

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.

Márquez Carrillo, Miguel Eduardo¹⁻², Falconí Esteban², Morillo Eduardo²

¹Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Facultad de ciencias de la Vida y de la Agricultura, Sangolqui, Ecuador

²Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias-Estacion Santa Catalina,
Quito-Ecuador

RESUMEN

En la actualidad el cultivo de trigo se ve afectado por la roya amarilla y fusariosis de la espiga, razón por la cual 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 Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, 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 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 vs. 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 élite de trigo, presentando en promedio cerca de 4,46 alelos/locus.

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

ABSTRACT

At present the wheat's crop is affected by yellow rust and scab, for this reason genotypic information is necessary to maintain and increase the gene pool of available varieties. The objective of this research was the molecularly characterize of 297 samples from a collection of advanced lines of spring wheat originating in the International Center for Maize and Wheat Improvement, initially using 84 fluorescently labeled microsatellite markers by M13-tailing technique to infer their population structure. First, DNA samples are extracted, then the validated using PCR, subsequently, the polymorphism of the primers are validated. Finally, the samples were amplified by PCR and then genotyped by 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, the technique was used Evanno additionally Principal Component was analyzed with the program 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.

Key Words: Molecular characterization, genotyping, microsatellite, population structure.

INTRODUCCION

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 y Abad, 2011). En el Ecuador, el consumo de trigo corresponde a 38.6 Kg/persona/año (CIMMYT, 2012) y para cubrir esta demanda, se importa el 98,45% del cereal (INEC, 2011).

La disminución de la producción del cultivo se debe a que el cultivo es afectado por una serie de enfermedades y problemas abióticos (Afonso y Perera, 2010), como la roya amarilla (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) y la fusariosis de la espiga producida por *Fusarium graminearum*, ocasionando hasta el 50% de la pérdidas de rendimiento (Nuñez, 2010).

Una estrategia eficiente para mejorar la productividad del cultivo en el país es el desarrollo de nuevas variedades pero

debido a la complejidad que representa el mejoramiento convencional se utilizan técnicas biotecnológicas (Pazmiño, 2012), como el cultivo de tejidos y la biología molecular. (Levitus, Echenique, Rubinstein, Hopp y Mroginski, 2010), que optimizan los recursos disponibles acelerando los procesos (Castañón, 2012).

Para ello, 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; Gama, Santos y Dias, 2012).

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, Díaz, y Castro, 2003), y las características que posea como (1) ser altamente polimórfico, (2) mostrar rasgos de heredabilidad de tipo, (3) no

tener influencia ambiental, (4) ser codominante, (5) útil para realizar el análisis en fases tempranas del desarrollo de la planta (Levitus *et al.*, 2010). 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.

En la actualidad los marcadores moleculares más utilizados son los microsatélites o secuencias de nucleótidos repetidas en tándem (López, 2004) distribuidas al azar a lo largo del genoma de la mayoría de especies eucariotas (Ferreira y 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). 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 y Miño, 2011), 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)

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.

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 (Azofofeifa, 2006).

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

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

Caracterización molecular

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo descrito por Ferreira y Grattapaglia (1998), a partir de muestra seca y muestra fresca. Después se realizó la cuantificación de ADN con electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v), utilizando 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. Una vez cuantificadas y diluidas las muestras, se validó la calidad de ADN extraído (Morillo y Miño, 2011), amplificándolo en base al marcador SSR BARC10, el cual genera fragmentos de 300pb a 51°C. La electroforesis de los productos de amplificación se realizó en un gel de agarosa al 2% en Buffer de corrida TAE 1X.

Para el genotipaje, se contó inicialmente con 84 *primers* SSRs, para los cuales se determinó la temperatura de *annealing* con las condiciones de amplificación ya descritas. 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 realizando duplexaje de *primers*. 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 y Miño, 2011).

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. 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.

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: Es la medida de la capacidad de información que un marcador genético puede otorgar (Basantes 2012; García, Guerrero, Alonso, Grau, Amorós y Ruiz, 2013).

El análisis de la diversidad genética se realizó en el programa Power Marker versión 3.0 (Liu y Muse, 2005),.

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 programa *Structure*, asume un modelo de "k" subpoblaciones (para la presente investigación, se consideró entre 1 y 10) (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, Zizumbo, Gepts, Delgado y Colunga, 2007).

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 .

Una vez obtenidos los datos de estructura poblacional, se correlacionaron con información fenotípica reportada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

RESULTADOS

Después de realizar la extracción y cuantificación de ADN, se encontró que las muestras tenían en promedio 400 ng/uL, datos que se verificaron utilizando un espectrofotómetro para re-cuantificar las muestras, obteniéndose resultados de más de 1000 ng/uL. Posteriormente, las muestras validaron exitosamente. Respecto al polimorfismo de los primers, se determinó la temperatura de annealing de 82 primers, y después en el screening de los mismos se encontró que solo 33 presentaban perfiles de genotipaje aptos para la investigación, por lo que se procedió a realizar el genotipaje de las muestras con 33 marcadores microsatélites. Luego, con la información genotípica obtenida se determinó el valor de LD de los marcadores, obteniéndose que solo 28 de ellos fueran idóneos para realizar los análisis de asignación genética.

Una vez determinado el número real de marcadores se realizó la caracterización molecular, que mostraron un promedio de 4.46 alelos por marcador, y un PIC promedio de 0.54, siendo el más alto el valor del primer GWM469 con 0,79.

Respecto a la asignación genética, inicialmente se observó la presencia de dos subpoblaciones, como se aprecia en la figura 1.

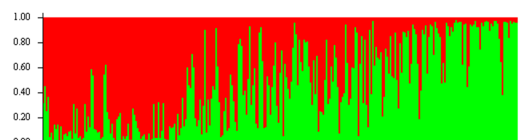


Figura 1. Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de 297 accesiones de trigo del (CIMMYT) a una subpoblación determinada.

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 de la investigación paralela realizada en Estados Unidos por Falconí E. (Comunicación personal, 2013), para saturar las zonas del genoma que no tenían cobertura de marcadores SSRs.

Realizando nuevamente la asignación genética se encontró que el número de subpoblaciones es de tres, según la figura 2.

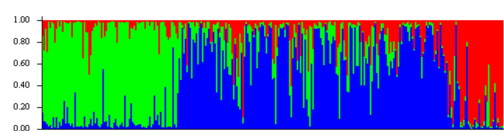


Figura 2. Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de cada una de las 297 accesiones de trigo del (CIMMYT) a una subpoblación determinada.

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).

Estos datos fueron corroborados por un análisis multivariado realizado por PCA. 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, 4 y 5). El PCA determinó que gran parte de la varianza existente en la población fue capturada en los tres primeros componentes principales con un 45.99%

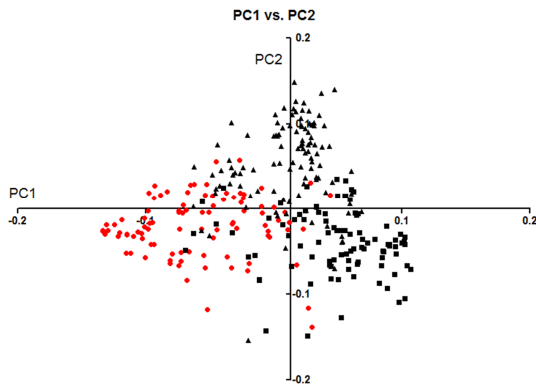


Figura 3. Distribución de las muestras de la subpoblación 1 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2.

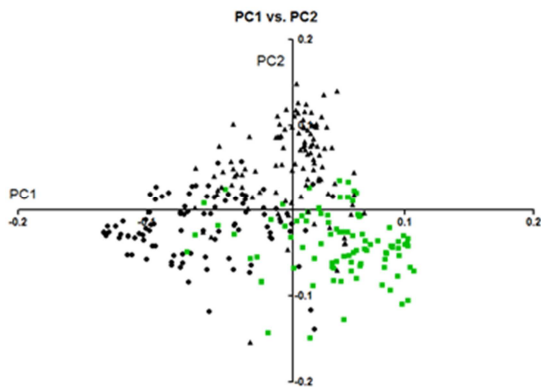


Figura 4. Distribución de las muestras de la subpoblación 2 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2

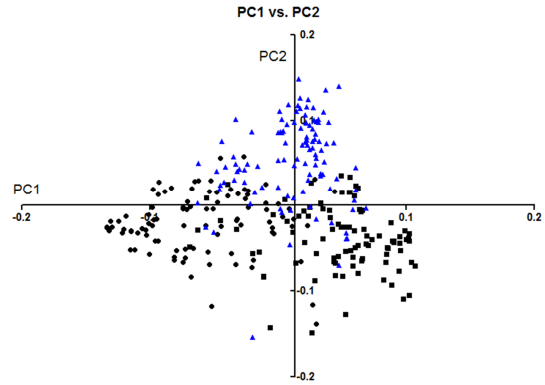


Figura 5. Distribución de las muestras de la subpoblación 3 en función de las coordenadas del componente 1 vs. componente 2

Finalmente, luego de asignar cada individuo a una subpoblación, se realizó un correlación con información fenotípica que revelo que la subpoblación 2 tiene el mayor porcentaje de plantas resistentes a roya amarilla, según la tabla 1.

Tabla 1. Frecuencia relativa de individuos con características fenotípicas reportadas asociadas a las subpoblaciones encontradas

	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%

DISCUSIÓN

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.

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.

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).

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/μL vs 200ng/μL). Sin embargo, cabe recalcar que la detección de marcadores SSRs demanda una concentración inicial de ADN entre 5 y 20 ng/μL.

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.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Afonso, D. y Perera, S. (2010). Plagas y enfermedades en el cultivo de Trigo. *Servicio Técnico de Agricultura y Desarrollo Rural* Tenerife-España, Recuperado de:

http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/otro_263_T_PLA_ENFER_TRIGO_2010.pdf

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 microsatélite*. (Tesis de Ingeniería). Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias de la Vida, Quito, Ecuador.
- Castañon, G. (2002). La Biotecnología y el Mejoramiento Genético Vegetal. *Kuxulkab*, 14 (7), pp: 1-15.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo "CIMMYT". (2012). *El resurgimiento del trigo en Ecuador*. Recuperado de <http://www.cimmyt.org/es/boletn/231-2010/872-ecuadors-wheat-awakening>
- De la Fuente, S. (2011). *Componentes Principales*. (Artículo didáctico). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales, Madrid, España, 30p.
- Dreisigacker, S., Shewayrga, H., Crossa, J., Arief, V., Ian, H., DeLacy, Sing, R., Dieters, M. y 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
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 2005 (14), pp: 74–75.
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. EMBRAPA-CENARGEN, Brasil, 1(ed), 220p.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations "FAO". (2013). Producción de Trigo en Ecuador en 2012. *FAOSTAT*. Recuperado de: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations "FAO". (2013). Producción Mundial de Trigo en 2012. *FAOSTAT*. Recuperado de: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations "FAO". (2013). Importación de Trigo en Ecuador. *FAOSTAT*. Recuperado de: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/T/TP/E>
- Gama, R., Santos, C. y 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>
- 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). Escuela Politécnica del Ejército, Facultad de Ciencias de la Vida, Quito, Ecuador.

- García, S., Guerrero, A., Alonso, A., Grau, A., Amorós, A. y Ruiz, J. (2013). Estudio de la variabilidad genética en una muestra de palmeras datileras cultivadas de Elche mediante marcadores SSR. *VII Congreso Ibérico de Agroingeniería y Ciencias Hortícolas*. Madrid, España. Recuperado de: <http://sechaging-madrid2013.org/geystiona/adjs/comunicaciones/272/C04770002.pdf>
- Garófalo, J., Ponce-Molina, L. y Abad, S. (2011). *Guía del cultivo de Trigo*. Boletín Divulgativo No. 411. INIAP, Ecuador, 20p.
- Gomes, C., Marques, J., Ferreira, T. y 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.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos "INEC". (2011). Boletín Agropecuario Mensual Septiembre. *Ecuador en cifras*. Recuperado de: <http://www.ecuadorencifras.com/cifras-inec/pdfs/agro14.pdf>
- Kohli, M., Díaz, M. y Castro, M. (Eds). (2003). *Estrategias y metodologías utilizadas en el mejoramiento de trigo: un enfoque multidisciplinario*. Seminario Internacional, La Estanzuela, Uruguay. CIMMYT-INIA. ISBN: 9974-7586-2-9.
- Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp E. y Mroginski, L. (Eds). (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. INTA. Recuperado de: http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2010/09/bio_WEB.pdf
- Liu, K., y 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). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima, Perú.
- Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villarreal, D., Gepts, P., Delgado-Valerio, P. y 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.
- Morillo, E. y Miño, G. (2011). *Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de Técnicas y Procedimientos en INIAP*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estación Experimental Santa Catalina, Quito, Ecuador, 121p.
- Núñez, M. (2010). *Caracterización del sistema de producción de Trigo (Triticum aestivum L.) en las provincias de Chimborazo y Bolívar*. (Tesis de Ingeniería).

- Escuela Superior Politécnica el Chimborazo, Facultad de Recursos Naturales, Riobamba, Ecuador.
- Olmos, S. (2004). Selección asistida por marcadores moleculares y su aplicación en el mejoramiento genético de trigo. *Agrotecnia*, 2004(12), pp: 23-31.
- Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Korol, A., Michalak, M., Kianian, S., Spielmeier, W., Lagudah, E., Somers, D., Kilian, A., Alaux, M., Vautrin, S., Bergès, H., Eversole, K., Appels, R., Safar, J., Simkova, H., Dolezel, J., Bernard M. y Feuillet, C. (2008). A Physical Map of the 1-Gigabase Bread Wheat Chromosome 3B. *Science*, 2008(322), 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). Escuela Politécnica del Ejército, Departamento de Ciencias de la Vida, Quito, Ecuador.
- Pritchard, J., Stephens, M. y 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., Balfourier, F., Dufour, P., Chalhoub, B., Brunel, D., Beckert, M. y 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.
- Rosero, C., Garzón, I. y 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). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Facultad de Ciencias Biológicas y de la Agricultura, Quito, Ecuador.
- Somers, D., Isaac, P. y Edwards, K. (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2004(109), pp: 1105–1114. DOI 10.1007/s00122-004-1740-7
- Song, Q., Shi, J., Singh, S., Fickus, E., Costa, J., Lewis, J., Gill, B., Ward, R. y 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.