

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**MARCADORES MOLECULARES EN EL ESTUDIO E
IDENTIFICACIÓN DE ALELOS REPRODUCIBLES EN
DIFERENTES VARIEDADES DE QUINUA**

TESIS

PRESENTADO POR:

Br. YESENIA CCAMAPAZA ALMANZA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



MARCADORES MOLECULARES EN EL ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE
ALELOS REPRODUCIBLES EN DIFERENTES VARIEDADES DE QUINUA

TESIS PRESENTADA POR:
Br. YESENIA CCAMAPAZA ALMANZA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

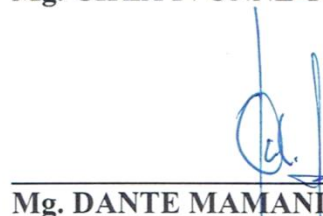
PRESIDENTE:


M.Sc. GILMAR GAMALIEL GOYZUETA CAMACHO

PRIMER MIEMBRO:


Mg. CIRIA IVONNE TRIGOS RONDÓN

SEGUNDO MIEMBRO:


Mg. DANTE MAMANI SAIRITUPAC

DIRECTORA DE TESIS:


Dra. MARÍA TRINIDAD ROMERO TORRES

ÁREA: Ciencias Biomédicas
LÍNEA: Diagnóstico y Epidemiología
TEMA: Biología Molecular

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 05 DE DICIEMBRE DEL 2017

DEDICATORIA

... a Dios supremo, que me permite día a día bregar por mis metas y por estar conmigo en cada paso que doy.

...a quien más quiero: mi madre, por su inmensurable amor y constante exigencia.

... a mis hermanos, a los que no les digo a menudo que los quiero pero son la razón de que este hoy aquí.

... a mis sobrinos, quienes se roban mi atención y son la inspiración para seguir adelante.

... a mi novio Jhojan, quien con amor supo ser mi esfuerzo y tesón en momentos de decline y cansancio.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, a la Facultad de Ciencias Biológicas y a cada uno de mis docentes quienes fueron parte y ejemplo en mi formación profesional.

A la Dra. María Trinidad Romero Torres, por la oportunidad que me dio de empezar mi ruta como investigadora, por su apoyo y consejos durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Raúl Blas y su equipo técnico por abrirme las puertas del Instituto de Biotecnología de la UNALM, y por guiarme en el desarrollo del proyecto.

A los que fueron participes en algún momento del desarrollo de mi tesis, por sus sabios consejos basados en su larga experiencia y su apoyo incondicional, Sr. Braulio, sr. Francisco, Lic. Noely, Ing. Joel, Ing. Inés.

A los distinguidos miembros del jurado por la inmensa paciencia que me tuvieron y por el apoyo en las correcciones de mi trabajo de investigación.

A mis amigos de la universidad, a quienes no menciono individualmente por el temor de olvidarme de alguno, quiero agradecerles por brindarme su amistad, de hecho hay recuerdos que quedaran marcadas en nuestra vida.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	11
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	13
	2.1. Antecedentes.....	13
	2.2. Marco Teórico	15
	2.2.1. Quinoa	15
	2.2.2. Recursos filogenéticos.....	24
	2.2.3. Marcadores Moleculares	26
	2.3.MARCO CONCEPTUAL	31
	Accesión:	31
	Alelo:	31
	Banco de germoplasma	31
	Marcadores moleculares.....	31
	Microsatélite.....	31
	Polimorfismo.....	31
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
	3.1. Área De Estudio.....	32
	3.2. Tipo De Estudio	33
	3.3. Población Y Muestra	33
	3.4. Metodología.....	33
	3.4.1. Diseño de muestreo o experimento	33
	3.4.2. De laboratorio.....	36
	3.4.3. Método estadístico.....	44
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
V.	CONCLUSIONES.....	55
VI.	RECOMENDACIONES.....	56
VII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	57
	ANEXOS	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Requerimiento de humedad y temperatura, según los grupos agroecológicos de quinua	19
Tabla 2. Protocolo para PCR inserto en el kit.....	39
Tabla 3. Descripción de marcadores moleculares. Puno, noviembre del 2017	47
Tabla 4. Análisis de los primers utilizados en la genotipificación de dos variedades de quinua	49
Tabla 5. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para marcadores moleculares utilizados en la genotipificación de dos variedades de quinua.....	49
Tabla 6. Datos pasaporte de las accesiones. Puno, mayo del 2016	64
Tabla 7. Datos del resultado de cantidad y calidad del ADN. UNALM, diciembre del 2016	65
Tabla 8. Catálogo de primers citados por Mason et al, 2005.....	66
Tabla 9. Condiciones de amplificación para PCR. UNALM, abril-agosto del 2017	67

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Crecimiento de <i>Chenopodium petiolare</i>	23
FIGURA 2	Características del color de grano de la variedad Witulla.....	24
FIGURA 3	Marcadores moleculares SSR	29
FIGURA 4.	Foto satelital del CIP Camacani-UNA Puno.	32
FIGURA 5.	Siembra de las semillas de quinua en diferentes macetas. CIP Camacani, Mayo del 2016	33
FIGURA 6.	Maceta codificada con el nombre y fecha de siembra. CIP Camacani, Mayo del 2016	34
FIGURA 7.	Hojas verdaderas que se observan en el cultivo de quinua antes de la recolección de muestras, CIP Camacani, setiembre del 2016	35
FIGURA 8.	Recolección de hojas jóvenes para la posterior extracción del ADN. CIP Camacani, setiembre del 2016.....	35
FIGURA 9.	Extracción del ADN en mortero con nitrógeno líquido. Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016	36
FIGURA 10.	Eppendorf con ADN purificado, resultado de la extracción de las 2 variedades de quinua. Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016	37
FIGURA 11.	Electroforesis en gel de agarosa. Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016	37
FIGURA 12.	Espectrofotómetro usado para cuantificación del ADN. UNALM, diciembre del 2016.....	38
FIGURA 13.	Termociclador usado para la amplificación del ADN. UNALM, abril- agosto del 2017.	40
FIGURA 14.	Corrida electroforética en gel de poliacrilamida. UNALM, abril- agosto del 2017.	41
FIGURA 15.	Gel de poliacrilamida en fijación 1. UNALM, abril- agosto del 2017.	42
FIGURA 16.	Resultado de screening en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata. UNALM, abril- agosto del 2017.....	42
FIGURA 17.	Score de datos tomados del revelado de vidrio. UNALM, abril- agosto del 2017.....	43

FIGURA 18. Fotografía del Revelado de muestras en gel de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio, carriles del 5 al 11, son las muestras de ADN y el carril inicial es el marcador de peso molecular. Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016.....	45
FIGURA 19. Fotografía de la amplificación y revelado del screening con diferentes temperaturas. UNALM, abril- agosto del 2017.	46
FIGURA 20. Análisis de conglomerados de dos variedades de quinua, según marcadores moleculares utilizados en su genotipificación.....	51
FIGURA 21. Variabilidad genética de dos variedades de quinua según marcadores moleculares utilizados en su genotipificación.....	52
FIGURA 22. Red de mínimo recorrido (filogenia) de muestras de dos variedades de quinua según marcadores moleculares utilizados en su genotipificación.	53

RESUMEN

Un requisito básico para los programas de mejoramiento genético y la conservación de bancos de germoplasma basada en la selección asistida por marcadores moleculares es contar con un adecuado número de marcadores polimórficos, por ello esta investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Nacional del Altiplano y la Universidad Nacional Agraria la Molina de abril del 2016 a noviembre del 2017, con el objetivo de identificar los marcadores moleculares altamente informativos en la genotipificación de dos variedades de quinua donde la totalidad de muestras evaluadas fueron 19 entre witulla y *Chenopodium petiolare*, después de la recolección de semillas y la germinación en invernadero se colectó hojas jóvenes para realizar la extracción del ADN, se hizo la cuantificación para luego realizar el método de PCR y electroforesis; para el análisis estadístico se usó el AMOVA a través del programa Infogen versión 2016, los resultados fueron: la identificación de nueve *primer`s*, de los cuales el que más bandas amplificó fue QCA015 con un 29.32%, el porcentaje de marcadores polimórficos fue 81.25%, los valores de contenido de información polimórfica (PIC) más representativos fueron obtenidos con los primers QCA012, QCA029, QCA053, QCA067 ($H= 0.32; 0.37; 0.33; 0.37$ respectivamente), los cuales serían altamente polimórficos. El tamaño de alelos se encuentra en el rango de 142 y 240 pb, la variación en el tamaño de alelos en un solo locus está en el rango de 2 a 28 pb, el locus que representó la mayor variabilidad fue el QCA015 con 7 diferentes tamaños de alelos. Lo que concluye que los marcadores moleculares son altamente informativos en la genotipificación de estas dos variedades de quinua.

Palabras Clave: Marcadores moleculares, polimorfismo, quinua, variedad.

ABSTRACT

A basic requirement for genetic improvement programs and the conservation of germplasm banks based on molecular marker-assisted selection is to have an adequate number of polymorphic markers, which is why the present research has been proposed, this work was carried out in the laboratories of the National University of the Altiplano and the National Agrarian University of La Molina in Perú from April 2016 to November 2017. The main objective was to identify highly informative molecular markers in the genotyping of two varieties of quinoa, where all the total samples evaluated were 19 between witulla and *Chenopodium petiolare*, After the seed collection and germination in a greenhouse, young leaves were collected to perform DNA extraction, after they were quantified and then the PCR and electrophoresis technique was applied over each sample; For the statistical analysis the Molecular Analysis of Variance was used through the program Infogen version 2016, the results were: the identification of nine primers of which the one that more bands amplified was QCA015 with 29.32%, the percentage of polymorphic markers was 81.25 %, the most representative polymorphic information content (PIC) values were obtained with the primers QCA012, QCA029, QCA053, QCA067 ($H = 0.32, 0.37, 0.33, 0.37$ respectively), which would be highly polymorphic. The size of alleles is in the range of 142 and 240 bp, the variation in the size of alleles in a single locus is in the range of 2 to 28 bp, the locus that represented the greatest variability was QCA015 with 7 different sizes of alleles. This concludes that molecular markers are highly informative in the genotyping of these two varieties of quinoa.

Keywords: Molecular markers, polymorphism, quinoa, variety.

I. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd*) es un grano de interés global domesticado hace miles de años (Gómez, 2003) y considerado un cultivo de mucha importancia alimenticia para el hombre por su alto valor nutricional, es decir un alto nivel de proteínas de buena calidad que podrían fácilmente remplazar a las proteínas de origen animal (Chauhan *et al.*, 1992), además de ciertas propiedades medicinales, es también de interés agronómico debido a que son cultivadas en zonas geográficas que van desde el nivel del mar hasta los más de 4000 m.s.n.m. Su resistencia a las heladas, la sequía y a la salinidad hacen de ella un cultivo tolerante a las variaciones inadvertidas del clima, por estas características en 1996 la quinua fue catalogada por la FAO como uno de los cultivos promisorios de la humanidad, no solo por sus propiedades nutraceuticas y por sus múltiples usos, sino también por ser considerada como una alternativa para solucionar los graves problemas de nutrición humana.

El cambio de los hábitos alimenticios y la preferencia por alimentos nutritivos y orgánicos a nivel global promovieron el reconocimiento y la revaloración de la quinua, dando lugar al incremento de su producción (Gomez, 2003). Por ello en los últimos años el incremento de la demanda del mercado ha ocasionado que los agricultores dediquen su interés en este grano debido al incremento del comercio internacional. Siendo la especie de mayor importancia desde el punto de vista económico.

Por nuestra diversidad geográfica y climática, en el Perú existe una gran variabilidad genética, la cual contribuye a la estabilidad de la producción agrícola, Sin embargo, conservar los recursos filogenéticos es conservar una fuente de genes de la especie como resultados de los procesos evolutivos a lo largo del tiempo. La conservación y el uso sostenible de los recursos filogenéticos requiere la identificación de sus accesiones (Martin, 2001), y a pesar que alberga una gran información de variabilidad se desconoce mucha más información, lo que limita su utilización en el mejoramiento genético. Los marcadores moleculares son un camino que permite realizar evaluaciones de diversidad genética y análisis de filogenia, como vía para aumentar la eficiencia del mejoramiento. En consideración a lo indicado se planteó usar marcadores moleculares con el fin de hallar alelos reproducibles que permitan diferenciar las variedades de quinua silvestre y nativa. Por ello, se planteó los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los marcadores moleculares, en el estudio e identificación de alelos reproducibles en diferentes variedades de quinua.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar los marcadores moleculares altamente informativos en la genotipificación de la variedad *Witulla* y un pariente silvestre *Chenopodium petiolare*.
- ✓ Determinar la variabilidad del tamaño de alelos reproducibles obtenidos de la variedad *Witulla* y un pariente silvestre *Chenopodium petiolare* con el uso de marcadores moleculares.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES

La fuente de variación genética de las plantas se encuentra en el conjunto de genes que ellas poseen y el espectro de esta variabilidad dentro de especies cultivadas y sus silvestres relacionadas son mantenidos en bancos de germoplasma, la importancia del mantenimiento de estos recursos está en la medición y caracterización de dicha diversidad (Bretting y Widrelechner, 1995), también mencionan que para el agrupamiento basado en marcadores genéticos se han empleado diferentes tipos de marcadores, la descripción fenotípica y adicionalmente se considera datos sobre susceptibilidad a factores de estrés, patógenos y enfermedades, estos marcadores agro morfológicos pueden ser definidos como atributos de las plantas fácilmente cuantificables e identificables, los cuales pueden o no ser altamente heredables y estar controlados por uno o pocos genes, lo que permite una discriminación rápida de fenotipos (Lowe *et al.* 1996). Posteriormente refieren que el primer banco de germoplasma caracterizado en Perú fue liderado por la Universidad Nacional del Altiplano, la cual reportó una colección de 1.029 accesiones de quinuas las que a partir de ellas se definió la colección núcleo de 103 accesiones sin considerar la presencia de especies silvestres (Fuentes *et al.*, 2009).

Por otro lado estudiaron la colección de germoplasma de quinua del departamento de agricultura de los EEUU (USDA) y el Centro Internacional de la Papa (CIP-FAO) que incluye 143 accesiones que fueron caracterizadas posteriormente con 36 marcadores SSR, detectando 420 alelos entre todas las accesiones con un promedio de 11 alelos por locus (Christensen *et al.* 2007), estos marcadores también fueron utilizados por (Fuentes *et al.* 2008) quienes caracterizaron accesiones de quinua chilena utilizando SSR con fluorescencia en reacciones de PCR multiplex, obteniendo información genética para 20 *loci* que resultaron altamente polimórficos, 150 alelos en total con un promedio de 7,5 alelos por locus (Maughan *et al.* 2004). También evaluaron la amplificación de los SSR desarrollados en germoplasma de *C. quinoa* y se incluyeron a su vez otras especies relacionadas de *Chenopodium*. El 67 % de los SSR evaluados amplificaron en todas las especies propuestos por (Tapia, 1982), el análisis de conglomerados permitió distinguir entre quinuas de nivel del mar y andinas

La colección boliviana de quinua está conformada por más de 3000 accesiones, las cuales fueron seleccionadas para caracterizarlas molecularmente utilizando ocho marcadores, habiendo encontrado 129 alelos, con un rango de 5 a 30 alelos por locus y tamaño que va de 111 a 239 pb, sus resultados mostraron una diversidad genética en general elevada para todas las regiones mencionadas, la información generada permitió la conformación de una colección núcleo con 189 accesiones (Doyle *et al.* 1990); por otra parte las relaciones genéticas existentes en una población de *C. quinua* del sur de Chile y parientes silvestres del género *Chenopodium*, provenientes del mismo cultivo y diversas zonas del norte de Chile realizaron el análisis a nivel de ADN con 20 marcadores de SSR y el espaciador intergénico del cloroplasto *psbA-trnH*, los resultados obtenidos coincidieron que la menor distancia media se encontró entre *C. quinoa* y *C. hircinum* con un valor de 0,025. Lo anterior avala la hipótesis propuesta por (Jacobsen y Mujica, 2002) y (Fuentes *et al.* 2009) que *C. hircinum* es un potencial ancestro de la quinua y que las quinuas bajo condiciones de cultivo en el sur de Chile presentan un constante intercambio de información genética intra y/o inter específica (Espinoza, 2009).

También mostraron el desarrollo de 216 nuevos marcadores polimórficos SSR con valores de heterocigosidad (H) que oscila desde 0,12 hasta 0,90 con un valor medio de 0,57. Se construyó el primer mapa de ligamiento a base de SSR en quinua y contiene 275 marcadores incluyendo 200 SSR, el mapa consta de 38 grupos de ligamiento (LGS) que cubren 913 cm (J. Genet *et al.* 2008), también afirman que a partir del desarrollo de marcadores microsatélites para quinua se pudieron realizar estudios más detallados de la variabilidad genética, identificaron 208 SSR polimórficos en 31 accesiones de quinua, diseñaron 397 cebadores para loci de SSR los cuales fueron analizados con un panel de accesiones *C. quinoa* y una accesión de *C. berlandieri* de los cuales un 52% fueron polimórficos dentro de las accesiones de *C. quinoa*, sin embargo al incluir *C. berlandieri* en el análisis, un 6% adicional de los cebadores se mostró polimórfico, por otro lado el número de alelos observados fue de 2 a 13 alelos por locus con un total de 818 alelos detectados, mientras que los valores de heterocigocidad se encontraron entre 0.20 a 0.90 donde un 32 % fue altamente polimórfico. Finalmente reportan la cercana relación de *C. quinoa* y *C. berlandieri* debido a que un 99.5% de los cebadores amplificaron productos específicos en *C. berlandieri* (Mason *et al.* 2005).

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1. *Quinoa*

Es una planta rustica que crece a grandes altitudes donde las condiciones ambientales son extremas y los suelos son poco fértiles. Se le denomina también pseudo cereal porque no pertenece a la familia de las gramíneas en las que están clasificadas los cereales tradicionales, sin embargo, es como un cereal debido a su alto contenido de almidón su aprovechamiento y utilización, además de ser la mayor fuente de proteínas (Popenoe *et al.* 1990), los pueblos indígenas y los investigadores lo denominan “el grano de oro de los andes”.

Posición taxonómica

Dominio	: Eucaria
Reyno	: Vegetal
División	: Fanerógamas
Clase	: Dicotiledóneas
Sub clase	: Angiospermas
Orden	: Centrospermales
Familia	: Chenopodiáceas
Género	: <i>Chenopodium</i>
Sección	: Chenopodia
Subsección	: Cellulata
Especie	: <i>Chenopodium quinoa</i> (Giusti, 1970).

Los nombres comunes que la quinua posee son diferentes dependiendo de la zona en la que se encuentran y son las siguientes: kinua, parca, quiuna (quechua) supha, jopa, jupha, jiura, aara, ccallapi, y vocali (aymara); suba, pasca, (chibcha), quingua (mapuche) quinoa, quinua dulce, dacha, dawé (araucana); jupa, jara, jupalukhi, candonga, licsa, quiñoa (Mujica y Jacobsen 2006).

La quinua fue descrita por primera vez en 1778 y considerada como parte de la familia Chenopodiaceae. Sin embargo, de acuerdo al sistema de clasificación APG III (2009),

por sus siglas en inglés Angiosperm Phylogeny Group, se clasificó a las Chenopodiaceae como subfamilia de la familia Amaranthaceae en base a datos moleculares.

Origen de la quinua

Estudios realizados por Maughan *et al.* (2006), sugiere que la quinua proviene de al menos un ancestro común con la especie *C. berlandieri* originaria de Norteamérica. Por otra parte Christensen *et al.* (2007), han reafirmado la hipótesis de que el centro de diversidad de la quinua se encuentra en Perú y Bolivia. Al respecto Lescano, (1994) indica que en los altiplanos de Perú y Bolivia se concentra la mayor superficie de cultivo, además las áreas circundantes al lago Titicaca, albergan la mayor diversidad y variación genética, lo cual es favorable para que se considere como centro de origen de la quinua. Esta situación fue evidenciada por Gandarillas, (1968). En cuanto al origen de las especies domesticadas, Toro (1964) estudiando quinuas del altiplano de Puno y Cusco, relaciona la actividad del cultivo y el origen de la domesticación de la quinua, con el actual uso de las voces quechua “kuina” y en aimará “jupha” y “jiura”, y las ve como prueba de que las poblaciones de la raza aimará y quechua fueron las primitivas domesticadoras de esta planta.

Tapia *et al.* (1980), reconoce 5 categorías básicas de quinua:

- Quinuas de valle: crecen en los valles entre los 2000 y 3000 m.s.n.m. son de gran tamaño y tienen un largo periodo de crecimiento.
- Quinuas de altiplano: crecen alrededor del lago Titicaca. Son resistentes a las heladas, de poca altura, tienen un corto periodo de crecimiento.
- Quinua de terrenos salinos: crecen en las llanuras del altiplano boliviano. Soportan terrenos salinos y alcalinos, tienen semillas amargas.
- Quinuas del nivel del mar: encontradas en el sur de Chile, generalmente sin ramas.
- Quinuas sub tropicales: encontrada en los valles interandinos de Bolivia, la planta tiene una coloración verde oscuro tornándose a naranja en la madurez.

En la actualidad la quinua se cultiva desde Venezuela, Colombia hasta Chile, incluyendo la parte andina que corresponde a la parte Argentina (Mujica *et al.*, 2013). La quinua fue uno de los principales cultivos y alimentos de las sociedades andinas (Tapia *et al.*, 1979).

Aproximadamente 7000 años de cultivo (Jacobsen, 2003), han sido participes de su domesticación y conservación, culturas como Tiahuanacota e incaica (Bonifacio *et al.*, 2001) fueron parte de esto que permitió el incremento del tamaño de la planta y semilla entre otras modificaciones morfológicas. En tanto que su origen genético es el cruce de dos diferentes especies diploides (con $2n = 18$ cromosomas), por lo que es una planta tetraploide con $2n = 4x = 36$ cromosomas. En la actualidad se encuentra en un proceso de expansión porque representa un gran potencial para mejorar las condiciones de vida de la población de los andes y del mundo moderno.

Importancia de la quinua

La quinua es un grano alimenticio que se cultiva ampliamente en la región andina, es considerada como un cultivo estratégico para la población especialmente autóctona, no solo porque satisface las necesidades de alimentación básica sino también por considerarse un producto que genera ingresos económicos para los pobladores que la cultivan (Saravia y Aroni, 2000), pues si bien hasta hace unas décadas la quinua únicamente era utilizada por los indígenas nativos hoy en día se está convirtiendo en un cereal demandado por muchos países que valoran sus grandes propiedades nutritivas, debido a la importancia de este cultivo, la última década también incrementó el interés entre los agricultores, empresas e instituciones (Mujica y Jacobsen, 2016).

En efecto, la quinua es uno de los alimentos consumidos casi diariamente por los pobladores andinos en forma de quispiño, pesque, quinua graneada, sopa y otros, ignorando en algunos casos el alto valor nutritivo de este grano reconocido y comprobado por muchos investigadores como Lescano (1994), quien indica que el grano de quinua contiene de 10.85 a 19.25% de proteína, con un equilibrado contenido de aminoácidos, haciendo de este alimento uno de los más importantes para la nutrición de los pobladores de esta región, Risi, (1991) señala que el balance de los aminoácidos esenciales de la proteína de la quinua es superior al trigo, la cebada y soya, comparándose favorablemente con la proteína de la leche.

Desde hace algunos años, las cualidades nutritivas de la quinua están siendo apreciadas en los países desarrollados, situación que convirtió a este cultivo en un producto de exportación (Bonifacio, 1995). Latinreco, una empresa financiada por Nestlé, publico en

1990 el libro “quinua, hacia su cultivo comercial” que marco una nueva visión del potencial de quinua como un cultivo de carácter empresarial (Wahli, 1990), así mismo la quinua tiene importancia desde el punto de vista del mejoramiento, por cuanto existe variabilidad genética aprovechable en diferentes condiciones ecológicas debido a su amplia distribución geográfica. Toda esa diversidad muestra las posibilidades del cultivo para hacer frente a condiciones medio ambientales adversas, características que pueden ser utilizadas en trabajos de fitomejoramiento (Gandarillas, 1995).

Diversidad genética del cultivo de quinua

Inicialmente, el centro de diversidad genética de la quinua fue identificada en el altiplano del sur de Bolivia (Gandarillas, 1979) posteriormente Christensen *et al.* (2007) utilizando marcadores SSR sugirió que el centro de la diversidad genética fue la zona del altiplano entre Perú y Bolivia. La mayor diversidad de la quinua andina se ha asociado con cinco ecotipos a estos se asumen comúnmente como descendientes de un conjunto génico central de las variedades locales domesticadas en las cuencas del lago Titicaca (Risi y Galwey, 1984).

Condiciones agro climáticas de cultivo

o Temperatura y humedad

La quinua se adapta a diferentes climas desde aquellos calurosos y secos como el clima de la costa desértica a aquellos templados lluviosos o secos de los valles interandinos y aquellos fríos y lluviosos o secos de la sierra alta y el altiplano, sin embargo se ha observado que con temperaturas medias de 10°C se desarrolla perfectamente el cultivo, así mismo ocurre con temperaturas medias y altas de hasta 25°C, pudiendo soportar hasta menos de 8°C, respecto a las temperaturas extremas altas, se ha observado que temperaturas por encima de los 38°C produce aborto de flores y muerte de estigmas y estambres (Mujica *et al.*, 2013). La quinua entonces es un cultivo con diferentes requerimientos de humedad y temperatura, de acuerdo al grupo ecológico al que pertenecen, esta información fue estructurada en base a trabajos de investigación efectuados en Perú y Bolivia (Tapia, 1997).

Tabla 1. Requerimiento de humedad y temperatura, según los grupos agroecológicos de quinua

Grupo Agroecológico	Precipitación (mm)	Temperatura mínima (°C)
Valle	700-1500	3
Altiplano	400-800	0
Salares	250-400	-1
Nivel del mar	800-1500	5
Yungas	1000-2000	7

Fuente: Tapia, 1997

La quinua se desarrolla normalmente entre los 3000 y 4000 msnm, estas condiciones de altiplano el factor más importante que limita al cultivo, es la baja temperatura (helada). Es así que los periodos críticos de sensibilidad al déficit térmico se presentan principalmente, al inicio del crecimiento y durante la fase de floración. La fase de cinco hojas alternas puede resistir fácilmente hasta -10°C ; mientras que heladas de -4° a -6°C , son dañinas para la etapa de floración y estado lechoso del grano (Espindola, 1995) y de acuerdo a Tapia (1997), la quinua se puede considerar como un cultivo de tipo “conformista”, es decir, que se adapta a niveles de estrés hídrico que le permite resistir la sequía, principalmente por precocidad. También muestra tolerancia a la sequía por plasticidad, bajo potencial osmótico y elasticidad tisular, y puede evitarla con una raíz profunda y densa, una reducción del área foliar, papilas higroscópicas con cristales y de oxalato de calcio y su comportamiento estomatal (Jacobsen et al, 1997).

o *Suelo*

Son deseables los de textura franca, con alto contenido de materia orgánica, con una profundidad de 60 a 90 cm y con un buen drenaje (Gómez, 2016). El pH del suelo debe ser neutro o ligeramente alcalino para el óptimo desarrollo de la quinua, aunque algunas variedades procedentes de los salares en Bolivia, pueden soportar hasta pH igual a 8 (Tapia, 1997). A menudo se ha indicado que la quinua es un cultivo rustico y que se produce en suelos pobres, pero prefiere suelos de textura franco arenosos, semi profundos, con buen contenido de materia orgánica y sobre todo que no se anieguen (Barco, 1995).

Descripción botánica

○ *Quinoa*

Es una planta herbácea anual, de amplia dispersión geográfica, presenta características muy peculiares en cuanto a su morfología, coloración y comportamiento en diferentes zonas agroecológicas donde se la cultiva, presenta enorme variación y plasticidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, se cultiva desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm, desde zonas áridas, hasta zonas húmedas y tropicales, desde zonas frías hasta templadas y cálidas; muy tolerante a los factores abióticos adversos como son sequía, helada, salinidad de suelos y otros que afectan a las plantas cultivadas (Mujica, 1988).

○ *Planta*

La planta, es erguida, alcanza alturas variables desde 30 a 300 cm, dependiendo del tipo de quinoa, de los genotipos, de las condiciones ambientales donde se desarrolla, de la fertilidad de los suelos; las de valle tienen mayor altura que las que crecen por encima de los 4000 msnm y de zonas frías, en zonas abrigadas y fértiles las plantas alcanzan las mayores alturas, su coloración varía con los genotipos y fases fenológicas (Mujica *et al.* 2013).

○ *Raíz*

Es de tipo pivotante, vigorosa, consta de una raíz principal de la cual salen un gran número de raíces laterales y muy ramificadas, la longitud de las raíces varía de 0.8 a 1.5 m (Gómez y Aguilar, 2016), se diferencia fácilmente la raíz principal de las secundarias que son en gran número, a pesar de que pareciera ser una gran cabellera, esta se origina del periciclo, variando el color con el tipo de suelo donde crece, al germinar lo primero que se alarga es la radícula, que continúa creciendo y da lugar a la raíz, alcanzando en casos de sequía hasta 1.80 cm de profundidad, y teniendo también alargamiento lateral, sus raicillas o pelos absorbentes nacen a distintas alturas y en algunos casos son tenues y muy delgadas, muy excepcionalmente se observa vuelco por efecto de vientos, exceso de humedad y mayormente es por el peso de la panoja, la profundidad de la raíz guarda estrecha relación con la altura de la planta (Mujica, 1993).

- *Tallo*

El tallo es cilíndrico en el cuello de la planta y anguloso a partir de las ramificaciones, puesto que las hojas son alternas dando una configuración excepcional, el grosor del tallo también es variable siendo mayor en la base que en el ápice, dependiendo de los genotipos y zonas donde se desarrolla, la coloración del tallo es variable, desde el verde al rojo, muchas veces presenta estrías y también axilas pigmentadas de color rojo, o púrpura (Mujica, 1993).

- *Hojas*

En muchas zonas del área andina se utilizan las hojas tiernas previas a la floración como alimento, por su alto valor nutritivo encontrando alto contenido de proteínas y vitaminas. (Cornejo, 1976) Las hojas son alternas y están formadas por peciolo y lámina, son de colores rojo, púrpura o cristalino, es variable dependiendo de los genotipos y están constituidos por betalainas, betaxantinas (Gallardo *et al.* 1996).

- *Inflorescencia*

Las panojas pueden medir de 15 a 70 cm y rendir individualmente hasta 220 gr (Tapia, 1997). La longitud de la panoja puede variar dependiendo de los genotipos, tipo de quinua, lugar donde se desarrolla y condiciones de fertilidad de los suelos, alcanzando de 30 a 80 cm de longitud por 5 a 30 cm de diámetro, el número de glomérulos por panoja varía de 80 a 120 y el número de semillas por panoja de 100 a 3000, encontrando panojas grandes que rinden hasta 500 gramos de semilla por inflorescencia (Mujica, 2001).

- *Flores*

Las flores presentan, por lo general un perigonio sepaloide, rodeado de cristales de oxalato de calcio, con cinco sépalos, de color verde, un androceo con cinco estambres cortos, curvos de color amarillo y filamentos cortos, y un gineceo con estigma central, ovario elipsoidal, súpero, unilocular (Tapia, 1979), las flores son pequeñas, incompletas, sésiles y desprovistas de pétalos, (Mujica, 1993) pudiendo ser hermafroditas, pistiladas (femeninas) y androestériles, lo que indica que podría tener hábito autógeno como alógamo, faltando determinar con precisión el porcentaje de alogamia en algunos genotipos, en general se indica que tiene 10 % de polinización cruzada (Rea *et al.*, 1979).

- *Fruto*

Es un aquenio, que se deriva de un ovario supero unilocular y de simetría dorsiventral, tiene forma cilíndrico lenticular, levemente ensanchado hacia el centro, en la zona ventral del aquenio se observa una cicatriz que es la inserción del fruto en el receptáculo floral, está constituido por el perigonio que envuelve a la semilla por completo y contiene una sola semilla, de coloración variable, con un diámetro de 1.5 a 4 mm, la cual se desprende con facilidad a la madurez y en algunos casos puede permanecer adherido al grano incluso después de la trilla dificultando la selección, el contenido de humedad del fruto a la cosecha es de 14.5% (Gallardo *et al.* 1997). El fruto es seco e indehiscente en la mayoría de los genotipos cultivados, dejando caer las semillas a la madurez en los silvestres y en algunas accesiones del banco de germoplasma (Mujica, 2001).

- *Semilla*

Constituye el fruto maduro sin el perigónio, es de forma lenticular, elipsoidal, cónica o esferoidal, presenta tres partes bien definidas que son: Episperma, embrión y perisperma. La episperma, está constituida por cuatro capas: una externa de superficie rugosa, quebradiza, la cual se desprende fácilmente al frotarla, en ella se ubica la saponina que le da el sabor amargo al grano y cuya adherencia a la semilla es variable con los genotipos, tiene células de forma alargada con paredes rectas; la segunda capa es muy delgada y lisa, se observa sólo cuando la capa externa es translúcida; la tercera capa es de coloración amarillenta, delgada y opaca y la cuarta capa, translúcida, está constituida por un solo estrato de células (Villacorta y Talavera, 1976); la quinua también posee endosperma el cual es de tipo celular, formado por varias capas rodeando completamente al embrión y separado de él por una capa de aire y que probablemente, después que la semilla se hidrata, las células del endosperma se ponen en contacto con el embrión que lo consume rápidamente durante su crecimiento (Gallardo *et al.* 1997).

El embrión está formado por dos cotiledones y la radícula que constituye el 30% del volumen total de la semilla el cual envuelve al perisperma como un anillo, con una curvatura de 320 grados, es de color amarillento mide 3.54 mm de longitud y 0.36 mm de ancho (Carrillo, 1992) en algunos casos alcanza una longitud de 8.2 mm de longitud y ocupa el 34 % de toda la semilla y con cierta frecuencia se encuentran tres cotiledones (Gallardo *et al.*, 1997), en forma excepcional a otras semillas, se encuentra en ellas la

mayor cantidad de proteína que alcanza del 35-40% , mientras que en el perisperma solo se encuentra el 6.3 al 8.3 % de la proteína total del grano (Ayala, 1977); la radícula, muestra una pigmentación de color castaño oscuro.

Variedades de importancia

✓ *Witulla*: Cultivo generalizado de zonas frías y altas, es una planta pequeña de 70 cm de altura, la panoja es mediana y amarantiforme, glomerulada e intermedia como muestra la Figura 1, sus colores van de rojo a morado con una amplia variación de tonos. Posee un grano mediano de 1.5 a 1.8 mm de color rojo a morado con alto contenido de saponina que rinde de 1800 kg/ha, es muy resistente al frío, sequía y salinidad así como a suelos relativamente pobres, es resistente al ataque de Q'hona – q'hona y al mildiu, en casos de adversidades abióticas inmediatamente deja caer sus hojas inferiores con facilidad, tiene una raíz muy ramificada y profunda y presenta movimientos nictinásticos muy pronunciados sobre todo como defensa a la sequía y frío. Su periodo vegetativo es largo con más de 180 días (Mujica *et al*, 2013).

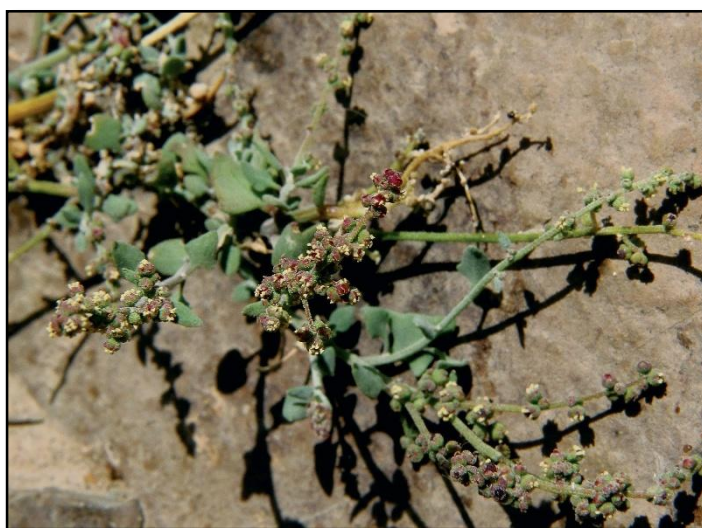


FIGURA 1 Crecimiento de Chenopodium petiolare

Fuente: Pinto, Raquel 2007

✓ *Chenopodium petiolare kunth*: Es una especie diploide con $2n = 2x = 18$ cromosomas, caracterizada por su crecimiento erecto, poco ramificado y panoja laxa, teniendo ubicación de los glomérulos muy distanciados dentro de la inflorescencia. Esta especie está presente al interior de los campos cultivados de quinua y posiblemente acompañe a los lugares de distribución de la quinua (Mujica *et al*, 2001). Fue observada

desde 3.830 hasta 3.900 msnm, mostrando gran variación fenotípica y confundiendo con la quinua cultivada, no solo por su apariencia y color de planta, sino también por su forma muy erecta y con pocas ramificaciones. Presenta en la madurez gran dehiscencia de las semillas, las mismas que aun permaneces envueltas en su perigonio, mostrando semillas de color negro y de tamaño muy pequeño con alta concentración en saponina. Se utiliza la planta tierna en la alimentación del ganado y sus hojas tiernas como verdura de hoja en la alimentación humana. Los granos se usan en la alimentación para elaborar el quispiño (panecillo de color oscuro elaborado de dicha harina) y también tiene uso medicinal, principalmente para fracturas de huesos (Mujica *et al*, 2013).



FIGURA 2. Características del color de grano de la variedad Witulla

Fuente: CONASI, 2017

2.2.2 Recursos filogenéticos

Según Vilela Morales y Candeira (1996), recurso filogenético es aquel material formado por conjuntos de muestras poblacionales de plantas, obtenidas con el fin de disponer caracteres útiles y con valor actual o potencial. Hawkes (1971); Jaramillo y Baena (2000) Los recursos filogenéticos disponibles en la naturaleza abarcan un amplio espectro taxonómico que incluye desde especies silvestres y formas regresivas (malezas) hasta especies cultivadas, viejas, variedades, variedades mejoradas incluyendo a productos de biotecnología e ingeniería genética. Los recursos filogenéticos permiten también desarrollar cultivos productivos, resistentes y de calidad. Ayudan a las naciones a incrementar la productividad y sostenibilidad de su agricultura e incluso a desarrollarse.

Sin embargo, a pesar de contribuir al sustento de la población y al alivio de la pobreza, son vulnerables; se pueden heredar y hasta desaparecer, poniendo en peligro la continuidad de nuestra especie. Paradójicamente, tanto el aprovechamiento como la pérdida de estos recursos dependen de la intervención humana (Jaramillo y Baena, 2000).

Variabilidad genética

Una evaluación precisa de la magnitud y el patrón de organización de la diversidad genética de los individuos, grupo de individuos o poblaciones conservadas, es fundamental para entender la estructura genética e identificar de manera confiable cada genotipo facilitando el conocimiento de la variabilidad de los cultivares (Smith, 1984). Es así que la quinua muestra mayor distribución de formas, diversidad de genotipos y de progenitores silvestres, en los alrededores del lago Titicaca de Perú y Bolivia. Desde el punto de vista de su variabilidad genética, ese tipo de quinua puede considerarse como una especie oligocéntrica, con centros de origen de amplia distribución y diversificación múltiple, de fácil ubicación en la región andina y dentro de ellas las orillas del lago Titicaca las que muestran mayor diversidad y variación genética (Mujica *et al*, 2001).

Conservación de los recursos filogenéticos

Se entiende por recursos genéticos a la variabilidad genética almacenada en los cromosomas y en otras estructuras que contienen ácido desoxirribonucleico y que codifican el desarrollo de cadenas de polipéptidos (proteínas) (Querol, 1988). La conservación de los recursos filogenéticos está relacionada con la captura y mantenimiento de la variabilidad genética existente en las plantas, con el objetivo de ser utilizada para los procesos tradicionales y avanzados del mejoramiento genético (Vilela Morales y Candeira, 1996).

Por otro lado, la importancia de conservar los recursos filogenéticos radica en que, sin estos no se pueden crear nuevas combinaciones genéticas (cultivares, variedades) de los cultivos que requiere constantemente la agricultura moderna. Sin nuevas variedades de plantas cultivadas, la agricultura perdería la capacidad de enfrentar los cambios ambientales, de satisfacer nuevas demandas de los consumidores y proveer alimentos en cantidad y calidad suficientes para atender las crecientes necesidades de la población (Contreras, 1994).

Germoplasma

Existen dos formas de conservación, una sugiere tratar de conservar las especies y su variabilidad en el hábitat natural de ellas sin perturbar su dinámica evolutiva, llamada conservación “in situ”, por el contrario cuando se conserva la variabilidad de las especies fuera de su hábitat natural se denomina conservación “ex situ” (Hidalgo, 1991). O también denominado germoplasma que constituye el elemento de los recursos filogenéticos que incluye la variabilidad genética intra e inter específica, con fines de utilización en la investigación en general y especialmente en el mejoramiento genético (Goeder et al, 1997). Constituye la base física de la herencia y se transmite de una generación para otra a través de células reproductivas. También se utiliza el término germoplasma vegetal para designar cultivos, plantas, semillas y otras partes de las plantas consideradas útiles para el mejoramiento, investigación y conservación, siempre con el propósito de estudiar, manejar y utilizar la información genética que poseen (Rojas, 1995).

Esto último es corroborado por Jaramillo y Baena (2000) al indicar que los recursos filogenéticos se pueden conservar en sus hábitats naturales (in situ), en condiciones diferentes a las de su hábitat natural (ex situ), o combinando los métodos in situ y ex situ, es decir, de manera complementaria. La finalidad de los bancos de germoplasma es conservar la semilla y ponerla a disposición de los usuarios para que sea utilizada directamente, o para que sirva como material básico en la generación de variedades superiores (Sevilla y hollé, 2004).

2.2.3. Marcadores Moleculares

Son segmentos de ADN que se consideran marcas o puntos de referencia para el análisis del genoma que representan cualquier característica química o molecular medible, que es heredada según un modelo mendeliano (Phillips, 1998). Actualmente utilizamos los marcadores genéticos para la conservación de germoplasmas, la identificación y clasificación de individuos, los cuales son de dos clases, los morfológicos y los moleculares (Azofeita, 2006).

La definición de la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) por parte de Watson y Crick en los años '50, abrió todo un mundo de nuevas posibilidades

científicas para el conocimiento y mejor aprovechamiento de plantas, animales y microorganismos, contribuyendo en gran parte a lo que se ha dado en llamar, la revolución biotecnológica (Phillips, 1998). Cada molécula de ácido desoxirribonucleico consiste en una doble hélice formada a partir de dos hebras complementarias de nucleótidos, emparejadas mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases G-C y A-T (Alberts *et al.*, 1996).

Ahora es posible conocer el contenido genético del ADN mediante el uso de marcadores moleculares los cuales se han convertido en herramientas para identificar características que están relacionadas con resistencia a enfermedades, producción, calidad, etc. Su uso frecuente en la agricultura ha sido útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de cultivos de importancia económica así también como para la caracterización e identificación de genotipos (Phillips, 1998). A mediados de la década de los 60's los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual como enanismo, deficiencia clorofílica, color de pétalos o morfología foliar. Los marcadores morfológicos contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores moleculares se han utilizado o se pueden utilizar en los siguientes aspectos de la mejora de plantas: estimación de la distancia genética entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos; identificación y distinción de variedades e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el registro de variedades protegidas de cada país; establecimiento de relaciones de parentesco entre líneas de variedades para realizar estudios genéticos; localización e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños que afectan caracteres cuantitativos (Cubero y Moreno, 1983). En el área de los recursos genéticos los marcadores moleculares han provisto de información relevante en áreas claves de la conservación y caracterización de germoplasma (Otero *et al.*, 1997).

Las ventajas de los marcadores moleculares es que son fenotípicamente neutros, pues no son afectados por el medio ambiente, se pueden evaluar un número indeterminado de

ellos, se puede analizar toda la planta o parte de ella, pueden ser evaluados desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo y aparentemente no muestran epistasias (Phillips *et al.*, 1995). De acuerdo con Otero *et al.* (1997), la rápida identificación de la extensión de la variación genética dentro y entre poblaciones usando marcadores moleculares, es de valor para las actividades de conservación genética y para el desarrollo de poblaciones mejoradas.

Existen un sin número de marcadores moleculares. Si bien la tecnología se inició con la utilización de marcadores basados en proteínas a partir de la posibilidad de aislar ADN se implementó la técnica de RFLP (Restriction fragment length polymorphism), sin embargo esta técnica implicaba un mayor nivel técnico y de infraestructura. A partir de la implementación de la técnica de PCR se facilitó el desarrollo y uso de los diversos tipos de marcadores moleculares, otro factor que ayudo a este desarrollo fue la factibilidad de utilizar métodos de tinción no radiactivos para la visualización de los fragmentos (Delgado, 2006). Para esto un marcador molecular debe reunir ciertas características tales como alto grado de polimorfismo, herencia codominante, distribución frecuente y uniforme en todo el genoma, facilidad de estudio, rapidez en los resultados, y costo de desarrollo bajo o proporcional a la cantidad de información reunida. Además, debe poseer un nivel de reproducibilidad adecuada para comparar resultados entre distintos laboratorios (Chalhoub *et al.*, 1997).

La desventaja que hoy en día tiene el uso de los marcadores moleculares en estudios de germoplasma y diversidad genética es el alto costo de los reactivos y los equipos que se utilizan para llevar a cabo las reacciones, equipos que no siempre están a disposición de todos los laboratorios de los países en desarrollo.

Marcadores Microsatélites SRR “Simple Sequence Repeats” (secuencias de repetición simple)

Los microsatélites, también conocidos como SSR (“Simple Sequence Repeats” o Secuencias Simples Repetidas) consisten en pequeñas secuencias con 2- 6 nucleótidos repetidos en tándem, altamente variables en tamaño, en un rango alrededor de los 100 a 200pb (Cornide, 2002).

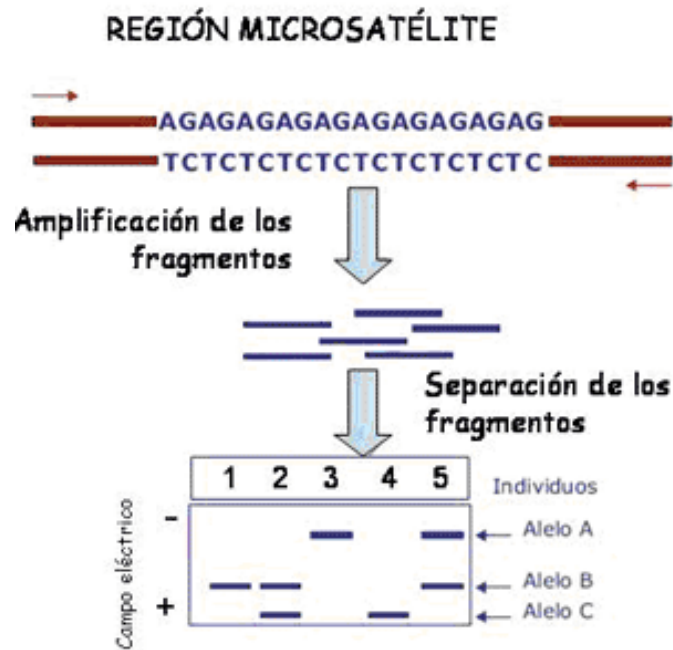


FIGURA 3. Marcadores moleculares SSR

Fuente: Argenbio, 2007

La información del polimorfismo generado se la detecta mediante la reacción en la cadena de la polimerasa (PCR) del ADN genómico total utilizando dos primers compuestos de cadenas cortas de nucleótidos que rodean el locus microsatélite (Powel *et al*, 1996), es posible analizar más de un locus por vez, siempre que los alelos de cada locus tengan tamaños suficientemente diferentes y migren hacia zonas separadas en el gel. En estos métodos de genotipado denominados multiplex, se utilizan simultáneamente más de un par de primers específicos en la misma reacción de PCR (Ferreira y Grattapaglia, 1995). Los loci SSR parecen ser somáticamente estables, poseen expresión codominante, es decir, ambos alelos de un individuo heterocigótico son visualizados y son altamente multialélicos, en una población donde potencialmente todos los alelos de aquel locus pueden ser detectados y discriminados (Ferreira y Grattapaglia, 1995). En conclusión, para la aplicación de esta técnica es necesario utilizar secuencias flanqueantes conservadas (primers), las cuales permiten la amplificación mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) del fragmento de ADN (microsatélite). Los fragmentos de ADN obtenidos son separados en geles de agarosa o acrilamida, y teñidos con bromuro de etidio o tinciones de nitrato de plata (Frankham *et al.*, 2003).

Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigocidad. El alto nivel de polimorfismo que permite una discriminación precisa entre individuos altamente emparentados. Además de ser altamente polimórficos, los microsatélites usan cantidades mínimas de ADN, equivalentes a las que se usan en RAPD. Las condiciones de amplificación y de reacción son especie-específicos y la variación en el largo de los productos amplificados mediante PCR es función del número de unidades repetidas (Becerra *et al*, 1999). Además, los microsatélites presentan altas tasas de mutación, lo que permite diferenciar individuos estrechamente emparentados (Zhang, 2004).

2.3. MARCO CONCEPTUAL

Accesión: colecta o entrada, es la unidad de colección o cada una de las muestras, puede ser también una variedad, línea o población en cualquiera de sus formas reproductivas como semillas, tubérculos, etc. (Seminario, 1992).

Alelo: secuencia de ADN con un componente variable que permite identificar diferencias entre individuos y que puede ser localizado en una posición concreta del genoma (Medina, 2014).

Banco de germoplasma: lugar donde se conserva la semilla y se pone a disposición de los usuarios para que sea utilizada directamente o como material básico en la generación de variedades superiores (Sevilla y Holle, 2004).

Marcadores moleculares: es un segmento de ADN que se consideran marcas o puntos de referencia para análisis de los genomas, con una ubicación identificable en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. Representa cualquier característica química o molecular medible (Phillips, 1998).

Microsatélite: Son secuencias de ADN en las que un fragmento (cuyo tamaño va desde dos hasta seis pares de bases) se repite de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones, y no la secuencia repetida, crea diferentes alelos (Cornide, 2002).

Polimorfismo: un locus es considerado polimórfico en una población dada, si este presenta más de un alelo (Frankham, *et al.* 2002).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDIO

El lugar donde se recolectaron las muestras fue en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Camacani de la Universidad Nacional del Altiplano que se ubica en:

Distrito	:	Platería
Provincia	:	Puno
Región	:	Puno
Latitud sur	:	15°56'34"S
Longitud oeste:	:	69°51'27"W
Altitud	:	3842 msnm
Huso horario	:	UT-5:00

El CIP Camacani, cuenta con el mejor Germoplasma del mundo ya que desarrolla la agricultura de alta montaña; asimismo este centro tiene investigadores que vienen refrescando materiales genéticos donde introducen productos andinos como el tarwi, maíz, quinua, cañihua, y otros productos andinos.

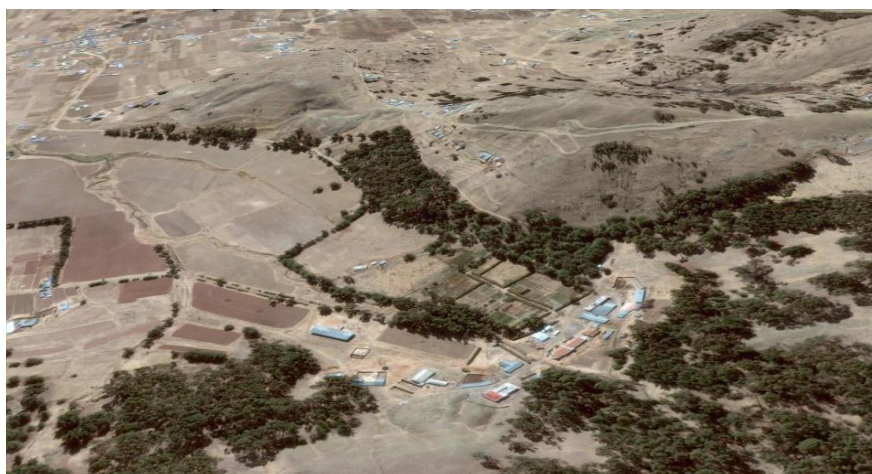


FIGURA 4. Foto satelital del CIP Camacani-UNA Puno.

Fuente: Google earth

El área donde se procesó las muestras fue en el Megalaboratorio de la UNA - Puno y en el laboratorio del Instituto de Biotecnología de la UNALM- Lima.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación es descriptiva analítica

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

Población: Se seleccionaron dos variedades de quinua; una variedad comercial *Witulla* y un pariente silvestre *Chenopodium petiolare*, del banco de germoplasma del CIP Camacani perteneciente a la Universidad Nacional del Altiplano. Con el fin de estudiar su información genética.

Muestra: la muestra estuvo conformada por 10 repeticiones de la variedad *Witulla* y 9 repeticiones del pariente silvestre *Ch. petiolare*.

3.4 METODOLOGÍA

Identificación de los marcadores moleculares altamente informativos para la genotipificación de dos variedades de quinua.

3.4.1. *Diseño de muestreo o experimento*

Las semillas necesarias para la investigación se colectaron del banco de germoplasma del CIP Camacani, se seleccionaron semillas conservadas provenientes de un mismo colector. Los datos del pasaporte de los sitios de colecta de la semilla se detallan en la tabla 6.



FIGURA 5. Siembra de las semillas de quinua en diferentes macetas. CIP Camacani, Mayo del 2016

Se sembraron las semillas en 19 macetas que corresponden a 2 variedades, 10 repeticiones de la variedad *witulla* y 9 del pariente silvestre *Ch. petiolare*, estas fueron debidamente codificadas, luego incluimos la información en el rotulo de las macetas y cada maceta contenía tierra negra, compost y arena en proporciones recomendadas para mantener la planta en condiciones óptimas que se observan en la Figura 5. Las semillas germinaron en condiciones de invernadero a una temperatura optima de 12°C a 25°C, transcurridos de 3 a 5 días germinaron unas diferentes a otras; se tuvo que esperar entre los 15 y 20 días después de la siembra hasta que aparecieron las dos hojas verdaderas, para luego entre 25 y 30 días observar las cuatro hojas verdaderas, hojas que utilizamos posteriormente para la extracción (Figura 6).



FIGURA 6. Maceta codificada con el nombre y fecha de siembra. CIP Camacani, Mayo del 2016

Las muestras fueron recolectadas de acuerdo a su tiempo de desarrollo, debido a que una variedad tenía un periodo vegetativo precoz y otra tardía, (Figura 7 y 8) luego de recolectadas fueron etiquetadas con el código correspondiente y se trasladaron al laboratorio en bolsas ziploc, donde fueron inmediatamente procesadas y otras almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.



FIGURA 7. Hojas verdaderas que se observan en el cultivo de quinua antes de la recolección de muestras, CIP Camacani, setiembre del 2016



FIGURA 8. Recolección de hojas jóvenes para la posterior extracción del ADN. CIP Camacani, setiembre del 2016

3.4.2. De laboratorio

Extracción de ADN

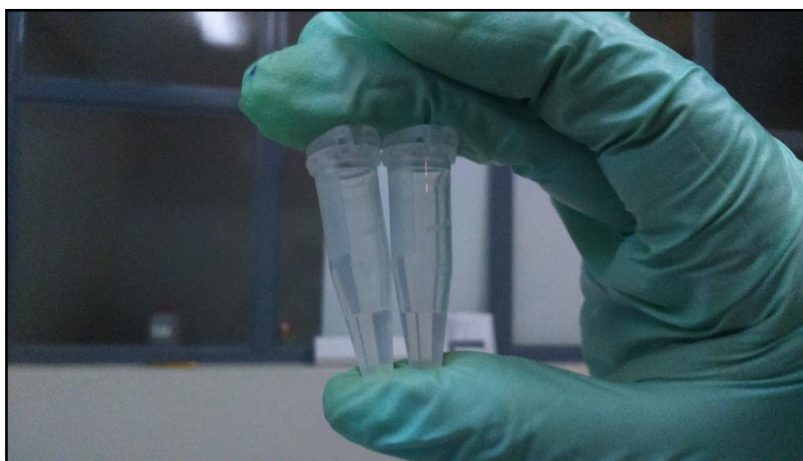
Fundamento. Las muestras son lisadas en tampones de lisis suministrados en presencia de RNasa. Las proteínas y los polisacáridos se eliminan mediante una solución de precipitación. El lisado se mezcla con la solución de unión de DNAg de la planta, el etanol se carga en la columna de purificación donde el ADN se une a la membrana de sílice, las impurezas se eliminan eficazmente lavando la columna con los tampones de lavado preparados. El ADN genómico luego se eluye bajo condiciones de baja fuerza iónica con el tampón de elución.

Procedimiento: Se utilizó el kit de extracción (GenJet plant Genomic DNA Purification) para lo cual se usaron aproximadamente 100 mg de hojas frescas de quinua (Figura 9) molidos con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y uniforme, para luego transferir inmediatamente el tejido a un tubo eppendorf, añadimos 350 μ l del tampón de lisis A, más 50 μ l de tampón de lisis B, y 20 μ l de RNasa, Añadimos luego 130 μ l de Solución de Precipitación; seguidamente recogimos el sobrenadante para transferirlo a un nuevo tubo eppendorf a lo que añadimos 400 μ l de Planta gDNA Binding Solución y 400ul de etanol. Entonces Añadimos 500 μ l de Buffer de lavado I luego 500 μ l de Buffer de lavado II para eliminar la proteína y los contaminantes. Por último el ADN está listo para ser usado o almacenado a -20°C (Figura 10).



FIGURA 9. Extracción del ADN en mortero con nitrógeno líquido. Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016

El protocolo de extracción del DNA se encuentra detallado en el anexo 1.



*FIGURA 10. Eppendorf con ADN purificado, resultado de la extracción de las 2 variedades de quinua.
Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016*

Cuantificación y calidad de ADN

Procedimiento: Se determinó la calidad del ADN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con bromuro de etidio; Se cargaron 2 μ l de marcador de peso molecular standart Low Mass Ladder al inicio de cada carril, adicionalmente se colocó 2.5 de la muestra y 8 μ l de Buffer de carga SALB 1x en cada pocillo de gel de Agarosa ya sumergida en el Buffer de corrida TBE 5x, se corrieron las muestras a 80V durante 45 minutos. (Figura 11) Posteriormente se realizó la visualización de las bandas mediante exposición con luz azul utilizando el fotodocumentador Blu Light Base.

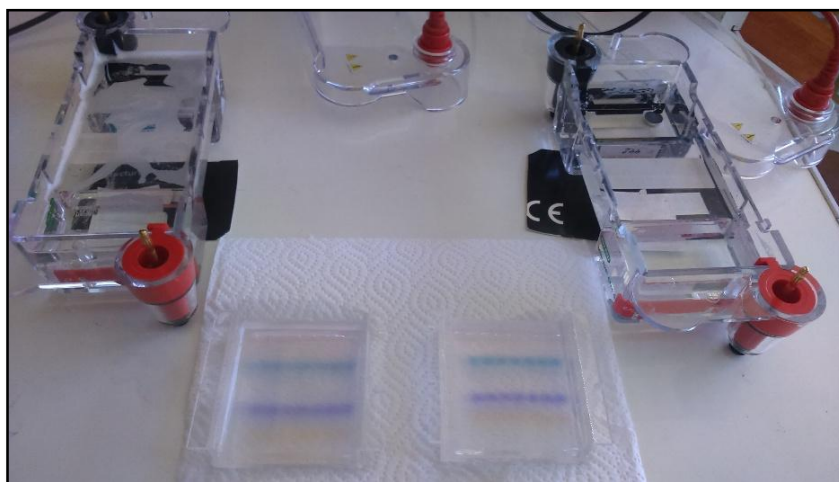


FIGURA 11. Electroforesis en gel de agarosa. Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016

El protocolo de electroforesis en gel de agarosa la encontramos en el anexo 3.

Así mismo se cuantificó y determinó la pureza del ADN mediante espectrofotometría BIOPHOTOMETER, de marca Eppendorf (Figura 12), se realizó la lectura de las muestras a DO_{260} nm y DO_{280} nm y se consideró como ADN puro cuando la relación DO_{260}/DO_{280} fue de 1.8- 2.0. Finalmente, de acuerdo a la concentración de ADN obtenida se realizó la dilución de trabajo a $10\text{ng}/\mu\text{l}$. Los resultados obtenidos de calidad y cantidad del ADN se detallan en la tabla 7.



FIGURA 12. Espectrofotómetro usado para cuantificación del ADN. UNALM, diciembre del 2016

Selección de microsatélites

Fundamento: El screening consiste en la prueba de diferentes temperaturas con la finalidad de establecer la temperatura de hibridación más adecuada y en la cual no se observaron productos de amplificación inespecíficos.

Procedimiento: Fueron diseñados 20 pares de iniciadores conformados por 10 forward y 10 reverse recomendados y citados por (Mason *et al.* 2005) los mismos que se detallan en la tabla 6, tuvimos que identificar a los marcadores moleculares que resulten ser altamente informativos por ello se utilizó la técnica de PCR para realizar la estandarización de los primers que permitió determinar la temperatura óptima de hibridación; el screening se realizó con los 20 marcadores microsatélite y para realizar el

screening se preparó una solución madre (stock) de los primers liofilizados a una concentración de 100 μM para garantizar una mejor conservación de los cebadores. La selección de primers se realizó probando diferentes temperaturas hasta encontrar la adecuada.

Amplificación de los microsatélites por la técnica de PCR

Fundamento. La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reproduce in Vitro el proceso fisiológico de la duplicación del ADN en las células. La PCR multiplica («amplifica») exponencialmente una secuencia específica de ADN bicatenario, sintetizando grandes cantidades de un segmento específico de ADN a partir cantidades inferiores a 1 μg del ADN de muestra. Comprende varios ciclos divididos en tres etapas (desnaturalización, hibridación o anillamiento y extensión del cebador) (Springer, 2007).

Procedimiento: Cada microsatélite representa un locus que contiene repeticiones simples de un, di, tri o tetranucleotido. Mediante la reacción de PCR se realizó la amplificación de esta secuencia blanco. Los primers diseñados reconocen las secuencias flanqueadoras de los SSR e inician la amplificación de la secuencia repetitiva (Karp *et al*, 1997).

Para ello se hizo una dilución de los primers a una concentración de 1 μM , Para la PCR se consideró: 10 μl de mezcla conteniendo 2 μg de ADN molde, 5 μl de Hot Start PCR Master Mix, 1.6 μl de cada iniciador (F y R) y 2.2 μl de agua Mili Q, se hizo modificaciones diferentes para hallar la temperatura y concentración adecuada, pero se usó una fórmula principal que detallamos en el cuadro.

Tabla 2. Protocolo para PCR inserto en el kit.

REACTIVO	CANTIDAD	CANTIDAD FINAL (4X)
Agua ultra pura	2.2 μl	8.8 μl
Master mix	5 μl	20 μl
Primer forward	0.4 μl	1.6 μl
Primer reverse	0.4 μl	1.6 μl
Volumen final	8 μl	32 μl

La amplificación se realizó en un Termociclador Vapo Protect de marca Eppendorf, recordando que cada ciclo de PCR se llevó a cabo en tres etapas que se muestran en la Figura 13: Desnaturalización, Hibridación y Extensión, primero con un tiempo de desnaturalización inicial del ADN por 4 min a 95°C, donde las cadenas de ADN son calentadas y separadas para luego servir como molde para el siguiente paso; seguido de 30 ciclos de desnaturalización cíclica a 95°C por 30 seg, donde los primers se alinean al extremo 3' del molde previamente separado e hibridan con su secuencia complementaria para que se forme el complejo molde-primer; luego la temperatura de anillamiento fue 55°C por 30 seg, a continuación 30 seg de elongación cíclica a 72°C y un ciclo final de elongación a 72°C por 5 min, por último la estabilización de 10°C donde la taq polimerasa actúa sobre el complejo molde-primer y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida, se agrega dNTPs complementarios para crear las cadenas completas de ADN.

Se realizó el PCR utilizando las condiciones del ciclado térmico recomendadas que se detallan en la tabla 9.

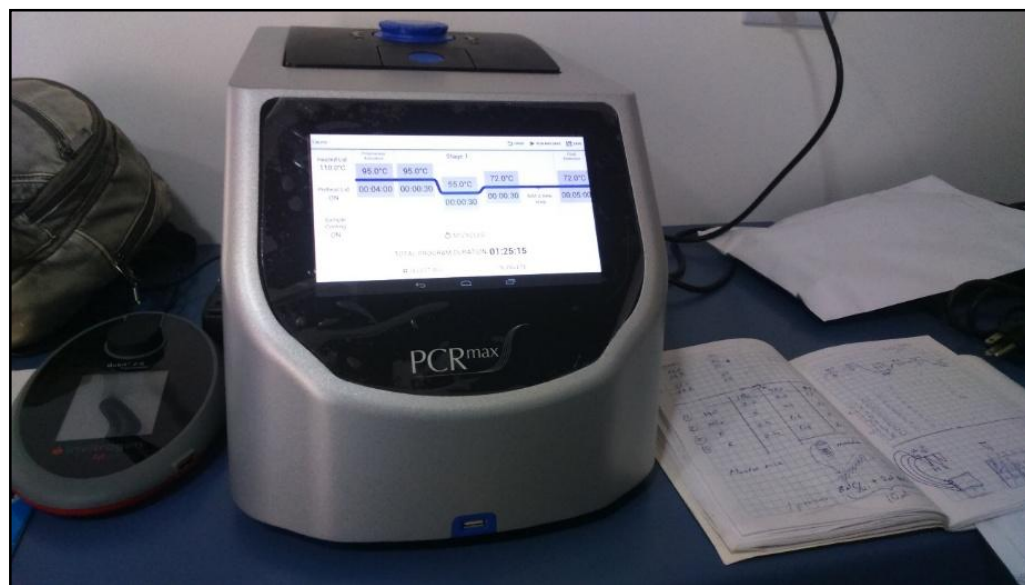


FIGURA 13. Termociclador usado para la amplificación del ADN. UNALM, abril- agosto del 2017.

Se realizó la PCR utilizando el protocolo estandarizado para los 20 primers microsátélites a excepción de algunos primers que solo variaba en la concentración de la dilución del primer (5 μ M).

Los productos de amplificación de PCR se resolvieron en una cubeta de electroforesis vertical con geles de poliacrilamida al 6% y se revelaron mediante tinción con nitrato de plata (Figura 14).

La visualización de los polimorfismos se realizó en geles de poliacrilamida al 6% sumergidos dentro de una solución amortiguadora, el alto contenido de electrolitos permitió la transmisión de corriente eléctrica manteniendo el pH estable al paso de la corriente donde las muestras de ADN se denaturaron y cargaron en los geles de poliacrilamida, el voltaje que se utilizó fue de 300 voltios por 14 horas para su posterior tinción. Los ácidos nucleicos poseen carga negativa, debido a los grupos fosfato que posee en su estructura por lo tanto migran hacia un polo positivo en consecuencia se desplazan y se separan por tamaños dando lugar a las bandas que posteriormente se visualizaran.

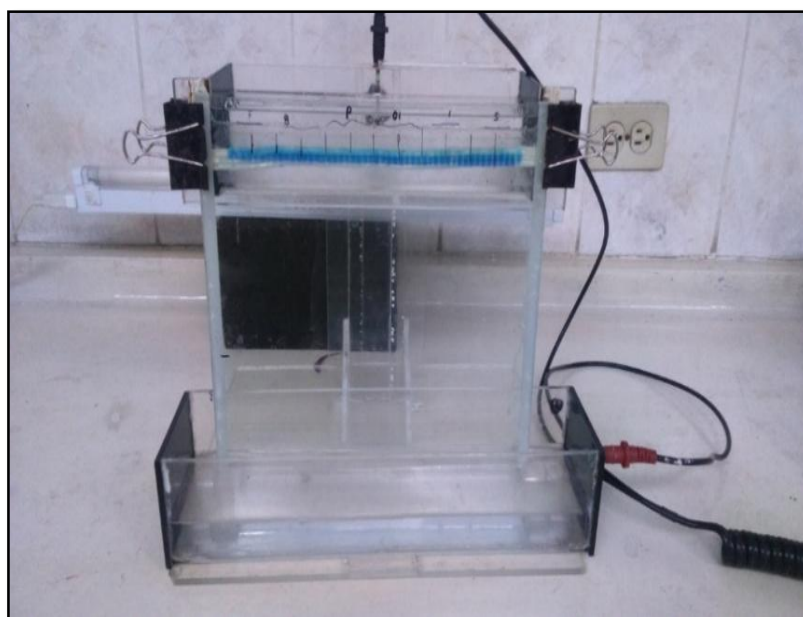


FIGURA 14. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida. UNALM, abril- agosto del 2017.

Técnica de tinción con nitrato de plata.

Procedimiento: Para la tinción con nitrato de plata de los geles de poliacrilamida se siguió el protocolo estandarizado por el DENAREF (Murillo, 2002). En resumen este proceso consistió en sumergir las placas de vidrio adherido el gel en una solución de ácido acético al 10% por 20 minutos en agitador automático para hallar una fijación 1. (Figura 15)



FIGURA 15. Gel de poliacrilamida en fijación 1. UNALM, abril- agosto del 2017.

Luego de un buen lavado con agua destilada y posteriormente secado, se volvió a sumergir en la segunda batea de tinción con ácido nítrico al 10% por 20 minutos, para luego de otro buen lavado sumergirlo en una batea de revelado con nitrato de plata por 5 minutos. Para detener la reacción se volvió a sumergir a una cuarta batea de fijación 2 con ácido acético al 10% y finalmente enjuagamos abundantemente con agua destilada sin malograr la placa con el gel. Dejamos secar completamente para llevar luego al transiluminador para su lectura. (Figura 16)

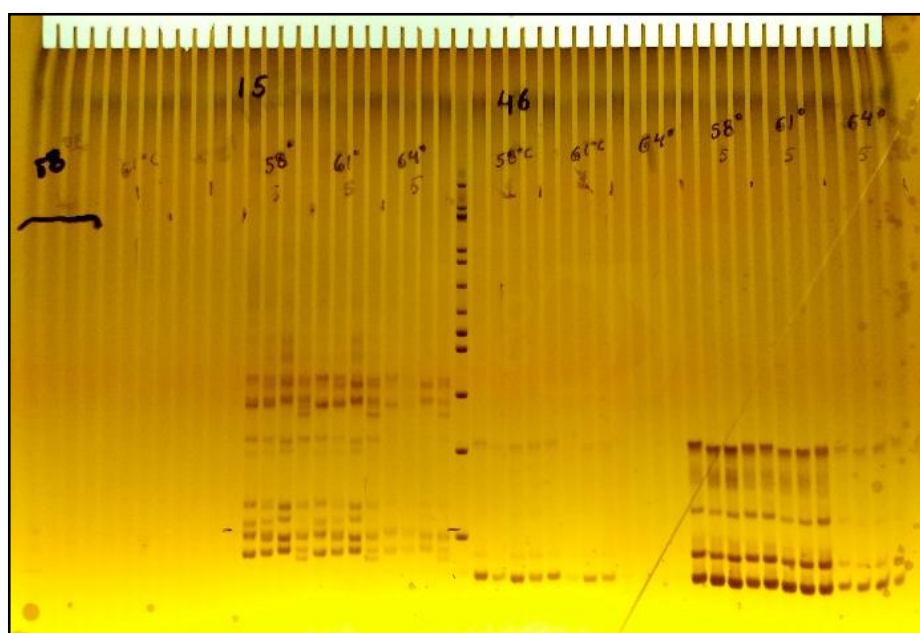


FIGURA 16. Resultado de screening en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata. UNALM, abril- agosto del 2017.

El análisis de la placa nos permitió seleccionar de estos 20 primers solamente 9 en función del polimorfismo observado y la calidad de los productos de amplificación.

Determinación de la variabilidad del tamaño de alelos reproducibles obtenidos de un cultivo de quinua con el uso de marcadores moleculares.

Registro de los alelos

Cada alelo SSR correspondiente a una banda amplificada se registró con “1” ó “0” según la presencia o ausencia respectivamente para cada genotipo y se ingresó en una matriz de datos (Figura 17), los datos dudosos se registraron con “9”. Y para determinar el número de alelos se tomó en cuenta el rango del tamaño esperado para los alelos en cada locus.

FIGURA 17. Score de datos tomados del revelado de vidrio. UNALM, abril- agosto del 2017.

Los datos fueron importados a Excel, que consta de una tabla de frecuencias alélicas en porcentaje y la talla de los alelos reportados por cada loci.

Índice de contenido polimórfico (PIC)

El contenido de información polimórfica (PIC) (Röder *et al.*, 1995), también llamado heterocigosidad de cada locus constituyó una medida de la informatividad y polimorfismo de un locus genético, se calculó a partir de las frecuencias alélicas para cada locus analizado según la expresión.

El valor de PIC es determinado mediante la siguiente fórmula:

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Dónde: p_i es la frecuencia del alelo I, p_j es la frecuencia del alelo J y n es el número de alelos en un locus (Botstein y col., 1980).

3.4.3. Método estadístico

Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Es el marco de referencia que sirvió para la estimación de la estructura genética a partir de la información contenida en la frecuencia alélica, la cual es introducida en una matriz de distancias cuadradas euclidianas y a partir de ella se obtuvo los componentes de covarianza asociado con posibles niveles de estructura genética.

La separación de los componentes de la varianza y la generación de análogos de las estadísticas de F se halló mediante un estimador poblacional asociado a posibles niveles de estructura genética dentro de los individuos, demos, grupos de demos, poblaciones y grupos de poblaciones.

El análisis de la estructura genética grupal se determinó en función del análisis molecular de variancia (AMOVA), Este análisis se realizó empleando el programa InfoGen versión 2016 (Balzarini *et al*, 2016), el cual calcula la varianza entre poblaciones permutando genotipos individuales entre las poblaciones.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de los marcadores moleculares SSR, en el estudio e identificación de alelos reproducibles en diferentes variedades de quinua, se presentan detallados en función a los objetivos:

a) Identificación de los marcadores moleculares altamente informativos en la genotipificación de dos variedades de quinua.

La extracción del ADN se realizó con un kit de extracción siguiendo el protocolo de Doyle & Doyle (1987) con pequeñas modificaciones debido a que no se usó el tradicional método CTAB, el kit de extracción nos simplificó el trabajo de laboratorio y optimizó el producto obtenido. El protocolo utilizado para la extracción permitió obtener un ADN de buena calidad y cantidad suficiente para los análisis moleculares con SSR utilizados en el estudio y mostrados en la Figura 18, permitió también obtener una relación de DO_{260} nm y DO_{280} nm entre 1.7 – 2.3; así mismo se obtuvo una concentración promedio de 112 ng/ μ l (tabla 7), una de las principales ventajas de estos marcadores moleculares tipo microsatélite es la pequeña cantidad de ADN que se necesita para la amplificación, siendo esta de 5 a 50 ng por reacción (Torrez y Moreno, 2001) por lo que hicimos la dilución a una concentración de 10 ng/ μ l necesaria para la amplificación del ADN.

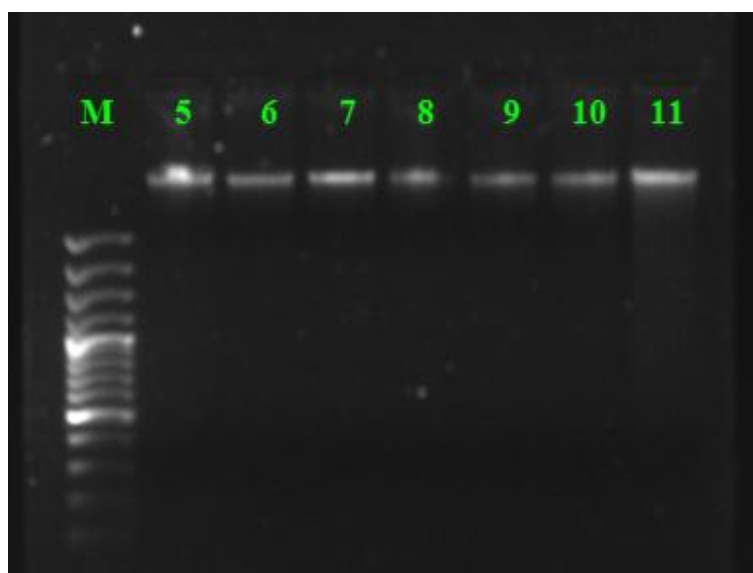


FIGURA 18. Fotografía del Revelado de muestras en gel de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio, carriles del 5 al 11, son las muestras de ADN y el carril inicial es el marcador de peso molecular. Megalaboratorio UNA- Puno, Setiembre del 2016

La figura 19 nos muestra las pruebas que realizamos para hallar la temperatura de anillamiento con temperaturas distintas que se encontraron en el rango de 57- 67°C y cuando los microsátélites no mostraban una amplificación adecuada se probó también la modificación de diferentes concentraciones del primer (1 μ M - 5 μ M) para obtener los resultados correctos.

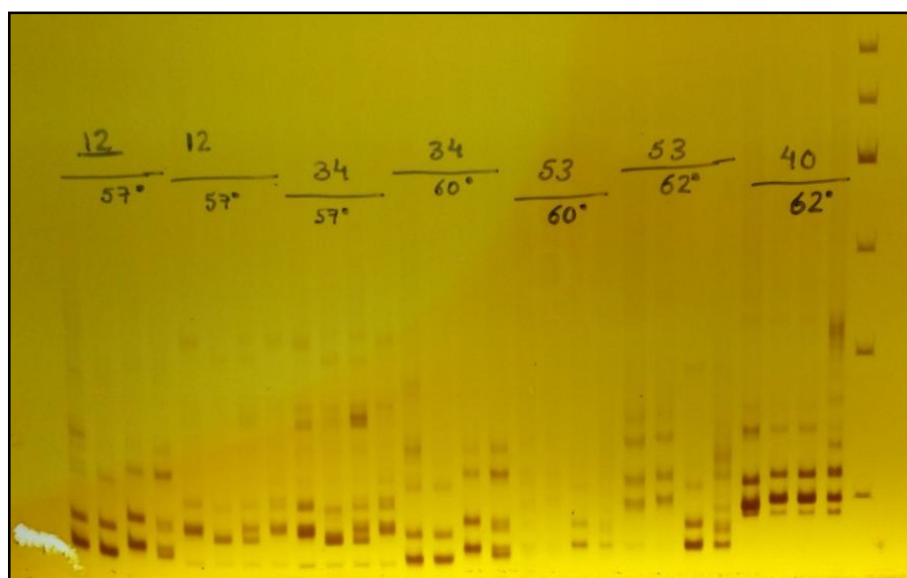


FIGURA 19. Fotografía de la amplificación y revelado del screening con diferentes temperaturas.
UNALM, abril- agosto del 2017.

Para encontrar la variación de los dos genotipos probamos 20 primers de quinua, de los cuales 11 de ellos no pudieron lograr una amplificación clara dentro de los cuales también resultaron siendo monomórficos y 9 de los primers resultaron ser polimórficos.

Los datos obtenidos del software estadístico dieron como resultado que las muestras duplicadas fueron 4 las cuales son observaciones que tienen el mismo perfil a través de todos los marcadores o bandas; para el análisis se utilizaron 48 bandas, el patrón de bandas duplicadas se presentó en 18 casos, las bandas monomórficas que determina el número de marcadores que no variaron a través de todo el perfil de observaciones fueron 9, las bandas polimórficas (%) que calcula el porcentaje de marcadores polimórficos fueron 81.25% de los mismos, finalmente se utilizó nueve primers en el análisis y se determinó entonces que de los 20 primers utilizados solo 9 fueron polimórficos (Tabla 3).

Tabla 3. Descripción de marcadores moleculares. Puno, noviembre del 2017

Resumen	Cantidad de casos
Muestras	19
Muestras duplicadas	4
Bandas (número)	48
Patrón bandas duplicadas	18
Bandas monomórficas	9
Bandas polimórficas (%)	81.25
Primers	9

Maughan *et al.* (2004), evaluaron la amplificación de los SSR desarrollados en germoplasma de *C. quinoa* y se incluyeron a su vez otras especies relacionadas de *Chenopodium*. El 67 % de los SSR evaluados amplificaron en todas las especies. Respecto a la quinua cultivada se analizaron 31 accesiones representantes de cuatro de los cinco ecotipos propuestos por Tapia (1982). En nuestra investigación el 45% de los SSR amplificaron en todas las especies, el restante de *primers* no amplificaron debido que la temperatura que recomendaban en el inserto no eran las adecuadas, generalmente la T_m oscila entre los 55 a 60°C, nosotros tuvimos que elevar aún más la temperatura incluso se tuvo que llegar hasta los 67°C para obtener una buena amplificación, podemos decir entonces que para la evaluación y elección de los primers es necesario hacer una gradiente de temperaturas para obtener la temperatura adecuada como aporte a los siguientes trabajos de investigación.

Mason *et al.*, 2005; identificaron 208 SSR polimórficos en 31 accesiones de quinua, diseñaron 397 cebadores para loci de SSR los cuales fueron analizados con un panel de accesiones *C. quinoa* y una accesión de *C. berlandieri* de los cuales un 52% fueron polimórficos dentro de las accesiones de *C. quinoa*, sin embargo al incluir *C. berlandieri* en el análisis, un 6% adicional de los cebadores se mostró polimórfico, por otro lado el número de alelos observados fue de 2 a 13 alelos por locus con un total de 818 alelos detectados, mientras que los valores de heterocigocidad se encontraron entre 0.20 a 0.90 donde un 32 % fue altamente polimórfico. Finalmente reportan la cercana relación de *C. quinoa* y *C. berlandieri* debido a que un 99.5% de los cebadores amplificaron productos

específicos en *C. berlandieri*. En nuestra investigación identificamos 9 iniciadores SSR polimórficas en 2 accesiones de quinua, de los cuales 81.25% fueron polimórficos, esto se debe a la alta variabilidad en el loci, es decir a la frecuente variación en el número de repeticiones por motivo que mostraron las poblaciones en estudio, es importante también saber que estos marcadores muestran una hipersensibilidad durante la replicación del ADN o el sobre cruzamiento desigual durante la meiosis, nuestras muestras resultan tener variabilidad inter e intra poblacional por ello que muestra un porcentaje alto de polimorfismo, así mismo los resultados confirman una vez más la utilidad de marcadores moleculares aplicados en este estudio para la genotipificación de variedades de quinua como aporte a los bancos de germoplasma y para uso del estudio de diferentes variedades de quinua en pro del mejoramiento genético.

b) Determinación de la variabilidad del tamaño de alelos reproducibles obtenidos de dos variedades de quinua con el uso de marcadores moleculares.

Como resultado de la amplificación, se determinaron un total de 48 alelos contenidos dentro de los 9 primers amplificados, el tamaño de alelos se encuentran en el rango de 142 y 240 pb. La variación en el tamaño de alelos en un solo locus se encuentra en el rango de 2 a 28 pb, lo cual demuestra las diferentes tasas de mutación de los loci evaluados. El locus que representó mayor variabilidad fue el QCA015 con 7 diferentes tamaños de alelos. Debido a que la quinua es tetraploide se puede observar máximo 4 alelos por muestra, no se registró la presencia de 5 o más alelos por individuo.

El primer que más bandas amplificó fue el QCA015 con un 29.32% de amplificación a través de las 19 muestras. Los valores de contenido de información polimórfica (PIC) fueron obtenidos con los primers QCA012, QCA029, QCA053 y QCA067, dichos valores estuvieron comprendidos en un rango de 0.15 a 0.37, los iniciadores QCA029 Y QCA067 obtuvieron los más altos valores (0.37), los cuales serían altamente informativos. La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por primer (PDICMA) fue encontrada para el primer QCA067, este primer mostró un alto grado de confianza. Estos resultados también muestran que los primers QCA034 y QCA040 tienen los menores valores de capacidad discriminativa y contenido de información polimórfica.

Tabla 4. Análisis de los primers utilizados en la genotipificación de dos variedades de quinua

Primer	BP	BM	BT	PMF (95%)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
QCA012	4	0	4	1.00	0.32	0.04	40.79	1.1E-14
QCA015	5	2	7	0.71	0.21	0.07	29.32	1.2E-05
QCA021	6	0	6	1.00	0.20	0.03	21.05	1.6E-08
QCA029	4	2	6	0.67	0.37	0.02	33.33	1.5E-11
QCA034	4	2	6	0.67	0.15	0.01	35.96	2.9E-03
QCA040	2	3	5	0.40	0.23	0.03	40.00	2.4E-03
QCA053	5	0	5	1.00	0.33	0.03	43.16	4.3E-15
QCA055	5	0	5	1.00	0.30	0.04	35.79	8.6E-14
QCA067	4	0	4	1.00	0.37	0.00	50.00	5.9E-17
Total	39	9	48	-	-	-	35.53	4.9E-87

BP: bandas polimórfica, BM: bandas monomórficas, BT: bandas totales, PMF: proporción de loci polimórficos, PIC: contenido de información polimórfica, AMP: porcentaje de amplificación, PDICMA: probabilidad que dos individuos compartan el mismo alelo.

El AMOVA indica que existe variabilidad genética entre las dos variedades de quinua (p -valor < 0.0001) y dentro de cada una de dichas variedades (p -valor < 0.0001), se usaron 400 iteraciones (permutaciones) para el cálculo del valor de p en cada caso. Los componentes de varianza indican un 77.85% para las variedades y un 22.15% dentro de las mismas.

Tabla 5. Análisis molecular de varianza (AMOVA) para marcadores moleculares utilizados en la genotipificación de dos variedades de quinua

F.V.	SC	GL	CM	p-valor	Iteraciones	Comp. varianza	Porcentaje
Variedades	89.81	1	89.81	<0.0001	400	8.2	77.85
Dentro	39.67	17	2.33	<0.0001	400	2.33	22.15
Total	129.47	18	7.19			10.53	100

Doyle *et al.* (1990), afirman que el origen y la diversidad genética de la quinua se encuentran en la región Andina y en particular en el altiplano que comparte Bolivia y Perú. La colección boliviana de quinua está conformada por más de 3000 accesiones, las cuales fueron seleccionadas para caracterizarlas molecularmente utilizando ocho marcadores, habiendo encontrado 129 alelos, con un rango de 5 a 30 alelos por locus y tamaño que va de 111 a 239 pb. Sus resultados mostraron una diversidad genética en general elevada para todas las regiones mencionadas, en orden descendente se ubicaron el altiplano centro, sur, valles y norte. La información generada permitió la conformación de una colección núcleo con 189 accesiones únicas en total. En este trabajo los alelos encontrados son un total de 48 alelos y el tamaño de estos se encuentran en el rango de 142 y 240 pb. La variación que presenta la cantidad y tamaños dependió de la variedad en estudio y el *primer* utilizado.

Christensen *et al.* (2007), Estudiaron la colección de germoplasma de quinua del Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA) y el Centro Internacional de la Papa (CIP-FAO), que incluye 143 accesiones, fue caracterizada posteriormente con 36 SSR, detectando 420 alelos entre todas las accesiones con un promedio de 11 alelos por locus. El agrupamiento resultante fue similar al mencionado anteriormente: uno compuesto por accesiones de la zona Andina (Perú, Bolivia, Ecuador, Argentina y norte de Chile) y otro por accesiones de Nivel del mar, junto a un conjunto de materiales de origen desconocido. Estos marcadores fueron también utilizados por Fuentes *et al.* (2008), quienes caracterizaron accesiones de quinua chilena (31 de las tierras bajas del sur y 28 del altiplano norte) utilizando SSR con fluorescencia en reacciones de PCR multiplex, obteniendo información genética para 20 loci, que resultaron altamente polimórficos (150 alelos en total con un promedio de 7,5 alelos por locus). En ese trabajo las accesiones se agruparon en dos: las originarias del norte (Andinas) y las accesiones del sur (de la costa). En nuestra investigación el locus que representó mayor variabilidad fue el QCA015 con 7 diferentes tamaños de alelos, trabajamos solamente con dos variedades que provenían del mismo lugar, aun así encontramos diferencias notorias gracias al número y tamaño de alelos presentes en su caracterización, y a diferencia nuestra Christensen *et al.*, caracterizaron más accesiones, por ello que varía el promedio. Sin embargo la determinación del tamaño de alelos no ayuda a encontrar las diferencias y la variabilidad genética dentro y fuera de las poblaciones. De esta manera queremos mostrar que a pesar

de que sean dos las poblaciones que estudiamos podemos decir que los marcadores moleculares nos ayudan a hallar la variabilidad genética de posterior uso en los bancos de germoplasma y su correcta clasificación.

Análisis de agrupamiento de la variedad witulla y el pariente silvestre *Chenopodium petiolare*.

Observamos grados de diferenciación muy notorias de las dos variedades en el árbol filogenético, producto del software estadístico. El dendograma fue elaborado por medio del análisis clúster o grupos, a partir de los datos obtenidos de los valores de similitud los genotipos pueden ser reunidos en dos grupos claramente definidos.

El análisis de conglomerados permite identificar la formación de dos grupos distinguibles, el primero formado por las muestras de variedad *Witulla*, y el segundo compuesta por las muestras de *Chenopodium petiolare*. Los resultados confirman la cercanía genética de las muestras respecto a la variedad de la que provienen, se observa una mayor variación para la variedad *Witulla*.

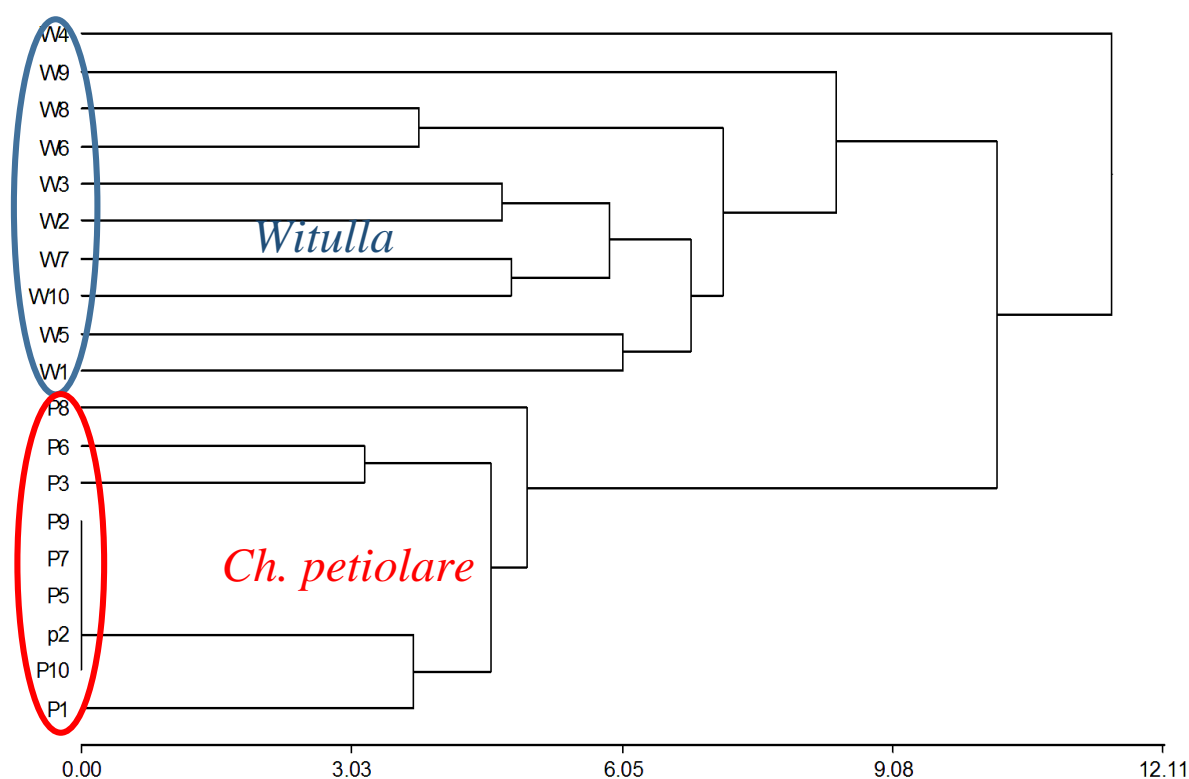


FIGURA 20. Análisis de conglomerados de dos variedades de quinua, según marcadores moleculares utilizados en su genotipificación

Para la diversidad genética se tiene que la variedad *Witulla* presenta una significativa ($p < 0.05$) mayor diversidad genética, respecto a la heterocigocidad se tiene similar valor para ambas variedades, para el contenido de información polimórfica (PIC) se tiene que la variedad *Witulla* presenta un mayor valor superior al de *Ch. petiolare* ($p < 0.05$), para alelos efectivos se tiene que los mismos presentan un mayor valor para *Witulla* que para *Ch. petiolare* ($p < 0.05$).

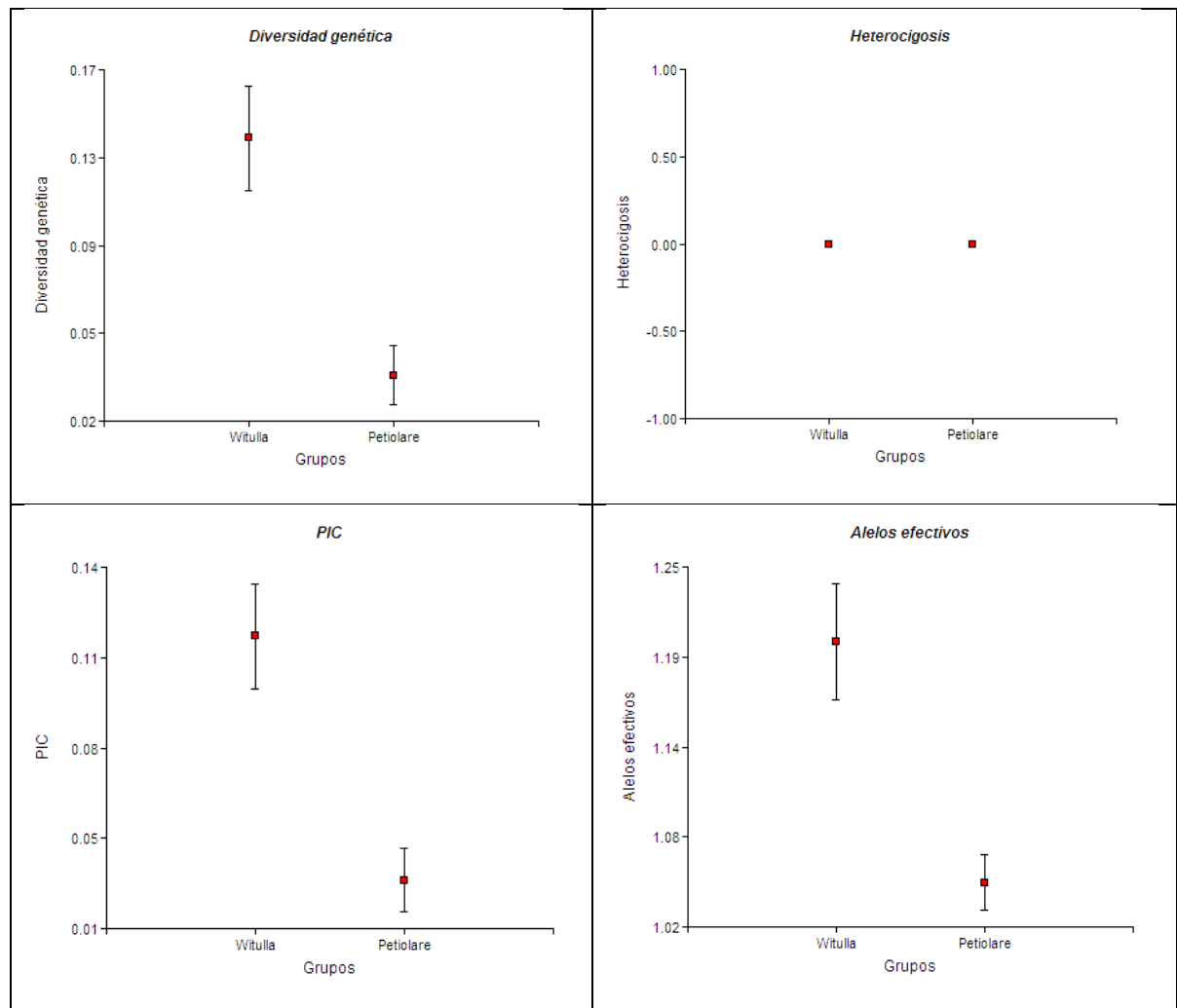


FIGURA 21. Variabilidad genética de dos variedades de quinua según marcadores moleculares utilizados en su genotipificación

Se observa una mayor línea común para *Ch. petiolare*, mientras que la variedad *Witulla* muestra la formación de dos líneas, concordando con los resultados anteriores de una mayor variabilidad genética para esta variedad.

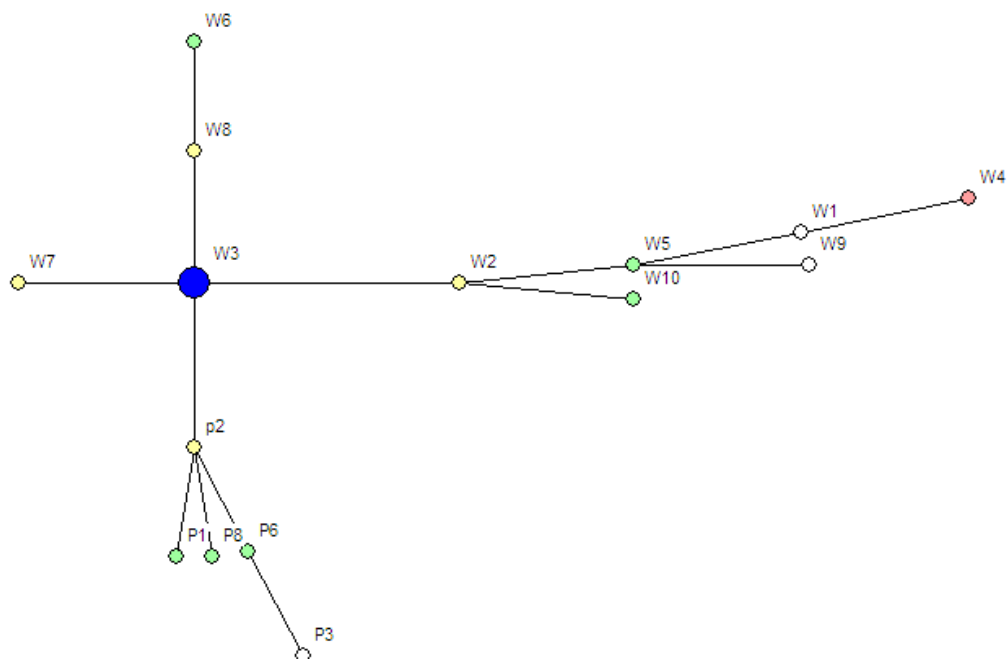


FIGURA 22. Red de mínimo recorrido (filogenia) de muestras de dos variedades de quinua según marcadores moleculares utilizados en su genotipificación.

Bretting y Widrelechner (1995), mencionan en su investigación, que la fuente de variación genética de las plantas se encuentra en el conjunto de genes que ellas poseen y el espectro de esta variabilidad dentro de especies cultivadas y sus silvestres relacionadas, es comúnmente mantenido en bancos de germoplasma. La importancia del mantenimiento de estos recursos está en la medición y caracterización de dicha diversidad. De hecho conservar la información genética es muy importante para los bancos de germoplasma, en esta nuestra investigación podemos también asumir que dentro de las mismas variedades observamos claramente por el dendograma grados de diferenciación filogenética, es decir existe variabilidad inter e intra poblacional en ambas variedades con distanciamientos diferentes, podemos también asumir que las distancias de las características moleculares se deben al flujo de genes, a la forma de reproducción, crecimiento, etc y el hecho mismo de que una variedad es considerada nativa y otra por ser considerada pariente silvestre, por lo que deberíamos de mejorar la forma de conservación de las accesiones en los bancos de germoplasma aplicando marcadores moleculares.

Nuestro trabajo está basado en marcadores moleculares SSR (simple secuencia repeat) que a diferencia de los marcadores RAPDS, o AFLPs, se realiza en un reducido tiempo y

costo. Nuestro aporte científico está basado en la búsqueda de técnicas y procedimientos más eficaces, más específicos para diferenciar variedades con mayor precisión, incluso dentro de la misma especie en este caso referidos a la quinua.

Además nuestro trabajo tiene como aporte principal la futura implementación del Megalaboratorio en la Universidad Nacional del Altiplano en la especialidad de biología molecular, la novedad de nuestro proyecto plantea y soluciona resultados más precisos, a menor tiempo casos en los que es necesario estudiar numerosas muestras, con relación a otros procedimientos similares.

Nuestro trabajo a su vez es un aporte en el futuro para estudiantes que tengan la inquietud e interés de poder plantear temas más puntuales sobre el tema de variedades, mejoramientos genéticos, etc. dentro de la universidad Nacional del Altiplano y fuera de ella.

V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

1. Se identificó los marcadores moleculares altamente informativos; QCA012, QCA029, QCA053 y QCA067, las cuales resultaron de la genotipificación de las 2 variedades de quinua.
2. Se determinó la variabilidad del tamaño de alelos reproducibles, el número de alelos detectados son de 4 a 48 probablemente por la elevada tasa de mutación que presentan los microsatélites contenidos dentro de los 9 primers amplificados y el tamaño de alelos se encuentran en el rango de 142 y 240 pb, la variación en el tamaño de alelos en un solo locus, está en el rango de 2 a 28 pb.

VI. RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización molecular de la quinua con accesiones representativas de todas las zonas de la región con el propósito de establecer la estructura genética poblacional de la quinua y conservar mejor la información de los bancos de germoplasma.

Realizar estudios genéticos con una población mayor a 2 muestras para discriminar la variabilidad dentro de los cultivares de quinua.

Realizar trabajos de investigación relacionados con otros grupos poblacionales como en Tarwi que también contiene un alto porcentaje de proteínas.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Bonifacio A., (2001). *Recursos genéticos, etnobotánica y distribución geográfica*. In: Mujica A., Jacobsen S.E., Izquierdo J. & Marathee J.P., eds. Primer taller internacional sobre quinua. Cultivos Andinos. [CD-ROM]. Santiago: FAO, UNA-Puno, CIP.
- Bonifacio, A., Vargas A. and Alcon M. (2007). *Segregación natural en variedades y ecotipos de quinua: Resúmenes 1er Congreso Internacional de Quinua*. Iquique, Chile.
- Bretting, P.K.; Widrlechner, M.P. (1995). *Genetic markers and horticultural germplasm management*. HortScience, 30(7):1349-1356.
- Canahua, A., Mujica y R. Saravia (2001). *(Chenopodium quinoa Willd) ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro*. Agronomía del cultivo de la quinua. En food and agricultura organization (FAO), quinua. Cap II versión 1.0, Santiago de Chile.
- Cardenas, M. (1944). *Descripción preliminar de las variedades de Chenopodium quinoa willd de Bolivia*. En revista Agricultura Boliviana. Vol II 2:13 – 26, Bolivia.
- Chauhan, G.S., N.A.M Eskin y R. Tkachuk (1992). *Nutrients and antinutrients in quinoa seed*. Cereal Chemistry 69 (1):85:88.
- Christensen S.A., Pratt D.B., Pratt C., Nelson P.T., Stevens M.R., Jellen E.n., coleman c.e., fairbanks D.J., Bonifacio A., Maughan P.J. (2007). *Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) using microsatellite markers*. Plant Genetic Resources 5:82-95.
- Cubero, J. y Moreno, m.(1983) *Leguminosas de grano*. Madrid: Ediciones mundi-Prensa,
- Dice, L.R. (1945). *Measures of the amount of ecologic association between species*. Ecology 26:297–302.
- Doyle, J.J. Y Doyle, J.L. (1990). *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus 12–15.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E. y Quattro, J.M. (1992). *Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data*. Genetics, 131: 479-491.

- Ferreira, M.E. & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético* 1ra ed. Ministerio de agricultura Embrapa - cenargen. Brasilia.
- Fuentes F., Delatorre J., Tello V., Arenas J., Riquelme A., Oliva M., LAnino M., Carevic A. (2005). *Diversidad genética intrapredial en germoplasma nativo de quínoa (Chenopodium quinoa Willd.) de la Comunidad de Ancovinto, Altiplano de la I Región de Chile*. En Anales del V SIRGEALC: 121. Montevideo, Uruguay.
- Fuentes, F., Martinez, A., Hinrichsen, V., Jellen, N., & Maughan, P. (2008). *Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers*. Springer Science + Business Media. DOI10.1007/s10592-008-9604-3
- Fuentes F. and A. Bhargava. (2009). *Morphological analysis of quinoa germplasm grown under desert conditions*. Journal of Agronomy and Crop Science (submitted).
- Fuentes F. F, Espinoza P. A., Von Baer I., Jellen E. N., Maughan P. J. (2009). *Determinación de relaciones genéticas entre Chenopodium quinoa Willd del sur de Chile y parientes silvestres del género Chenopodium*. En Anales del XVII Congreso Nacional de Biología del Perú: 45. Tacna, Perú.
- Fuentes F.F., Martinez E.A., Hinrichsen P.V., Jellen E.N., Maughan P.J. (2009). *Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers*. Conservation Genetics. Vol. 10. N° 2: 369-377.
- Ghislain, M., Spooner, D.M., Rodríguez, F., Villamón, F., Nuñez, J., Vásquez, C., Waugh, R., Bonierbale, M. (2004). *Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRS) for genotyping of cultivated potato*. theorappl genet 108:881–890.
- Ghislain, M., Nuñez, J., Herrera, M.R., Pignataro, J., Guzman, F., Bonierbale, M. & Spooner, D.M. (2009). *Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato*. mol breeding 23:377–388.

- Gandarillas, H. (1989) Razas de quinua en Ecuador. EESC. INIAP. Boletín Técnico No.67. 16 pp,
- Gomez, P.L. (2003). “La quinua”. Disponible en www.samconet.com/productos/producto44/descripcion44.htm.
- Hakim, I.R.; Kammoun, N.G.; Makhloufi, E. & Rebai, A. (2010). *Discovery and potential of snp markers in characterization of tunisian olive germplasm diversity*, 2, 17-27.
- Herrera, A. (2000). *La clasificación numérica y aplicación en la ecología*. Santo Domingo, editorial san Merycar.
- Ipgri y Cornell (2004) *University Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: módulo de aprendizaje medidas de la diversidad genética*.
- Jabconsen, S.E; Mujica A., Jensen; C. R. (2003). *The resistance of quinoa (Chenopodium quinoa Willd) to adverse abiotic factors*. Food Rev. Int. 19 (1-2):99.109.
- Jaramillo, S. and Baena M. (2002) *Ex situ conservation of plant genetic resources: training module*. International Plant Genetic Resources Institute, Cali, Colombia.
- Karp, A., Edwards, K., & Bruford, M. (1997). *Molecular technologies for diversity*
- Karp, A., Isaacs, G., Isaac, P., & Ingram, D. (1998). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. London, Chapman & Hall, 498 pp.
- Kloosterman, A.D.; Budowle, B. & Daselaar, P. (1993) *PCR-amplification and detection of the human d1s 80-vntr locus*. int j leg med 105: 257—264.
- Lescano J.L. (1994). *Mejoramiento y fisiología de cultivos andinos. Cultivos andinos en el Perú*. CONCYTEC, Proyecto FEAS, p 231.
- Lowe, A.J.; Hanotte, O.; Garino, L. (1996). *Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collection: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD)*. Plant Genetic Resources Newsletter, 107:50-54.
- Martin I. (2001) *Conservación de recursos fitogenéticos*. Centro de recursos filogenéticos (CRF) Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) Disponible en:

http://www.esporus.org/recursos/articles/agrobiodiversitat/conservacion_rec_fitog_isaura_martin.pdf.

- Mason SL, Stevens MR, Jellen EN, Bonifacio A, Fairbanks DJ, Coleman CE, McCarty RR, Rasmussen AG, Maughan PJ, (2005) development and use of microsatellite markers for germoplasma characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Crop Sci* 45:1618-163.
- Maughan J, Bonifacio A, Jellen E, Stevens M, Coleman C, Ricks, M, Mason S, Jarvis D, Arduña B, Fairbank D. (2004). A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, SSRs and AFLP. *Theor Appl Genet* 109: 1188-1195.
- Mujica, A. (1988). *Parámetros genéticos e índices de selección en quinua (Chenopodium quinoa Willd.)*. Tesis de doctorado, Colegio de Postgraduados, Chapingo. 158 p.
- Mujica, S. (1993) *cultivo de quinua*. Lima: Instituto de Investigación Agraria, Dirección General de Investigación Agraria. Manual N° 11-93, pp, 23-27.
- Mujica, A. & S.-E. Jacobsen. (1998). *Resistencia a sequía de la quinua (Chenopodium quinoa Willd.)*. Escuela de Postgrado, Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 6 p.
- Mujica, A., R. Ortiz, R. Chura, V. Aguilar, A. Arias, A. Aguirre, L. Avila, L. Barcena, B. Carpio, M. Condori, M. Duenas, M. Ordonez, J. Zapana & J. Rossel. (1999). Conservación *in situ* y uso potencial de Chocca Chiwa (*Chenopodium carnosolum* Moq.). pp. 116-117 En: Resúmenes VIII Congreso Nacional de Botánica. 24-28 abril, Arequipa.
- Mujica, A., Jacobsen S.E. (2000) Agrobiodiversidad de las aynokas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y la seguridad alimentaria. Seminario Agrobiodiversidad en la Región Andina y Amazónica 151-156.
- Mujica, A. & S.-E. Jacobsen. (2000). *Agrobiodiversidad de las Aynokas de quinua (Chenopodium quinoa Willd.) y la seguridad alimentaria*. p.151-156 En: C. Felipe-Morales & A. Manrique (eds.). Proc. Seminario Taller Agrobiodiversidad en la Región Andina y Amazónica. 23-25 noviembre. 1988, NGO- CGIAR, Lima.

- Mujica, A., R. Ortiz & S.-E. Jacobsen. (2000) *Uso potencial de Chenopodium carnosolum Moq. En zonas áridas*. Pp.16-21 En: Resúmenes II Congreso Internacional de Zonas Áridas, Iquique.
- Mujica, A., J. Izquierdo & J.P. Marathe. (2001). *Origen y descripción de la quinua*. pp. 9-29 En: Mujica, A., S. E. Jacobsen, J. Izquierdo & J. P. Marathe (eds.) *Quinua (Chenopodium quinoa Willd.): Ancestral Cultivo Andino, Alimento del Presente y Ruturo*. FAO, UNA, Puno, CIP. Santiago de Chile.
- Mujica, A., R. Ortiz, J. Rossel, V. Apaza & A. Canahua. (2002). *Investigaciones de la cañihua (Chenopodium pallidicaule Aellen.) en Puno, Perú*. Centros e Institutos de Investigación, Universidad Nacional del Altiplano, Puno.
- Mujica, A. (2004). *Descriptores para la caracterización de quinua (Chenopodium quinoa Willd.)*. Pp.121-136 En: Memorias del Seminario- Taller Nacional sobre Caracterización de los Cultivos Nativos y sus Parientes Silvestres en el Perú. INIA, PNUD-Proyecto *In situ*. Chosica, 19-20 mayo 2004, Lima.
- Mujica A. (2006). *Manual para caracterización in situ de cultivos nativos, conceptos y procedimientos*. Proyecto de conservación in situ de cultivos nativos y sus parientes silvestres. Instituto de Investigación Agraria y Ministerio de la Agricultura.
- Mujica, A. y E. Jacobsen. (2006) *La quinua (Chenopodium quinoa Willd.) y sus parientes silvestres*. Botánica Económica de los Andes Centrales. 449-457.
- Nei, M. (1973). *Analysis of gene diversity in subdivided populations*. *procnatlacadsci usa* 70:3321–3323. doi: 10.1073/pnas.70.12.3321.
- Ortiz, R.; Ruiz-Tapia, E.N. And Mujica-Sanchez, A. (1998). *Sampling strategy for a core collection of peruvian quinoa germplasm*. *Genet* 96: 475-48.
- Phillips W. (1998). *Marcadores Moleculares en Plantas*. CATIE. Turrialba, Costa Rica
- Powell, W.; Morgante, M.; Andre, C.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingey, S.; Rafalsky, A. (1996). *The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis*. *Molecular Breeding*, 2:225-238.
- Powell, W., Machray, G., & Provan, J. (1996). *Polymorphism revealed by simple sequence repeats*. Elsevier Science: 1(7), 215-222.

- Popenoe, H., King, S., León, J., & Kalinowski, L. (1990). *Lost crops of the Incas*. National Academy Press. Washington, pp 415
- Rea, J.; Tapia, M : Mujica, A. (1979) “*prácticas agronómicas*” en quinua y cañihua, *cultivos andinos*. Bogotá: instituto interamericano de ciencias Agrícolas. Serie de libros y materiales educativos N° 49, pp. 83-120.
- Roder, M.S.; Korzun, V.; Wendehake, K.; Plaschke, J.; Tixier, M.H.; Leroy, P. y Ganal, (1998) *Microsatellite map of wheat*. Genetics 149: 2007-2023.
- Röder, M.S.; Plaschke, J., König, S.U.; Börner, A.; Sorrells, M.E.; Tanksley S.D. And Ganal, M.W. (1995). *Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat*. Mol gen genet 246: 327—333.
- Rohfl, F. NTSYS PC (2000). *Numerical taxonomy and multivariable analysis for the ibm pc microcomputers (and compatibles)*, version 2.1 user manual. Stony brook, New York, USA.
- Rojas, W. (2003). *Multivariate analysis of genetic diversity of Bolivian quinoa germplasm*. Food Reviews International. Vol. 19 (1-2):9–23.
- Rojas, J., Beltran, A., Sanchez, Y., Bonifacio, A., Maughan, J., & Fairbanks, D. (2007). Avances en el Estudio de la diversidad genética de la colección boliviana de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) utilizando marcadores microsatélites. Fundación PROINPA (Cochabamba-Bolivia).
- Ruas P., Bonifacio A., Ruas C., Fairbanks D., Andersen W. (1999). Genetic relationship among 19 accessions of six species *Chenopodium* L., by Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPD). Euphytica 105:25–32.
- Ruiz, M., Murillo, A., Corrales, C., Romero, N & Álvarez, A. (2007). Genética de poblaciones amazónicas: la historia evolutiva del jaguar, ocelote, delfín rosado, mono lanudo y piurí, reconstruida a partir de sus genes. Animal Biodiversity and Conservation: 30, (2) 178-189.
- Tapia, M., Gandarillas, H., Alandia, S., Cardozo, A., Mujica, A., & Ortiz, R. (1979). *La Quinua y la Kañiwa cultivos andinos*. Centro internacional de investigaciones para el desarrollo (CIID). Bogotá- Colombia, pp63-67
- Tapia, M., Mujica, a. y canahua, (1980) “*origen de distribución geográfica y sistemas de producción de la quinua*”. En I reunión sobre genética, y Fito mejoramiento en la quinua. Puno: Proyecto de investigación de los sistemas de cultivos andinos, Publicación N° 1.

- Tapia, M., (1997) cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Santiago de Chile: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
- Tapia M.E. (2000). *Mountain agrobiodiversity in Peru*. Seed fairs, seed banks, and mountain-to-mountain exchange. *Mountain Res Dev* 20:220-225.
- Zhang, D. (2004). Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol. Evol.* 19:507- 509

ANEXOS

Tabla 6. Datos pasaporte de las accesiones. Puno, mayo del 2016

RECOLECCIÓN DE SEMILLAS					
N°	MUESTRA	CÓDIGO	REPETICIONES	VARIEDAD	PROCEDENCIA
1	1	SSR071CHQ-WI01	R-1	WITULLA	CAMACANI
2		SSR072CHQ-WI02	R-2	WITULLA	CAMACANI
3		SSR073CHQ-WI03	R-3	WITULLA	CAMACANI
4		SSR074CHQ-WI04	R-4	WITULLA	CAMACANI
5		SSR074CHQ-WI05	R-5	WITULLA	CAMACANI
6		SSR074CHQ-WI06	R-6	WITULLA	CAMACANI
7		SSR074CHQ-WI07	R-7	WITULLA	CAMACANI
8		SSR074CHQ-WI08	R-8	WITULLA	CAMACANI
9		SSR074CHQ-WI09	R-9	WITULLA	CAMACANI
10		SSR074CHQ-WI10	R-10	WITULLA	CAMACANI
11	2	SSR101CHP-01	R-1	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
12		SSR102CHP-02	R-2	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
13		SSR103CHP-03	R-3	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
14		SSR104CHP-04	R-4	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
15		SSR105CHP-05	R-5	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
16		SSR105CHP-06	R-6	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
17		SSR105CHP-07	R-7	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
18		SSR105CHP-08	R-8	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI
19		SSR105CHP-09	R-9	<i>Ch. petiolare</i>	CAMACANI

Tabla 7. Datos del resultado de cantidad y calidad del ADN. UNALM, diciembre del 2016

N°	<i>Witulla</i>		<i>Ch. petiolare</i>	
	concentración en ng/μl	pureza	concentración en ng/μl	pureza
1	130	1.83	80	2.29
2	109	1.88	76	1.77
3	65	1.89	92	1.69
4	80	1.83	70	1.87
5	141	1.76	85	2.35
6	107	1.81	148	1.83
7	91	2.10	217	1.73
8	72	1.72	92	1.93
9	130	1.72	159	1.86
10	95	1.91	207	1.85

Tabla 8. Catálogo de primers citados por Mason et al, 2005

N°	Primer's	Forward	Reverse	Ref. bibliográfica
1	QCA005	GTG GTT CAT GGC TGA TCC TT	CTT GCC ATC AGG GCA TAT CT	Mason et al, 2005
2	QCA012	TCC CAT ATG CCT ACG TAG CAA	TGG TCA TCA ACA TCC AAA GG	Mason et al, 2005
3	QCA013	TCC GAA CTA TGA AAT CTG ACT CTG	TCC GAA CTA TGA AAT CTG ACT CTG	Mason et al, 2005
4	QCA015	TGG GAC CCT GAT AGC TTG AC	TGT CCT TTG CAT GTG CTA TGA	Mason et al, 2005
5	QCA021	CAG GGT ATC AGA ATA CTG GGA AA	CCA AGA TTG GAG GAC AGG AA	Mason et al, 2005
6	QCA026	TTC CAA TAC AGC ACC ACC TC	TCG AAG CAT ACA TAA GAC AGT CA	Mason et al, 2005
7	QCA027	ATT GCT CCA AAC CTG CAA A	TTT CGG GAT ATA TGA GGC TGT	Mason et al, 2005
8	QCA029	TCT ACT TGC AAC CCG AAT GTC	CGC AAA GCA AAT CAG GTA CA	Mason et al, 2005
9	QCA030	TCA TTG GTT AGA TGG TGG AAT G	CCC TCT AGT GCA TAG GAG TTT CTG	Mason et al, 2005
10	QCA034	AGG GAG AAT GCG GAG AAG A	TCA ACA AAC AAG CAC GAA GG	Mason et al, 2005
11	QCA040	TGT GGT GAC AAG CAA CTT TGA	AAC CTA CTT CAA TTA GAC CAA CTT CC	Mason et al, 2005
12	QCA046	GCA GGT AAA TCA ACC CTT GC	TGC ATG ATA AAC TAA GCA GAC GA	Mason et al, 2005
13	QCA048	ACA ATA CAT ACA TAA CCC AAT ATT CAA	TGG AAA TGT CAC TAT GAT TGG A	Mason et al, 2005
14	QCA052	TGA TTT CAG AAA CTG ATT TCA T	GCA CCT CCT TAA ACA CAC TT	Mason et al, 2005
15	QCA053	AGA TGT GGT GCG TTG GAT CT	AAG GAG AGC TCT AAC CGC TTG	Mason et al, 2005
16	QCA055	GGG CAT ATC TGA AGA GAA TCC A	ACG CAG GTA GCA CTT CCA GT	Mason et al, 2005
17	QCA056	TTG GAA GAG CTC CAC AAG GT	CCT CTG AAT AGG ATA CCC TTC TGT	Mason et al, 2005
18	QCA058	CTC GAC CAG CAG GGT CTG	CTA GCT AGG CGT TGC CTG AC	Mason et al, 2005
19	QCA066	AGA GTT CTT ACA TAA GGG AAG AGT	TTT CCT TTG GTA GTT TCT TGT T	Mason et al, 2005
20	QCA067	GGC AGA CCT GCT CAC AAC AA	TAT CAA CAG CAA CGG AAG CA	Mason et al, 2005

Tabla 9. Condiciones de amplificación para PCR. UNALM, abril-agosto del 2017

STEP	T°C	TIME	Numer of Cycles
Initial denaturation/ enzyme activation	95	4 min	1
Denaturation	95	30 seg	25 – 40
Annealing	T _m – 5	30 seg	
Extension	72	1 min/k	
Final Extension	72	5 – 15 min	1

- Se probaron diferentes temperaturas de melting para cada marcador molecular

ANEXO 1. Protocolo de extracción del ADN

1. Pipetear 350ul de **Buffer de Lysis A** en un ependorf de 1.5ml (no incluido)
Se pesa el tejido de la planta – utilizar un máximo de 100mg de tejido fresco o congelado; hasta 20mg de tejido liofilizado.
Moler el material por uno de los métodos siguientes:
 - a) Mortero y maja: coloque hasta 100mg de tejido vegetal en nitrógeno líquido y moler a fondo con un mortero y mano de mortero.
 - b) Molino: coloque un máximo de 100mg de tejido vegetal en un vial que contiene perlas de acero inoxidable. El vial y los granos deberán refrigerarse con nitrógeno líquido. La configuración de la rotura mecánica depende del tipo de tejido.
Transferir inmediatamente el tejido en polvo en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml que contiene 350ml del tampón de lisis A. vórtice durante 10 a 20 seg para mezclar completamente.
NOTA: transferir el suelo para el tampón de lisis tan rápidamente como sea posible para evitar la degradación del ADN, puede ocurrir en partículas que se dejan secar sobre las paredes del tubo.
El tejido molido se puede usar inmediatamente en el protocolo de aislamiento de ADN o almacenar a -70°C hasta su uso.
2. Añadir 50ul de **Buffer de lysis B** y 20ul de **RNAsa**.
Opcional: para los tejidos que son resistentes a la rotura mecánica, añadir arena de vidrio al tubo de microcentrifuga y agitar durante 1 min.
3. Incubar la muestra a 65°C por 10 min, mezcla de vez en cuando o usar un baño maria con agitación, la plataforma oscilante o thermomixer.
4. Añadir 130ul de **Precipitation Solution** y la mezcla invirtiendo el tubo 2-3 veces, incubar en hielo por 5 min.
5. Centrifugar durante 5min a 14 000 rpm.
6. Recoger el sobrenadante (por lo general 450 – 550 ul) y transferir a un tubo nuevo, limpio (no incluido). Añadir 400ul de **Plant ADN Binding Solution** y 400ul de **Etanol al 96%** y mezclar bien.
7. Transferir la mitad de la muestra preparada (600 a 700 ul) a la columna de centrifugación. Centrifugar durante 1 minuto a (8000 rpm.) Desechar la solución de seguimiento y aplicar la mezcla restante sobre la misma columna. Centrifugar durante 1 min a 8000 rpm.

Importante: No exceda la fuerza centrífuga relativa especificada.

Nota: Cierre la bolsa con columnas de purificación de ADN , después de usarlas.

8. Añadir 500 ul de **Wash Buffer I** a la columna, centrifugar durante 1 min a 10 000 rpm. Desechar el flujo de filtrado y coloque la columna de nuevo en el tubo de recogido.
9. Añadir 500 ul de **Wash Buffer II** a la columna. Centrifugar durante 3 min a velocidad máxima de 14 000 rpm.

Reomendado: Vaciar el tubo de recogida. Colocar la columna de purificación de nuevo en el tubo y volver a girar la columna de 1 min. A la velocidad máxima de 14 000 rpm.

Desechar el tubo de recogida que contiene la solución de flujo continuo y la transferencia de la columna a un tubo de 1,5 ml de centrifuga estéril.

10. Para eluir el ADN genómico, añadir 100ul de **Elution Buffer** al centro de la membrana de la columna, se incuba durante 5 min a temperatura ambiente y centrifugar durante 1 min a 10 000rpm.
11. Realice una segunda etapa de elución usando 100 ul de **Elution Buffer**. Es posible realizar la segunda elución utilizando el mismo tubo de elución o en un tubo diferente. El ADN purificado está listo para ser utilizado o se almacene a -20°C.

ANEXO 2. Electroforesis en gel de agarosa

Previamente preparar la cámara electroforética, la fuente poder, y demás accesorios para el procedimiento.

1. Preparar el soporte de gel, sellar bien los bordes con cinta maskintape o usar las puertas de fundición.
2. Preparar TBE 1x con Agua destilada (27 ml de agua destilada y 3ml de TBE al 10x)
3. Pesar 0.3 mg de agarosa en papel aluminio, contar con una espátula.
4. Echar a un matraz 30ml de TBE 1x medido en una probeta y agregar la agarosa pesada, mezclar suavemente con movimientos envolventes.
 - Agarosa 1% (equivale a 1gr de agarosa y llevar a 100ml con TBE 1x en la probeta)
5. Llevar al microondas por unos 25 segundos aproximadamente hasta diluir bien la mezcla y obtener una solución transparente, usar guantes y protegerse (evitar mirar el matraz de frente)
6. Esperar que se enfríe o enfriar con agua de caño a chorro.
7. Agregar 0,8 ul de Bromuro de Etidio a la preparación de agarosa, mover para lograr la mezcla homogénea.
8. Echar la agarosa en el soporte del gel o portageles, previamente debemos colocar el peine para formar los pocillos donde se colocaran las muestras, dejar que enfríe y gelifique.
 - El soporte para la agarosa por gelificar debe estar sobre el papel toalla mientras se gelifique.
9. Sacar la cinta maskintape una vez gelificada la agarosa, retirar el peine y llevar a la cámara electroforética.
10. Enumerar las muestras de ADN, homogenizar el eppendorf
11. Ahora debemos agregar a la cámara electroforética el tampón de carga o buffer de corrida (TBE 5x) hasta que cubra el gel y cargar las muestras
12. Para ello preparar el papel aluminio (opcional, hacerlo en tubos de 1.5ml) y enumerar para evitar la confusión
13. Usar 8ul de SALB 1x y añadir 2,5ul de ADN stock, con ayuda de los tips homogenizar rápidamente para evitar la evaporación.
14. Cargar las muestras en los pocillo correspondientes, en el primer pocillo debe de ir el marcador de peso molecular en este caso 0,5ul de **DNA Ladder Plus (100pb)**
15. Colocar la tapa, conectar a los colores correspondientes (rojo con rojo y negro con negro) y enchufar a la fuente poder, configurar a 80voltios y 40watts.
16. Realizar la corrida por unos 45 minutos aproximadamente.
Cumplido el tiempo hacer la lectura en el foto documentador.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

CONSTANCIA

El Jefe de Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina-Lima.

HACE CONSTAR QUE:

La Srta. YESENIA CCAMAPAZA ALMANZA identificada con DNI N° 46471024, bachiller de la Facultad de Ciencias Biológicas – Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, ha realizado la ejecución del proyecto de investigación “**MARCADORES MOLECULARES, EN EL ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE ALELOS REPRODUCIBLES EN DIFERENTES VARIEDADES DE QUINUA**” en las áreas del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina-Lima, durante los meses de Diciembre del 2016 a Agosto del 2017.

Se otorga la presente constancia a petición de la interesada para los fines que considere conveniente.

Lima, 05 de marzo del 2018



Raul Blas, Ph.D.
Full Professor UNALM
Director de la Unidad de Investigación
+511-6147800, x 213, 217 +51 999 422 242 rblas@lamolina.edu.pe
Facultad de Agronomía, Departamento de Fitotecnia

Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM)

www.lamolina.edu.pe

Av. La Molina s/n Lima 12-Perú