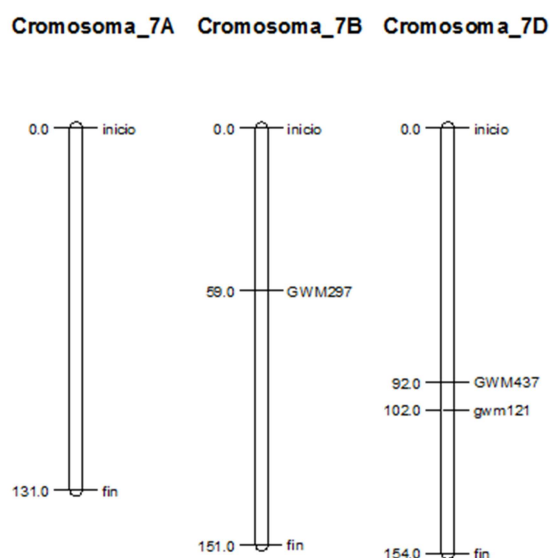


Ilustración 3. 4 Localización de 33 primers seleccionados en el genoma de trigo, para la caracterización molecular.

3.4. Estandarización del genotipaje en LI-COR 4300S con *primers* seleccionados

Los pares de *primers* seleccionados para el dúplex en base a la temperatura de *annealing*, tamaño del producto y tipo de marcaje, se describen en la tabla 3.3. El anexo F muestra la agrupación final en la que fueron corridas las muestras.

Tabla 3. 3 Combinaciones de *primers* para genotipaje.

<i>PRIMER</i>	<i>MARCAJE</i>	<i>TIPO</i>
BARC83 WMC216	800	DÚPLEX
GWM325 CFD49	700	DÚPLEX
WMC773 WMC111	800	DÚPLEX
WMC658 WMC728	700	DÚPLEX
BARC71 BARC204	800	DÚPLEX

<i>PRIMER</i>	<i>MARCAJE</i>	<i>TIPO</i>
GWM437	700	DÚPLEX
WMC492		
CFA2129	800	DÚPLEX
GWM493		
WMC331	700-BSA	DÚPLEX
CFD84		
GWM261	800	DÚPLEX
BARC130		
GWM297	700	DÚPLEX
GDM153		
WMC89_4B	800	DÚPLEX
WMC89_4D		
GWM161	700	MONOPLEX
GWM456	700	MONOPLEX
GWM147	800	MONOPLEX
WMC720	800	MONOPLEX
GDM132	800	MONOPLEX
BARC133	700-CL	MONOPLEX
BARC19	700-BSA	MONOPLEX
GWM121	800	MONOPLEX
GWM314	800	MONOPLEX
GWM636	700	MONOPLEX
GWM469	700	MONOPLEX

3.5. Genotipaje de marcadores seleccionados SSR en LI-COR 4300S (corridas)

Se analizaron 297 muestras con los 33 marcadores seleccionados en el equipo LI-COR4300S. El proceso se evidenció en un gel digital editable y con una resolución de hasta 2pb. Se procesaron 150 geles (Figura 3.5-3.8) provenientes de alrededor de 80 corridas.

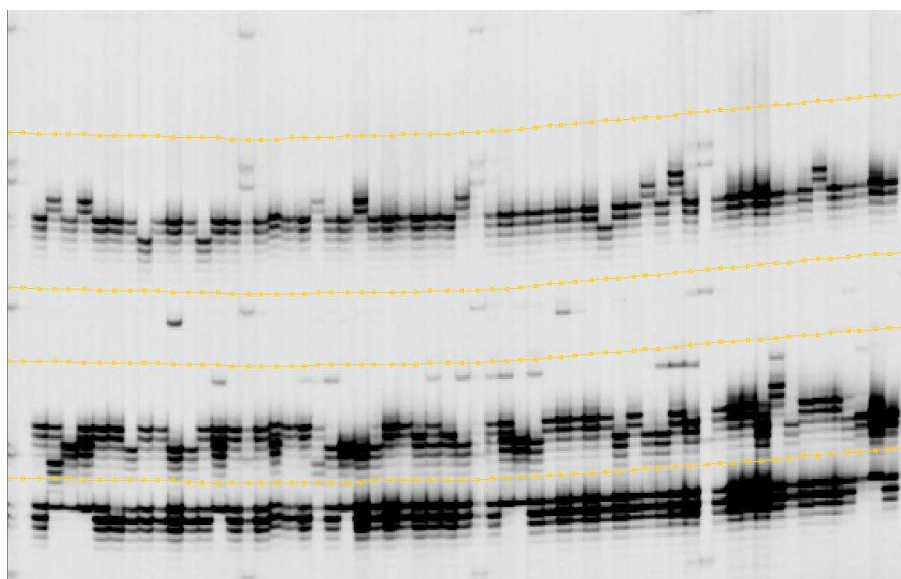


Ilustración 3. 5 Amplificación de la placa 3 con el Primer WMC89_4B y WMC89_4D en Li-COR 4300 s.

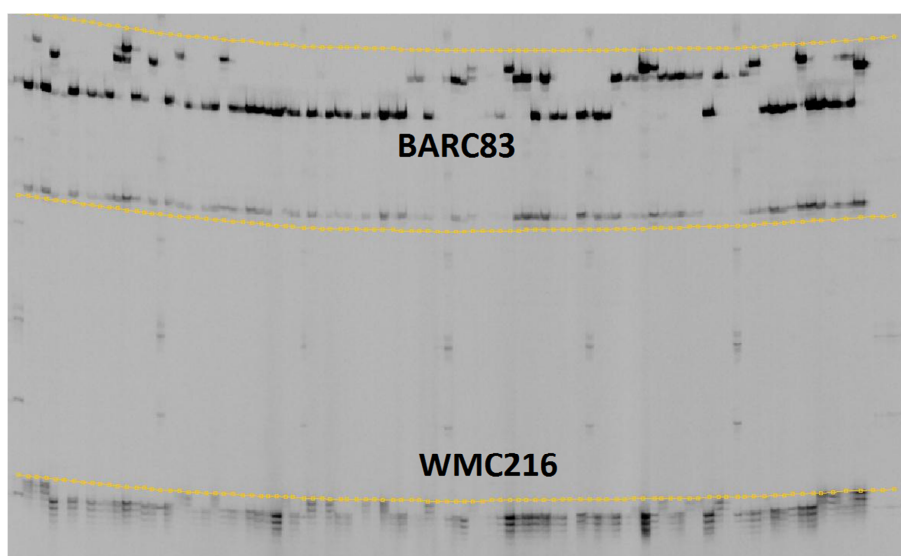


Ilustración 3. 6 Amplificación de la placa 1 con el primer

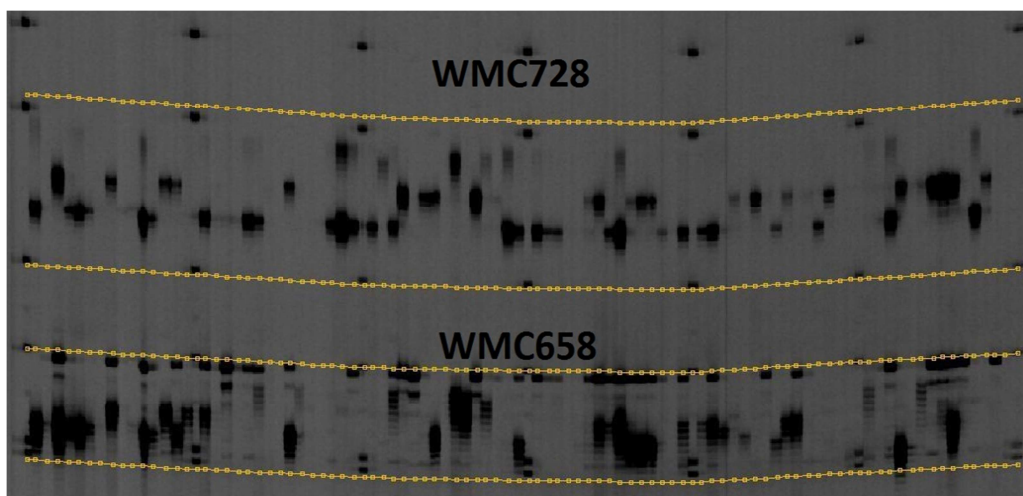


Ilustración 3. 7 Amplificación de la placa 2 con el primer WMC728 y WMC658 en Li-COR 4300 s.

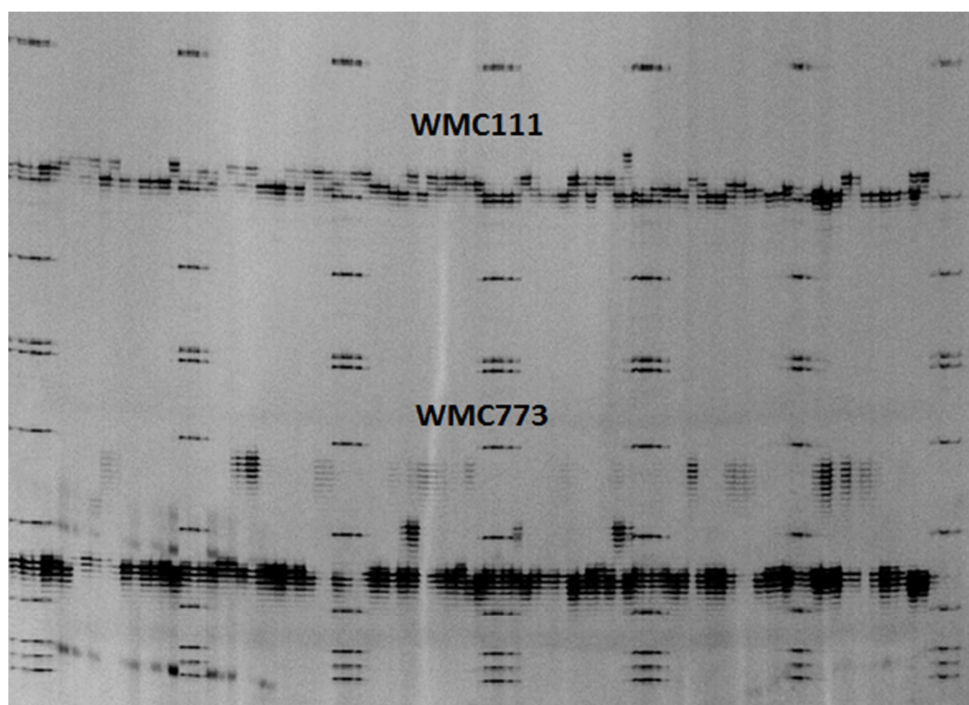


Ilustración 3. 8 Amplificación de la placa 3 con el primer WMC111 y WMC773 en Li-COR 4300 s.

Las imágenes fueron interpretadas en el programa SAGA-GT y se reportaron datos de peso molecular de los fragmentos.

3.6. Registro de datos del LI-COR 4300S y análisis estadísticos

Los datos generados en SAGA-GT fueron registrados y compilados en una base de datos para realizar los análisis de estructura poblacional.

Después de estimar LD entre marcadores con el paquete Genetics v. 1.3.8.1, se descartaron 5 marcadores, por lo que la matriz final fue estructurada con 297 muestras y 28 marcadores SSRs. Los marcadores utilizados se presentan en la tabla 3.4

Tabla 3. 4 Marcadores SSRs utilizados en análisis de estructura.

MARCADORES SSR UTILIZADOS
BARC130_5D
BARC133_3B
BARC19_3A
BARC71_3D
BARC83_1A
CFA2149_5A
CFD49_6D
CFD84_4D
GDM132_6D
GDM153_5D
GWM121_7D
GWM147_1D
GWM161_3D
GWM261_2D
GWM297_7B
GWM314_3D
GWM437_7D
GWM456_3D
GWM469_6D
GWM493_3B
GWM636_2A
WMC111_2D
WMC216_1D
WMC331_4D
WMC492_3D
WMC658_2A
WMC720_4D
WMC89_4B

Los resultados del análisis de la matriz final en Power Marker, se describen en la tabla 3.5.

Tabla 3. 5 Análisis de diversidad genética de 28 marcadores SSRs con el programa PowerMarker

MARCADOR	TAMAÑO DE MUESTRA	Nº OBSERVACIONES	DE ALELOS	DIVERSIDAD GÉNICA	PIC
BARC83_1A	297	292	3	0.56	0.48
GWM147_1D	297	292	3	0.26	0.24
WMC216_1D	297	288	2	0.41	0.32
GWM636_2A	297	275	6	0.72	0.68
WMC658_2A	297	258	5	0.78	0.74
WMC111_2D	297	271	4	0.73	0.68
GWM261_2D	297	292	5	0.63	0.58
BARC19_3A	297	278	3	0.58	0.48
BARC133_3B	297	288	4	0.63	0.57
GWM493_3B	297	285	3	0.49	0.44
GWM161_3D	297	290	4	0.6	0.55
GWM314_3D	297	286	6	0.74	0.71
WMC492_3D	297	292	3	0.46	0.4
GWM456_3D	297	282	3	0.62	0.55
BARC71_3D	297	261	4	0.4	0.37
WMC89_4B	297	281	4	0.36	0.34
WMC720_4D	297	283	6	0.76	0.73
WMC331_4D	297	287	3	0.66	0.58
CFD84_4D	297	287	2	0.43	0.34
CFA2149_5A	297	290	4	0.52	0.48
BARC130_5D	297	287	3	0.51	0.46
GDM153_5D	297	277	4	0.69	0.63
CFD49_6D	297	278	6	0.54	0.52
GDM132_6D	297	279	3	0.6	0.52
GWM469_6D	297	285	6	0.79	0.76
GWM297_7B	297	281	5	0.65	0.61
GWM437_7D	297	282	6	0.77	0.73
GWM121_7D	297	280	4	0.52	0.48
MEAN	297	282.71	4.46	0.59	0.54

En el anexo I se presenta el análisis de la distribución alélica de cada marcador y su frecuencia. Los análisis de diversidad genética mostraron un promedio de 4.46 alelos por marcador.

3.6.1. Asignación genética

El análisis en el programa *Structure*, con el método de Evanno (2005), ΔK , determinó que las accesiones de trigo se agruparon en dos subpoblaciones ($k=2$) (Figura 3.10).

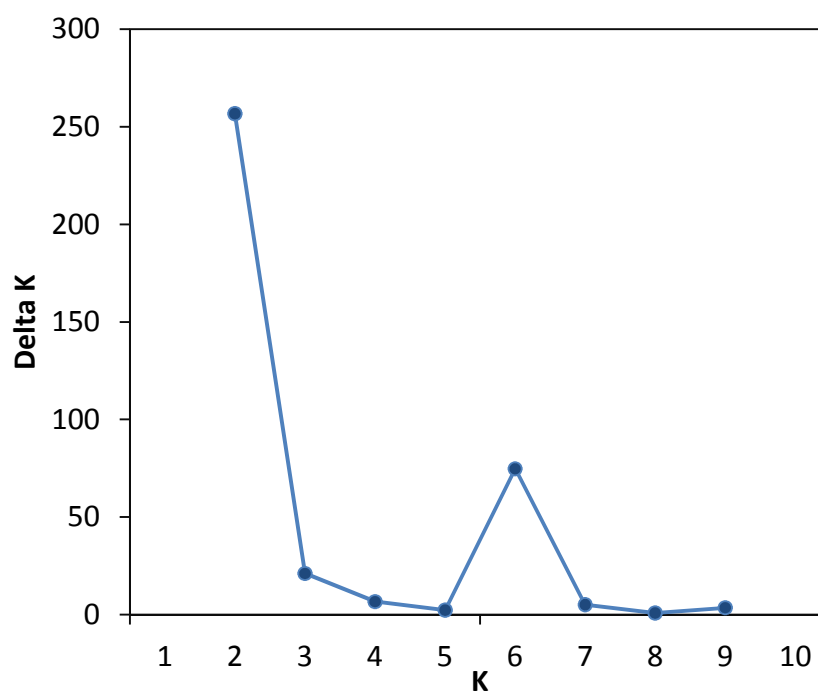


Ilustración 3. 9 Distribución de valores ΔK basados en el análisis de estructura poblacional de 297 accesiones de trigo originadas en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) con 28 marcadores SSRs en el programa Structure vs. 2.3.4

La agrupación de los análisis de la colección en 2 subpoblaciones, se muestra en la Figura 3.10.

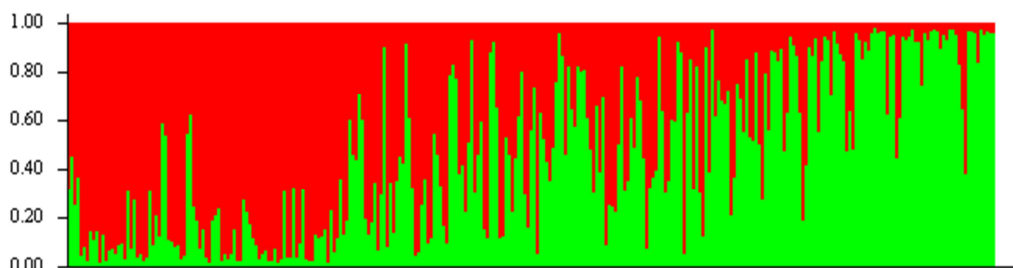


Ilustración 3. 10 Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de 297 accesiones de trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a una subpoblación determinada. En el eje de las “x” están las muestras desde la 1 hasta la 297 y en el eje “y” los coeficientes de pertenencia (verde de pertenecer a la subpoblación 1 y rojo de pertenecer a la subpoblación 2).

Debido a que la mayoría de marcadores SSRs se encontraron en el genoma D y que para este tipo de análisis fue necesario incluir marcadores presentes en todos los cromosomas, con el fin de tener representatividad en cada grupo de ligamiento, se utilizaron un total de 45 marcadores SNPs (Anexo H) de la investigación paralela realizada en Estados Unidos por Falconí E, para saturar las zonas del genoma que no tenían cobertura de marcadores SSRs.

El re - análisis de estructura poblacional utilizando k entre 1 a 20, demostró un ajuste de la agrupación correspondiente a k=3.

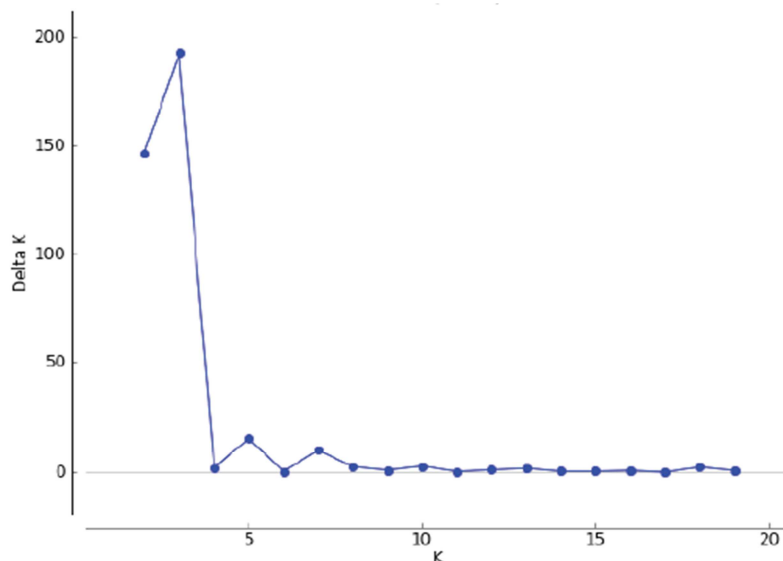


Ilustración 3. 11 Distribución de valores ΔK basados en el análisis de estructura poblacional de 297 accesiones de trigo originadas en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Con 28 marcadores SSRs + 45 marcadores SNPs en el programa Structure vs 2.3

Las tres subpoblaciones de la colección analizada se muestra en el gráfico 3.12.

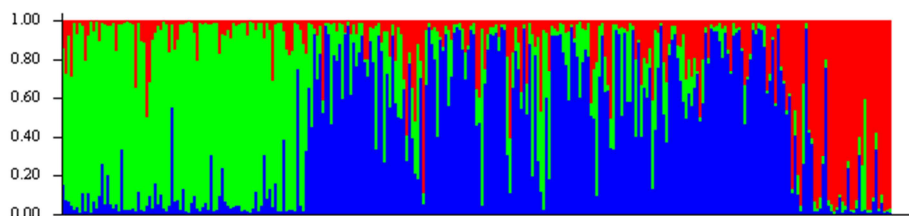


Ilustración 3. 12 Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de cada una de las 297 accesiones de trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a una subpoblación determinada. En el eje de las “x” están las muestras desde la 1 hasta la 297 y en el eje “y” la probabilidad (verde de pertenecer a la subpoblación 1, rojo de pertenecer a la subpoblación 2 y azul la probabilidad de pertenecer a la subpoblación 3).

El tamaño cada subpoblación fue definido en función de la asignación con mayor probabilidad (Gráfico 3.13)

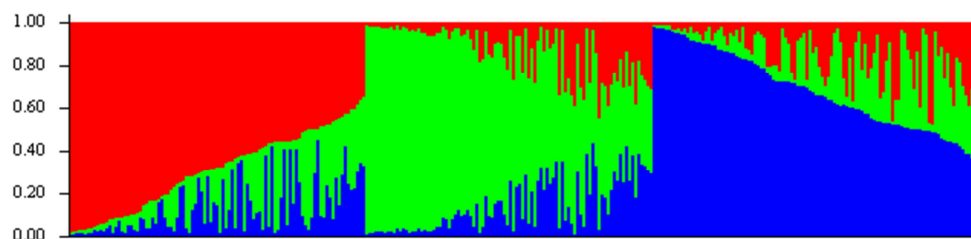


Ilustración 3. 13 Gráfico de barras ordenado en función de los coeficientes de pertenencia de cada una de las 297 accesiones de trigo del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) a una subpoblación determinada.

En el anexo J se presenta un listado de la asignación de cada individuo a las tres subpoblaciones.

Además, se realizó Análisis de Componentes Principales (PCA) a partir de un set de 3,700 SNPs, que determinó los ejes de mayor varianza con el cálculo del porcentaje individual y acumulado de la variabilidad de cada coordenada.

Se efectuó el PCA en dos dimensiones (2D), usando el Programa Eigensoft versión 4.2, ya que se podía apreciar de mejor manera la separación genética de los 3 grupos conformados (Figura 3.14, 3.15 y 3.16). El PCA determinó que gran parte de la varianza existente en la población fue capturada en los tres primeros componentes principales (Tabla 3.6)

Tabla 3. 6 Porcentajes individuales y acumulados de la varianza para 2 coordenadas, en el análisis de 297 materiales con 3700 SNPs.

<i>Coordenada</i>	<i>Porcentaje individual (%)</i>	<i>Porcentaje Acumulado (%)</i>
1	21.516	21.516
2	13.854	35.37
3	10.618	45.99

En las ilustraciones 3.14, 3.15 y 3.16 se muestran las dos primeras coordenadas y se puede apreciar la formación de tres grupos genéticos. La primera (coordenada X) muestra un 21.5 % de la variación total, mientras que la segunda (coordenada Y) muestra un 13.8 % de la variación total.

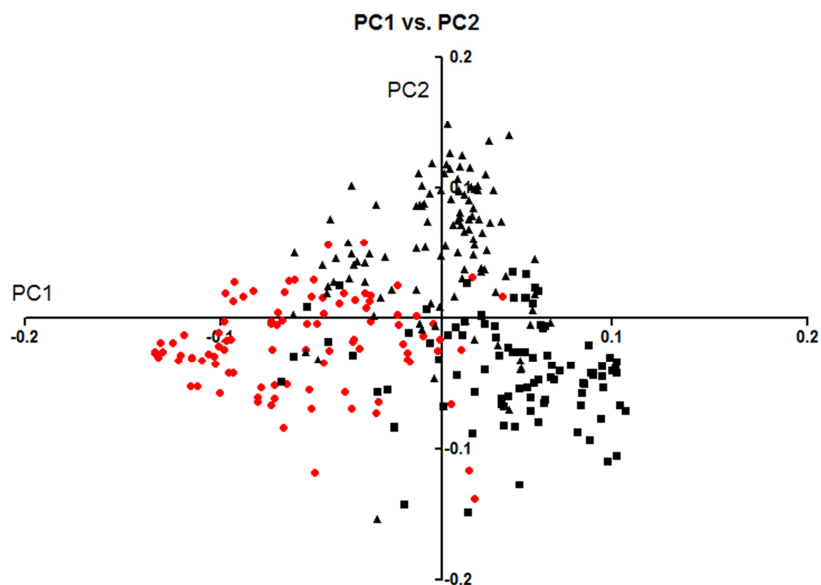


Ilustración 3. 14 Distribución de las muestras de la subpoblación 1 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2.

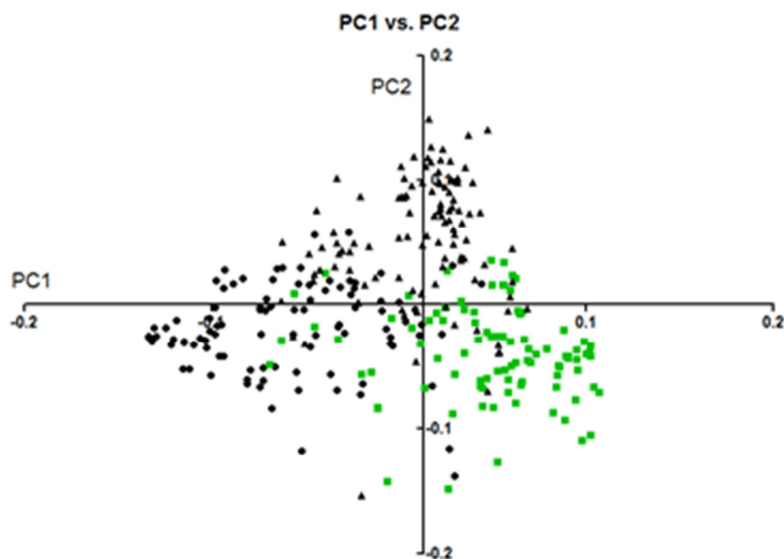


Ilustración 3. 15 Distribución de las muestras de la subpoblación 2 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2.

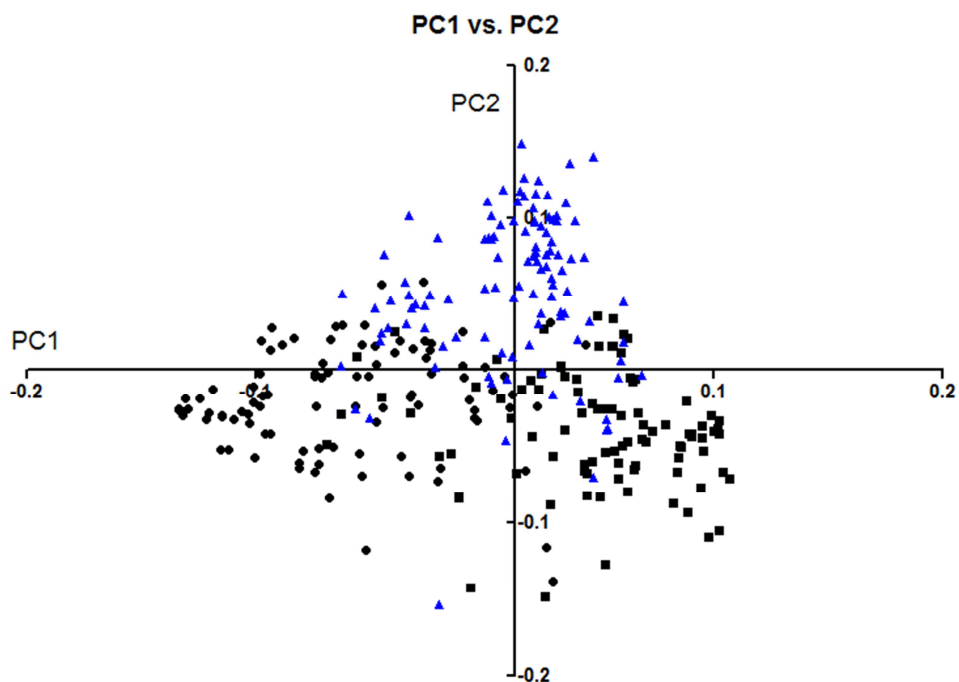


Ilustración 3. 16 Distribución de las muestras de la subpoblación 3 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2.

3.6.2. Correlación de datos fenotípicos

Las accesiones se correlacionaron con la información fenotípica de resistencia a roya amarilla descrita en el anexo A (Tabla 3.7).

Tabla 3. 7 Frecuencia relativa de individuos con características fenotípicas asociadas a la resistencia o susceptibilidad a los fitopatógenos en las subpoblaciones encontradas.

Etiquetas de fila	subpoblación 1	subpoblación 2	subpoblación 3	Total
Immune	16.67%	5.32%	5.61%	9.09%
Muy Resistente	11.46%	25.53%	29.91%	22.56%
Muy Susceptible	14.58%	9.57%	11.21%	11.78%
Resistente	39.58%	55.32%	40.19%	44.78%
Susceptible	17.71%	4.26%	13.08%	11.78%
Total general	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Considerando la dificultad de interpretación de este análisis inicial se agrupó las plantas inmunes, muy resistentes y resistentes en un grupo vs. las susceptibles y muy susceptibles (Tabla 3.8).

Tabla 3. 8 Frecuencia relativa de individuos con características fenotípicas reportadas asociadas a las subpoblaciones encontradas

Etiquetas de fila	subpoblación 1	subpoblación 2	subpoblación 3	Total
Resistentes	67.71%	86.17%	75.70%	76.43%
Susceptibles	32.29%	13.83%	24.30%	23.57%
Total general	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Se observó en la subpoblación 2, un mayor porcentaje de plantas resistentes al fitopatógeno (Tabla 3.8).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

En el Ecuador el trigo y sus derivados son productos de consumo masivo, por lo que es de relativa importancia implementar procesos de producción eficientes, que garanticen el acceso de la población a un producto de calidad y que al mismo tiempo su cultivo sea rentable. La investigación molecular de las variedades genotípicas y fenotípicas del trigo en el país es por lo tanto, un tema de relevancia nacional. Esta investigación es la base de un proyecto de mejoramiento genético, donde se dio lugar a un proceso de extracción de ADN, basado en los protocolos descritos por Ferreira y Grattapaglia (1998), modificados por (Pazmiño, 2012), que resultó ser una estrategia conveniente por la cantidad y calidad de material genético obtenido, tanto para muestras frescas como secas.

Al comparar la cantidad de ADN extraída a partir de las muestras frescas y las pretratadas se observó una diferencia de aproximadamente 300ng/μL por muestra. Esta diferencia pudo deberse a la degradación del material genético durante el proceso de secado, puesto que se utilizó silica gel, durante tres días (Basantes, 2012). Aunque algunas investigaciones mostraron que esta técnica fue apropiada para otras muestras, como palma africana y palma oleífera, ya que reduce el tiempo de maceración (Palmano, 2001); en este estudio no se consideró el secado previo de las muestras como alternativa metodológica eficiente.

La cuantificación espectrofotométrica del ADN extraído demostró concentraciones diez veces superiores a las determinadas en gel, ya que la absorbancia leída por el equipo no discrimina nucleótidos sueltos o fragmentos degradados. Sin embargo, cabe recalcar, que el material genético validó, a pesar de haber utilizado las concentraciones mencionadas para la dilución del ADN, mostrando que el rango de sensibilidad de la PCR propuesta, resultó ser muy amplio (Kohli *et al.*, 2003).

A pesar de la presencia de RNA en las muestras originalmente extraídas, este no interfirió en la PCR (Pazmiño, 2012), dado que es una molécula sumamente inestable y puede degradarse fácilmente, además las estrategias de amplificación generalmente utilizan polimerasas que reconocen de forma específica al ADN (Levitus *et al.*, 2010).

Para validar el ADN, se utilizó como parámetro de discriminación la presencia del fragmento amplificado por el *primer* BARC10 (Song *et al.*, 2005), lo que demostró que las condiciones de PCR fueron óptimas para la amplificación con este marcador.

Al determinar las condiciones de amplificación se descartaron 2 de los 84 *primers* iniciales, ya que para los *primer* CFD35 y SNF-A2 no se observó amplificación. Esta ausencia de producto pudo deberse a una falla del mix o falta de compatibilidad con el programa de PCR (Dreisigacker *et al.*, 2010).

Del *screening* de los marcadores, se rescató a 33 de los 82, ya que resultaron informativos y de interpretación sencilla, los que permitieron visualizar mayor cantidad de polimorfismos por su naturaleza codominante y altamente multialélica (Ferreira y Gratapaglia, 1998), y por ende idóneos y útiles para determinar el genotipo de una población (Ravel *et. al.*, 2006). Se disminuyeron aquellos marcadores que generaron información redundante, porque fue importante tomar en cuenta que generar mayor información se relaciona con aumento de la variabilidad o varianza y según De la Fuente (2011), no se debe considerar esta información, por lo tanto, después de estimar el equilibrio de ligamiento entre marcadores se determinó el grupo final a utilizarse, que fue de 28 marcadores.

Como se observó en la Tabla 3.5, el promedio de alelos encontrados fue 4.46 por locus, resultados que difieren con los obtenidos por Somers, Isaac y Edwards, (2004), en los cuales se reportó un promedio de 2.65 alelos. Cabe recalcar, que los marcadores utilizados en esta investigación fueron aquellos recomendados por este mismo grupo de investigadores. Las diferencias encontradas en este parámetro de análisis se pueden explicar, porque en el trabajo de Somers, *et al.*, se utilizaron 1108 marcadores SSR, en 8 accesiones mientras que en este estudio, si bien al final se utilizaron 28 marcadores, la colección en estudio tiene 297 ejemplares muy variados, de pedigree complejo, que incluyen plantas resistentes y susceptibles, lo que indica una amplia gama de posibles genes que se traduce a una amplia gama de alelos por locus.

Inicialmente, la asignación genética utilizando el programa *Structure* desde los datos del genotipaje con 28 marcadores SSR reveló que la colección se agrupaba en dos subpoblaciones. Al contrastar estos resultados con la PCA realizada a partir de un set de 3700 marcadores SNP de la misma población (Falconí, E. 2013, comunicación personal) se observó la ausencia de una subpoblación, lo que se debió a la presencia de zonas del genoma, donde no existió información genotípica de marcadores SSR (Dreisigacker *et al.*, 2012). Esto motivó a la ejecución de un segundo análisis, en el cual se incorporaron 45 marcadores SNPs específicamente en las zonas poco saturadas. Al tener información genotípica de todos los cromosomas, se determinó que existieron tres subpoblaciones, lo que concordó con las observaciones de Falconí, E. (comunicación personal, 2013).

Es importante anotar que estudios anteriores en trigo, Dreisigacker *et al.*, (2012) demostraron que la estructura de una colección del CIMMYT diseminada durante 25 años a partir de ESWYT (Elite Spring Wheat Yield Trial), constó de 5 subpoblaciones. La colección comprendió 606 líneas avanzadas de trigo de primavera y fue analizada con 83 marcadores DArT (Diversity Arrays Technology) distribuidos por todo el genoma. Los análisis fueron ejecutados en el mismo programa informático.

En cuanto a la correlación de los genotipos descritos en la colección y la evidencia de susceptibilidad o resistencia a la roya amarilla de la variedad de trigo en estudio, se demostró que la subpoblación dos resultó tener un mayor porcentaje de

plantas resistentes a la plaga, por lo que esta sería de interés para desarrollar bloques de cruzamiento para programas de fitomejoramiento (Olmos, 2004).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Se demostró que la extracción de ADN a partir de muestras frescas garantizó una mayor concentración de material genético obtenido frente a muestras secas (300ng/ μ L vs 200ng/ μ L). Sin embargo, cabe recalcar que la detección de marcadores SSRs demanda una concentración inicial de ADN entre 5 y 20 ng/ μ L.

Es factible optimizar el proceso operativo, sobre todo con especies alopoliploides, estandarizando reacciones de PCR múltiplex con marcadores que amplifiquen regiones de diferentes cromosomas, como fue el caso de WMC89 que amplificó en el cromosoma 4B y 4D.

Se determinó que las condiciones óptimas de amplificación para los *primers* BARC19 y CFD84, incluyó 0,1% de BSA en el mix. Mientras, que para los *primers* BARC124 Y BARC133, se debió disminuir la concentración de MgCl₂ a 1,5 mM.

Para obtener resultados objetivos en el análisis de agrupamiento de trigo, fue necesario tener datos genotípicos en todos los cromosomas de sus genomas.

Para saturar regiones del genoma que no tuvieron cobertura, se utilizó marcadores basados en distintos principios como SSRs y SNPs, siendo necesario que estuvieran en equilibrio de ligamiento.

Los estudios de caracterización molecular efectuados mediante la tecnología M-13 tailing usando el analizador de ADN LI-COR 4300S en 297 variedades de trigo reflejaron que con los 28 marcadores utilizados se detectaron un total de 125 alelos, resultando un promedio de 4.46 alelos por marcador y un índice de contenido polimórfico de 0.54.

Los análisis de agrupamiento y multivariados realizados con los programas *Structure* y *Eigensoft* respectivamente, permitieron distinguir que la colección de 297 variedades de trigo, estuvo estructurada en tres grupos genéticos con características muy similares. La subpoblación 1 agrupó a 96 individuos, la 2 a 94 y la 3 a 107. Siendo la subpoblación 2, la que presentó el mayor porcentaje (87%) de plantas resistentes a roya amarilla.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar los especímenes agrupados en la subpoblación 2 para futuros programas de mejoramiento de trigo resistente a la roya amarilla.

Para mejorar la amplificación de marcadores SSRs, se puede optimizar el mix agregando BSA o modificar la concentración de $MgCl_2$.

Para realizar el análisis de estructura de la colección de líneas élites, se debe contar con un ordenador de alto rendimiento, que garantice su permanencia encendido y energía por más de 48 horas.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

- Afonso, D., & Perera, S. (2010). Plagas y enfermedades en el cultivo de Trigo. Obtenido de Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural: http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/otro_263_T_PLA_ENFER_TRIGO_2010.pdf, Tenerife-España
- Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del tropico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), pp: 221-242.
- Basantes, M. (2012). *Caracterización molecular de la colección nacional de camote (Ipomoea spp.) del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP mediante marcadores microsatélites*. (Tesis de Ingeniería). Sangolquí-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias de la Vida.
- Bragachini, M., Von Martini, A., & Méndez, A. (2012). *Regulación de la cosechadora en trigos con fuerte ataque de Fusarium*. Obtenido de Deere&Company: http://www.deere.com/wps/dcom/es_LA
- Castañon, G. (2002). La Biotecnología y el Mejoramiento Genético Vegetal. *Kuxulkab*, 14(7), pp: 1-15.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo . (2012). *El resurgimiento del trigo en Ecuador*. Obtenido de "CIMMYT": <http://www.cimmyt.org/es/boletin/231-2010/872-ecuadors-wheat-awakening>
- Cevallos, S. (2011). *Acuerdan subida de dos centavos en el precio del pan popular en Ecuador*. Obtenido de El Popular: <http://www.elpopular.com.ec/19224->

acuerdan-subida-de-dos-centavos-en-el-precio-del-pan-popular-en-ecuador.html

De la Fuente, S. (2011). *Componentes Principales*. (Artículo didáctico). Madrid-España: Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, 30p.

Dreisigacker, S., Shewayrga, H., Crossa, J., Arief, V., Ian, H., DeLacy, . . . Braum, H. (2010). Genetic structures of the CIMMYT international yield trial targeted to irrigated environments. *Mol Breeding*, 2012(29), pp:529–541. doi:10.1007/s11032-011-9569-7

Estación Metereológica Izobamba. (2010). *Condiciones climáticas Estación Experimental Santa Catalina*. Quito-Ecuador.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 2005(14), pp: 74–75.

Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 2003(164), pp: 1567–1587.

Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético* (1 ed.). Brasil: EMBRAPA-CENARGEN, 220p.

Fita, A. (2013). *Análisis de Componentes Principales*. Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia: <http://riunet.upv.es/handle/10251/29887>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *Importación de Trigo en Ecuador*. Obtenido de FAOSTAT: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *Producción de Trigo en Ecuador en 2012*. Obtenido de FAOSTAT: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). *Producción Mundial de Trigo en 2012*. Obtenido de FAOSTAT: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>

Gama, R., Santos, C., & Dias, R. (2013). Genetic variability of watermelon accessions based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 12(1), pp:747-754. doi:<http://dx.doi.org/10.4238/2013>

Gambarotta, L. (2005). *Caracterización de las fracciones de harina de trigo pan. Análisis de las propiedades físico-químicas y reológicas de las fracciones de harina de trigo pan obtenidas en el molino experimental BÜHLER MLU-202*. (Tesis de Licenciatura). Buenos Aires-Argentina: Universidad de Belgrano, Licenciatura en tecnología de Alimentos.

García, K. (2008). *Estudio de la diversidad genética de Phaseolus lunatus L. en zonas silvestres y cultivadas en la provincia de Imbabura-Ecuador mediante el uso de microsatélites*. (Tesis de Ingeniería). Sangolquí-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias de la Vida.

- García, S., Guerrero, A., Alonso, A., Grau, A., Amorós, A., & Ruiz, J. (2013). *Estudio de la variabilidad genética en una muestra de palmeras datileras cultivadas de Elche mediante marcadores SSR*. Obtenido de VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas: <http://sechaging-madrid2013.org/geystiona/adjs/comunicaciones/272/C04770002.pdf>
- Garófalo, J., Ponce-Molina, L., & Abad, S. (2011). Guía de Cultivo de Trigo. En *Boletín Divulgativo N°411* (pág. 20 p). Quito-Ecuador: INIAP.
- Gilchrist, L., Matínez, C., Duveiller, E., & García, I. (2006). *Guía Práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada* (2 ed.). México: AlmaMc.Nab. pp: 19,21.
- Gomes, C., Marques, J., Ferreira, T., & Gonçalves, E. (2013). Molecular characterization of soybean cultivars by microsatellite markers with universal tail sequence. *Pesq. agropec. bras.*, 48(3), pp: 270-279. doi:10.1590/S0100-204X2013000300005
- Gramene Triticum. (2010). *Triticum Taxonomy*. Obtenido de Gramene Triticum: http://www.gramene.org/species/triticum/wheat_taxonomy.html
- Gupta, P., Varshney, R., Sharma, P., & Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding*, 1999(11), pp: 369-390.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2011). *Boletín Agropecuario Mensual Septiembre*. Obtenido de Ecuador en cifras: <http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/pdfs/agro14.pdf>

- Khan, A., Khaliq, M., Shah, M., & Irshad, A. (2005). Cytogenetics and evolution of (*Triticum aestivum* L.). *International Journal of Agriculture & Biology*, 07(3), pp: 527–534.
- Kohli, M., Díaz, M., & Castro, M. (Edits.). (2003). *Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo: un enfoque multidisciplinario*. Uruguay-La Estanzuela: Seminario Internacional. CIMMYT-INIA. ISBN: 9974-7586-2-9.
- Lara, N. (2012). *Panificadores buscan subsidio gubernamental para estabilizar precios*. Obtenido de El Mercurio: <http://www.radioelmercurio.com.ec/?p=1929>
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (Edits.). (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. INTA. Obtenido de http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf
- Li, Y.-C., Fahima, T., Röder, M., Kirzhner, V., Beiles, A., Korol, A., & Nevo, E. (2003). Genetic effects on microsatellite diversity in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) at the Yehudiyya microsite, Israel. *Heredity*, 2003(90), pp: 150–156. doi:10.1038/sj.hdy.6800190
- Liu, K., & Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21(9), pp: 2128-2129.
- López, W. (2004). *Detección de la variabilidad genética en la población de Puno utilizando marcadores STR DYS390, DYS391 DYS392 del cromosoma*. (Tesis

de Licenciatura). Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.

Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villarreal, D., Gepts, P., Delgado-Valerio, P., & Colunga-García, P. (2007). Structure and Genetic Diversity of Wild Populations of Lima Bean from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Crop Science*, 2007(46), pp: 1071–1080.

Martos, V. (1998). *Influencia del regimen hídrico sobre parámetros de calidad del trigo duro (triticum durum Desf.) en ambiente mediterráneo*. (Tesis de Licenciatura). Granada-España: Universidad de Granada, Facultad de Ciencias.

Mathias, M., Sagredo, B., & 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), pp:3-15.

Molina, A., & Zulma, E. (2006). Flora chaqueña Argentina: Formosa, Chaco y Santiago del Estero: familia 'Gramineas'. *INTA*, 2006(23), pp: 848. ISBN 9875212210.

Molinero, L. (2002). *El método bayesiano en la investigación médica*. Obtenido de Asociación de la sociedad Española de Hipertensión: <http://www.seh-lelha.org/bayes1.htm#TOP>

Montaldo, P. (1994). *La agricultura americana durante el siglo XVI y sus antecedentes*. (Tesis de maestría). Valdivia-Chile: Universidad Austral de Chile, Dirección de Investigación y Desarrollo.

- Montenegro, D. (2012). *Respuesta agronómica de trece líneas y dos variedades de trigo rojo (*triticum vulgare L.*), en la parroquia la Paz, provincia del Carchi.* (Tesis de Ingeniería). Ibarra-Ecuador: Universidad Técnica del Norte, Facultad de ingeniería en ciencias Agropecuarias y Ambientales.
- Mora, F., & Perret, S. (2007). Aplicación de técnicas bayesianas en el análisis genético de árboles forestales. *Bosque*, 28(3), pp:198-206.
- Morillo, E., & Miño, G. (2011). *Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de Técnicas y Procedimientos en INIAP.* Quito-Ecuador: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estacion Experimental Santa Catalina. pp:121.
- Núñez, M. (2010). *Caracterización del sistema de producción de Trigo (*Triticum aestivum L.*) en las provincias de Chimborazo y Bolívar.* (Tesis de Ingeniería). Riobamba- Ecuador: Escuela Superior Politécnica el Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales.
- Olmos, S. (2004). Selección asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético de trigo. *Agrotecnia*, 2004(12), pp: 23-31.
- Palmano, S. (2001). A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathologia Mediterranea*, 2001(40), pp: 99–107.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., . . . Feuillet, C. (2008). A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. *Science*, 2008(22), pp: 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*. (Tesis de Ingeniería). Sangolquí-Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida.
- Powell, W., Machray, G., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Elsevier Science*, 1(7), pp: 215-222.
- Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 2000(155), pp: 945–959.
- Ravel, C., Praud, S., Murigneux, A., Canaguier, A., Sapet, F., Samson, D., . . . Charmet, G. (2006). Single-nucleotide polymorphism frequency in a set of selected lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 2006(49), pp: 1131–1139. doi:10.1139/G06-067
- Ríos del Prado, C. (2005). *Caracterización de microsatélites del roedor tetraploide (Tympanoctomys octodontidae)*. (Tesis de Licenciatura). Valdivia- Chile: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias.
- Rivadeneira, M. (2005). *Inventario Tecnológico del Programa de Cereales*. Quito-Ecuador.: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Programa de Cereales.
- Roelfs, A., Singh, R., & Saari, E. (1992). *Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades*. México, D.F.: CIMMYT. pp: 81.

- Rosero, C., Garzón, I., & Morillo, E. (2013). *Selección estable de marcadores moleculares microsatélites (SSRs) para la identificación de clones comerciales de cacao Nacional (Theobroma cacao L.), recomendados por el INIAP*. (Tesis de Ingeniería). Quito-Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Facultad de Ciencias Biológicas y de la Agricultura.
- Sala, C., Echarte, M., Bulos, M., Vrdoljak, G., & Paulucci, P. (2005). *Tendencias en el mejoramiento del cultivo de trigo*. Obtenido de INTA Rafaela: <http://cursa.ihmc.us/rid=1HZ6D7CN9-19QWMN9-RHP/Tendencias%20en%20el%20mejoramiento%20del%20cultivo%20de%20trigo.pdf>
- Somers, D., Isaac, P., & Edwards, K. (2004). A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2004(109), pp: 1105–1114. doi:10.1007/s00122-004-1740-7
- Song, Q., Shi, J., Singh, S., Fickus, E., Costa, J., Lewis, J., . . . Cregan, P. (2005). Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(3), pp: 550-560. doi:10.1007/s00122-004-1871-x
- Valadez, E., Kahl, G., Ramser, J., Hüttel, B., & Rubluo, A. (2001). Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Fitotecnia Mexicana*, 24(1), pp 103-120. ISSN impreso: 0187-7380.

Vinueza, R. (2011). *Validación de Protocolos para la amplificación de marcadores moleculares ligados a genes de resistencia a Roya Amarilla de Trigo*. (Tesis de Ingeniería). Quito-Ecuador: Universidad de los Hemisferios.

CERTIFICACIÓN

Los suscritos certifican:

Que el trabajo titulado “Caracterización molecular de 297 genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) provenientes del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo e inferencia de su estructura genética”, realizado por el egresado Miguel Eduardo Márquez Carrillo, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Universidad de las fuerzas Armadas-ESPE.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) y financiado por el proyecto “Desarrollo e innovación biotecnológica para la potenciación de rubros agrícolas de importancia en seguridad alimentaria, competitividad exportable y adaptación al cambio climático (CÓDIGO SENESCYT PIC-12-INIAP001)”, se deja en libertad del autor y del INIAP, para su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Se autoriza a Miguel Eduardo Márquez Carrillo para que lo entregue a la Dra. María Augusta Chávez, en su calidad de Directora de la Carrera.

Sangolquí, 20 de Enero del 2014

Dra. María Augusta Chávez
COORDINADORA DE LA CARRERA

Dr. Eduardo Morillo
LÍDER DEL DEPARTAMENTO
DE BIOTECNOLOGÍA (INIAP)