

ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEBADA *Hordeum vulgare* L. EN LA COLECCIÓN DEL INIAP USANDO MARCADORES MOLECULARES SSR

Moreno, J¹. Morillo, E². Ponce, L². Peña, C¹. Romero, P¹.

¹Carrera de Ingeniería en Biotecnología – Universidad de las fuerzas Armadas – ESPE

²Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP)

RESUMEN

La cebada, *Hordeum vulgare* L., es el cuarto cereal de mayor producción en el mundo y en el Ecuador ha sido y es uno de los principales rubros en la alimentación de los habitantes de la región andina. El presente trabajo tuvo como objetivo generar información molecular que permita analizar la diversidad genética concerniente al germoplasma de cebada del INIAP. Se analizaron 219 genotipos de cebada correspondientes a 160 materiales entre variedades cultivadas, acriolladas y líneas promisorias. Se obtuvieron los perfiles alélicos con 16 loci SSR altamente polimórficos y distribuidos en los siete cromosomas de cebada. Se detectaron 157 alelos en un rango desde 104 hasta 232bp. El número de alelos por locus varió desde 3 hasta 14 con un promedio de 9.81. Excepto para el marcador Bmag0217 el índice de diversidad genética mostró altos valores, que variaron desde 0.60 hasta 0.85 y resultaron en un promedio de 0.75. Los análisis de conglomerados y el de coordenadas principales demostraron que no existe una diferenciación entre materiales acriollados y mejorados. Esto fue corroborado por análisis molecular de varianza y estadísticos F ($F_{ST}=0.014$) que mostraron además que una configuración con 10 clusters evidencia la mayor diferenciación ($F_{ST}=0.422$). El análisis mediante biplot logístico externo reveló 27 alelos significativos ($R^2 \geq 0.5$, $p < 0.05$) y sus predicciones de presencia de individuos pertenecientes a sus respectivos clusters. La gran diversidad genética de cebada reportada en este estudio debe ser técnicamente considerada en programas de fitomejoramiento y conservación de este germoplasma.

Palabras clave: diversidad genética, cebada, SSR, acriolladas, biplot, germoplasma, fitomejoramiento.

INTRODUCCIÓN

La cebada *Hordeum vulgare* L. es uno de los cultivos más antiguos, y ha desempeñado un importante rol en el desarrollo de la agricultura y en el de las ciencias como la agronomía, fisiología y genética (Ullrich, 2010).

La cebada ha sido y es en la actualidad uno de los principales rubros en la alimentación de los habitantes de las zonas altas de la región andina como fuente de almidón, proteínas, vitaminas y minerales, y tiene gran potencial para que se incremente su consumo en las

zonas urbanas. Hoy en día la cebada, a pesar de la reducción en su superficie cultivada, es después del maíz el cereal de más amplia distribución en la región interandina y el que mejor se adapta a zonas de alturas superiores a los 3000 m.s.n.m

No se han reportado estudios de diversidad genética en germoplasma de cebada, a nivel morfológico o molecular en el país. Por lo tanto es necesario analizar y evaluar el germoplasma que se encuentra en los campos de agricultores, “variedades acriolladas”, las variedades mejoradas generadas por

los centros de investigación, así como los materiales promisorios en evaluación, para conocer su composición genética, para una futura orientación de este trabajo a la identificación de genes y características de interés agronómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El germoplasma en estudio constó de 160 variedades de cebada de distinto tipo, tanto acriolladas como provenientes de programas de mejoramiento que se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Descripción del germoplasma en estudio de acuerdo a su tipo, proveniencia y número de accesiones o variedades.

Grupo	Tipo de material	Proveniencia	No. de accesiones/ variedades
A.1	Acriollado	Banco de Germoplasma INIAP	46
A.2	Acriollado	Colectas Austro e Imbabura	28
A.3	Acriollado	Programa de Cereales	23
M.1	Mejorado	Programa de Cereales	51
M.2	Mejorado	Programa de Cereales	12
			160

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el protocolo descrito por Pallotta *et al.* (2003), con buffer (0.1M Tris-HCl pH 7.5; 0.05M EDTA pH 8.0; 1.25% SDS). Se tomó en cuenta la naturaleza de cada tipo de germoplasma y se consideraron 10 individuos por cada variedad de los grupos A.1 y A.2 y dos individuos para el resto de grupos.

El conjunto de loci SSR analizados se redujo a 16 de un grupo de 21 iniciales. Los marcadores descartados fueron: Bmag0853, EBmac0701 y Bmag0135 que presentaron alelos nulos en sus perfiles de amplificación para un porcentaje considerable (superior al 30%) de muestras en estudio; Bmag0692 que presentó amplicones de gran tamaño (superiores a 500 pb) y Bmac0399 para el que no se obtuvieron amplicones (Tabla 2).

Tabla 2: Marcadores SSR para cebada en estudio

Nº	Marcador	Ta (°C)
1	Bmac0303	58
2	Bmag0007	58
3	Bmac0040	58
4	Bmac0127	58
5	Bmac0213	58
6	EBmac0501	58
7	Bmac0209	58
8	Bmag0223	58
9	Bmag0217	58
10	Bmag0384	60
11	Bmac0134	55
12	Bmag0125	55
13	Bmag603	55
14	EBmac0679	55
15	Bmac0316	55
16	scssr02306	60

La amplificación del ADN genómico de cebada se realizó con la metodología descrita por Morillo & Miño (2011) con las siguientes concentraciones finales en un volumen de reacción de 7,5 µl: ADN (5,0 ng/µl): 1,33 ng/µl; Buffer GoTaq PROMEGA® (10 X): 1X; MgCl₂ PROMEGA® (25,0 mM): 2,0 mM; dNTPs INVITROGEN® (5.0 mM): 0,235 mM; Primer Forward y Reverse (10 µM): 0,5 µM; Taq DNA Polymerasa PROMEGA® (5,0 U/µl): 0,067 U/µl.

El programa de amplificación fue el siguiente: un periodo de 94 °C por 5 minutos; seguido de la repetición de 30 ciclos con 94 °C por 45 segundos, ° TA por 1 minuto y 72 °C por 2 minutos. Un ciclo de extensión final de 72 °C por 7 minutos y uno de 10 °C por 5 minutos.

El genotipaje final para la plataforma LI-COR 4300S con la técnica M13-*tailing* en condiciones según Morillo y Miño (2011); se realizó con 305 genotipos de cebada (Tabla 3), provenientes de un *screening* previo que partió de 912 muestras de ADN ya que se consideraron para el estudio 10

individuos de cebada por cada accesión de los grupos A.1 y A.2 y dos individuos por variedad de los grupos A.3, M.2 y M.3. Dicho screening se realizó al escoger el mínimo número de individuos en el que consten todos los perfiles por accesión amplificados con los marcadores EBmac0501 y Bmac0040 (Figura 1).

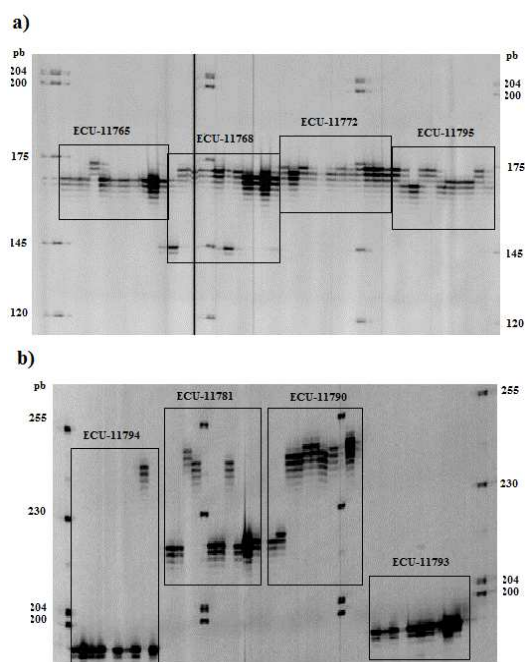


Figura 1: Perfiles de amplificación para accesiones de cebada acriollada del Banco de Germoplasma. a) Con el marcador EBmac0501. b) Con el marcador Bmac0040.

Tabla 3: Resumen del número de individuos y genotipos total y por cada grupo de germoplasma analizados.

Grupo	Número de accesiones/ variedades	Individuos seleccionados	Nº Genotipos
A.1	46	92	92
A.2	28	41	41
A.3	23	46	23
M.1	51	102	51
M.2	12	24	12
TOTAL	160	305	219

Para el análisis de diversidad genética se utilizaron los siguientes paquetes informáticos: PowerMarker V3.25 (Liu & Muse, 2005) y GenA1Ex V6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

Los análisis multivariantes empleados fueron: Análisis de coordenadas principales (ACoP), análisis de conglomerados (AC) y biplot logístico externo (BLE) llevados a cabo en el software MULTBILOT (Vicente-Villardón, 2014).

En la determinación de un set núcleo se emplearon los programas: COREFINDER (Policriti & Sgarro, 2014) y POWERCORE (Kim et al., 2007).

RESULTADOS

El protocolo desarrollado por Pallotta *et al.* (2003) permitió obtener un alto rendimiento que en promedio fue de $54.4 \pm 1.8 \mu\text{g}$ de ADN. Los coeficientes de la razón entre los valores de absorbancias $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ tuvieron en promedio un valor de 2.10 ± 0.02

Se realizaron análisis de diversidad genética en la base de la colección de 219 genotipos de cebada. Se detectaron 157 alelos con un rango de longitud en pares de bases que fueron desde 104 hasta 232. (Tabla 4).

El número de alelos por locus varió desde 3 (scsr2306) a 14 (Bmag0007 y Bmac0316) con una media de 9.81 alelos por locus. En cuanto al número de alelos raros, fueron los marcadores Bmac0213 y Bmac0316 los de mayor proporción.

Adicionalmente, el valor promedio para la heterocigosidad observada es 0.027 ya que 10 marcadores no detectaron individuos heterocigotos. El índice de diversidad genética de Nei o heterocigosidad esperada tuvo su valor máximo de 0.85 en el marcador Bmag0007 y el mínimo de 0.51 en Bmag0217 con un promedio de 0.75.

Tabla 4: Resumen de los parámetros de diversidad genética de 219 genotipos de cebada de la colección completa analizados con 16 loci SSR.

Marcador	Na*	Nea*	Nar*	Ho*	He*	PIC*
Bmac0213	13	2.87	9	0.024	0.65	0.63
Ebmac0501	10	4.05	5	0.005	0.75	0.72
Bmac0209	10	5.12	5	0.000	0.81	0.78
Bmag0223	9	4.90	2	0.000	0.80	0.77
Bmac0303	10	4.77	5	0.000	0.79	0.76
Bmac0040	13	5.55	8	0.005	0.82	0.80
Bmag0007	14	6.59	8	0.000	0.85	0.83
Bmag0217	7	2.03	3	0.117	0.51	0.48
Bmag0384	5	3.47	1	0.000	0.71	0.66
Bmac0127	10	5.87	4	0.000	0.83	0.81
Bmac0134	12	4.37	7	0.000	0.77	0.75
Bmag0125	7	3.73	3	0.260	0.73	0.69
Bmag0603	12	3.71	8	0.019	0.73	0.70
EBmac0679	8	3.61	3	0.000	0.72	0.68
Bmac0316	14	5.88	9	0.000	0.83	0.81
scssr2306	3	2.47	0	0.000	0.60	0.53
Promedio	9.81	2.87	5.06	0.027	0.75	0.71

* Na= número de alelos, Nea= número efectivo de alelos, Nar= número de alelos raros ($p_i \leq 0.05$), Ho= heterocigosidad observada, He= heterocigosidad esperada o diversidad genética de Nei (1973), PIC= *Polimorfism Index Content* o Contenido de información polimórfica

Pese a que los parámetros: número de alelos, alelos raros, alelos únicos y número efectivo de alelos por locus en el germoplasma acriollado son mayores;

polimorfismo PIC promedio fueron superiores en el germoplasma mejorado (Figura 2).

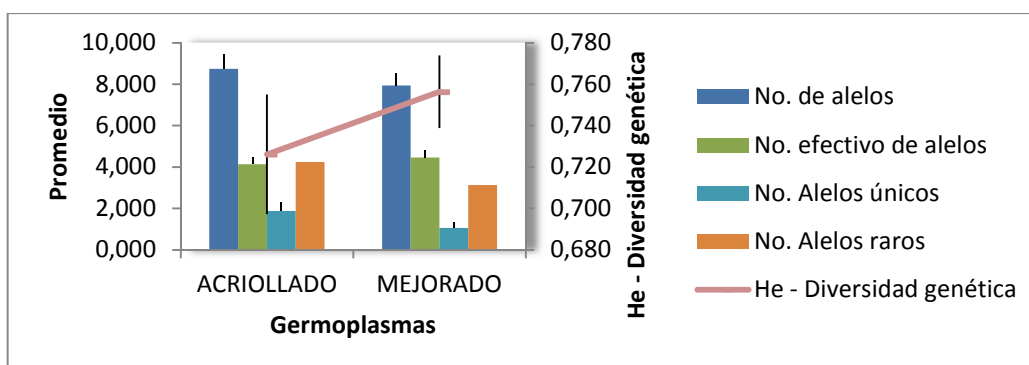


Figura 2: Comparación de los índices de diversidad genética entre el germoplasma acriollado y el mejorado.

Las primeras tres dimensiones del ACoP (análisis de coordenadas principales) explican el 32.63% de la variación total, siendo las coordenadas 1 y 2 las de mayor porcentaje de varianza con el 15.02% y 10.03% respectivamente.

distinguir grupos definidos por los tipos de material establecidos a priori: mejorados y acriollados (Figura 4).

En la distribución espacial generada en el ACoP (Figura 3) no se pudieron

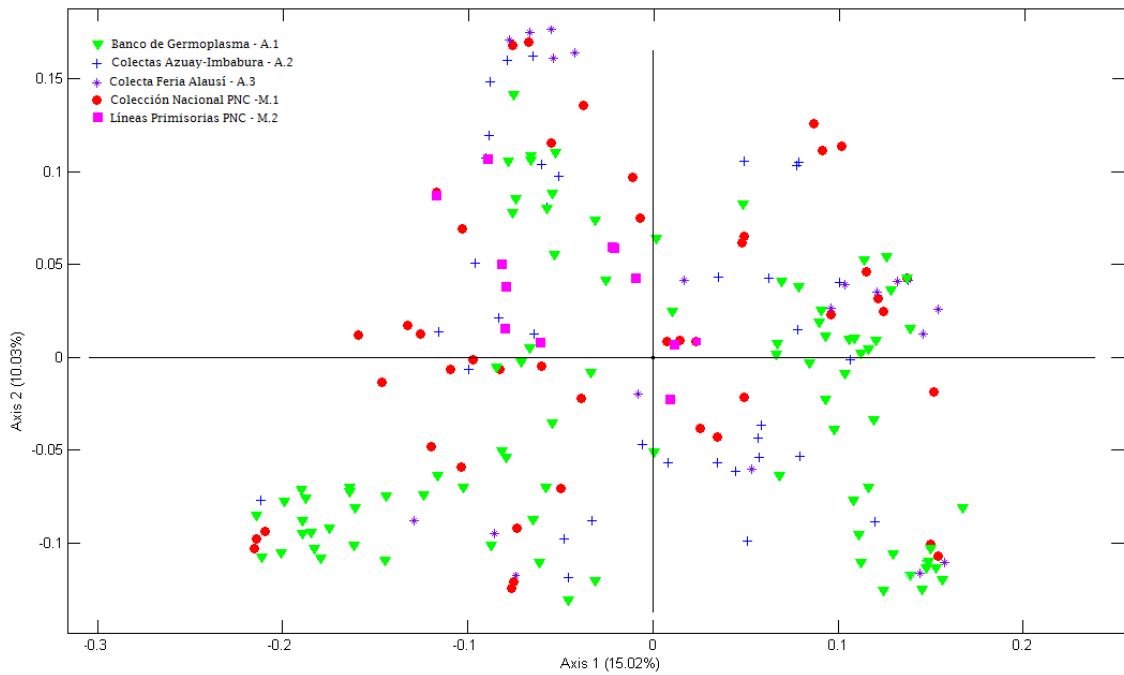


Figura 3: Análisis de coordenadas principales a partir de la matriz de similitud calculada con el coeficiente SM (Sokal & Michener, 1958), de 219 genotipos de cebada con 16 marcadores SSR. Los genotipos están representados de acuerdo a su tipo de germoplasma

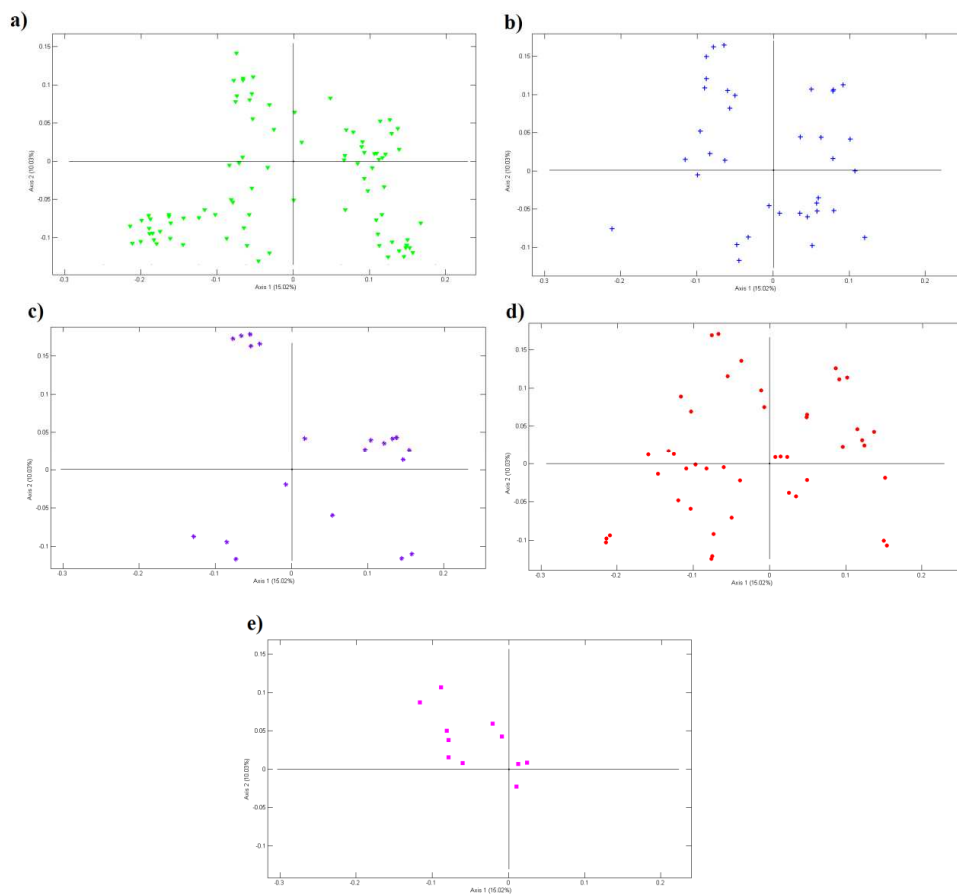


Figura 4: Análisis de coordenadas principales a partir de la matriz de similitud calculada con el coeficiente SM (Sokal & Michener, 1958) de 219 genotipos de cebada con 16 marcadores SSR. a) Germoplasma tipo A.1, b) germoplasma tipo A.2, c) germoplasma tipo A.3, d) germoplasma tipo M.1 y e) germoplasma tipo M.2.

Se sometió tanto a la matriz de similitud inicial como a la matriz resultante del ACoP al análisis de conglomerados mediante el algoritmo UPGMA.

El dendrograma obtenido presentó un valor para el coeficiente de correlación cofenética de 0.75 (Figura 5). También se generó el plot del ACoP con los 10 clusters UPGMA a partir de los datos resultantes de la ordinación.

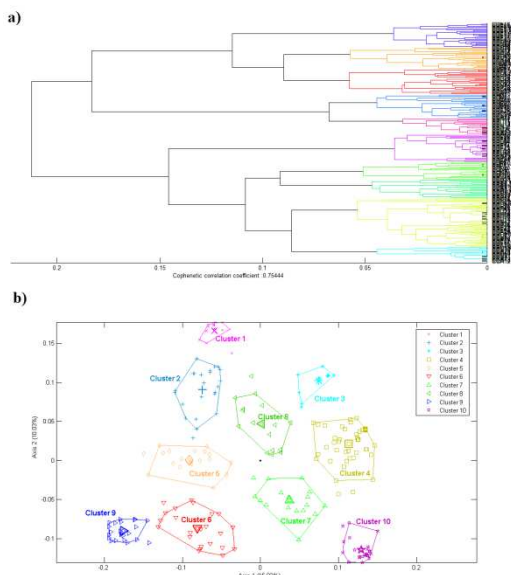


Figura 5: Análisis de conglomerados de 219 genotipos de cebada con 16 loci SSR en base a la matriz de coordenadas principales. a) Dendrograma obtenido con el algoritmo UPGMA en el programa MULTBILOT y b) Representación en el ACoP de los clusters obtenidos con el algoritmo UPGMA.

Se realizó el análisis molecular de varianza que confirmó la inexistencia de una significativa relación de agrupación entre los genotipos de cebadas acriolladas y mejoradas (Tabla 5).

El índice de fijación F_{ST} confirmó que la mayor diferenciación genética se obtuvo cuando fueron analizados los clusters ordinales más alejados del origen y se evidenció incluso, una diferenciación menor a la revelada por todos los clusters, cuando se analizaron los grupos más cercanos al origen (Tabla 6)

Tabla 5: Análisis molecular de varianza para 16 loci de los grupos, establecidos a priori, de cebada acriollada y de mejoramiento.

Fuente de variación	g.l.	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	0.119	1.98
En las poblaciones	217	5.909	98.02
Total	218	6.030	

Tabla 6: Estimación de Weir & Cockerham (1984) de los promedios del índice F_{ST} , de los clusters ordinales en distintos casos.

Casos en estudio	F_{ST}
Clusters del 1 al 10.	0.452
Clusters 2, 4, 5, 6, 7 y 8	0.308
Clusters 1, 3, 9 y 10	0.764

Se efectuó el análisis de biplot logístico externo, BLE, sobre la base del ACoP que permitió identificar relaciones entre individuos (genotipos de cebada) y variables (alelos de los loci SSR) en el espacio euclídeo. Con el criterio de corrección Bonferroni y un valor para pseudo se establecieron 27 alelos de 157 alelos encontrados, pertenecientes a 14 de los 16 loci SSR (Tabla 7).

Se determinó un set núcleo de 51 genotipos de cebada mediante la estrategia M y cuyos índices de diversidad genética se muestran en la tabla 8.

Tabla 7: Alelos significativos ($R^2 \geq 0.5$, $p < 0.05$) resultantes del biplot logístico externo

No.	Alelo
1	Bmac0040(202pb)
2	Bmac0127(124pb)
3	Bmac0134(162pb)
4	Bmac0209(179pb)
5	Bmac0213(150pb)
6	Bmac0213(160pb)
7	Bmac0213(170pb)
8	Bmac0303(136pb)
9	Bmac0316(134pb)
10	Bmac0316(136pb)
11	Bmac0316(160pb)
12	Bmag0007(192pb)
13	Bmag0007(198pb)
14	Bmag0125(107pb)
15	Bmag0125(109pb)
16	Bmag0125(113pb)
17	Bmag0384(114pb)
18	Bmag0384(116pb)
19	Bmag0384(118pb)
20	Bmag0303(110pb)
21	EBmac0501(125pb)
22	EBmac0501(149pb)
23	EBmac0501(155pb)
24	EBmac0679(116pb)
25	EBmac0679(144pb)
26	EBmac0679(148pb)
27	scssr02306(151pb)

Tabla 8: Cuadro comparativo de los de diversidad genética para los 16 loci SSR en la colección completa y el set core de cebada.

	Set núcleo	Colección completa
No. de alelos por locus	9.75	9.81
No. de alelos efectivos por locus	5.67	2.86
No. de alelos únicos por locus	1.75	--
Heterocigosidad esperada	0.80	0.75

DISCUSIÓN

Cuando se emplearon un mayor número de marcadores y accesiones de cebada se reportaron valores para este índice que fueron desde 16.7 (Malysheva-Otto *et al.*, 2006), 10.65 (Yahiaoui, 2006) hasta 8.0 (Malysheva-Otto *et al.*, 2007). Mientras que, cuando se emplearon un menor número de marcadores y accesiones Chen *et al.* (2012) reportaron 6.0 alelos por locus. Un estudio que

puede ser comparable al presente, en cuanto al número de datos generados, es el de Struss & Plieske (1998) que analizaron 163 líneas de cebada con 15 loci SSR y reportaron 8.6 alelos por locus.

El marcador Bmag0007 fue el más informativo de este estudio, de acuerdo a su número de alelos (14), al índice de polimorfismo PIC (0.83) y de diversidad genética de Nei (0.85), mientras que este mismo locus SSR en el estudio de Kolodinska-Brantestam *et al.* (2012) fue reportado el valor de 0.79 para el índice PIC de este marcador. Por otro lado, el menos informativo, Bmag0217 (PIC=0.48) según Wang *et al.* (2010) tuvo un índice PIC de 0.69.

Varios estudios han demostrado cambios en la diversidad debido a programas de mejoramiento y han evidenciado una cierta disminución de la diversidad genética en los materiales modernos (Russel *et al.*, 2000; Matus & Hayes, 2002; Koebner *et al.*, 2003). Sin embargo, en un meta-estudio de Wouw *et al.* (2010) no se encontró una disminución significativa de la diversidad genética en variedades liberadas en el siglo XX de ocho diferentes cultivos que incluyeron a la cebada.

El estudio de Bellucci *et al.* (2013) hizo una comparación de la diversidad entre poblaciones de variedades criollas y cultivares de cebada italianas, y mostraron que la diversidad dentro de las primeras es comparable a la observada dentro de las segundas.

La alta variabilidad genética detectada, tanto entre materiales acriollados y mejorados, podría hacer que se descarte un enfoque de introgresión de genes desde las variedades criollas hacia los cultivares en futuros programas de mejoramiento; como lo recomienda

Ram, Thiruvengadam, & Vinod (2007) en el germoplasma de arroz.

CONCLUSIÓN

A la luz de los resultados expuestos, se puede afirmar que existe una gran diversidad genética inherente a la colección de cebada del INIAP; y este estudio puede ser considerado un insumo en actividades de fitomejoramiento y de conservación de accesiones en el Banco de Germoplasma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bellucci, E., Bitocchi, E., Rau, D., Nanni, L., & Ferradini, N. (2013). Population Structure of Barley Landrace Populations and Gene-Flow with Modern Varieties. *PLoS ONE*, 8(12).
- Chen, Z., Lu, R., Zou, L., Du, Z., Gao, R., He, T., & Huang, J. (2012). Genetic diversity analysis of barley landraces and cultivars in the Shanghai region of China. *Genet. Mol. Res.*, 11(1):644-650.
- FAO. (1 de Marzo de 2014). *FAOSTAT*. Obtenido de <http://faostat.fao.org>
- Koebner, R., Donini, P., Reeves, J., Cooke, R., & Law, J. (2003). Temporal flux in the morphological and molecular diversity of UK barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 106:550-558.
- Kolodinska-Brantestam, A., Rashal, I., Tuveesson, S., Weibull, J., & von Bothmer, R. (2012). Genetic profiles and diversity of baltic spring barley material. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences*, 66, 10-20.
- Liu, K., & Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21(9), 2128-2129.
- Malysheva-Otto, L., Ganal, M., & Roder, M. (2006). Analysis of molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide survey of cultivated barley germplasm (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genet*, 7, 6.
- Malysheva-Otto, L., Ganal, M., Law, J., Reeves, J., & Röder, M. (2007). Temporal trends of genetic diversity in European barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.). *Mol. Breed.*, 20:309-322.
- Matus, I., & Hayes, P. (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45(6):1095-1106.
- Morillo, E., & Miño, G. (2011). Marcadores Moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP. *Manual No. 91 INIAP Estación Experimental Santa Catalina*.
- Pallotta, M., Warner, P., Fox, R., Kuchel, H., Jefferies, S., & Langridge, P. (2003). Marker assisted wheat breeding in the southern region of Australia. *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium*, 789-791.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). Gen ALEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. *The Australian National University*.

- Policriti, A., & Sgarro, A. (2014). *Istituto di Genomica Applicata (IGA)*. Obtenido de <http://services.appliedgenomics.org/software/corecollections/>
- Ram, S., Thiruvengadam, V., & Vinod, K. (2007). Genetic diversity among cultivars, landraces and wild relatives of rice as revealed by microsatellite markers. *J. Appl. Genet.*, 48:337-345.
- Russel, J., Ellis, R., Thomas, W., Waugh, R., J., P., & Booth, A. (2000). A retrospective analysis of spring barley germ plasm development from 'foundation genotypes' to current successful cultivars. *Molecular breeding*, 6:553-568.
- Struss, D., & Plieske, J. (1998). The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theor. Appl. Genet.*, 97,308-315.
- Ullrich, S. (2010). *Barley: Production, Improvement and Uses* (Vol. 12). John Wiley & Sons.
- Yahiaoui, S. (2006). La colección nuclear española de cebada: diversidad genética y potencial agronómico. *Tesis Doctoral*. Universidad de Lleida.
- Wang, J., Yang, J., Zhu, J., Jia, Q., & Tao, Y. (2010). Assessment of genetic diversity by simple sequence repeat markers among forty elite varieties in the germplasm for malting barley. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*.
- Wouw, M. v., Hintum, T. v., Kik, C., Treuren, R. v., & Visser, B. (2010). Genetic diversity trends in twentieth century crop cultivars: A meta analysis. *TAG*
- Theoretical and Applied Genetics*, 120(6),1241-1252.