

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**MARCADORES MOLECULARES RAPDs ASOCIADOS CON  
TOLERANCIA A TEMPERATURAS ALTAS EN  
*Chenopodium quinoa* Willd - QUINUA**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO

**Presentada por:**

**Bach. KAREN JESSICA JORDÁN QUISPE**

**Asesora:**

**Mgt. JULIA GRISELDA MUÑIZ DURÁN**

**Co- asesor:**

**Ing. RIGOBERTO ESTRADA ZÚÑIGA**

Auspiciado por el Consejo de Investigación de la UNSAAC

**CUSCO – PERÚ  
2015**

## **DEDICATORIA**

A mi familia: Luisa, Hilda, Marina, Mayra, Domingo, Eber y Julio  
por haber sido y ser, el regalo incalculable del infinito amor de

Dios en mi vida ♥.

## AGRADECIMIENTOS

La culminación de la tesis es para mí personalmente el logro más anhelado en los 2 últimos años de vida profesional, que no habría sido posible sin el aporte de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a feliz término. Por tanto considero un privilegio el poder hacer uso de este espacio para tratar de expresar en palabras lo más profundo de mi sentir.

A la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, por abrir sus puertas y aportar a mi desarrollo profesional y personal, a mi Facultad y a mis docentes por haber ampliado mis conocimientos y mi amor por la ciencia.

Agradezco de igual manera a la Mgt. Griselda Muñiz Durán, mi asesora, un gran modelo de cuidado y detalle por encaminarme en el arduo camino que significo para mí la tesis, por su confianza, tiempo, paciencia y los consejos brindados que ayudaron y fueron esenciales a cada momento.

Al INIA en la persona del Ing. Estrada, Co asesor del presente proyecto, por las facilidades brindadas desde un primer momento, Al Ing. Palomino por los conocimientos y consejos sobre técnicas de siembra y al Ing. Gonza por la paciencia y la información brindada.

Al Convenio con el Concejo Interuniversitario de la Comunidad Francesa de Bélgica (CIUF actual CUD) por financiar la compra de ciertos insumos y equipos necesarios para la realización de la presente investigación.

Al Programa de Adaptación al Cambio Climático (PACC) por el apoyo económico brindado y la oportunidad de ser parte de esta gran política de cambio climático.

A mis dictaminantes: M. Sc Jorge Acurio y Blga. Olga Cjuno por su valioso aporte, motivación, apoyo y críticas necesarias para la mejora de este trabajo y a los miembros replicantes del jurado Blga. Emperatriz Madera y

M. Sc. Américo Chacón por las observaciones y críticas que sin duda aportaron al presente.

Al M. Sc. Luciano Cruz por todo el apoyo desde el inicio del proyecto, a la Blga. Maritza Quispe por las aportaciones y sugerencias, a la Blga. Elsa Aguilar por las facilidades brindadas en el uso de sala y equipos a su cargo que fueron necesarios para mi tesis.

Al Mgt. Wilbert Cruz (INIA, Sede EE.UU), por darse el tiempo de transmitir en mi sus conocimientos y destrezas en técnicas moleculares a pesar de la distancia.

A Liz, Yaha y Ronal personas amorosas y lindas que conocí en el camino, cuyos consejos, cariño, ánimos y ayuda en manejo de equipos e informática fueron importantes.

A mis amigos de siempre, Luzbeth, Sandra, Stev, Neftali y Manuel por ser mi soporte emocional en momentos difíciles por su cariño y amistad sincera. A los amigos de clases, Angela, Zarela, Jhon Stev, Paul, Fernando y María a ustedes mil gracias por la compañía y las alegrías vividas en cada recuerdo mío. A mis amigos Walter, Judith, Beysit, Yulin y Mary por la oportunidad brindada de ampliar mi visión.

A mi Tía Charo por la acogida a pesar de las molestias causadas en su casa durante mi estadía en Lima. A mis primas Lisbeth y Rosa por hacer de mi estadía confortable y amena.

Finalmente y por ser un lugar privilegiado, a mi familia: Mi mami querida Luz Marina, mi Papi Eber, mi hermana Mayra, mis abuelitos: Domingo e Hilda, mi recordada Mamá Luisa, mi hermosa madrina Gloria y mi amor Julio, las palabras me quedan cortas para agradecer vuestra compañía y cariño a cada momento de mi vida.

# CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

CAPITULO I: MARCO TEORICO	20
1.1 ANTECEDENTES	21
1.2 EL CAMBIO CLIMÁTICO	23
1.3 LA QUINUA	24
1.3.1 POSICION TAXONOMICA	25
1.3.2 NOMBRES COMUNES	25
1.3.3 ORIGEN DE LA QUINUA	26
1.3.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA	27
1.3.5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA QUINUA	29
1.3.6 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL	30
1.3.5.1 IMPORTANCIA DE LOS AMINOÁCIDOS DE LA QUINUA	31
1.3.5.2 USO TRADICIONAL Y NO TRADICIONAL DE LA QUINUA	33
1.3.7 GENÉTICA DE LA QUINUA Y NIVEL DE PLOIDIA	34
1.4 MARCADORES MOLECULARES	35
1.4.1 RAPD (Polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente)	36
1.4.2 BASE GENÉTICA DE LOS MARCADORES RAPDs	38
1.4.3 DOMINANCIA DE LOS MARCADORES RAPDs	38
1.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	39
1.5.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL	39
1.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN	39

1.5.3	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN	42
1.5.4	ELECTROFORESIS	43
1.5.5	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	43
1.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO	45
1.6.1.	TAXONOMÍA NUMÉRICA	45
1.6.2.	UNIDAD TAXONÓMICA OPERATIVA (OTU)	46
1.6.3.	CARACTERES	47
1.6.4.	MATRIZ BÁSICA DE DATOS	48
1.6.5.	COEFICIENTE DE SIMILITUD	48
1.6.6.	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO	50
1.6.7.	DENDOGRAMA	51
CAPITULO II: MATERIALES Y MÉTODOS		53
2.1	ÁREA DE ESTUDIO	54
2.2	MATERIAL EXPERIMENTAL	54
2.2.1	MATERIAL PARA EL CULTIVO	56
2.2.2	REACTIVOS	56
2.2.3	EQUIPOS	57
2.2.4	OTROS MATERIALES	58
2.3	METODOLOGÍA	59
2.3.1	DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE HOJAS MERISTEMATICAS DE <i>Chenopodium quinoa</i> Willd - QUINUA	60
2.3.2	EXTRACCION DE ADN	60
2.3.3	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ADN EN QUINUA	61
2.3.4	AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE INICIADORES RAPD	63
2.3.5	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.6%	65
2.3.6	EVALUACIÓN DE BANDAS	65
2.3.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	66
2.3.7.1	CONSTRUCCIÓN DE LA MATRIZ BÁSICA DE. DATOS (M. B. D)	66

2.3.7.2	ANALISIS DE SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO	66
CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		68
3.1.	DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE HOJAS MERISTEMATICAS DE <i>Chenopodium quinoa</i> Willd - QUINUA	69
3.2.	CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN	71
3.3.	INICIADORES RAPD CON MAYOR POLIMORFISMO EN QUINUA	76
3.3.1.	FRAGMENTOS DE ADN POSIBLEMENTE ASOCIADOS CON LA TOLERANCIA A TEMPERATURAS ALTAS EN QUINUA	78
3.4.	SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO DE VARIEDADES Y COLECTAS DE QUINUA	80
3.4.1.	SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO DE LAS VARIEDADES DE QUINUA TOLERANTES A TEMPERATURAS ALTAS	84
3.4.2.	SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO DE LAS COLECTAS SIN REGISTROS DE TOLERANCIA A TEMPERATURAS ALTAS	87
CONCLUSIONES		90
RECOMENDACIONES		92
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA		93
ANEXOS		101

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1: Tipo de datos para la codificación de caracteres	48
Tabla 2: Tipo de datos doble estado	48
Tabla 3: Matriz (2 x 2) que muestra las combinaciones posibles al compararse dos OTUs (j y k) para un carácter del tipo doble-estado.	49
TABLA 4: Registro de datos de las variedades y colectas de quinua en estudio	55
Tabla 5: Secuencia nucleotídica de los iniciadores decaméricos empleados para el análisis RAPD del ADN en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd - quinua.	63
Tabla 6: Componentes de la mezcla de reacción para la PCR	64
Tabla 7: Perfil térmico de amplificación	64
Tabla 8: Registro del peso de hojas por variedad y colecta.	71
Tabla 9: Calidad y Concentración de ADN en las variedades y colectas de quinua determinado por espectrofotometría	73
Tabla 10: Registro del polimorfismo en 10 iniciadores RAPD utilizados para el análisis en variedades y colectas de quinua.	76
Tabla 11: Iniciadores RAPD que presentan bandas discriminantes en las 11 variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas	78
Tabla 12: Matriz de similitud de las variedades de quinua de valles interandinos con tolerancia a temperaturas altas	86
Tabla 13: Matriz de similitud de las variedades de quinua del altiplano con tolerancia a temperaturas altas.	86
Tabla 14: Matriz de similitud de las variedades Illpa INIA, INIA 431- Altiplano y Salcedo INIA	87
Tabla 15: Matriz de similitud de la colecta de quinua de Ayacucho sin reportes de tolerancia a temperaturas altas.	88
Tabla 16: Matriz de similitud de la colecta de quinua de Puno sin reportes de tolerancia a temperaturas altas	89



# ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Zonas agroecológicas potenciales de cultivo de Quinua en el Perú	30
Figura 2: Flujograma para el estudio de la taxonomía numérica	46
Figura 3: Semillas de las variedades y colectas de quinua proporcionadas por el PNIA en Cultivos Andinos del INIA	54
Figura 4: Flujograma para la identificación de marcadores RAPDs asociados con la tolerancia a temperaturas altas en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd - quinua	59
Figura 5a y 5b: Germinación de variedades y colectas de quinua	69
Figura 6 Crecimiento 15 días de las variedades y colectas de quinua	70
Figura 7 Obtención de follaje óptimo en las variedades y colectas de quinua a los 35 días.	70
Figura 8: Análisis de calidad y cantidad de DNA mediante el espectrofotometro NanoDrop 2000c de dos variedades de quinua.	74
Figura 9: Electroforesis de calidad de ADN en gel de agarosa al 1% de variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registro de tolerancia	75
Figura 10: Producto de amplificadas con el iniciador OPA- 11 en las variedades y colectas analizadas	77
Figura 11: Producto de amplificación con el iniciador OPR-02 en las variedades y colectas analizadas	77
Figura 12: Bandas polimórficas obtenidas con el iniciador Pr5 en variedades tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registro de tolerancia.	79
Figura 13: Bandas polimórficas obtenidas con el iniciador OPS-03 en variedades tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registro de tolerancia.	80

Figura 14:	Agrupamiento genético de las 11 variedades de quinua con tolerancia a temperaturas altas y 15 colectas sin registros de tolerancia.	83
Figura 15:	Agrupamiento genético de las 11 variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas.	85
Figura 16:	Agrupamiento genético de las 15 colectas de quinua sin registros de tolerancia a temperaturas altas	88
Figura 17:	Agrupamiento genético de las colectas de quinua de Ayacucho sin registros de tolerancia a temperaturas altas	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Acido desoxirribonucleico
Br-et	Bromuro de etidio
CTAB	(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) Bromuro de hexa-decil Tri- metil amonio
dNTP	Desoxirribonucleotidos trifosfatos
EDTA	Ácido Etilen Diamino Tetracético
EEA	Estación Experimental Agraria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
IICA	Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura
IPCC	Programa Intergubernamental de expertos sobre el Cambio Climático
M.B.D	Matriz Básica de Datos.
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PSCNC	Proyecto Segunda Comunicación Nacional de Cambio Climático
PNIA	Programa Nacional de Innovación Agraria
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampón Tris- borato- EDTA
UPGMA	Media aritmética no ponderativa

## RESUMEN

Debido a los actuales cambios en el clima, experimentados y reportados a nivel mundial entre ellos: el incremento de temperaturas, la desertificación, la salinidad de suelos y demás fenómenos naturales, se presume que diversos cultivos al no poseen condiciones para enfrentar dichos cambios, no logran sobrevivir generando un problema en la seguridad alimentaria en el mundo entero; en este contexto de cambio climático y considerando que la quinua es un cultivo manejable y productivo incluso en condiciones adversas, en la presente investigación, se planteó como objetivo identificar marcadores moleculares de tipo RAPD presentes en quinua asociados con la tolerancia a temperaturas altas. Se utilizaron 26 muestras de quinua (11 variedades con tolerantes a temperaturas altas y 15 colectas sin registros de tolerancia), las mismas fueron proporcionadas por el Programa Nacional de Innovación Agraria en Cultivos Andinos del INIA-Cusco.

El ADN genómico total fue extraído por el método CTAB (Doyle & Doyle, 1990) con algunas modificaciones (CIP, 1998). Para determinar la calidad del ADN en las muestras se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio (1 µg/ml) y la amplificación de las 26 muestra se realizó utilizando 20 iniciadores RAPD llegando a seleccionar solo 10 de ellos que resultaron ser los más polimórficos, los cuales generando 86 bandas polimórficas con un tamaño promedio de 400 a 3 500 pb, todas las bandas presentes en el total de muestras fueron scoreadas y asignadas con el valor numérico de 1 a la presencia y 0 a la ausencia de bandas. Los Iniciadores Pr 5 y OPS-03 mostraron la presencia de 4 marcadores moleculares RAPD relacionados posiblemente con la tolerancia a temperaturas altas, estas bandas para el iniciador Pr 5 presentaron tamaños de 950 pb y 458 pb y para el iniciador OPS-03 tamaños de 930 pb y 580 pb.

Se realizó una matriz de datos con el programa NTSYS versión 2.1 usando el coeficiente de similitud de Jaccard, el dendograma fue construido usando el método de ligamiento promedio UPGMA. Los resultados obtenidos a

partir de los datos moleculares agruparon las accesiones en 3 diferentes grupos a un coeficiente de similitud de 0.20, el Grupo 1 ( $G_1$ ) estuvo conformado por 18 accesiones (11 variedades tolerantes a temperaturas altas y 7 colectas sin registros de tolerancia) que presentan características genéticas compartidas, el Grupo 2 ( $G_2$ ) conformado por 7 colectas y el Grupo 3 ( $G_3$ ) por la Col 7 en un grupo independiente.

# INTRODUCCIÓN

La temperatura promedio en el planeta ha aumentado en 0.74 °C, causado por diversos cambios durante la última década (IPCC, 2007). En el Perú la emisión de carbono se ha incrementado hasta en un 53% en los últimos años (PSCNCC, 2009) y en la Región Cusco desde 1965 a la fecha, se ha constatado en la cuenca Urubamba-Vilcanota, un incremento sostenido de la temperatura media que va de 0.01 a 0.04°C por año, precisando que la temperatura anual se incrementará en 1.3°C para el 2030 y 2.2°C para el 2050 (Delgado, 2012).

Se estima que para el 2100 los efectos causados por el cambio climático afectaran gravemente a los sectores productivos de todo el país y entre ellas la zona andina con incrementos de temperatura, tiempos prolongados de sequias, salinidad, aridez, y otros fenómenos; teniendo efecto directo en los cultivos, por eso es preciso elaborar mecanismos de adaptación al cambio climático que permitan salvaguardar los cultivos andinos entre ellos: la quinua que abarca distintas zonas de vida desde la zona Quechua, hasta la zona de Puna Baja, entre los 2600 a los 3900 m. (Jacobsen *et al.*, 2003), en estas condiciones de altiplano y valles interandinos el cultivo tolera rangos de temperatura que van de 4°C hasta 17°C y un pH de 5.5 hasta 8.0 (Apaza *et al.*, 2013).

La quinua es uno de los cultivos más antiguos de la cultura andina, desde hace más de 500 años estuvo marginado al igual que los otros granos andinos como la kiwicha y cañihua. Actualmente la quinua especie nativa de nuestro país ha tomado mayor importancia debido a su alto valor agroeconómico, nutritivo y de exportación (Tamayo, 2010). El contenido de proteína de las semillas de quinua varía entre 14-22%, siendo significativamente mayor que la de los cereales. Sin embargo, la ventaja nutricional más importante de la quinua es la cantidad de aminoácidos esenciales que presenta, los cuales están muy cerca de los recomendados

por la FAO/OMS/ONU para todos los grupos de edad (Gómez y Eguiluz, 2011).

La exportación de quinua ha experimentado un alza en los últimos años, el Perú es uno de los mayores productores de quinua con un 42% de la producción mundial (Mujica, 2005 citado por Tamayo, 2010); los pronósticos ambientales que presagian el aumento de la temperatura media en la zona altiplánica y de valle interandino incrementan la necesidad de tener que identificar variedades de quinua con tolerancia a dichos incrementos que además satisfaga la demanda del mercado internacional y contribuya a la seguridad alimentaria del país, El INIA ha logrado introducir variedades de Puno, Cusco y Junín (Altiplano y valle interandino) con éxito a la costa peruana (Lima y Chiclayo). El realizar un estudio molecular de estas variedades significaría conocer la relación que existe entre ellas o la diferencia con colecciones propias del altiplano y valles interandinos mediante el uso de marcadores RAPD.

El uso de nuevas técnicas en biotecnología y específicamente la de los polimorfismos en el ADN aleatoriamente amplificados (RAPD) permitirá establecer una relación genética entre quinua y la característica de tolerancia, y poder identificar secuencias de ADN en aquellas variedades con característica de tolerancia a temperaturas altas.

El objetivo del presente trabajo fue identificar marcadores moleculares de tipo RAPD en quinua asociados con la tolerancia a temperaturas altas en variedades de quinua proporcionadas por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) que actualmente vienen siendo cultivadas a temperaturas altas (en Lima y Chiclayo) en comparación con líneas propias de altiplano y valle interandino que no registran tal característica.

# IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El uso de combustibles fósiles y el crecimiento demográfico son dos factores importantes que han causado el incremento de los Gases de Efecto Invernadero (GEI). Para el 2050 se espera que la población mundial se duplique; en ese momento, alcanzará los 11.000 millones de personas, de las cuales el 90% residirá en países en desarrollo (PSCNCC, 2009). El cambio climático plantea desafíos para la seguridad alimentaria a nivel mundial, proteger la seguridad alimentaria significa evitar que los cambios climáticos y los fenómenos meteorológicos extremos afecten el suministro de alimentos, siendo la temperatura un factor determinante en la distribución geográfica de la gran mayoría de las especies cultivables. Para afrontar estos desafíos es necesario desarrollar estrategias basadas en un mejor conocimiento de nuestros recursos que permitan satisfacer la demanda. Estableciendo desde hoy programas que aseguren la alimentación de la población nacional e internacional con productos altamente nutritivos, sanos y accesibles económicamente.

Actualmente el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) viene evaluado por métodos de selección, la introducción y rendimiento de distintas variedades de *Chenopodium quinoa Willd - quinua* de valles interandinos y altiplano peruano (cuya temperatura de crecimiento va de 4°C a 17°C), a ambientes con temperaturas de 24-25°C, lo que permitirá conocer qué variedades pueden soportar futuros incrementos de temperatura.



## JUSTIFICACIÓN

El altiplano, al igual que otras regiones del Perú y el mundo, viene siendo afectada por el cambio climático, lo que implica aumentos de temperatura, irregularidad de lluvias y mayores vientos en época de cultivo; por ello es importante que se estudie adecuadamente el cultivo de quinua desde su genética molecular, para su mejor aprovechamiento.

Hoy en día la producción preliminar de quinua en el Perú es de 33.920 toneladas siendo las regiones con mayor producción de quinua Puno, Junín y Cusco (Esteban *et al.*, 2001 citado por Tamayo, 2010) donde Puno concentra el 80% del área cosechada y el 81% de la producción nacional (MINAG, 2009 citado por Tamayo, 2010). Asegurar la producción de quinua en dichas regiones, evitando que sean afectadas por el aumento de las temperaturas registradas, permitirá continuar satisfaciendo el mercado nacional e internacional y permitirá además ampliar el área cultivable.

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN fácilmente detectables cuyo mecanismo hereditario puede ser analizado (González y Pita, 2001). Dichas secuencias pueden ser genes o fragmentos de ADN, cuya codificación no se conoce y se transmiten con un comportamiento mendeliano pudiendo generar patrones polimórficos y monomórficos (Ferreira y Grattapaglia, 1998 citado por Tamayo, 2010). Un marcador molecular es toda y cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético, dentro de ellos están: los marcadores moleculares basados en ADN, que ayudan a acceder a regiones del ADN tanto codificantes, como no codificantes (Intrones, Zonas de ADN repetitivo, pseudogenes, etc), convirtiéndose en una herramienta potencial para el análisis genético y sus aplicaciones (García-Mas, *et al.*, 2000). Una ventaja de los RAPD es que es una técnica relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia de

ADN, el número de loci que puede ser examinado es ilimitado y no requiere pruebas radiactivas (Whitkus *et al.* 1994 citado por Ochoa *et al.*, 1997).

En esta investigación se planteó como objetivo identificar marcadores moleculares de tipo RAPD en *Chenopodium quinoa* Willd - quinua asociados con la tolerancia a temperaturas altas utilizando para tal fin variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registros de tolerancia, todas provenientes del banco de germoplasma del INIA.

## **HIPÓTESIS**

La tolerancia de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) a temperaturas altas puede ser identificado con marcadores moleculares RAPDs.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

- Identificar marcadores moleculares RAPDs en *Chenopodium quinoa* Willd asociados con la tolerancia a temperaturas altas.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el genotipado con RAPD de 26 variedades de *Chenopodium quinoa* Willd tolerantes y sin registros de tolerancia a temperaturas altas provenientes del banco de germoplasma del INIA.
- Identificar y seleccionar fragmentos de ADN involucrados en la tolerancia a temperaturas altas en *Chenopodium quinoa* Willd.
- Determinar la distancia genética entre variedades de *Chenopodium quinoa* Willd tolerantes a temperaturas altas.

# **CAPITULO I**

## **MARCO TEORICO**

## 1.1 ANTECEDENTES

**Bustinza (2004)** Estudió la diversidad genética en poblaciones de las diferentes variedades nativas y cultivadas de quinua obtenidas de los bancos de germoplasma de Puno y Huancayo empleando marcadores moleculares de tipo RAPD, distinguiendo dos grupos: Variedades de origen peruano situados en el centro del Perú y variedades de origen Boliviano.

**Del Castillo *et al.* (2006)** Realizaron estudios en quinua para determinar la estructura jerárquica de la variabilidad genética presente en ocho poblaciones dedicadas al cultivo de quinua representativas del altiplano y valles interandinos de Bolivia utilizando Marcadores RAPDs mostraron que la quinua presenta una alta variación intra-poblacional debido no solo a la destacada estructura geografía del país sino también a barreras climáticas y orográficas.

**Tamayo (2010)** Realizó la caracterización molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de Quinua (*Ch. quinoa*) mediante la técnica ISSR. Teniendo como resultado el agrupamiento de las accesiones en 3 grupos diferentes. El grupo 1 conformado por 12 accesiones: 5 de Puno, 3 de Cusco, 3 de Cajamarca y 1 de Arequipa; el grupo dos por 2 accesiones de Ancash y el grupo 3 por 2 accesiones: Puno y Arequipa. Siendo la conclusión que el polimorfismo generado por los marcadores ISSR mostró diferentes grados de relaciones genéticas entre las 16 accesiones.

**Nolasco *et al.* (2013).** Evaluó el polimorfismo de seis variedades de quinua (Quillahuaman INIA, Mantaro, Hualhuas, Real Boliviana, Salcedo INIA e Illpa INIA) utilizando la técnica de AFLP, empleando adaptadores para EcoRI y MseI, encontraron tres pares de primers con mayor polimorfismo de los 5 probados. Discriminando la variedad Mantaro como una variedad alejada de las variedades propias del sur del altiplano peruano- boliviano, de acuerdo al análisis de UGPM. Esta combinación de cebadores también discrimino las

variedades Illpa INIA y Salcedo INIA siendo estas variedades obtenidas por cruces de mejoramiento genético.

**Chura et al.** (2014) Evaluó 23 accesiones de quinua (*Ch. quinua Willd.*) entre variedades nativas y parientes silvestres utilizando AFLPs con el objetivo de determinar el grado de parentesco y la distancia genética presente. Obteniendo como resultado un dendograma que diferencia 3 grupos a un coeficiente de similitud de 0.64, presentando variedades cultivadas y parientes silvestres agrupadas en los 3 grupos, concluyendo que las variedades nativas de quinua y sus parientes silvestres comparten un pool de genes y/o ocurre permanentemente introgresión de genes.

**Cruz** (2014) Caracterizó genéticamente variedades de quinua que venían siendo cultivadas en cuatro zonas geográficas del Perú utilizando 05 pares de microsatelites, siendo los iniciador QGA 024 y QAAT 27 los que presentaron mayor número de alelos, con una frecuencia de 28.8 y 21.2 obteniendo 52 marcadores microsatelites que determinando un alto grado de polimorfismo mediante análisis de similitud y el posterior agrupamiento UPGMA a través del software Infostat permitió identificar 3 grupos donde las variedades de altiplano y las de valle interandino se agrupan dentro de este agrupamiento.

## 1.2 EL CAMBIO CLIMÁTICO

Para el Programa Intergubernamental de expertos sobre el Cambio Climático (IPCC), el término “cambio climático” indica cambio en el estado del clima identificable (por ejemplo, mediante análisis estadísticos) a raíz de un cambio en el valor medio y/o en la variabilidad de sus propiedades, persistentes durante un período prolongado. Es decir, indica todo cambio del clima a lo largo del tiempo, tanto si es debido a la variabilidad natural o como consecuencia de la actividad humana. Este significado difiere del utilizado en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMCC), que describe el cambio climático como un cambio del clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana, que altera la composición de la atmósfera mundial y que viene a sumarse a la variabilidad climática natural observada en períodos de tiempo comparables (IPCC, 2007).

Mediante el efecto invernadero, ciertos gases atrapan las radiaciones que emite la tierra caliente, evitando que se pierdan en el espacio exterior. Sin los gases de efecto invernadero (GEI) se estima que la temperatura media de la superficie terrestre sería de  $-19^{\circ}\text{C}$  en vez de los  $+14^{\circ}\text{C}$  actuales. El efecto invernadero natural hace posible la vida en nuestro planeta. Sin embargo, la quema de combustibles fósiles, la destrucción de los bosques, los cambios de usos del suelo, la producción de residuos y la emisión de ciertos gases artificiales, son factores que magnifican el efecto invernadero (Calentamiento Global), amenazando actualmente la salud del planeta (IPCC, 2007).

Observaciones efectuadas en todos los continentes, evidencian que numerosos sistemas naturales están siendo afectados por cambios del clima, particularmente por variaciones de temperatura. Se dice que la temperatura promedio en el planeta ha aumentado en  $0.74^{\circ}\text{C}$  causado por la emisión de Gases de Efecto Invernadero (GEI) incrementadas desde la era preindustrial en un 70% (IPCC, 2007); mientras que en el Perú la emisión de carbono se ha incrementado hasta en un 53% en los últimos años, según estudios actualizados recientemente por el Inventario Nacional de Emisiones de GEI y en la Región Cusco desde 1965 a la fecha, se ha constatado en la cuenca



Urubamba-Vilcanota, un incremento sostenido de la temperatura media que va de 0.01 a 0.04°C por año, precisando que la temperatura anual se incrementará en 1.3°C para el 2030 y 2.2°C para el 2050 (Delgado *et al.*, 2012).

La amenaza del cambio climático global ha causado preocupación entre los científicos ya que variables climáticas claves para el crecimiento de los cultivos como precipitación y temperatura, serán severamente afectadas e impactarán la producción agrícola. Aunque los efectos de los cambios en el clima sobre la producción de cultivos varía ampliamente de una región a otra, se espera que los cambios anticipados tengan grandes efectos y de gran envergadura (Altieri y Nicholls, 2009).

Un pronóstico dado por el IPCC (2007) plantea que la productividad de algunos cultivos importantes disminuiría, y con ella la productividad pecuaria, con consecuencias adversas para la seguridad alimentaria, aumentando el número de personas amenazadas por el hambre. La FAO y el INIA (2013) recomiendan promover programas de mitigación al cambio climático que permita salvaguardar la producción de cultivos como la quinua que se presenta con un alto potencial tanto desde sus bondades nutritivas como de su versatilidad agronómica para contribuir a la seguridad alimentaria de diversas regiones del planeta, siendo considerada en el Perú y países productores como la principal fuente de alimento y en la actualidad revalorada y consumida mundialmente (Tamayo, 2010).

### **1.3 LA QUINUA**

*Chenopodium quinua* Willd - quinua fue domesticada por primera vez en los países andinos hace más de 5 000 años. Desde la conquista española fue rechazada y se consideraba simplemente como una “comida india”. La sobrevivencia de este cultivo fue posible gracias a las comunidades campesinas que habitan la zona, quienes en base a sus tradiciones y conocimientos ancestrales sobre el manejo y utilización de esta especie, han logrado evitar su pérdida (FAO, 2011).

La quinua fue cultivada y utilizada por las civilizaciones prehispánicas, y reemplazada por los cereales a la llegada de los españoles, a pesar de

constituir un alimento básico de la población de ese entonces (Tamayo, 2010). Su potencial fue redescubierto durante la segunda parte del siglo XX y desde entonces, el número de países cultivándola pasó de 6 a 13 (FAO, 2011).

### 1.3.1 POSICION TAXONOMICA

Según Tapia (1976) *Chenopodium quinoa* Willd presenta la siguiente posición taxonómica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Sub familia: Chenopodioideae

Género: *Chenopodium*

Especie: *Chenopodium quinoa* Willd

Dentro del género *Chenopodium* existen cuatro especies cultivadas como plantas alimenticias: como productoras de grano, *Ch. quinoa* Willd. y *Ch. pallidicaule* Aellen, en Sudamérica; como verdura *Ch. berlandieri* ssp. *nuttalliae* , en México; *Ch. carnosololum* y *Ch. ambrosioides* en Sudamérica; el número cromosómico básico del género es nueve, siendo una planta alotetraploide con 36 cromosomas somáticos.

### 1.3.2 NOMBRES COMUNES

De acuerdo a Biodiversity International *et al.* (2013), la quinua recibe diferentes nombres comunes que varían según el idioma y la localidad del país. Los más comunes que se encuentran en la literatura son los siguientes:

- Quechua: Kiuna, quinua, parca.
- Aymara: Supha, jopa, jupha, jauira, jiura, aara, ccallapi, vocali.
- Azteca: Huatzontle.

- Chibcha: Suba, supha, pasca.
- Mapuche: Quinoa.
- Español: Quinoa, quínoa, quingua, quiuna, kinoa, triguillo, trigo inca, arrocillo, arroz del Perú, Dahuie, juba, ubaque, ubate, jaira, suba.
- India: Bathu.
- Portugués: Arroz miúdo do Perú, espinafre do Perú, quinoa.
- Inglés: Quinoa, quinua, kinoa, sweet quinoa, Peruvian rice, Inca rice, petty rice.
- Francés: Ansérine quinoa, riz de Pérou, petit riz de Pérou, quinoa.
- Italiano: Quinoa, chinua.
- Alemán: Reisspinat, Peruanischer reisspinat, reismelde, Reissgerwacks, Inkaweizen.

### 1.3.3 ORIGEN DE LA QUINUA

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) descrita por primera vez en sus aspectos botánicos por Willdenow en 1778, como una especie nativa de Sudamérica; tuvo como centro de origen los Andes de Bolivia y Perú (Tamayo, 2010) corroborado por Gandarillas (1979), quien indica que su área de dispersión geográfica es bastante amplia, no sólo por su importancia social y económica, sino porque allí se encuentra la mayor diversidad de ecotipos tanto cultivados técnicamente como en estado silvestre.

Apaza (2000) citado por Tapia y Fries (2007) sostienen que la quinua se originó en las inmediaciones del lago Titicaca y desde allí el cultivo se expandió a todos los países andinos. Jacobsen *et al.*, (2003) indica que la quinua es uno de los cultivos más antiguos de la región Andina, con aproximadamente 5000 años de cultivo, en cuya domesticación y conservación han participado grandes culturas como la Tiahuanaco y la Inca.

Otros autores se refieren a diferentes centros de origen ubicados en los valles interandinos y opinan que las quinuas hubieran sido llevadas

al altiplano del lago Titicaca, constituyéndose este en el gran centro de diversificación (Tapia y Fries, 2007).

La quinua fue ampliamente cultivada en la región Andina por culturas precolombinas y sus granos fueron utilizados en la dieta de los pobladores tanto de valles interandinos, zonas más altas (superiores a 3500 msnm), frías (temperaturas promedio de 12 °C) y áridas (350 mm de precipitación promedio), como en el altiplano (FAO, 2011).

#### **1.3.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

La planta de quinua presenta una altura que varía entre 0.60 a 3.00 m, dependiendo de la variedad, los genotipos, la fertilidad de los suelos y las condiciones ambientales donde crece. La quinua presenta una raíz pivotante, vigorosa, profunda que puede alcanzar hasta 1,80 cm de profundidad, bastante ramificada y fibrosa, lo cual le confiere tolerancia a la sequía y buena estabilidad. Su tallo es cilíndrico en el cuello de la planta y angulosos a partir de las ramificaciones, de coloración variable desde el verde al rojo, muchas veces presenta estrías y también axilas pigmentadas de color, verde rojo o púrpura. Con hojas alternas formadas por peciolo y lámina, los peciolos son largos, finos y acanalados en su parte superior y de longitud variable dentro de la misma planta. La lámina en la misma planta puede tener forma romboidal, triangular o lanceolada, plana u ondulada, algo gruesa, carnosa y tierna, cubierta por cristales de oxalato de calcio, de colores rojo, púrpura o cristalino, tanto en el haz como en el envés (Azcon y Talón, 2008).

La coloración de la hoja es muy variable va del verde al rojo con diferentes tonalidades debido a la presencia de oxalatos de calcio. (Gandarillas, 1979). La inflorescencia en panoja típica, constituida por un eje central y ramificaciones secundarias, terciarias y pedicelos que sostienen a los glomérulos, el eje principal está más desarrollado que los secundarios, ésta puede ser laxa (Amarantiforme) o compacta (glomerulada), existiendo formas intermedias entre ambas. La longitud de la panoja es variable, 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. Las flores son pequeñas alcanzan un tamaño máximo de 3 mm, incompletas, sésiles y desprovistas de pétalos, pueden ser hermafroditas, pistiladas (femeninas) y androestériles, tienen 10% de polinización cruzada. Fruto en aquenio, con forma cilíndrica-lenticular, levemente ensanchado hacia el centro. Constituido por el perigonio que envuelve a la semilla por completo. (Apaza, *et al.*, 2013).

La semilla es de forma lenticular, elipsoidal, cónica o esferoidal y presenta diferentes colores (Azcon y Talón, 2008) con tres partes bien definidas, que son: Episperma, embrión y perisperma.

- Episperma: en ella se ubica la saponina que le da el sabor amargo al grano y cuya adherencia a la semilla varía en cada genotipo (Azcon y Talón, 2008).
- Embrión: está formado por dos cotiledones y la radícula, constituye el 30% del volumen total de la semilla, el cual envuelve al perisperma como un anillo, con una curvatura de 320°, es de color amarillo, mide 3,54 mm de longitud y 0,36 mm de ancho (Azcon y Talón, 2008).
- Perisperma: es el principal tejido de almacenamiento y está constituido principalmente por granos de almidón, es de color blanquecino y representa prácticamente el 60% de la superficie de la semilla (Azcon y Talón, 2008).

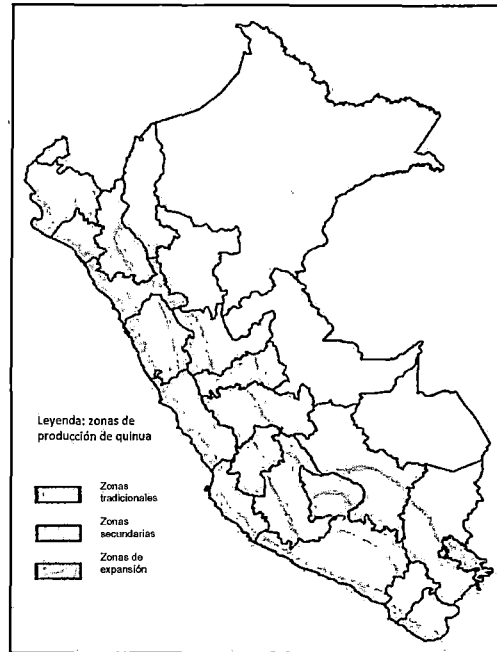
La quinua es una planta herbácea anual, dicotiledónea de amplia dispersión geográfica, Su periodo vegetativo varía desde 90 hasta 240 días, se adapta a suelos ácidos de pH 4,5, hasta alcalinos con pH de 9,0. Asimismo prospera en suelos arenosos hasta los arcillosos, la coloración de la planta es también variable con los genotipos y etapas fenológicas,

desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillo, anaranjado granate y demás gamas que se puedan diferenciar (INIA, 2006).

### **1.3.5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA QUINUA**

La quinua en América del Sur se extiende desde los 5° Latitud Norte, hasta los 43° Latitud Sur (Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina y Chile) y su distribución altitudinal varía desde el nivel del mar hasta los 4000 m, con mayor diversidad en el altiplano de Perú y Bolivia (FAO, 2011).

En el Perú la producción de quinua se concentra principalmente en el altiplano y los valles interandinos, donde se han adaptado variedades procedentes del altiplano. (Apaza, *et al.*, 2013), existiendo una gran diversidad genética del cultivo de quinua cuya distribución se observa en la Figura 1, El INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria) señala la presencia de 100 cultivares y alrededor de 3000 ecotipos, registrados para el Perú (Nolasco *et al.*, 2013). En 08 bancos de germoplasma que se encuentran en las Estaciones Experimentales del INIA: en Illpa (Puno), Andenes (Cusco), Canaán (Ayacucho), Santa Ana (Huancayo) y Baños del Inca (Cajamarca), y en la Universidad Agraria La Molina de Lima, la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y la Universidad Nacional del Altiplano de Puno (Gómez y Eguiluz, 2011).



Fuente: Apaza *et al*, 2013

**Figura 1: Zonas agroecológicas potenciales de cultivo de Quinoa en el Perú**

### 1.3.6 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL

La quinua posee altas cualidades nutracéuticas (Tamayo, 2010) por su contenido de ácidos grasos insaturados que ayudan a mantener la fluidez de líquidos en las membranas entre ellos, el ácido linoleico (Omega 6), el ácido oleico (Omega 9) seguidos por el ácido linolénico (Omega 3) y saturados como el ácido palmítico. La quinua es considerada como una de las principales fuentes de proteínas de los pobladores de la región alto andina (Azcon y Talón, 2008). Siendo el único alimento vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales (localizados en el núcleo del grano, a diferencia de otros cereales que los tienen en el exosperma o cáscara, como el arroz y el trigo) (Repo-Carrasco, *et al.*, 2001).

El grano de quinua, las hojas y las inflorescencias son fuentes de proteínas de muy buena calidad. La calidad nutricional del grano es importante por su contenido y calidad proteínica, siendo rico en los aminoácidos lisina y azufrados. La quinua posee un alto porcentaje de fibra dietética total (FDT), lo cual la convierte en un alimento ideal que actúa como un depurador del cuerpo, logrando eliminar toxinas y residuos que puedan dañar el organismo. Produce sensación de saciedad. El cereal en general y la quinua en particular, tiene la propiedad de absorber agua y permanecer más tiempo en el estómago (Jacobsen, *et al.*, 2003).

Entre el 16 y el 20% del peso de una semilla de quinua lo constituyen proteínas de alto valor biológico, entre ellas todos los aminoácidos, incluidos los esenciales, es decir, los que el organismo no es capaz de fabricar y por tanto requiere ingerirlos con la alimentación. Los valores del contenido de aminoácidos en la proteína de los granos de quinua cubren los índices recomendados por la FAO, OMS y ONU para niños en edad preescolar, escolar y adultos (Gómez y Eguiluz, 2011).

Las proteínas de quinua son principalmente del tipo albúmina y globulina. Estas, tienen una composición balanceada de aminoácidos esenciales parecida a la composición aminoacídica de la caseína, la proteína de la leche. Se ha encontrado también que las hojas de quinua tienen alto contenido de proteínas de buena calidad. Además, las hojas son también ricas en vitaminas y minerales, especialmente en calcio, fósforo y hierro (Azcon y Talón, 2008).

#### **1.3.5.1 IMPORTANCIA DE LOS AMINOÁCIDOS DE LA QUINUA**

La excepcional riqueza en aminoácidos que tiene la quinua le confiere propiedades terapéuticas muy interesantes. Entre ellos la lisina el aminoácido esencial más abundante de sus semillas, mejora la función inmunitaria al colaborar en la formación de anticuerpos, favorece la función gástrica, colabora en la reparación celular, participa en el metabolismo de



los ácidos grasos, ayuda al transporte y absorción del calcio e incluso, parece retardar o impedir junto con la vitamina C las metástasis cancerosas, por mencionar sólo algunas de sus numerosas actividades terapéuticas (Azcon y Talón, 2008).

En cuanto a la isoleucina, la leucina y la valina, participan juntos en la producción de energía muscular, mejoran los trastornos neuromusculares, previenen el daño hepático y permiten mantener en equilibrio los niveles de azúcar en sangre, entre otras funciones. Por lo que respecta a la metionina se sabe que el hígado la utiliza para producir s-adenosilmetionina, una sustancia especialmente eficaz para tratar enfermedades hepáticas, depresión, osteoartritis, trastornos cerebrales, fibromialgia y fatiga crónica, entre otras dolencias. Además actúa como potente agente detoxificador que disminuye de forma considerable los niveles de metales pesados en el organismo y ejerce una importante protección frente a los radicales libres. La quinua también contiene cantidades interesantes de fenilalanina (un estimulante cerebral y elemento principal de los neurotransmisores que promueven el estado de alerta y el alivio del dolor y de la depresión, entre otras funciones), de treonina (que interviene en las labores de desintoxicación del hígado, participa en la formación de colágeno y elastina, y facilita la absorción de otros nutrientes) y triptófano (precursor inmediato del neurotransmisor serotonina por lo que se utiliza con éxito en casos de depresión, estrés, ansiedad, insomnio y conducta compulsiva) (Repo-Carrasco, *et al.*, 2001).

La quinua contiene más del triple de histidina que el trigo, que presenta una acción ligeramente antiinflamatoria y participa en el sistema de respuesta inmunitaria (Soto, *et al.*, 2006).

Por lo que respecta a los aminoácidos “no esenciales” la arginina presente también en la quinua, es considerada como un aminoácido casi esencial en la infancia, niñez y adolescencia ya que el organismo no lo puede sintetizar hasta ser adultos, actúa estimulando la producción y liberación de la hormona de crecimiento, además de mejorar la actividad

del timo y de los linfocitos T, participar en el crecimiento y reparación muscular, y actúa como protector y detoxificador hepático. La alanina es fuente de energía para músculos, cerebro y sistema nervioso y la glicina actúa como un neurotransmisor tranquilizante en el cerebro y como regulador de la función motora. Y la prolina es un aminoácido que no contienen otros cereales, participa en la reparación de las articulaciones, es necesaria para la cicatrización de lesiones y úlceras, parece ser eficaz para tratar los casos de impotencia y frigidez, es protector cardiovascular y se utiliza junto a la lisina y la vitamina C para impedir o limitar las metástasis cancerosas (Soto, *et al.*, 2006).

### **1.3.5.2 USO TRADICIONAL Y NO TRADICIONAL DE LA QUINUA**

La quinua es un cultivo andino de alto valor nutritivo, con una calidad proteica sobresaliente y una capacidad de ser transformado en una gran gama de productos (Jacobsen, *et al.*, 2003). Los pobladores alto andinos tradicionalmente utilizan el grano de quinua para elaborar meriendas, refrescos, jugos y de manera especial, buñuelos y postres, dependiente de la disponibilidad del grano de acuerdo a la época del cultivo (INIA, 2006).

En 1996 la quinua fue catalogada por la FAO como uno de los cultivos promisorios de la humanidad, no sólo por sus grandes propiedades benéficas y por sus múltiples usos, sino también por considerarla como una alternativa para solucionar los graves problemas de nutrición humana. La NASA también la incluyó dentro del sistema CELLS (en español: Sistema Ecológico de Apoyo de Vida Controlado) para equipar sus cohetes en los viajes espaciales de larga duración, por ser un alimento de composición nutritiva excelente como alternativa para solucionar los problemas de insuficiente ingesta de proteínas. Existen varios productos derivados de la quinua, como insuflados, harinas, fideos, hojuelas, granolas, barras energéticas, etc.; sin embargo el uso de nuevas tecnologías permite actualmente obtener otros productos más elaborados, como el aceite de quinua, el almidón, la saponina, colorantes de las hojas y semillas,

concentrados proteicos, etc. Estos productos son considerados el potencial económico de la quinua por darle uso a características no sólo nutritivas sino fisicoquímicas que abarcan más allá de la industria alimentaria y ofrecen productos a la industria química, cosmética y farmacéutica (Jacobsen, *et al.*, 2003).

### 1.3.7 GENÉTICA DE LA QUINUA Y NIVEL DE PLOIDIA

Cubero (2003), describe un ejemplo de fenotipo y genotipo de la siguiente manera: El individuo A homocigoto para AA tendrá sus flores rojas; aa las tendrá blancas. A la manifestación del genotipo en forma de carácter visible se le denomina fenotipo. Así pues, a un genotipo AA le corresponde un fenotipo “flor roja”, y al genotipo aa un fenotipo “flor blanca”. El fenotipo es el resultado de las influencias interactivas del genotipo (totalidad de los genes) y del ambiente, asimismo menciona que cuando varios genotipos se expresan de diferente manera en distintos ambientes se dice que hay interacción genotipo-ambiente. El genotipo es la totalidad de los genes, que se encuentran en los cromosomas. Un gen sometido a mutaciones en el transcurso de tiempo, puede tener diferentes estados. Estos estados se llaman alelos. Como la quinua es un tetraploide, un gen puede tener en la misma planta 4 diferentes alelos del mismo gen, uno en cada uno de los 4 genomios. Los alelos pueden expresar de manera dominante, recesivo o aditivo. Si los 4 alelos de un gen son idénticos, la planta es homocigótica para éste carácter. Si un alelo o más son diferentes, la planta es heterocigótica para éste carácter.

Los cromosomas de la quinua se encuentran en el núcleo celular y son los portadores de los genes y por ende de la información hereditaria. La quinua cultivada tiene 36 cromosomas, repartidos en 4 genomios con el número básico de  $x = 9$  cromosomas, quiere decir, la quinua es un tetraploide con  $4x = 36$  cromosomas (IICA, 2005).

Se cree que esta tetraploidia es el resultado de un cruce de dos diferentes especies diploides (con  $2n = 18$ ), por lo tanto la quinua es más

considerada como un alotetraploide con  $2n=4x=36$  cromosomas (Griffiths *et al.*, 2008).

#### 1.4 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN fácilmente detectables cuyo mecanismo hereditario puede ser analizado (Griffiths *et al.*, 2008). Dichas secuencias pueden ser genes o fragmentos de ADN, cuya codificación no se conoce y se transmiten con un comportamiento mendeliano pudiendo generar patrones polimórficos y monomórficos (Griffiths *et al.*, 2008).

Un marcador molecular es toda y cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético, dentro de ellos están: los marcadores moleculares basados en ADN, que ayudan a acceder a regiones del ADN tanto codificantes, como no codificantes (Intrones, Zonas de ADN repetitivo, pseudogenes, etc), convirtiéndose en una herramienta potencial para el análisis genético y sus aplicaciones (García-Mas, *et al.*, 2000)

Actualmente 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 a factores bióticos y abióticos como la tolerancia a enfermedades, producción, calidad, temperatura, etc. Su uso frecuente en la agricultura ha sido útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de cultivos con importancia económica, así también como para la caracterización e identificación de genotipos (Mora, 1998).

Con la llegada de técnicas modernas en biología molecular, surgieron diversos métodos para la detección del polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. Inicialmente la utilización de enzimas de restricción permitió el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de ADN o técnica mejor conocida como RFLP. Luego se desarrolló el proceso de amplificación en cadena utilizando una ADN polimerasa o técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la amplificación de ADN al azar (RAPD),

fragmentos polimórficos de ADN amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otros (Becerra y Paredes, 2000).

Los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, pues no son afectados por el medio ambiente, lo cual confiere una gran ventaja frente a los marcadores morfológicos, ya que se puede evaluar desde los primeros estadios de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, siendo también independientes a la época del año en que se realiza el análisis (Griffiths *et al.*, 2008). Lo que permitirá establecer una relación entre el marcador molecular y una característica de interés de manera rápida y segura, con un ahorro considerable en tiempo y recursos económicos (Ochoa, *et al.*, 1997).

En relación, Sevilla y Holle (2004) menciona que los marcadores moleculares son la principal herramienta utilizada hoy en día en microorganismos, plantas y animales para: caracterización de germoplasma, identificación de genotipos, determinación de pureza, análisis de diversidad genética, mejoramiento genético asistido por marcadores, aislamiento y caracterización de genes específicos para usar en transformación genética, construcción de mapas de ligamiento, identificación de transformantes individuales o su progenie, entre otros.

#### **1.4.1 RAPD (Polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente)**

Esta técnica fue desarrollada independientemente por dos grupos en Estados Unidos, Williams *et al.* (1990), describieron una técnica en el contexto del análisis mendeliano, demostrando la identificación de marcadores genéticos para mapeamiento; la patentaron con el nombre de RAPD o "Random Amplified Polymorphic DNA" (ADN polimórfico amplificado al azar). Welsh & McClelland (1990) a su vez propusieron la denominación más apropiada para la técnica, llamándola AP-PCR ó "Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction" ó Amplificación al azar de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Azofeifa, 2006; Ferreira y Grattapaglia, 1998 citados por Tamayo, 2010).

La modificación de la técnica PCR que dio origen al RAPD se logró al sustituir el uso de un par de oligonucleótidos (primers, iniciadores o cebadores) largos, por un solo "iniciador" corto y con la capacidad de unirse a muchos loci diferentes. El producto de esa unión pueden ser bandas polimórficas o monomórficas (Becerra y Paredes, 2000).

El polimorfismo generado con la técnica RAPD se denominan marcadores RAPDs, y pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (Mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también puede ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde (Waugh y Powell 1992 citado por Azofeifa, 2006). Los RAPD son generalmente marcadores dominantes y presentan un tipo de herencia mendeliana simple (Griffing y Griffing 1994 Citado por Ochoa *et al* 1997).

#### **ELEMENTOS BASICOS NECESARIOS PARA EL ANALISIS RAPD**

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos (Arguedas, 2001; Azofeifa, 2006):

- a. ADN molde: ADN proveniente de la muestra a analizar.
- b. El iniciador: que es un oligonucleótido, con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Debe tener un contenido de al menos un 50% de Guanina-Citocina para funcionar correctamente.
- c. Desoxirribonucleótidos: se requiere de concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena.
- d. Solución buffer
- e. Taq-polimerasa: es una enzima ADN-polimerasa, ADN dependiente termoestable. Tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde a partir de un punto determinado, fijado en este caso, por el iniciador.

La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por varios factores, entre ellos: El número de ciclos de amplificación, la

cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el iniciador y la temperatura (Mora *et al.*, 1995).

La simplicidad de esta técnica ha permitido su uso en el análisis de marcadores moleculares asociados con genes de tolerancia en diferentes cultivos, como: arroz (Yamazaki *et al.*, 1994), frijol (Haley *et al.*, 1994) y tomate (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991), entre otros (autores citados por Ochoa *et al.*, 1997). En palma de aceite se han utilizado los marcadores RAPD para determinar variabilidad genética dentro de la especie (Shan *et al.*, 1994 Citado por Ochoa *et al.*, 1997).

#### **1.4.2 BASE GENÉTICA DE LOS MARCADORES RAPDs**

Para que ocurra la amplificación de un fragmento RAPD en el genoma analizado, las secuencias de ADN complementarias al iniciador arbitrario, deben estar suficientemente adyacentes (Menor a 4 000 pb) y orientadas en direcciones opuesta, de forma que pueda ser posible la amplificación exponencial de ese segmento por la Taq polimerasa. En función de la gran cantidad de ADN, este fragmento amplificado puede ser visualizado por una fuente de luz ultravioleta, autofotografía o tinción de plata, en forma de una banda en gel de electroforesis, por lo general este gel es de agarosa a concentraciones que varían, logrando visualizar fragmentos de dimensiones entre 200 – 3 500 pb (Ferreira y Grattapaglia, 1998, citados por Tamayo, 2010).

#### **1.4.3 DOMINANCIA DE LOS MARCADORES RAPDs**

El polimorfismo detectado con marcadores RAPDs, es generalmente dado por la presencia o ausencia de determinados productos de amplificación de un único locus, los fenotipos homocigotos dominantes y heterocigotos son considerados como una misma clase fenotípica al presentar bandas en el gel. Mientras que los demás alelos de aquel locus ya sea por: mutación, inserción, delección, etc. no se amplifican y no presentan bandas en el gel son considerados como el genotipo recesivo. Esto quiere decir que la técnica RAPD tiende a proveer solamente

marcadores dominantes y que individuos conteniendo cuatro copias de un alelo no son distinguibles cuantitativamente de aquellos que contienen una única copia del alelo, lo que indicaría que esta técnica no permite diferenciar un organismo homocigoto dominante de un heterocigoto (Tingey *et. al.*, 1992 citato por Quispe, 2012).

## **1.5 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR**

### **1.5.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL**

La cantidad y calidad de ADN son afectadas en general por la condición del tejido antes de la extracción, por ello las condiciones más importantes en cualquier técnica para extracción de ADN de plantas es la forma utilizada para coleccionar el tejido vegetal. En la colecta se deben cumplir con algunas condiciones: el material debe ser lo más joven posible, no debe maltratarse, cortarse, ni pulverizarse. Evitando de esta manera que un área mayor de la superficie del tejido se exponga al oxígeno y desencadene procesos oxidativos de polifenoles (Tapia y Fries, 2007).

El material fresco puede ser coleccionado y mantenido en hielo o en un frigorífico durante algunos días hasta ser procesado. Si fuera necesario un almacenamiento prolongado, el material debe ser congelado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante algunas semanas, o a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  indefinidamente y descongelado justo antes de la extracción (Ferreira y Grattapaglia, 1998 citados por Tamayo, 2010).

### **1.5.2 EXTRACCIÓN DE ADN**

La aplicación de las diferentes técnicas empleadas en biología molecular para el análisis del genoma, depende en gran medida de la habilidad para extraer el ADN. Para lo cual se utilizan diversos métodos de extracción dependiendo del tipo de tejido a emplear, una técnica favorable es la metodología CTAB (Doyle & Doyle, 1990) que ha dado buenos resultados en investigaciones con plantas.



Sin embargo uno de los problemas a enfrentar cuando se trabaja con plantas es la composición de la pared celular, la cual dificulta el acceso al interior de las células vegetales (Velazco, 2005). La ruptura o degradación de la pared celular se realiza generalmente mediante la molienda con nitrógeno líquido, hielo seco o con algún método mecánico o eléctrico de molienda (Rogers y Bendich, 1988). El nitrógeno líquido, congela de inmediato la muestra y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación. (Quispe, 2012). Este procedimiento, se puede utilizar en tejido fresco o congelado, por ejemplo semillas, plantulas, tejidos fibrosos o viscosos y hongos (Velazco, 2005). Enseguida, se deben destruir las membranas celulares de manera que el ADN, acompañado de otros compuestos (proteínas, enzimas, carbohidratos), quede disponible (Griffiths *et al.*, 2008).

#### - SOLUBILIZACIÓN DE LAS MEMBRANAS

Se emplea un detergente solubilizador de lípidos con el propósito de liberar el contenido nuclear y disociar la membrana celular. Un método modificado es el método que utiliza un detergente catiónico CTAB (Cetyl Trimethyl ammonium bromide) de carga positiva, muy adecuado para el aislamiento de ADN de alto peso molecular, el cual se pega fuertemente al ácido nucleico, desplazando la proteína previniendo la degradación del mismo. El CTAB se remueve mediante extracciones con cloroformo y el ADN permanece en fase acuosa listo para ser precipitado con etanol (Valadez y Kahl, 2000).

El CTAB utiliza Triz-HCl pH 8.0, para mantener un pH estable, que permite solubilizar las membranas lipoproteíca, la presencia de NaCl en la solución resulta necesaria para la solubilidad y acción del CTAB ya que al ser una sal aumenta el poder iónico de la solución y fortalece la precipitación del ADN (Alagón y Rosas, 2008).

El CTAB junto a los iones  $\text{Na}^+$  forman un complejo con el ADN estabilizándolo y protegiéndolo de ataques enzimáticos y/o químicos (Dellaporta *et al.*, 1983).

#### - INHIBICIÓN ENZIMÁTICA

El ADN debe ser protegido de la acción degradante de las enzimas (endonucleasas) o compuestos secundarios liberados con la ruptura de las células, el EDTA (Etilen Diamino Tetra Acético) que es un quelante por excelencia capta cationes divalentes tales como  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (que actúan como cofactores enzimáticos de las endonucleasas) por tanto inhibiendo la acción de las endonucleasas al no haber cofactores libres (Griffiths *et al.*, 2008).

La mayor parte de las enzimas quedaran inhibidas bajo condiciones de un pH que no sea el adecuado para las enzimas degradantes como las ADNasas, que tienen un pH óptimo de 7 (Cheng *et al.*, 1997).

La forma de inhibir las actividades enzimáticas es usando temperaturas no óptimas para la acción de las enzimas eucariotas como la temperatura de incubación de  $65^{\circ}\text{C}$ , que además de facilitar la homogenización permite solubilizar las membranas con el detergente. Otra forma es utilizar un agente reductor como el  $\beta$ -mercaptoetanol, que protege el ADN de las peroxidasas y polifenoloxidasas (Ferreira y Grattapaglia, 1998 citados por Tamayo, 2010). El  $\beta$ -mercaptoetanol actúa como un poderoso antioxidante, cuyo uso es obligatorio si se desea restringir la acción de las oxidadas y sus subproductos (polifenoles oxidados) contra el ADN (Griffiths *et al.*, 2008).

#### - COMBATIENDO LOS SUBPRODUCTOS

El NaCl junto al CTAB permite en los pasos iniciales la limpieza de polisacáridos (Cheng *et al.*, 1997).

Sin embargo la presencia de otros subproductos también deben de ser eliminados, un componente importante que se adiciona al tampón de

extracción es el PVP, un polímero (Cheng *et al.*, 1997) que tiene efecto antioxidante para reducir el efecto indeseable de la oxidación de compuestos fenólicos como taninos, quinonas y polifenoles (Ferreira y Grattapaglia, 1998 citados por Tamayo, 2010).

### **1.5.3 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN**

Una vez obtenido el material genético, es importante determinar el rendimiento mediante espectrofotometría. La ley de Beer-Lambert indica que la concentración de una molécula en solución depende de la cantidad de luz absorbida de las moléculas disueltas. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Cuando la longitud de la celda en que se disuelve el ADN, es de 1 cm, la absorbancia es igual a la densidad óptica (OD). En el caso de ADN genómico o de doble cadena, una densidad óptica equivale a 50 ug/ml (Griffiths *et al.*, 2008). Se debe considerar el factor de dilución para obtener la concentración en nanogramos/microlitro (ng/ul).

En el caso de algunos equipos como el espectrofotometro Nanodrop, no es necesario diluir la muestra y el equipo nos proporciona directamente la concentración en ng/ul (Aubert, 2013).

Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente  $A_{260}/A_{280}$  para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Los cocientes respectivos del ADN puro van aproximadamente de 1,8 a 2,0 valores que determinan la calidad de ADN extraído (Griffiths *et al.*, 2008).

Complementariamente a esta técnica es necesario evaluar la integridad del ADN extraído mediante una electroforesis en gel de agarosa 1%, observar bandas bien estructuradas es indicador de la pureza o buena calidad de ADN obtenido mientras que barridos o corridas indican presencia de contaminantes en el ADN extraído (Allende, 2014).

El ADN genómico usado para RAPD y SSR puede tener una cantidad media ya que estas técnicas no requieren ADN altamente puro a diferencia de los RFLP y AFLP (Azofeifa, 2006; Tamayo, 2010).

#### **1.5.4 ELECTROFORESIS**

La electroforesis es una técnica comúnmente empleada para la separación, identificación y purificación de moléculas de ácidos nucleicos. Se basa en el hecho de que las moléculas de los ácidos nucleicos están cargadas negativamente y migran hacia el ánodo en un campo eléctrico. La electroforesis del ADN usualmente se realiza en un gel de agarosa o poliacrilamida, inmersa en un buffer salino que permita el establecimiento de un campo eléctrico (Allende, 2014).

Los geles de agarosa y poliacrilamida pueden prepararse en una variedad de formas, tamaños y porosidades y pueden ser corridos a varias configuraciones diferentes. Las elecciones de estos parámetros depende principalmente del tamaño de los fragmentos que se van a separar. Los geles de agarosa de 0.8 a 2.0 % son muy útiles para separar fragmentos de ADN cuyo tamaño está comprendido en el intervalo de 300 a 10 000 pb. Tienen mayor poder de resolución y mayor rango de separación que los geles de poliacrilamida. Se corren usualmente en una configuración horizontal en un campo eléctrico de carga y dirección constante (Alagón y Rosas, 2008).

Los geles se someten a un campo eléctrico que hace migrar los fragmentos de ADN según su tamaño, de modo que los fragmentos grandes migran más lentamente que los fragmentos cortos (Alagón y Rosas, 2008).

#### **1.5.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA**

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Becerra, 2000) por la abreviatura de su nombre en inglés "Polymerase Chain Reaction" es una técnica potente que se ha convertido rápidamente en una de las más utilizadas en biología molecular porque es rápida,

versátil y altamente sensible; además de su bajo costo y sencillez (Ferreira y Grattapaglia, 1998 citados por Tamayo, 2010). Se usa para sintetizar *in vitro* fragmentos específicos de ADN con la finalidad de detectar una secuencia o un gen de interés en el genoma de algún individuo (Griffiths *et al.*, 2008).

Un ciclo de PCR consta de tres etapas: Desnaturalización, Alineamiento y Extensión (Roche Molecular Manual PCR Applications, 1999):

#### - **DESNATURALIZACIÓN**

La solución de reacción contiene moléculas de ADN blanco, polimerasas, iniciadores o primers y nucleótidos. La reacción se calienta a altas temperaturas (90- 95°C) para reducir la doble hélice del ADN a cadenas simples, tornándose accesibles a los iniciadores (Griffiths *et al.*, 2008).

#### - **ALINEAMIENTO O HIBRIDACIÓN**

Se enfría la mezcla de reacción, disminuyendo la temperatura (36- 65°C) lo que permite el apareamiento de los iniciadores con las regiones complementarias a las cadenas del ADN patrón, formándose nuevas cadenas dobles entre los iniciadores y las secuencias. Las polimerasas entonces comienzan a añadir nucleótidos complementarios en estos sitios, fortaleciendo la unión entre los iniciadores y el ADN (Griffiths *et al.*, 2008).

#### - **EXTENSIÓN O ELONGACIÓN**

En este paso la temperatura otra vez es incrementada a 72°C, temperatura ideal para las polimerasas usadas en esta técnica, una de ellas es la Taq polimerasa que se denominó así por la bacteria *Thermus aquaticus* aislada originalmente de aguas termales, vive a 75°C siendo estable a 94°C, lo que ha permitido la automatización del procedimiento ya que la enzima se aplica una sola vez. Conocida también como ADN polimerasa, usa una porción de la cadena simple de ADN como molde

para la síntesis de la cadena complementaria nueva en dirección 5'→3', puede resistir altas temperaturas necesarias para separar las cadenas de ADN permaneciendo en el tubo de reacción. La enzima lee la secuencia de la cadena opuesta y extiende los iniciadores agregando nucleótidos en orden de modo que puedan emparejarse. Al mismo tiempo cualquier unión o pérdida que se forme entre los primers y segmentos del ADN hacen que la unión de la taq-polimerasa se rompa (Valadez y Kahl, 2000; Griffiths *et al.*, 2008; Tamayo, 2010).

Las etapas de la PCR se llevan a cabo, una tras otra, en episodios cíclicos. Haciendo de esta técnica un proceso exponencial que a partir de la amplificación de los productos de cada ciclo anterior amplifica nuevos productos, sirviendo estos como molde para el próximo ciclo de amplificación, esta técnica normalmente, genera bastante producto amplificado después de los 20 o 40 ciclos de PCR (Santos *et al.*, 2004) y se visualizan al someter a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio (Br-et) para ser visualizado con luz ultravioleta (Griffiths *et al.*, 2008).

## **1.6 ANALISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIADO**

El análisis estadístico multivariado se refiere a todos aquellos métodos estadísticos que analizan simultáneamente medidas múltiples (más de 2 variables) de cada individuo. En sentido estricto, son una extensión de los análisis univariados (Análisis de distribución) y bivariados (clasificaciones cruzadas, correlación, análisis de varianza y regresiones simples) (Franco e Hidalgo, 2003). Los métodos estadísticos multivariados más utilizados en estudios biotecnológicos son los coeficientes de similitud, dendogramas y conglomerados (Martínez, 1995).

### **1.6.1. TAXONOMÍA NUMÉRICA**

La taxonomía numérica ha sido definida como la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de estas en taxones mediante operaciones matemáticas,

basándose en el estado de sus caracteres (Sneath y Sokal, 1963 citado por Alagón y Rosas, 2008). La taxonomía numérica se utiliza para eliminar las subjetividades en el proceso de asignar individuos o clases previamente definidos. Al usar procedimientos estadísticos; la clasificación de los individuos en los grupos se hace con objetividad (Sevilla y Holle, 2004).

Básicamente un estudio de taxonomía numérica consta de los pasos mostrados en la figura 2 (Crisci y López, 1983).

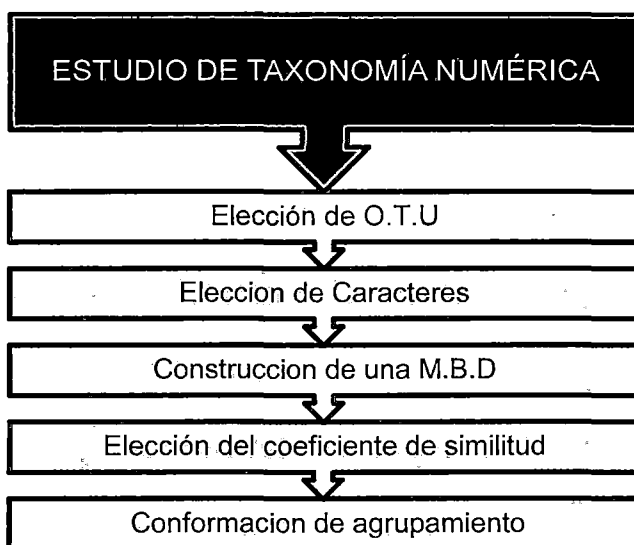


Figura 2: **Flujograma para el estudio de la taxonomía numérica**

### 1.6.2. UNIDAD TAXONÓMICA OPERATIVA (OTU)

OTU es el acrónimo de Operacional Taxonomic Unit, o Unidad taxonómica Operativa. Dicho de una manera práctica son las unidades en estudio. El rango taxonómico de estas dependerá del objetivo del estudio si se quieren caracterizar todas las accesiones de una misma especie existente en un banco de germoplasma. Con el fin de estudiar si existen duplicados, homónimos o sinónimos, cada una de las accesiones será una OTU. Si por el contrario lo que se quiere analizar es la variabilidad interpoblacional de una determinada especie, las OTU serán cada una de dichas poblaciones (González y Pita, 2001). En este caso como lo que interesa analizar es la semejanza entre las variedades de quinua

tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registros de tolerancia, la OTU sería el individuo (Crisci y López, 1983).

### **1.6.3. CARACTERES**

El carácter puede definirse como cualquier propiedad que varía entre OTUs. Los posibles valores que ese carácter pueda presentar se le considera sus estados (Alagón y Rosas, 2008).

La clasificación se hace en base a un gran número de caracteres morfológico, fisiológicos, adaptativos, anatómicos, citológicos, etc. En la genética molecular los caracteres o atributos están relacionados a puntos de referencia en los cromosomas y técnicamente son denominados Marcadores Moleculares con los que se puede estimar la variabilidad genética y otros parámetros poblacionales (Mansilla, 2002) en el entendido que la similitud en el ADN es la mejor evidencia de semejanza filogenética (Alagón y Rosas, 2008).

#### **- CODIFICACIÓN DE LOS CARACTERES (Tipo datos científicos)**

Los caracteres taxonómicos forman parte del universo denominado “datos científicos” y responden a las exigencias de este. El científico observa hechos y los registra en datos, los datos son representaciones simbólicas de los eventos y/o estados y se obtienen por la observación (Kneller, 1978 citado por Alagón y Rosas, 2008). Para tratar estadísticamente los resultados de un estudio de caracterización molecular, los caracteres deben ser correctamente codificados desde el punto de vista numérico. Los datos pueden ser doble estado o multiestado, tal como se presenta en la Tabla 1 (Alagón y Rosas, 2008).



Tabla 1: Tipo de datos para la codificación de caracteres

TIPO DE DATOS		
<b>Datos Doble Estado</b>	Presencia- Ausencia	
	Estados Excluyentes	
<b>Datos Multiestado</b>	Cualitativos	Sin secuencia lógica
		Con secuencia lógica
	Cuantitativos	Continuos
		Discontinuos

Los datos doble estado son llamados binarios o predicados dicotómicos, es decir aquellos que tienen solo dos estados. Pueden indicar Ausencia/ Presencia y estados excluyentes tal como se presenta en la tabla 2 (Alagón y Rosas, 2008).

Tabla 2: Tipo de datos doble estado

Carácter	Estado	Codificación
	Presencia	1
	Ausencia	0

#### 1.6.4. MATRIZ BÁSICA DE DATOS

Una Matriz Básica de Datos (M.B.D) es una matriz rectangular, es decir una matriz  $n \times t$ , donde  $n$  (filas) representan a los caracteres y,  $t$  (columnas) representan a las OTUs analizadas. Por tanto la matriz recoge el valor de cada carácter en cada una de las OTU (González y Pita, 2001).

#### 1.6.5. COEFICIENTE DE SIMILITUD

La utilización de métodos numéricos se basa fundamentalmente en el estudio y cálculo de la distancia genética entre las entidades taxonómicas. Estos métodos numéricos son procedimientos matemáticos que permiten cuantificar el parecido o similitud entre unidades taxonómicas (Crisci y López, 1983).

Existen diferentes tipos de coeficientes basados en fundamentos matemáticos como los coeficientes de Distancia, Correlación, siendo los

más utilizados en marcadores moleculares RAPDs, los coeficientes de Asociación (Mansilla, 2002).

### - COEFICIENTE DE ASOCIACIÓN

Estos miden la similitud entre cada par de individuos. El coeficiente de asociación mide las coincidencias y diferencias en los estados de los caracteres entre dos OTUs, cuando estos tienen solo dos estados para cada característica los que son Presencia (codificado con 1) o ausencia (Codificado con 0) (Sevilla y Holle, 2004). Si se compara un carácter de doble estado de dos OTUs j y k, se presentan cuadro posibilidades:

Tabla 3: Matriz (2 x 2) que muestra las combinaciones posibles al compararse dos OTUs (j y k) para un carácter del tipo doble-estado.

		OTU k		
		1	0	
OTU j	<b>Presencia (1)</b>	1,1 (a)	1,0 (b)	a + b
	<b>Ausencia (0)</b>	0,1 (c)	0,0 (d)	c + d
		$a+c$	$b+d$	
$m = a + b + c + d$				

Dónde:

- m            Total de caracteres analizados en ambas OTUs
- 1,1 (a)      Ambos OTUs tienen el carácter comparado.
- 1,0 (b)      El carácter está presente en el primer OTU y ausente en el segundo.
- 0,1 (c)      El carácter está ausente en el primer OTU y presente en el segundo.
- 0,0 (d)      Ambos OTUs presentan ausencia del carácter comparado

El coeficiente varía de 0 a 1, siendo el valor 1 el que expresa la máxima semejanza entre dos OTUs (García, *et al.*, 1994).

## - **MATRIZ DE SIMILITUD**

Con los valores de similitud obtenidos con el coeficiente de asociación para los pares posibles de OTUs ordenados en forma tabular se elabora la matriz de similitud (Gonzales y Pita, 2001). Los valores tabulados para la matriz de similitud varían entre uno (1) y cero (0), siendo el valor de 1 el de máxima similitud y 0 el valor mínimo. (Franco e Hidalgo, 2003) los valores de la diagonal representan a cada OTU comparada consigo misma, este valor corresponde al de máxima similitud (Crisci y López, 1983).

### **1.6.6. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO**

La matriz de similitud es insuficiente para expresar relaciones entre la totalidad de las OTUs, pues solo expone similitudes entre pares de dichas unidades, es por esto que con la finalidad de permitir el reconocimiento de las relaciones entre la totalidad de las OTU se dispone de infinidad de técnicas de análisis de matriz de similitud (Quispe, 2012).

El análisis de agrupamiento o cluster analysis comprende técnicas que siguiendo reglas más o menos arbitrarias, forman grupos de OTUs que se asocian por el grado de similitud. Las técnicas de agrupamiento más utilizadas son (Quispe, 2012):

- **TÉCNICAS EXCLUSIVISTAS:** Originan grupos donde las OTUs son exclusivas del grupo del cual forma parte y no pueden pertenecer a otro grupo que se halle en un mismo rango o nivel (Alagón y Rosas, 2008).
- **TÉCNICAS JERÁRQUICAS:** Originan conjuntos que presentan rangos en los cuales las OTUs o grupos de OTUs subsidiarios forman parte de un grupo mayor o inclusivo (Alagón y Rosas, 2008).
- **TÉCNICAS AGLOMERATIVAS:** Son las que partiendo de  $n$  OTUs separadas, las agrupan en sucesivos conjuntos, siempre en

número menor que  $n$  para llegar finalmente a un solo conjunto que contiene a las  $n$  unidades (Alagón y Rosas, 2008).

- **TÉCNICAS SECUENCIALES:** Cada grupo es formado uno a la vez hasta que se agota el conjunto total (Alagón y Rosas, 2008).

Entre las técnicas jerárquicas una de las más sencillas, es la técnica del Pair group (grupo par) en la cual solo puede ser admitida una OTU o un grupo de OTUs por nivel, Esto significa que los grupos formados en cualquier etapa de los agrupamientos contienen solo dos miembros (núcleo), al incorporarse un OTU a un núcleo se forma un grupo (conjunto formado por más de 2 OTUs) al repetirse el proceso hasta la última OTU se obtiene finalmente un dendograma (Gonzales y Pita, 2001).

Existen métodos de ordenamiento para el cálculo de la similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo al que se incorpora. El más utilizado es el UPGMA (Unweigthed Pair Group Method Using Arithmetic Averages) o Media aritmética no ponderada. Según este método el valor de similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo (Crisci y López, 1983).

#### **1.6.7. DENDOGRAMA**

Una vez realizado el análisis de agrupamiento utilizando la matriz de similitud puede representarse gráficamente de varias formas, pero la más utilizada es el dendograma. El dendograma (Fenograma) es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTUs o grupo de OTUs. Los valores de similitud se expresan en una escala que se encuentra en el extremo superior o inferior del gráfico resultante (Crisci y López, 1983).

Los dendogramas son modos alternos de mostrar una multibifurcación como una serie de bifurcaciones en el mismo nivel (Rohlf, 1997). Visualmente se reconocen primero los grandes grupos, es decir los que sean originados a niveles bajos de similitud, luego se analizan dichos grupos separándolos en subgrupos, conjuntos y subconjuntos hasta llegar a los núcleos que representa la máxima similitud hallada en los individuos estudiados (Martínez, 1995). Básicamente un dendograma incluye a dos tipos de gráficos, fenogramas y cladogramas, el primero representa relaciones fenéticas, en cambio en el segundo las ramificaciones están basadas en las conexiones filogenéticas entre las OTUs (Crisci y López, 1983).

# **CAPITULO II**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 ÁREA DE ESTUDIO

El cultivo, la extracción, y la caracterización molecular de *Chenopodium quinoa* Willd - quinua del presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular ambiente C-264 de la Facultad de Ciencias de la UNSAAC.

## 2.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

Los datos de de las 26 muestras de quinua (11 variedades con tolerancia a temperaturas altas y 15 colectas sin registros de tolerancia) se presentan en la Tabla 4. El material vegetal en semillas fue suministrado por el banco de germoplasma del Progranman Nacional de Innovación Agraria en Cultivos Andinos del INIA, todas provenientes de la Estación Experimental Agraria (EEA) Andenes ubicado en el Departamento del Cusco, Provincia de Anta Distrito de Zurite ubicado a 13°26'30" latitud, 72°14'30" de longitud, con una elevación de 3 437 msnm, temperatura promedio máxima anual de 12.5°C y 88 mm de precipitación anual.

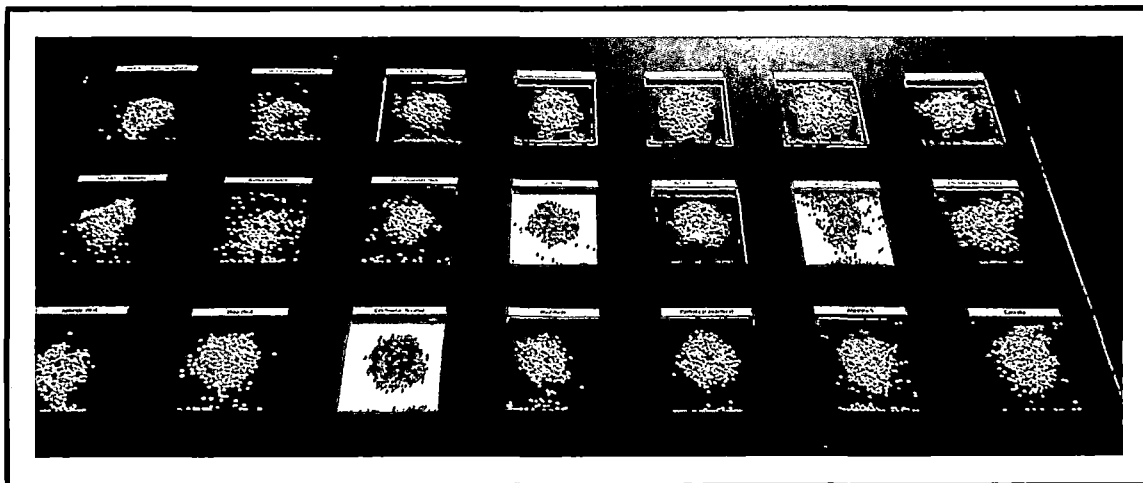


Figura 3: Semillas de las variedades y colectas de quinua proporcionadas por el PNIA en Cultivos Andinos del INIA

TABLA 4: Registro de datos de las variedades y colectas de quinua en estudio

Código	Nombre de la Variedad y Colectas	Lugar de origen	Característica de tolerancia a temperatura alta	EEA Andenes - Cusco						EEA Vista florida- Chiclayo			
				Periodo vegetativo		T°C		Humedad Relativa	Rendimiento t/ha	T°C		Humedad Relativa	Rendimiento t/ha
				Cuantitativo (días)	Cualitativo	T max.	T min.			T max.	T min.		
Var1	Amarilla Marangani	Cusco	Si	190- 210	Tardío	21	4.5	69.4	3.50	27	15	80%	3.49
Var2	Blanca de junin	Junin	Si	160- 180	Semiprecoz	21	4.5	69.4	2.50	27	15	80%	2.53
Var 3	Hualhuas	Junin	Si	160	Semiprecoz	21	4.5	69.4	3.20	27	15	80%	3.51
Var4	Huancayo	Junin	Si	170	Semiprecoz	21	4.5	69.4	2.80	27	15	80%	2.80
Var5	Illpa INIA	Puno	Si	145	Precoz	21	4.5	69.4	3.00	27	15	80%	3.50
Var6	INIA 415 Pasankalla	Puno	Si	144- 120	Precoz	21	4.5	69.4	3.54	27	15	80%	4.00
Var7	INIA 420 Negra Collana	Puno	Si	138- 115	Precoz	21	4.5	69.4	2.0	27	15	80%	2.5
Var8	INIA 427- Amarilla Sacaca	Cusco	Si	160- 170	Tardío	21	4.5	69.4	3.50	27	15	80%	3.90
Var9	INIA 431- Altiplano	Puno	Si	150	Precoz	21	4.5	69.4	3.00	27	15	80%	7.01
Var10	Quillahuaman INIA	Cusco	Si	180- 200	Tardío	21	4.5	69.4	3.50	27	15	80%	3.50
Var11	Salcedo INIA	Puno	Si	150- 135	Precoz	21	4.5	69.4	2.50	27	15	80%	6.50
Col 1	Achachino (RBA)	Puno	No Reportado	S/d (*)	Precoz	21	4.5	S/d (*)	0.65	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 2	Airampo, Cabana	Puno	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	0.20	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 3	Alquipa-5	Puno	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	0.22	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 4	Anicho llave	Puno	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	0.49	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 5	Caccata	Puno	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	0.41	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 6	Chullpi amarillo (N.G)	Puno	No Reportado	S/d (*)	Tardío	21	4.5	S/d (*)	0.54	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 7	Cochillilla	Puno	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	0.30	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 8	Cochiwila, Nicasio	Puno	No Reportado	S/d (*)	Precoz	21	4.5	S/d (*)	0.24	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 9	CQA 002	Ayacucho	No Reportado	S/d (*)	Precoz	21	4.5	S/d (*)	1.24	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 10	CQA 006	Ayacucho	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	1.33	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 11	CQA 017	Ayacucho	No Reportado	S/d (*)	Tardío	21	4.5	S/d (*)	0.80	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 12	CQA 044	Ayacucho	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	1.82	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 13	CQA 057	Ayacucho	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	1.21	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 14	Pomata (Capachica)	Puno	No Reportado	S/d (*)	Semiprecoz	21	4.5	S/d (*)	0.17	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)
Col 15	Sucano Pilcuyo	Puno	No Reportado	S/d (*)	Tardío	21	4.5	S/d (*)	0.23	S/d (*)	S/d(**)	S/d (*)	S/d (*)

(\*) Sin datos

Fuente: EEA Andenes y EEA- Vista Florida (2014)



## **2.2.1 MATERIAL PARA EL CULTIVO**

- Bolsas para almácigos
- Estacas etiquetadas.
- Jiffys (Tierra negra deshidratada)
- Pala pequeña
- Plumón marcador
- Tierra negra

## **2.2.2 REACTIVOS**

### **- PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN**

- Ácido acético glacial (Merck)
- Ácido etilen diamino tetra-acético (EDTA) (Merck)
- Alcohol isoamilico (Merck)
- Bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB) (Merck)
- B-mercapto etanol (Sigma)
- Cloroformo (Merck)
- Etanol absoluto (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- Nitrógeno líquido
- Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma)
- Ribonucleasa A from pancreas (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)
- Tris Base (Sigma)

### **- PARA LA PCR**

- dNTPs (Marca: NEB)
- DNA molde 20 ng/μl
- Enzima Taq DNA polimerasa (Marca:NEB)
- MgCl<sub>2</sub> (Marca: Thermo)
- Primers (Marca: Biolab y Operon)
- Tampón PCR (Marca: NEB)

- **PARA LA ELECTROFORESIS**

- Agarosa ( Merck)
- Ácido bórico (Sigma)
- Bromuro de etidio 10 mg/ml. (Sigma)
- Marcador de peso molecular: DNA de fago Lambda ( $\lambda$ ) Pst I
- Triz HCl (Sigma)
- Triz Base (Sigma)
- Tampón de carga (Azul de bromofenol, Sacarosa)

**2.2.3 EQUIPOS**

- Autoclave (Marca: AutEster. Modelo: 437.p)
- Balanza analítica (Marca: HW Kessel; Modelo: GR-200)
- Cámara de Baño maría (Marca: Memmert, Modelo: W 200)
- Cámara horizontal de electroforesis (Marca: Wealtec, Modelo: GES) con peines de 20 y 30 pozos.
- Centrifuga refrigerada (Marca: Sigma, Modelo: 1-15K)
- Digitalizador de imágenes Gel doc (Marca: BIORAD, Modelo: Gel Doc<sup>TM</sup>XR+) incorporado con una Computadora (Marca: Compac, Modelo: CQ5105LA)
- Termociclador (Marca: Techne, Modelo: TC-412)
- Cámara de flujo laminar (Marca: Telstar, Modelo: Bio-II-A)
- Fuente de poder (Marca: Wealtec, Modelo: Elite 300 Plus)
- Espectrofotómetro Nanodrop (Marca: Thermo, Modelo: 2000c)
- Congeladora a -20°C (Marca: Oliveros)

- Horno Pasteur (Marca: HW Kessel, Modelo: ED-53)
- Destilador (Marca: Thermo, Modelo: A442012)
- Potenciómetro (Marca: Schott instruments Lab 850)
- Vórtex (Marca: LW Scientific, Modelo: TM-2000)

#### **2.2.4 OTROS MATERIALES**

- Contenedor para nitrógeno líquido (Marca: Thermo)
- Espátulas, pinzas y tijeras
- Fiolas de 25, 50 y 500 ml
- Guantes de Nitrilo
- Gradillas y soportes para tubos eppendorf.
- Termobloques para tubos de 1.5 ml y 0.2 ml.
- Matraces erlenmeyer.
- Morteros con sus respectivos pilos
- Pipetas de 1000  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  y 20  $\mu\text{L}$ .y propipetas
- Probetas.
- Puntas plásticas de primer uso estériles para pipetas de 1000  $\mu\text{l}$  100  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  y 1  $\mu\text{L}$ .
- Tubos de micro centrifuga de 0.2 ml y 1.5 ml.
- Vasos de precipitado de 250 ml

## 2.3 METODOLOGÍA

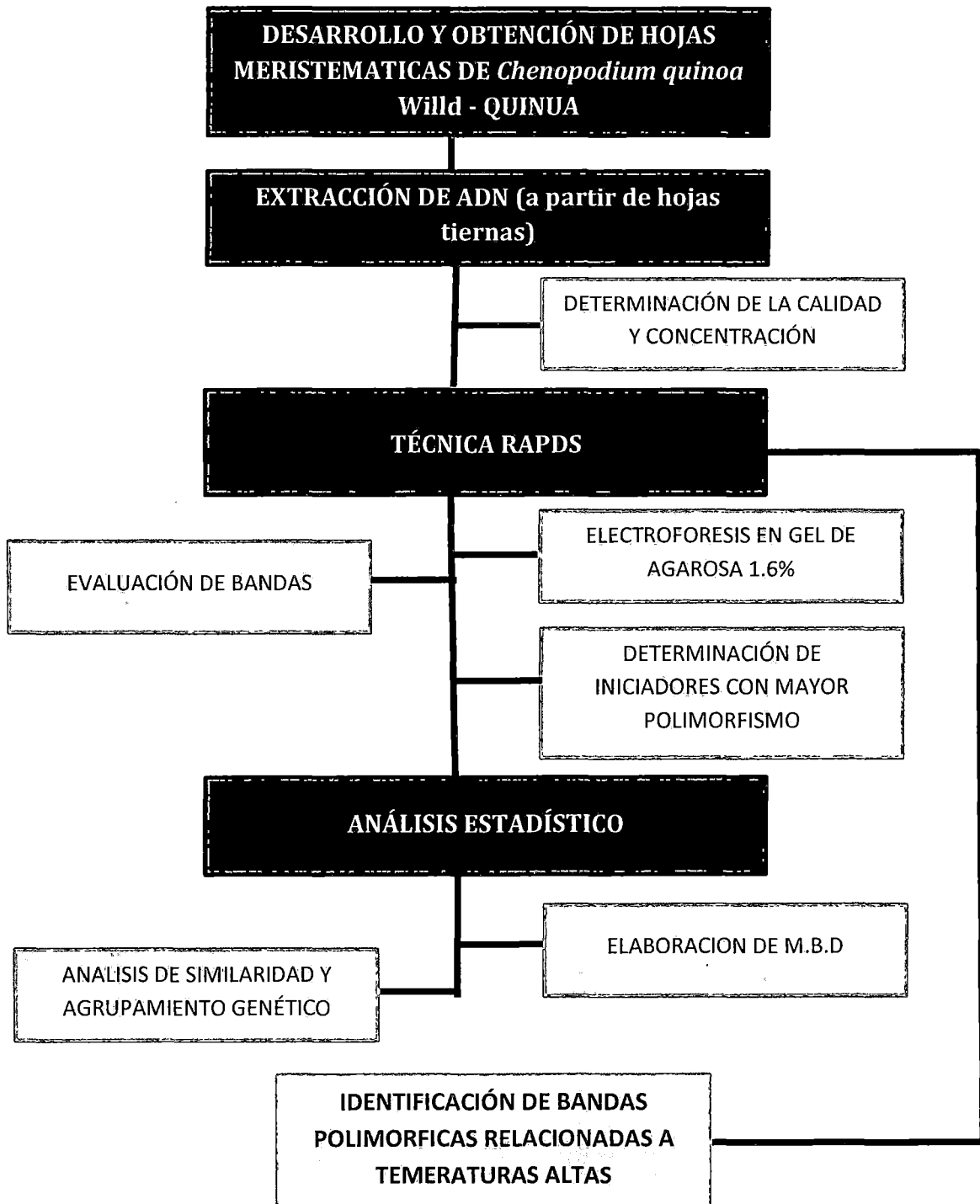


Figura 4: Flujograma para la identificación de marcadores RAPDs asociados con la tolerancia a temperaturas altas en *Chenopodium quinoa* Willd - quinua

### **2.3.1 DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE HOJAS MERISTEMATICAS DE *Chenopodium quinoa* Willd - QUINUA**

Se inició la germinación de las semillas para la obtención del segundo y tercer par de hojas, procediendo según lo propuesto por Palomino (2014).

- a. Las semillas fueron sembradas en Jiffys (Suelo deshidratado) previamente se rotulo y etiqueto con pequeñas estacas.
- b. Para la siembra se hidrataron los jiffys con agua destilada durante media hora, seguidamente se colocó 5 semillas por jiffy, en un total de 10 semillas sembradas por variedad y colecta de quinua.
- c. El riego se realizó cada 2 días.
- d. Posterior a la germinación las plántulas se trasplantaron a bolsas para almácigos de 200 g de capacidad, con tierra negra como sustrato empleado, hasta la obtención del segundo y tercer par de hojas que se dio a los 35 días.

### **2.3.2 EXTRACCION DE ADN**

El ADN genómico total fue extraído por el método CTAB (Doyle & Doyle, 1990) con algunas modificaciones (CIP, 1998). Fue necesario el uso de hojas tiernas y aparentemente sanas ya que estas no contienen aún muchos carbohidratos acumulados, facilitando el aislamiento de ADN.

- a. Se pesó 100-170 mg de tejido vegetal, proveniente de plántulas jóvenes (5 - 10 hojas), las que se trituraron utilizando nitrógeno líquido en morteros previamente enfriados.
- b. Se transfirió el total de muestra obtenida en un tubo de microcentrifuga, para luego agregar 700  $\mu$ L de tampón CTAB 2X (Anexo A) y 2  $\mu$ L de  $\beta$ -Mercaptoetanol.

- c. Las muestras se incubaron en baño maría a 65°C durante 45 min, agitando cada 15 min.
- d. Se agregó 700 µL de cloroformo/alcohol isoamilico (24:1) a cada tubo y se mezcló por inversión (1 min).
- e. Se centrifugo a 1400 rpm por 10 min y el sobrenadante fue transferido en un tubo Eppendorf nuevo, evitando absorber la interface.
- f. Se agregó 50 µL de tampón CTAB al 10% (en NaCl 0.7M), agitando suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.
- g. Los pasos d y e fueron repetidos.
- h. Se agregó un volumen de isopropanol frio (500 - 600 µl) a cada tubo, se mezcló por inversión 30 seg y se dejó en reposo a -20°C por 45 min.
- i. Se centrifugaron las muestras a 1400 rpm por 20 min a -4°C, el precipitado de ADN fue lavado en 1 ml de etanol 70% (3 min), este paso fue repetido dos veces.
- j. Se agregó 1 ml de etanol 90% para continuar el lavado, se centrifugó y eliminó el sobrenadante.
- k. Los tubos conteniendo el pellet se dejaron abiertos e invertidos toda la noche sobre papel secante para que el etanol aun restante en el tubo seque por completo.
- l. Para resuspender el ADN. Cada muestra se precipitó en 50 µL de agua ultrapura y se agregó 2 µL de ARNasa (10 mg/ml) (libre de ADNasa), se agitó e incubó a 37°C por 2 horas.

### **2.3.3 DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DEL ADN EN QUINUA**

La determinación de la calidad o pureza de ADN obtenido en cada variedad y colecta de quinua se hizo mediante la relación entre las longitudes de onda 260/280 y la concentración en ng/ µl de ADN, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop (Allende, 2014).

- a. Se utilizó como blanco agua ultrapura (la misma que se utilizó para la resuspensión del ADN).
- b. Se tomó 1- 2  $\mu$ l de ADN muestra resuspendido, y se colocó en el Nanodrop para la lectura.
- c. Los datos fueron almacenados uno a uno en la computadora conectada del Nanodrop y extraídos posteriormente.

De forma comparativa se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 1 para determinar la calidad del ADN en la extracción, procediendo para tal fin según lo propuesto por el INS (2003).

- a. Se preparó la cámara electroforética vertical en una superficie plana, dentro de ella se colocó la cubeta porta gel con el peine correctamente sujetado.
- b. Se vertió agarosa 1% (Anexo A) y se dejó gelificar por 20 min, luego de lo cual se llenó cuidadosamente la cámara con TBE 1X.
- c. Se retiró el peine, y en cada pozo generado se colocó ADN muestra conjugado con tampón de carga en una proporción 10:1 (9  $\mu$ l de tampón de carga con 1  $\mu$ l de ADN)
- d. En el primer carril se cargó del Marcador de peso molecular de Fago Lambda ( $\lambda$ ) digerido con Pst I
- e. Se corrió a 90V por 30 min.
- f. Los resultados fueron visualizados en un digitalizador de imágenes (fotodocumentador) Gel Doc<sup>TM</sup>XR+System (BioRad). La adecuada calidad de ADN genómico en cada muestra fue determinando por bandas definidas, sin degradación, ni barrido y la concentración se interpretó de manera comparativa con la primera banda del marcador de peso molecular equivalente a 280 ng/ $\mu$ l.

Después de determinar la concentración de ADN en cada muestra todas fueron diluidas a 20 ng/μl, utilizando para tal fin agua libre de nucleasas (CIP, 1998).

### 2.3.4 AMPLIFICACIÓN DE ADN MEDIANTE INICIADORES RAPD

La amplificación del ADN de todas las accesiones, se realizó utilizando 20 iniciadores RAPD (Tabla 5)

Tabla 5: Secuencia nucleotídica de los iniciadores decaméricos empleados para el análisis RAPD del ADN en *Chenopodium quinoa* Willd - quinua.

N°	INICIADOR	SECUENCIA	MARCA
1	Pr 1	5'-TGCCGAGCTG-3'	Gbt oligos
2	Pr 2	5'-AGACGTCCAC-3'	Gbt oligos
3	PR 3	5'-AGTCGTCCCC- 3	Gbt oligos
4	Pr 4	5'-CCCAGTCACT-3'	Gbt oligos
5	Pr 5	5'-TGCGTCCTT-3'	Gbt oligos
6	Pr 6	5'-GGACGACAAG-3'	Gbt oligos
7	Pr 7	5'-TCTGGACGGA-3'	Gbt oligos
8	Pr 8	5'-GGCAGGCTGT-3'	Gbt oligos
9	OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	Operon
10	OPB- 13	5'-TTCCCCCGCT-3'	Operon
11	OPG- 02	5'-GGCACTGAGG-3'	Operon
12	OPM-14	5'-AGGGTCGTTC-3'	Operon
13	OPR-02	5'-CACAGCTGCC-3'	Operon
14	OPR-10	5'-CCATTCCCA-3'	Operon
15	OPS-03	5'-CAGAGGTCCC-3'	Operon
16	OPS-10	5'-ACCGTCCAG-3'	Operon
17	OPS-13	5'-GTCGTTCTG-3'	Operon
18	OPS-19	5'-GAGTCAGCAG-3'	Operon
19	OP BG-06	5'-GTGGATCGTC-3'	Operon
20	OP BG-08	5'-GACCAGAGGT-3'	Operon



## REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN

La Reacción de amplificación se realizó en base a lo propuesto por el CIP (1998)

- a. Se preparó la mezcla de reacción (MMx) en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml de capacidad a partir de soluciones Stock (Tabla 6). Procurando mantener cada componente sobre hielo para mantener su estabilidad.
- b. Se distribuyó 15  $\mu\text{l}$  de la misma en tubos de reacción (0.2 ml) seguidamente se dispensaron 5  $\mu\text{l}$  del ADN (20 ng/ $\mu\text{l}$ ) de las muestras en estudio. Haciendo un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ .
- c. Los cambios de temperatura necesarios para la amplificación se realizaron en un termociclador programado con los periodos de tiempo mostrados en la tabla 7.

Tabla 6: Componentes de la mezcla de reacción para la PCR

SOLUCIÓN STOCK DE COMPONENTES	VOLUMEN POR REACCIÓN ( $\mu\text{L}$ )	CONCENTRACIÓN FINAL
Tampón PCR 10x	2.0	1 X
MgCl <sub>2</sub> 25 Mm	1.2	1.5 mM
dNTPs 10 mM c/u	0.4	0.2 mM
Taq polimerasa 5U/ $\mu\text{l}$	0.1	2.5 unidades/50 $\mu\text{L}$ pcr
RAPD 100 $\mu\text{M}$	1.5	7.5 $\mu\text{M}$
ADN molde	5	20 ng/ $\mu\text{l}$
Volumen final ( $\mu\text{l}$ )	20	

Tabla 7: Perfil térmico de amplificación

CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
1	94 °C	4 min
40	94 °C	1 min
	36 °C	1 min
	72 °C	2 min
1	72 °C	7 min
	4 °C	$\infty$

### **2.3.5 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1.6%**

Los productos de amplificación obtenidos para cada iniciador utilizado se visualizó por electroforesis en geles de agarosa 1.6% (CIP, 1998).

- a. Se ubicó la cámara sobre una superficie plana, protegida de la luz, dentro de la cubeta porta geles se ubicó el peine y se vertió en ella la agarosa al 1.6% (Anexo A) dejando gelificar por unos 20 min. Una vez solidificado el gel se añadió con cuidado el buffer de electroforesis TBE 1X 1cm por encima del gel.
- b. Se mezcló 2  $\mu$ l de buffer de muestra con 10  $\mu$ l de producto amplificado.
- c. Mediante el uso de puntas de 20  $\mu$ l se procedió a cargar cuidadosamente la muestra en los pocillos.
- d. En el primer carril se cargó el marcador de peso molecular de Fago Lambda digerido con Pst I cuyo primer fragmento es de 280 ng/ $\mu$ l como indicador del peso de las banda generadas por el ADN de las muestra. Dicho marcador fue mezclado con su buffer de corrida en las misma proporción que las muestras 6:1.
- e. Se completó la corrida a 90 voltios por 4 horas
- f. Para la revelación del gel, éste fue colocado en un digitalizador de imágenes (fotodocumentador de BIORAD) y por medio del programa Quantity one los geles fueron observados y documentados.

### **2.3.6 EVALUACIÓN DE BANDAS**

Con las imágenes obtenidas del fotodocumentador y almacenadas en el computador se procedió a realizar la evaluación del número de bandas obtenidas para cada iniciador, se seleccionaron aquellos que dieron mejores resultados (los

que presentaron mayor número de bandas polimórficas) (Quispe, 2012).

De igual manera se procedió a identificar las bandas polimórficas presentes en las variedades tolerantes a temperaturas altas y ausentes en las colectas sin registros de dicha tolerancia (Cruz, 2014).

## **2.3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

### **2.3.7.1 CONSTRUCCIÓN DE LA MATRIZ BÁSICA DE DATOS (M. B. D)**

Para cada iniciador se visualizó la presencia y ausencia de bandas y los datos fueron incorporados en una matriz binaria asignando el valor de 1 a la Presencia; 0 a la Ausencia y 9 para datos dudosos (Yee *et al.*, 1999). Asumiendo que el patrón de bandas muestra dominancia, es decir la presencia de una banda representa el genotipo homocigoto dominante y heterocigoto y la ausencia corresponde al genotipo recesivo (Alagón y Rosas, 2008).

Los datos fueron ingresados en una hoja de cálculo Microsoft Excel 2003 siendo la M.B.D construida de 26 filas (Variedad o Colecta) x 86 columnas (marcadores RAPDs).

### **2.3.7.2 ANALISIS DE SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO**

Para el análisis de datos se ingresaron estos a una matriz binomial la cual fue usada para calcular valores de similitud genética entre cada par de genotipos, utilizando el coeficiente de Jaccard incluido en el paquete estadístico NTSYS pc 2.1 utilizando el módulo SIMQUAL para obtener una matriz de similitud y distancia genética (Alagón y Rosas, 2008)

El coeficiente de Jaccard no toma en cuenta a la combinación (0, 0) de todas las posibles comparaciones (Crisci y López, 1983) (Ver tabla 3), siendo la fórmula:

$$Jaccard = \frac{A_{(1,1)}}{A_{(1,1)} + B_{(1,0)} + C_{(0,1)}}$$

En base a la matriz de similitud se realizó el análisis de agrupamiento según el algoritmo UPGMA (Unweighed Pair-Group Method using Arithmetic Averages), del paquete estadístico NTESYS-pc versión 2.1, para la construcción del dendograma (Alagón y Rosas, 2008).

# **CAPITULO III**

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. DESARROLLO Y OBTENCIÓN DE HOJAS MERISTEMATICAS DE *Chenopodium quinoa* Willd - QUINUA

La emergencia de la plántula a la superficie del suelo en las 11 variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas y 15 colectas sin reportes de tolerancia se inicia a los 4 días con la variedad: Var 4 (Huancayo) resultados similares a lo reportado por el INIA quienes indican 4 días hasta la emergencia de la plántula a la superficie del suelo en esta variedad (Apaza, 2013).

Mientras que la emergencia a la superficie del suelo para la Var 1 (Amarillo marangani, Var 3 (Hualhuas), Var 10 (Quillahuaman), Col 1 (Achachino), Col 6 (Chullpi amarillo), Col 7 (Cochillilla), Col 8 (Cochiwilla-Nicasio), Col 9 (CQA002) y Col 12 (CQA 044), se da entre los 5 - 6 días (semi tardía), en el caso de las demás semillas, la emergencia de la plántula se da entre los 7 y 8 días (tardía). Estos resultados están en concordancia con lo reportado por el INIA (Apaza *et al.*, 2013) quienes señalan que los días hasta la emergencia de la plántula a la superficie del suelo en quinua puede ser temprana (3-4 días), semi tardía (5-6 días) y tardía (7-9 días).

Se sembraron 5 semillas por jiffy haciendo un total de 10 semillas por variedad y colecta, como se muestra en la Figura 5a y 5b.

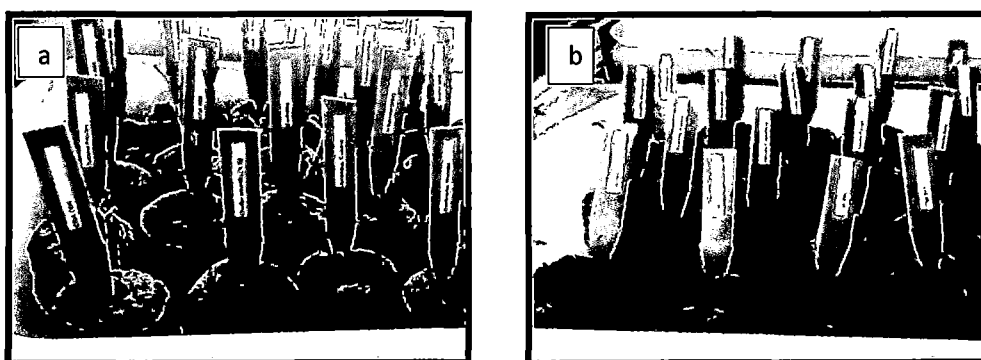
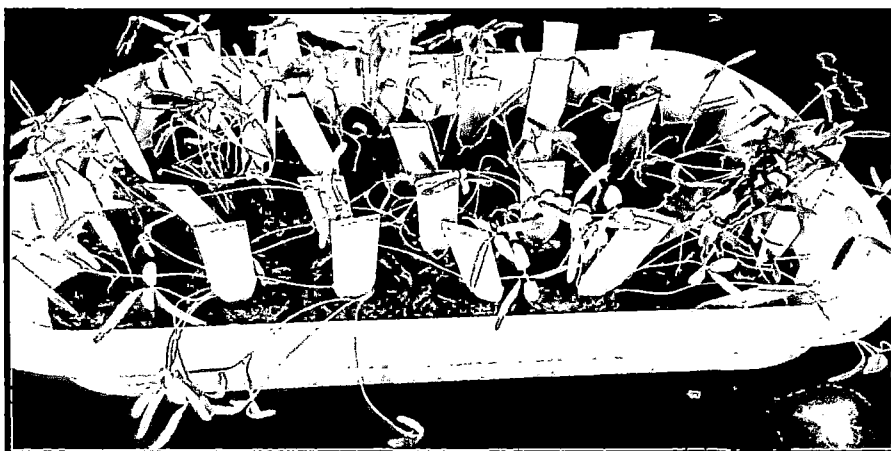
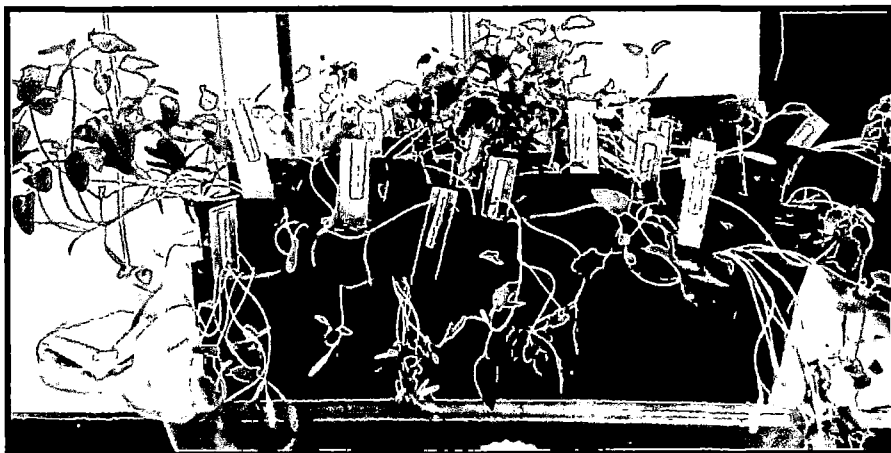


Figura 5a y 5b: Emergencia a la superficie del suelo de las variedades y colectas de quinua

En la Figura 6 y 7 se observa el follaje de las variedades y Colectas de quinua a los 15 y 35 días de desarrollo, en la Figura 6 se ve la presencia del primer par de hojas verdaderas en la Figura 7 ya se observa mayor cantidad de tejido foliar posterior al trasplante de las muestras en bolsas para almácigo de 200 g de capacidad con tierra negra como sustrato. Las plántulas muestran óptimo desarrollo foliar, siendo más abundante en la Var 1, Var 2, Var 4, Var 5, Var 6, Var 9, Var 10, Var 11, Col 6 y Col 15.



**Figura 6 Crecimiento 15 días de las variedades y colectas de quinua**



**Figura 7 Obtención de follaje óptimo en las variedades y colectas de quinua a los 35 días.**

En la tabla 8 se presenta la cantidad de material vegetal (mg) de cada variedad y colectas de quinua utilizada en el presente estudio cuyos valores oscilan entre 100.5 y 166.7 mg, estas cantidades de material vegetal

(5-10 hojas) permitirá obtener concentraciones de ADN superiores a 100 ng/μl, considerado óptimo para aplicar la técnica RAPD (González, 2003).

Tabla 8: Registro del peso de hojas por variedad y colecta.

Código	Variedad	Peso de la muestra (mg)	Código	Colecta	Peso de la muestra (mg)
Var.1	Amarilla Marangani	153.8	Col.1	Achachino (RBA)	105.8
Var.2	Blanca de junin	152.8	Col.2	Airampo- Cabana	105.5
Var.3	Hualhuas	102.3	Col. 3	Alquipa-5	100.5
Var.4	Huancayo	155.0	Col.4	Anicho ilave	101.7
Var.5	Illpa INIA	157.5	Col.5	Caccata	121.2
Var.6	INIA 415 Pasankalla	155.4	Col.6	Chullpi amarillo (N.G)	155.8
Var.7	INIA 420 Negra Collana	100.8	Col.7	Cochillilla	106.5
			Col.8	Cochiwila- Nicasio	140.8
Var.8	INIA 427- Amarilla Sacaca	105.8	Col.9	CQA 002	108.1
			Col.10	CQA 006	101.8
Var.9	INIA 431- Altiplano	166.7	Col.11	CQA 017	111.9
Var.10	Quillahuaman INIA	159.1	Col.12	CQA 044	106.3
Var.11	Salcedo INIA	152.0	Col.13	CQA 057	117.4
			Col.14	Pomata (Capachica)	117.2
			Col.15	Sulcano Pilcuyo	165.8

### 3.2. CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN

En la Tabla 9 se muestra las concentraciones del ADN extraído a partir de tejido foliar de todas las variedades y colectas de quinua determinado por espectrofotometría. Los resultados obtenidos varían de 65.4 a 377.2 ng/μl. Presentando las muestras: Var 7, Col 2 y Col 11 las menores concentraciones, iguales a 117.9, 65.4 y 87.1 ng/μl respectivamente, siendo las variedades y colectas que muestran mayor concentración: Var 1, Var 2, Var 6, Var 9, Var 10, Var 11, Col 4, Col 5, Col 6, Col 7, Col 8, Col 9, Col 13 y Col 14 con valores que oscilan entre 203.5 y 377.2 ng/μl confirmando lo observado en la figura 9 donde se puede apreciar claramente la nitidez y el grosor de la banda en la Var 2,



Var 6, Var 9, Var 10, Var 11, Col 9, Col 8 que en comparación con la primera banda del marcador de Fago ( $\lambda$ ) Pst I sugiere concentraciones cercanas a 280 ng/ $\mu$ l.

Se muestra además la calidad determinada por la relación  $A_{260}/A_{280}$  con valores que se encuentran dentro del rango óptimo (1.8–2.0) en todos los casos, dichos valores indican que el ADN obtenido de cada muestra es de buena calidad, un valor ligeramente inferior indicaría la presencia de proteínas y valores superiores a 2 contaminantes fenólicos (Clark, 1996 citado por Tamayo, 2010).

Se observa que en la Col 2 a partir de 105.5 mg de material vegetal (Tabla 8) se obtuvo 65.4 ng/ $\mu$ l (Tabla 9) de ADN y para la Col 8 a partir de 140.8 mg de material vegetal se obtuvo 377.2 ng/ $\mu$ l pudiendo existir una relación directa entre la cantidad de material vegetal y la concentración final de ADN como indicó Aubert (2013) al evaluar la calidad y concentración de ADN en Tarwi, Maiz, Kañihua y Quinoa considerando que a mayor cantidad de material vegetal, se presenta mayor concentración de ADN. Sin embargo esta relación no se cumple completamente, tal es el caso que en la Var 9 el material vegetal de partida fue 166.7 mg, mayor al material usado en la Col 8, por lo que se esperaba tener más cantidad de ADN, sin embargo se obtuvo 206.4 ng/ $\mu$ l. Probablemente la cantidad obtenida no depende solamente de la cantidad de material vegetal utilizado sino también del cuidado que se tenga al momento de coleccionar las muestras, la lisis celular y el continuismo de la técnica utilizada que evitara la degradación del material genético por acción de las endonucleasas y procesos oxidativos (Valadez y Kahl 2000).

Además debido a que la variación de la relación  $A_{260}/A_{280}$  dentro de rango admisible (1.8-2) está determinada por la composición de nucleótidos del ácido nucleico, se infiere que la calidad de ADN obtenido, no está influenciado por la cantidad de muestra vegetal, sino por la cantidad de bases nitrogenadas púricas o pirimidicas que presente

la muestra de ADN siempre que esta cumpla con los estándares del protocolo propuesto como guía (Allende, 2014).

**Tabla 9: Calidad y Concentración de ADN en las variedades y colectas de quinua determinado por espectrofotometría**

Código	Variedad y Colecta	Concentración de ADN (ng/μl)	260/280
Var.1	Amarillo marangani	257.0	1.92
Var.2	Blanca de Junin	306.8	1.89
Var.3	Hualhuas	166.7	1.98
Var.4	Huancayo	162.1	1.99
Var.5	Illpa INIA	133.2	1.98
Var.6	INIA 415 Pasankalla	208.3	1.97
Var.7	INIA 420 Negra collana	117.9	1.94
Var.8	INIA 427 Amarillo sacaca	146.1	1.99
Var.9	INIA 431- Altiplano	206.4	1.97
Var.10	Quillahuaman INIA	270.0	1.93
Var.11	Salcedo INIA	216.0	1.95
Col.1	Achachino (RBA)	189.7	1.86
Col.2	Airampo, Cabana	65.4	1.86
Col.3	Alquipa-5	188.5	1.91
Col.4	Anicho ilave	329.0	1.99
Col.5	Caccata	311.7	1.96
Col.6	Chullpi amarillo (N.G)	203.5	1.89
Col.7	Cochillilla	213.6	1.98
Col.8	Cochiwila, Nicasio	377.2	1.97
Col.9	CQA 002	367.4	1.89
Col.10	CQA 006	170.9	1.93
Col.11	CQA 017	87.1	1.81
Col.12	CQA 044	157.6	1.94
Col.13	CQA 057	278.8	1.99
Col.14	Pomata (Capachica)	237.5	1.89
Col.15	Sulcano Pilcuyo	152.2	1.88

En la figura 8 se presenta la calidad del DNA obtenido en las variedades y colectas de quinua, se observa que la calidad en ambos casos está dentro de la relación A260/A280 (1.8 a 2.0) considerada aceptable, es decir, DNA puro o de buena calidad (Allende, 2014).

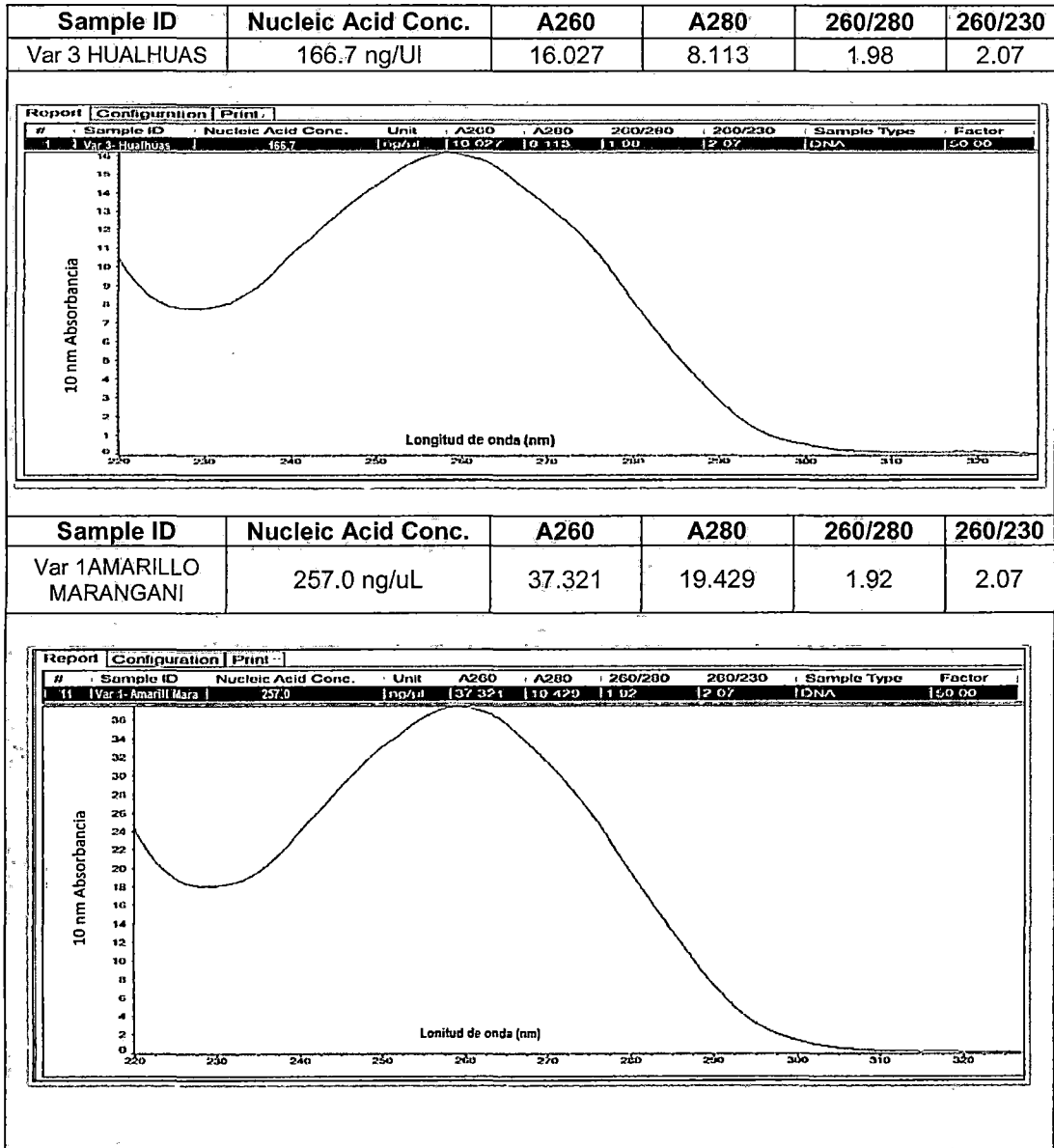


Figura 8: Análisis de calidad y cantidad de DNA mediante el espectrofotometro NanoDrop 2000c de dos variedades de quinua.

La electroforesis para corroborar la calidad de ADN de variedades y colectas, calculados por espectrofotometría en la tabla 9 se presenta en la Figura 9: En el primer carril se observa al Marcador de Peso Molecular del Fago Lambda ( $\lambda$ ) digerido con Pst I que se utilizó para estimar la concentración de los muestras de ADN cuya primera banda tiene una concentración de 280 ng/ $\mu$ l correspondiente a 14 000 pb, en los posteriores carriles se muestra la calidad de ADN de las 11 variedades y 15 colectas de quinua, en cada una de ellas se observa bandas bien definidas, nítidas y con buena intensidad, siendo las menos intensas la banda de ADN mostrada por la Var 7, la Col 2 y la Col 11, probablemente debido a que presentan menor concentración de ADN.

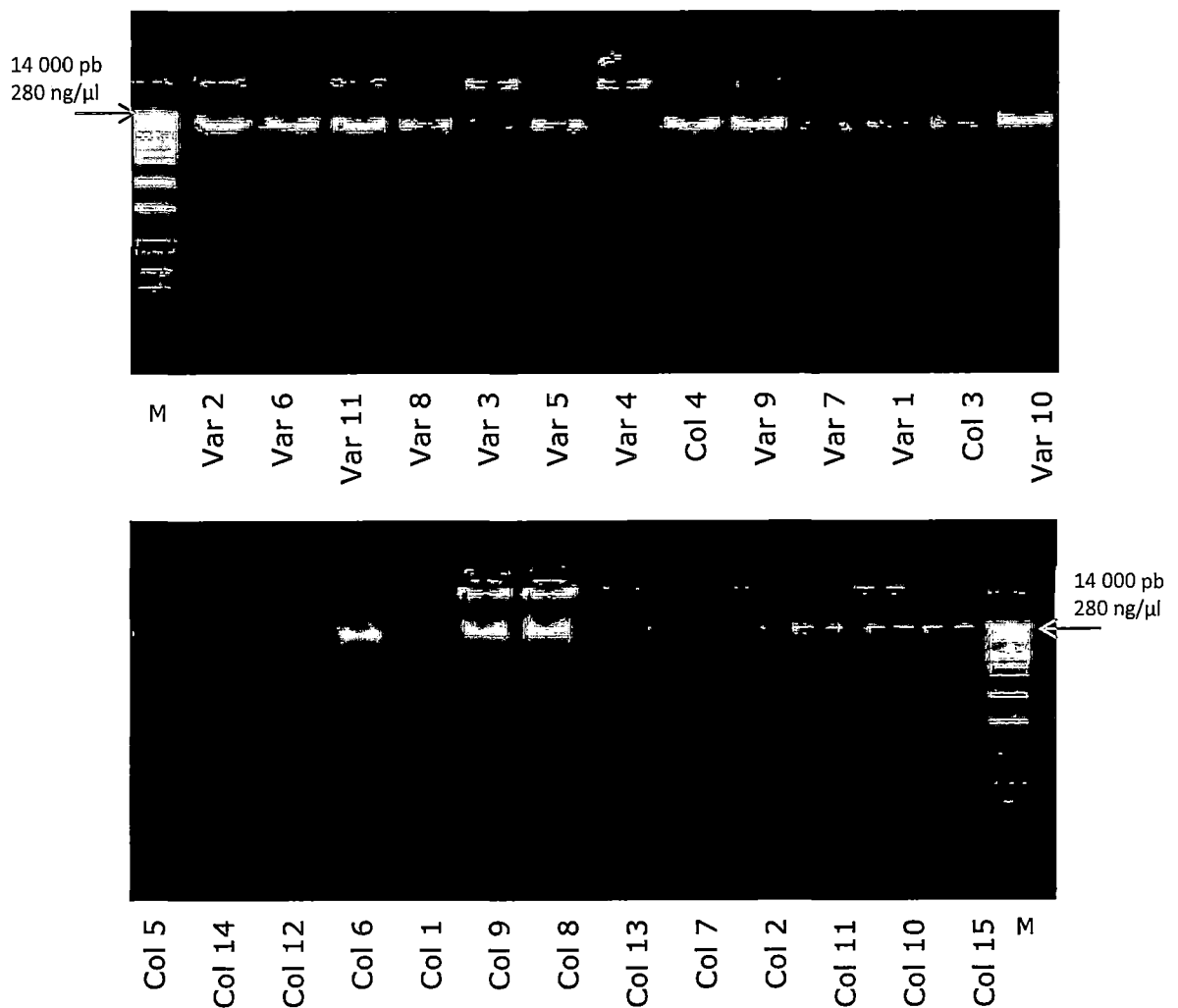


Figura 9: Electroforesis de calidad de ADN en gel de agarosa al 1% de variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registro de tolerancia

### 3.3. INICIADORES RAPD CON MAYOR POLIMORFISMO EN QUINUA

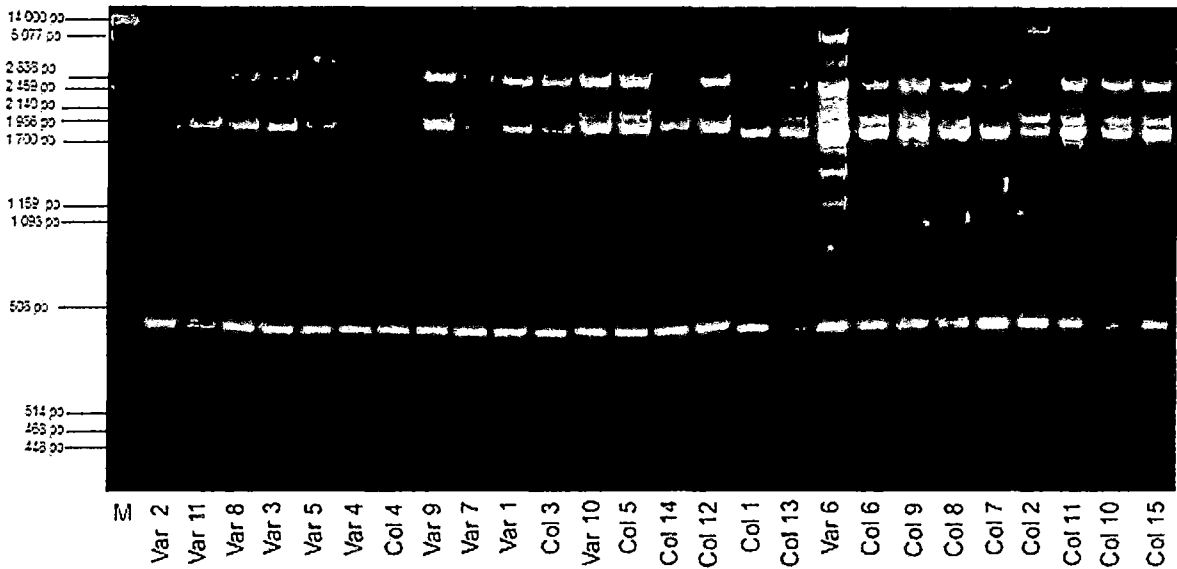
Se probaron 20 iniciadores RAPD, de los cuales 10 (50%) (Pr 1, Pr 2, Pr 4, Pr 5, Pr 8, OPA-11, OPM-14, OPR-02, OPS-03, OPS-13) resultaron más polimórficos e informativos para diferenciar las variedades y colectas de quinua evaluadas, Los otros 10 iniciadores presentaron numerosas bandas monomórficas y ausencia de bandas (sin bandeo), los mismos que fueron considerados como no informativos en el presente estudio.

Se visualizó un total de 187 bandas amplificadas con los 10 iniciadores, de los cuales 86 (46%) fueron polimórficas y las restantes (54%) monomórficas (Tabla 10). Estos valores, indicarían una moderada variabilidad genética dentro de las colectas y variedades de quinua.

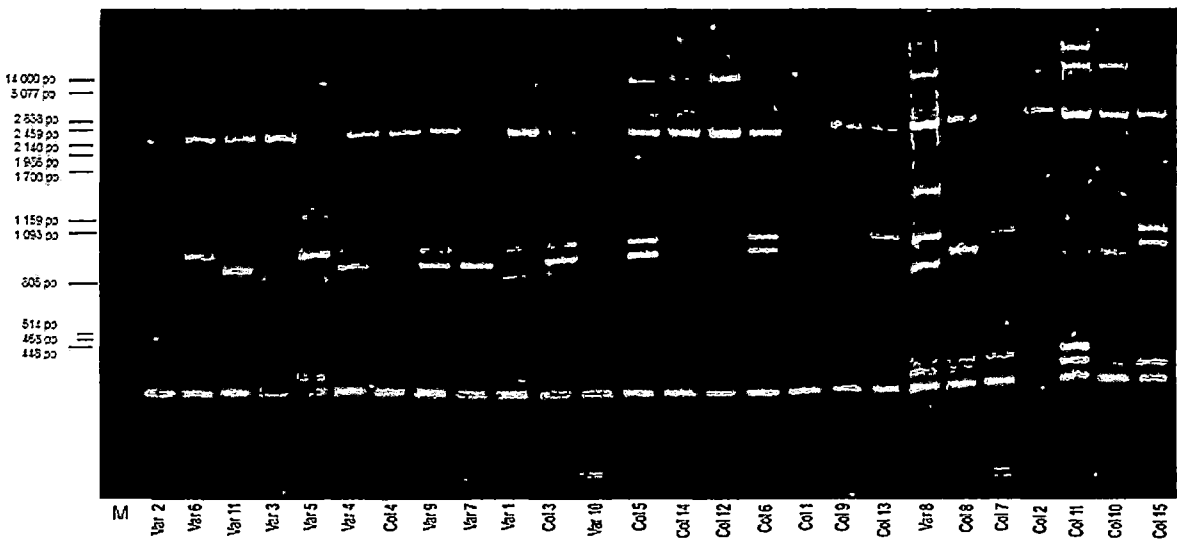
Tabla 10: Registro del polimorfismo en 10 iniciadores RAPD utilizados para el análisis en variedades y colectas de quinua.

Iniciador	SECUENCIA	N° TOTAL DE BANDAS	BANDAS POLIMORFICAS	
			N°	FRACCIÓN POLIMORFICA %
Pr 1	5'-TGCCGAGCTG-3'	12	5	41.7
Pr 2	5'-AGACGTCCAC-3'	19	9	47.4
Pr 4	5'-CCAGTCACT-3'	20	8	40.0
Pr 5	5'-TGGCGTCCTT-3'	18	13	72.2
Pr 8	5'-GGCAGGCTGT-3'	19	9	47.4
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	25	15	60.0
OPM-14	5'-AGGGTCGTTC-3'	20	8	40.0
OPR-02	5'-CACAGCTGCC-3'	17	3	17.6
OPS-03	5'-CAGAGGTCCC-3'	19	6	31.6
OPS-13	5'-GTCGTTCTTG-3'	18	10	55.6
Total		187	86	46

En la figura 10 y 11 se observa el bandeo del iniciador OPA-11 que muestra un 60 % de bandas polimórficas y OPR-02 con 17.6% de bandas polimórficas.



**Figura 10: Producto de amplificadas con el iniciador OPA- 11 en las variedades y colectas analizadas**



**Figura 11: Producto de amplificación con el iniciador OPR-02 en las variedades y colectas analizadas**

Dejando en evidencia el nivel de polimorfismo de cada iniciador en quinua, siendo consideradas polimórficas aquellas bandas de igual peso molecular presentes solo en algunas variedades o colectas y las

bandas monomorfas aquellas presentes de manera uniforme en todas las variedades y colectas (Tamayo, 2010).

### 3.3.1. FRAGMENTOS DE ADN POSIBLEMENTE ASOCIADOS CON LA TOLERANCIA A TEMPERATURAS ALTAS EN QUINUA

Se lograron identificar dos iniciadores promisorios Pr-5 y OPS-03 (Tabla 11) para la identificación de fragmentos de ADN posiblemente asociados con la tolerancia a temperaturas altas en quinua; ambos iniciadores presentan 2 bandas, en las 11 variedades tolerantes a temperaturas altas (Figura 12 y 13).

**Tabla 11: Iniciadores RAPD que presentan bandas discriminantes en las 11 variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas**

PRIMER	Nº BANDA	TAMANO (pb)	Secuencia
Pr-5	1	950	5'- TGCCGAGCTG- 3'
	2	458	
OPS-03	1	930	5'- CAGAGGTCCC- 3'
	2	580	

En la tabla 11 se muestra el tamaño de las dos bandas generadas por el iniciador Pr-5 de 950 pb, y 458 pb respectivamente y el tamaño de las bandas del iniciador OPS-03 que presenta igualmente 2 bandas con tamaños de 930 pb y 580 pb. Se puede establecer que estas 4 bandas resaltan el parentesco existente entre las 11 variedades tolerantes a temperaturas altas y que podrían ser consideradas como marcadores moleculares RAPDs posiblemente asociados con la tolerancia a temperaturas altas.

Se debe considerar que las 11 variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas utilizadas en la investigación vienen siendo cultivadas a temperaturas que oscilan entre 15°C (Temperatura mínima) y 27°C (Temperatura máxima) (Tabla 4) con un rendimiento

promedio de 3.9 t/ha, en comparación a las 15 colectas cultivadas a temperaturas entre 4.5°C (Temperatura mínima) y 21°C (Temperatura máxima) cuyo rendimiento promedio es de 0.66 t/ha.

Por otra parte si se compara el rendimiento de una de las variedades con tolerancia a temperatura alta por ejemplo : INIA 431- Altiplano (Var 9), la cual según los datos de pasaporte presentados en la tabla 4, al ser cultivada en la EEA Andenes - Cusco con registro de temperatura entre 4.5 y 21°C tiene un rendimiento de 3 t/ha, pero cuando esta misma variedad es cultivada en la EEA – Vista Florida – Chiclayo con registros de temperatura entre 15 y 27°C su rendimiento es de 7 t/ha. Estos valores evidencian que para el cultivo de quinua la temperatura es un factor importante en el rendimiento de grano, pudiendo ser considerado entonces como un factor favorable en el aumento de la productividad, razón por la que, al identificar en las 11 variedades 04 marcadores moleculares RAPDs posiblemente asociados con la tolerancia a temperaturas altas, se podría deducir que la tolerancia a temperaturas altas está determinado genéticamente. Sin embargo para poder afirmar esto, sería necesario conocer la secuencia de bases de estos 04 marcadores a fin de determinar si estos fragmentos están asociados a genes de tolerancia a temperaturas altas

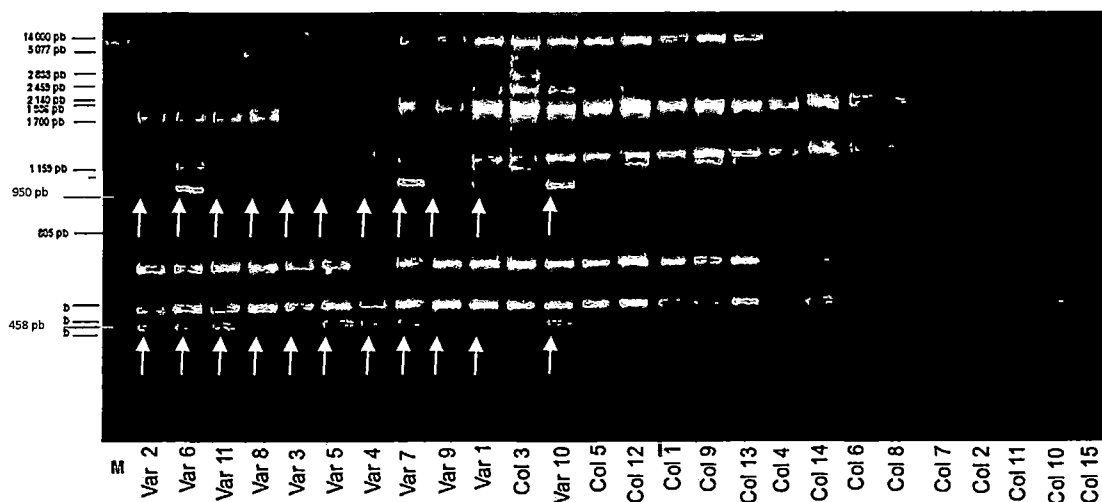


Figura 12: Bandas polimórficas obtenidas con el iniciador Pr5 en variedades tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registro de tolerancia.



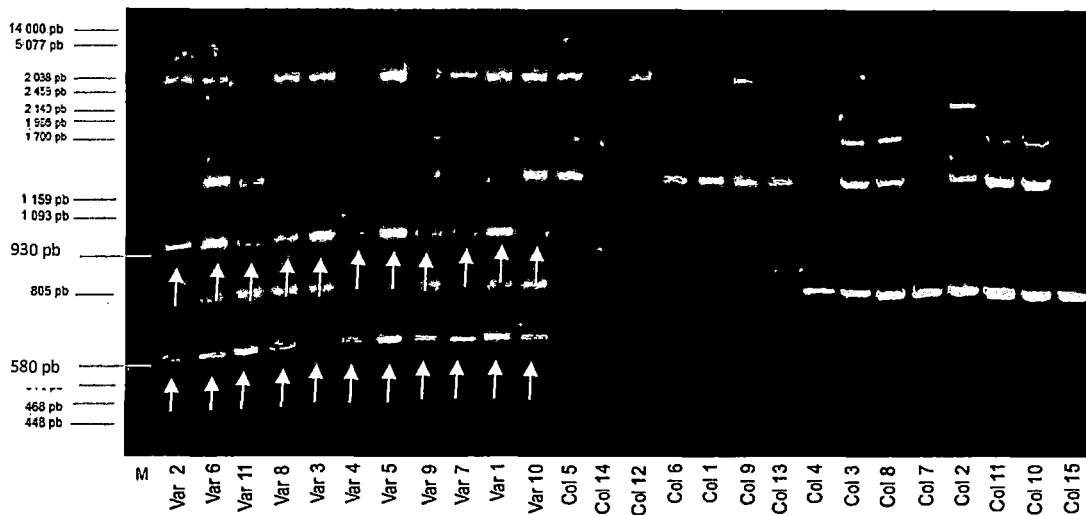


Figura 13: Bandas polimórficas obtenidas con el iniciador OPS-03 en variedades tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registro de tolerancia.

### 3.4. SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO DE VARIEDADES Y COLECTAS DE QUINUA

La técnica RAPD con un total de 10 iniciadores, generó 86 bandas polimórficas, datos que fueron utilizados para construir la matriz de similitud para las variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas y colectas sin registros de tolerancia a temperaturas altas (Anexo C), datos que fueron representados gráficamente en un dendograma (figura 14). El dendograma resultante dividió el total de variedades y colectas analizadas en 2 grupos claramente diferenciados; el Grupo 1 ( $G_1$ ) y el Grupo 2 ( $G_2$ ) unidos a un coeficiente de similitud de 0.29; se observa también la presencia de un grupo independiente Grupo 3 ( $G_3$ ) a un coeficiente de similitud de 0.20, lo que indica un porcentaje alto de variación genética existente entre las variedades y colectas integrantes de cada grupo. Lo que coincide con lo reportado por Del Castillo *et al*, 2006 que resaltan la alta diferenciación genética entre 8 cultivares de quinua de valle interandino y altiplano.

El Grupo  $G_1$  se divide en 5 subgrupos:  $SG_1$ ,  $SG_2$ ,  $SG_3$ ,  $SG_4$  y  $SG_5$  agrupando en total a las 11 variedades tolerantes a temperaturas altas y 7 colectas sin registros de tolerancia a temperaturas altas. Las 7 colectas y el total de variedades tolerantes a temperaturas altas, estaría indicando que tanto variedades como colectas conformantes de la  $G_1$  poseen características genéticas coincidentes. Es así que la Var 1 y Col 3 se agrupan a un coeficiente de similitud de 0.73 al cual se une la var 8 seguida por la Col 12 y la Var 9 a un coeficiente de similitud de 0.66, 0.61 y 0.53 respectivamente, este subgrupo incluye también a la Var 3, Col 4, Col 10 que se une al  $SG_2$  a un coeficiente de similitud de 0.47 y agrupa la Col 5 con la Col 14 a un coeficiente de similitud de 0.57. El  $SG_3$  y el  $SG_4$  agrupan a 3 variedades cada una: la Var 7, la Var 11, la Var 2, la Var 4, Var 5 y la Var 6 respectivamente. El  $SG_5$  agrupa la Col 1 y Col 6 que se unen a un coeficiente de similitud de 0.47.

El grupo  $G_2$  con 3 subgrupos está formado por 7 colectas sin registros de tolerancia a temperaturas altas. A un coeficiente de similitud de 0.30, la Col 2 presenta características genéticas semejantes a la Col 8, Col 10, Col 11, Col 9 y Col 13. El porcentaje de similitud más alto encontrado en este análisis de RAPD fue entre las Col 10 y Col 11 con un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.75 lo que indica un alto grado de parecido genético presente entre ambas colectas.

Las 11 variedades (Var) del grupo  $G_1$  con tolerancia a temperaturas altas y las 7 colectas incluidas en este grupo indican características genéticas coincidentes entre variedades y las 7 colectas, que podría ser la tolerancia a ciertos factores abióticos como las temperaturas altas, ocurrida probablemente como consecuencia de un intercambio constante de genes dado por la actividad agrícola, ya que los agricultores mantienen un sistema dinámico de flujo de semillas, lo que es realizado consciente e inconscientemente, para mantener la productividad de sus cultivos en los sistemas de siembra tradicional tal como lo reporta Chura *et al.*, (2014) cuyos resultados obtenidos muestran claramente el agrupamiento genético de variedades

comerciales de quinua y parientes silvestres con características de tolerancia a factores abióticos diversos, evidenciando un pool de genes compartidos.

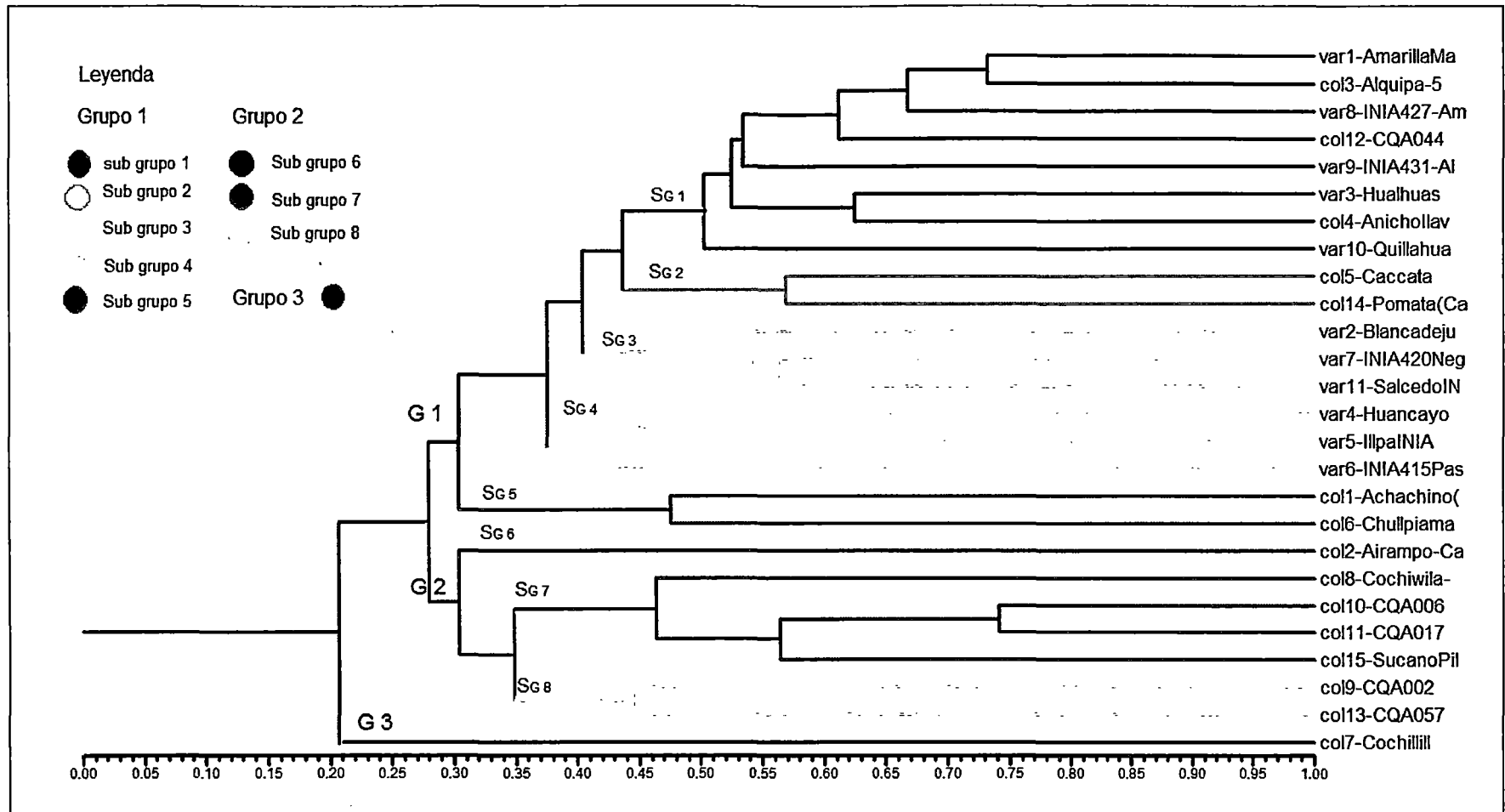


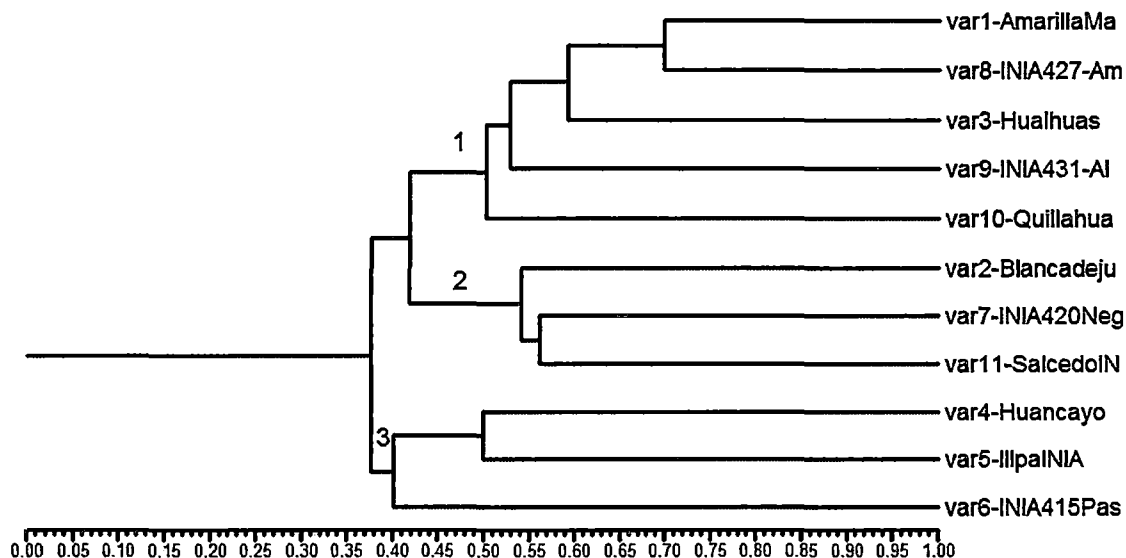
Figura 14: Agrupamiento genético de las 11 variedades de quinua con tolerancia a temperaturas altas y 15 colectas sin registros de tolerancia.

### **3.4.1. SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO DE LAS VARIETADES DE QUINUA TOLERANTES A TEMPERATURAS ALTAS**

Actualmente el INIA viene trabajando con diferentes variedades de quinua y su introducción a la costa peruana (climas con temperaturas altas) con buenos resultados. Estas variedades presentan características particulares como óptimo crecimiento a temperaturas altas, buen rendimiento en producción de grano. Entre estas encontramos las 11 variedades del presente estudio, las mismas que presentan 0.37 de parecido genético según el coeficiente de Jaccard, siendo menor a lo reportado por Chura (2004) quien infiere un coeficiente de similitud de 0.64.

El agrupamiento genético de las 11 Variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas observado en la Figura 15. Distingue 3 grupos, el primero agrupa a la Var 1 y la Var 8 con una similitud de 0.70 (alto parecido genético entre variedades), al cual se une independientemente la Var 3, así como la Var 9 y la Var 10. Haciendo un total de 5 variedades: 3 de Cusco (Var 1, Var 8 y Var 10), una de Junín (Var 3) y Una de Puno (Var 9).

El segundo grupo formado por las variedades Blanca de Junín oriunda de Junín que independientemente se une al subgrupo formado por la Var 7 y Var 11. Y un tercer grupo integrado por la Var 4, Var 5 y Var 6.



**Figura 15: Agrupamiento genético de las 11 variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas.**

En el grupo 1 se encuentran presentes la var1, var3, var8 y var10 todas ellas oriundas de valles interandinos, la var9 al ser una variedad obtenida por cruces genéticos presenta cierto grado de asociación genética con var3. La Var3 Hualhuas es una variedad liberada por la Universidad Nacional del Centro cuyo origen es un material de la zona (UNC-H-20-P-69), con asociación genética entre las variedades del sur, el análisis es similar al reportado por Nolasco *et al.*, 2013, quien hace referencia al agrupamiento por zonas geográficas en quinua.

En la Tabla 12 se presenta la matriz de similitud mediante el coeficiente de Jaccard para las variedades tolerantes a temperaturas altas de valles interandinos, siendo la Var 1 y la Var 8 más semejantes genéticamente lo que era de esperarse ya que ambas variedades son originarias de Cusco, tienen grano amarillo, rendimiento promedio de 3.5 t/ha y comparten la característica de ser tolerantes a temperaturas altas tal como se indica en la Tabla 4 (datos de pasaporte), tal como lo reportado por Cruz, (2014) cuyos resultados ubican Amarillo sacaca y Amarillo marangani a una distancia genética de 0.53 mediante uso de marcadores ISSR.

**Tabla 12: Matriz de similitud de las variedades de quinua de valles interandinos con tolerancia a temperaturas altas**

	Var 1	Var 2	Var 3	Var 4	Var 8	Var 10
Var 1 - Amarilla marangani	1.000					
Var 2 - Blanca de junín	0.333	1.000				
Var 3 - Hualhuas	0.582	0.418	1.000			
Var 4 -Huancayo	0.313	0.302	0.393	1.000		
Var 8 - INIA 427-Amarilla sacaca	0.698	0.386	0.603	0.386	1.000	
Var 10 - Quillahuaman INIA	0.487	0.328	0.529	0.288	0.479	1.000

La tabla 13 muestra las variedades del altiplano tolerantes a temperaturas altas mostrando un coeficiente de similitud de 0.53 entre la Var 7 y la Var 9 lo que significa un parecido genético del 53% entre dichas variedades, semejante a los resultados obtenidos por Cruz (2014) que reporta un parecido genético de 0.83 entre dichas variedades.

**Tabla 13: Matriz de similitud de las variedades de quinua del altiplano con tolerancia a temperaturas altas.**

	Var 5	Var 6	Var 7	Var 9	Var 11
Var 5- Illpa INIA	1.000				
Var 6- INIA 415 Pasankalla	0.438	1.000			
Var 7- INIA 420 Negra Collana	0.463	0.347	1.000		
Var 9- INIA 431- Altiplano	0.443	0.339	0.527	1.000	
Var 11- Salcedo INIA	0.444	0.383	0.563	0.456	1.000

La Tabla 14 presenta el coeficiente de similitud entre las Var 5, Var 9 y Var 11 analizado mediante el Coeficiente de Jaccard, resaltando que la Var 5 es producto del Cruce entre Sajama y Blanca de Juli lograda y liberada en la región Puno el año 1997. Mientras que la Var 11 resulta del cruce entre Real Boliviana y Sajama, liberada en la región Puno el año 1995; distinguiendo que ambas variedades comparten a Samaja como parental común. Siendo la Var 9 una variedad generada por el cruce entre la Var 5 x Var 11 por tanto también comparte el antepasado común entre ambas. Sin embargo el coeficiente de similitud presente entre estas variedades es menor a 0.5, siendo 0.46 la mayor similitud presente entre la Var 9 y Var 11.

**Tabla 14: Matriz de similitud de las variedades Illpa INIA, INIA 431- Altiplano y Salcedo INIA**

	Var 5	Var 9	Var 11
Var 5- Illpa INIA	1.000		
Var 9- INIA 431- Altiplano	0.443	1.000	
Var 11- Salcedo INIA	0.444	0.456	1.000

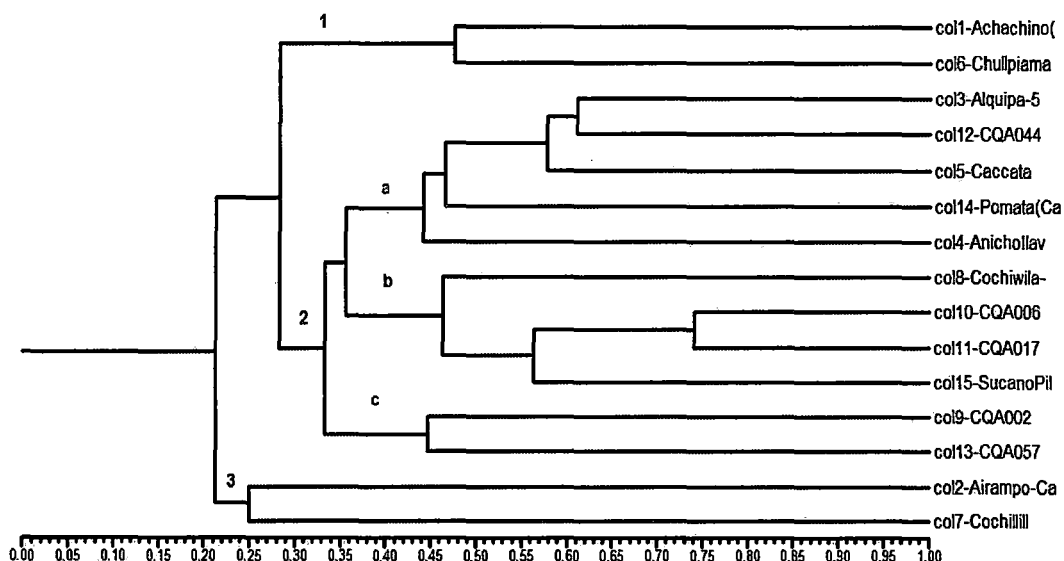
### **3.4.2. SIMILITUD Y AGRUPAMIENTO GENÉTICO DE LAS COLECTAS SIN REGISTROS DE TOLERANCIA A TEMPERATURAS ALTAS**

La figura 16 muestra el agrupamiento genético de las colectas de quinua sin reportes de tolerancia a temperaturas altas, diferenciando 5 grupos.

A un coeficiente de similitud de 0.21, se forman 3 grupos, el grupo 1 formado por 2 colectas, unidos a un coeficiente de similitud de 0.48, el grupo 2 constituido por 11 colectas, donde se incluyen 5 oriundas de valle interandino (Ayacucho) siendo todas las demás del altiplano y el grupo 3 constituido por 2 colecta Col 2 y Col 7 a un coeficiente de similitud de 0.25, estos coeficientes indican el grado de similitud genética existente entre cada par.

Se observa que el Subgrupo "a" del grupo 2 une a las 5 colectas (Col 3, Col 12, Col 5, Col 14 y Col 4) que comparten características genéticas con las variedades tolerantes a temperaturas altas (figura 14), manteniendo un coeficiente de similitud de 0.34 con los 2 subgrupos "b" y "c".



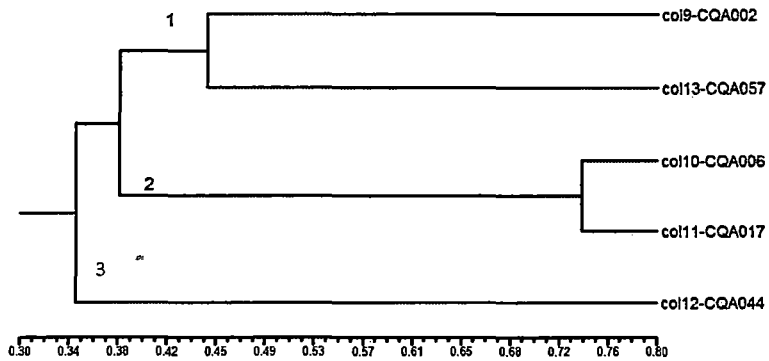


**Figura 16: Agrupamiento genético de las 15 colectas de quinua sin registros de tolerancia a temperaturas altas**

Las Colectas de Ayacucho CQA 002, CQA 006, CQA 017, CQA 044, CQA 057. forman parte del Grupo 1, 2 y 3 en la Figura 14 Siendo CQA 044 la colecta más separada cuya distancia respecto a las demás colectas es de 0.34 lo que significaría que es esta colecta la que presenta mayor diferenciación genética respecto a las demás (Figura 17).

**Tabla 15: Matriz de similitud de la colecta de quinua de Ayacucho sin reportes de tolerancia a temperaturas altas.**

	col 9	col 10	col 11	col 12	col 13
col 9 - CQA 002	1.000				
col 10 - CQA 006	0.407	1.000			
col 11 - CQA 017	0.351	0.741	1.000		
col 12 - CQA 044	0.324	0.408	0.329	1.000	
col 13 - CQA 057	0.447	0.393	0.362	0.314	1.000



**Figura 17: Agrupamiento genético de colectas de quinua de Ayacucho sin registros de tolerancia a temperaturas altas**

Los datos presentados en la tabla 16 son los valores calculados utilizando el índice de Jaccard para las colectas del Altiplano que no presentan reportes de tolerancia a temperaturas altas. Se muestra similitud que varía de 0.14 (entre Col 1 y Col 2) a 0.59 (entre Col 3 y Col 5).

**Tabla 16: Matriz de similitud de la colecta de quinua de Puno sin reportes de tolerancia a temperaturas altas**

	col 1	col 2	col 3	col 4	col 5	col 6	col 7	col 8	col 14	col 15
col 1 - Achachino (RBA)	1.000									
col 2 - Airampo-Cabana	0.136	1.000								
col 3 - Alquiya-5	0.324	0.216	1.000							
col 4 - Anicho-Ilave	0.283	0.185	0.459	1.000						
col 5 - Caccata	0.373	0.222	0.592	0.397	1.000					
col 6 - Chullpi amarillo (N.G)	0.475	0.100	0.338	0.259	0.387	1.000				
col 7 - Cochillilla	0.225	0.250	0.203	0.189	0.169	0.174	1.000			
col 8 - Cochiwila-Nicasio	0.241	0.400	0.427	0.306	0.362	0.161	0.319	1.000		
col 14 - Pomata (Capachica)	0.362	0.154	0.425	0.444	0.569	0.327	0.180	0.305	1.000	
col 15 - Sucano Pilcuyo	0.245	0.319	0.395	0.250	0.329	0.224	0.245	0.463	0.288	1.000

## **CONCLUSIONES**

1. Mediante iniciadores RAPD, se realizó el genotipado de 11 variedades de quinua tolerantes a temperaturas altas y 15 colectas sin reportes de tolerancia, se observó que 7 de estas, (Col 1, Col 3, Col 4, Col 5, Col 6, Col 12 y Col 14) presentaron características genéticas semejantes con las variedades tolerantes a temperaturas altas agrupándose todas en la  $G_1$ .
2. De los 20 iniciadores evaluados, 10 mostraron entre 25.0% a 72.2% de polimorfismo, el iniciador Pr 5 mostro un 72.2 % de polimorfismo seguido del iniciador OPA 11 con un 60 % de polimorfismo.
3. Se identificaron 4 marcadores moleculares RAPDs en quinua asociados posiblemente con la tolerancia a temperaturas altas. Presentando 2 marcadores el iniciador Pr 5 y 2 marcadores el iniciador OPS-3 de 458pb, 950pb, 580pb y 930pb respectivamente.
4. Se determinó la distancia genética entre variedades y colectas, mediante el índice de asociación de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA, identificando 3 grupos unidos a un índice de asociación de 0.20, el primero  $G_1$ , agrupa las 11 variedades y a las colectas col 3, col 12, col 4, col 5, col 14, Col 1 y Col 6 indicando un grado de parentesco existente entre variedades y colectas. El grupo  $G_2$  agrupa 7 colectas, dejando la Col 7 como único integrante de  $G_3$ .
5. Las variedades más cercanas genéticamente con un índice de similitud de 0.70 fueron la Var 1 (Amarillo marangani) con la Var 8 (Amarillo sacca) debido a las características que ambas comparten en cuanto a origen, color de grano, tolerancia a temperaturas altas. En contraste las Var 5 (Illpa INIA), Var 11 (INIA 431 Altiplano) y Var 9 (Salcedo INIA) que comparten un parental en común, presentaron un índice de asociación de 0.45.

## RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de otros marcadores moleculares fácilmente reproducibles que permitan la identificación de las bandas posiblemente relacionadas con la tolerancia a temperaturas altas detectadas en este estudio. Que permita la continuación de este proyecto para la obtención de mayor información ya que los marcadores moleculares detectados podrían ser aislados a partir del gel, para ser secuenciados a fin de determinar si los fragmentos identificados están asociados a genes de tolerancia a temperaturas altas. De ser este el caso, con la identificación de la secuencia de estos, se podría contribuir favorablemente al desarrollo de programas de mejora genética para la obtención de un mayor número de variedades tolerantes a temperaturas altas, aspecto importante a considerar frente al contexto de cambio climático actualmente vivido.

**REFERENCIA  
BIBLIOGRÁFICA**

- Alagón, R. I., y Rosas, M. A., (2008). Caracterización molecular de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) de las comunidades campesinas de Cusco y Huánuco, mediante marcadores AFLPs.
- Altieri, Miguel, & Nicholls, Clara. (2009). Cambio climático y agricultura campesina: impactos y respuestas adaptativas. LEISA revista de agroecología, 14, 5-8.
- Allende, L. (2014). Estudio de radiosensibilidad de pseudocereales mediante marcadores moleculares y microscopía electrónica. Tesis para optar al título profesional de Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias. Toluca-México.
- Apaza, V., Cáceres, G., Estrada, R., Pinedo, R. (2013). Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. Ed. JB Grafic E. I. R. L.: Lima-Perú.
- Aubert, R. F. (2013). Estandarización de protocolos para aislar DNA genómico a partir de Tarwi, Maíz, Quinua y Kiwicha de Acciones conservadas en el Banco de Germoplasma de Kayra- UNSAAC. Cusco- Perú. Seminario de investigación
- Arguedas, A. (2001). Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del hongo *Micena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialba, Costa Rica. 91p
- Azcon, J., Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw Hill(2): España.
- Azofeifa, A., (2006). Revisión bibliográfica Uso de marcadores moleculares en plantas: aplicaciones en frutales del trópico. Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca: Agronomía mesoamericana: 17 (2): 221- 242.

- Becerra V. y M. Paredes. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica* 60(3): 270-281.
- Biodiversity International, FAO, PROINPA, INIA y FIDA. (2013). Descriptores para quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) y sus parientes silvestres. Biodiversity International, Roma, Italia; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia; Fundación PROINPA, La Paz, Bolivia; Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal, La Paz, Bolivia; Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola, Roma, Italia.
- Bonifacio A.; Mújica A.; Álvarez A.; Roca W. (2001). Mejoramiento genético, germoplasma y producción de semillas en quinua, ancestral cultivo andino. Cultivos andinos. FAO, Santiago, Chile
- Bustinza B. (2004). Diversidad de Marcadores RAPDs entre cultivares y variedades nativas de quinua. Universidad Nacional Federico Villareal. Lima.
- Centro Internacional de la papa (CIP). (1998). Protocolos de laboratorio de biología molecular. Tipificación Genética. Ghislain, M., Zhang, D., and Herrera, M. R. (Eds). Departamento de Recursos Genéticos. Manual de Capacitación. 2ª edición (revisada Oct. 1998). Lima- Perú.
- Cheng, F.S., Brown, S.K. y Weenden, N.F. (1997). A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *Hortscience* 32(5): 921- 922
- Crisci, J. y López, M. (1983). Introducción a la taxonomía y práctica de la taxonomía numérica. Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos (OEA). Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Washington D.C. Serie de biología: 26. 132p
- Cruz, W. (2014). Conservación y valoración de material elite de la diversidad de quinua (*Chenopodium quinoa W.*) en zonas productoras de Ayacucho, Cusco, Junin y Puno como alternativa al cambio climático y su seguridad alimentaria. Informe técnico de caracterización genética de las variedades de quinua. INIA-Lima.



- Cubero J. (2003). Introducción a la mejora genética vegetal. 2a.ed.: Mundi Prens. España 567 p.
- Chura, E., Mujica, A., Flores, A. L. (2014). Determinación del parentesco y distancias genéticas en variedades nativas y parientes silvestres de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) por métodos moleculares. Puno: Investig. Altoandín. 16(2): 33-36p
- Delgado, A. A. (2012). Estrategia Regional Frente al Cambio Climático – ERFCC Cusco. Versión resumida. Cusco: Ed. Quality Print.
- Dellaporta S.L., Wood J. And Hicks J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1(14):19-21pp.
- Del Castillo, C., Winkel, Th., Mahy, G., Bizoux, J.P. (2006). Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) from the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. GenetResour Crop Evol. Original Paper: 54: 897-905. Springer Science + Business Media B. V. Disponible en:<http://orbi.ulg.ac.be/bitstream/2268/25072/1/del%20castillo%20et%20al%202007.pdf>. Consultado el 28 de Febrero del 2015
- Doyle & Doyle (1990). Isolation of DNA from Small amoynnts of plant tissues. BRL Focus 12: 13-15.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura). (2011). La Quinoa cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial.
- Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds). (2003). In análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Filogenéticos. Boletín técnico N° 8, Institución Internacional de Recursos filogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p
- Gandarillas, H. (1979). Genética y origen. In: M. Tapia (ed). Quinoa y Kañiwa, cultivos andinos. Bogotá, Colombia, CIID, Oficina Regional para América Latina. pp 45-64.

- Gandarillas, H. (1984). Obtención experimental de *Chenopodium quinoa Willd.* MACA, IBTA. La Paz, Bolivia. 21 p
- García, J. M., Duque, J., Tohme, S. & Levy, M., (1994). Un programa S.A.S para análisis de clasificación. En documento de trabajo. CIAT. Colombia. P 17
- Gómez, L. R; Eguiluz, A. L. (2011). Catálogo del banco de germoplasma de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*). Ed. N°1, Lima.
- Gonzáles, Y. C., (2003). Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE, Costa Rica. Costa Rica- Turrialba: Tesis para optar el grado de Magister Scientiae presentado a la Escuela de Posgrado de Educación para el Desarrollo y la conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- González, A., Pita, J.M. (2001). Conservación y caracterización de Recursos Filogenéticos INEA. Valladolid. 279p
- Griffiths, A., Wessler, S., Lewantia, R., Caroll, S. (2008). Genética. McGraw-Hill(9): España.
- Hoefer, INC. (2012). Hoefer HE 99X submarine electrophoresis unit.USA: LO/07-12.
- IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). (2005) Manual de producción de quinua de calidad en el Ecuador disponible en URL <http://www.ecuarural.gov.ec/ecuagro/pàginas/ productos manuales>. Consultado 10/01/15
- Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA). (2006). Conservación in Situ de cultivos Nativos y sus Parientes silvestres. Boletín Técnico Trilingüe Nro1. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de Salud (INS). (2003). Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN. Serie de Normas Técnicas N° 38. Lima.
- IPCC (Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático). (2007). Cambio climático 2007 informe de síntesis. Ginebra 2, Suiza

- Jacobsen, S. E., Mujica, A, & Ortiz, R. (2003). La importancia de los cultivos andinos. Mexico- Fermentum, 13(36), 14-24.
- Leninger, A. L. (1975). Biochemistry. Worth Publishers, New York, EE.UU. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4326.
- Mansilla, R., (2002). Caracterización Genética Molecular de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl) H. Robinson "Yacón" mediante marcadores RAPDs. Tesis para optar al título profesional de Biólogo, Universidad Nacional Agraria la Molina, Perú.
- Martínez, W. O. (1995). Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. Agronomía Colombiana: 12(1). 66-71 p
- Mora, W. (1998). Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. Memoria II Congreso Nacional de Estudiantes del sector Agropecuario Costarricense. IICA-EARTH-CATIE. p. 77-87
- Mora, W., Rodriguez, H., Fritz, P., (1995). Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba, Costa Rica, CATIE. Serie técnica. Informe técnico no. 252. p.183
- Nolasco, O., Cruz, W., Santa Cruz, C., Gutierrez, A., (2013). Evaluación del polimorfismo de ADN de seis variedades de *Chenopodium quinoa Willd*, utilizando AFLP (art. Original). Lima- Perú: The Biologist: 11(2), jul-dec: 277-286.
- Ochoa. I., Villegas, V., Beebe. St., (1997). Identificación de marcadores moleculares RAPD asociados con la Tolerancia al complejo Pudrición de Cogollo en palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.). Colombia. Palmas: 18(1).
- Palomino, L. (2014). Técnica y manejo de la germinación y cultivo de semillas de quinua en jiffys. Programa nacional de innovación en Papa del INIA. Comunicación verbal.

- Peiretti, P. G., Gai, F. & Tassone, S. (2013). Fatty acid profile nutritive value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds and plants at different growth stages. *Animal Feed Science and Technology*, 183:56-61.
- Proyecto Segunda Comunicación Nacional de Cambio Climático (PSCNCC). (2009). Inventario Nacional Integrado de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero del Perú en el año 2000. Ministerio del Ambiente – MINAM. Lima-Peru: Q & P Impresore.
- Quispe, A. C. (2012). Caracterización morfológica y molecular de Mashua *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon (Tropaeolaceae) procedentes de 9 distritos de la región Cusco. Tesis para optar título de Biólogo, UNSAAC. Cusco – Perú
- Repo-Carrasco R., Espinoza C., Jacobsen S.-E. (2001). Valor nutricional y usos de la quinua (*Chenopodium quinoa*) y de la kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). En *Memorias, Primer Taller Internacional sobre Quinoa \_ Recursos Genéticos y Sistemas de Producción* (Jacobsen S.-E., Portillo Z., Editores), 10\_14 May, UNALM, Lima, Perú, 391-400.
- Roche Molecular Biochemicals Researchs. (1999). *Nucleic Acid Isolation and Purification Manual*. Germany
- Rogers, S. y Bendich, A., (1988). Extraction of DNA from plant tissue. En *Plant Molecular Biology*. Publisher. Dordiecht- Printed in Belgium. A6: 1- 10
- Rohlf, F.J. (1997). *Ntsys pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, version 201. Department of Ecology and Evolutions State University of New York.
- Santos, C., Sakal, V., Machado, M., Schippers, D., y Greene, A. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: Principles and Applications in Dentistry. *J Appl Oral Sci*: 12(1).1-11pp
- Sevilla, R., Hollé, M. (2004). *Recursos Genéticos Vegetales*. Luis León Asociados SRL. 445pp

- Soto, J. L., Hartwich, F., Monge, M., & Ampuero, L. (2006). Innovación en el cultivo de Quinoa Bolivia Efectos de la Interacción Social y de las Capacidades de Absorción de los Pequeños Productores. *Revista de Análisis*, 17.
- Tamayo, H.L. (2010). Caracterización molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (quinua) mediante la técnica de ISSR. Tesis para optar el grado de: Magister Sc. Lima-UNALM
- Tapia, M., Fries, A. (2007). Guía de campo de los cultivos andinos. Lima: FAO y ANPE
- Tapia, G. (1976). Clasificación taxonómica de plantas vasculares. Academia Nacional de Bolivia.
- Valadez M. E. (1998). Técnicas biotecnológicas en el mejoramiento por mutagénesis en SOMEFI (Edits.), VI Seminario nacional sobre el uso de la irradiación en el fitomejoramiento, Sociedad Mexicana de Fitogenética, México pp. 19-29.
- Valadez, M., y Kahl, G., (2000). Huellas de ADN de genomas de plantas (teoría y Protocolos del Laboratorio). Ed: Mundi-Prensa Mexico, S. A de C: V. 148pp
- Velazco R., (2005). Marcadores Moleculares y la extracción de ADN. Fac. de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional del CAUCA- Colombia: 3(1).
- Villacorta, L. y Talavera, V. (1976). Anatomía del grano de quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*). *Anales científicos*. Vol. XIV: 39-45. Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú.
- Williams, J. KG., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18(24). 6531-6535.
- Yee, E., Kidwell, K., Sill, G., & Lumpkin, T. A. (1999). Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Science*.

# ANEXOS

## Anexo A

### 1. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA PROTOCOLO CTAB (CIP,1998)

#### Tampón de extracción CTAB 2X

Stock	Concentración final	100 mL
CTAB	2 %	2.00 g
NaCl 5M	1.4 M	28.00 mL
EDTA 0.5 M	20 mM	4 mL
Tris HCl 1M, pH 8.0	1000 mM	10 mL
PVP	1 %	1.00 g
H2O destilada		Completar a 100 mL

#### CTAB 10%:

Componente	50 ml
NaCl	2.05 gr
CTAB	5 g
EDTA 0.5 M pH 8	5 ml
H2O destilada	Aforar a 50 ml

El CTAB se hecha en caliente, se enraza a 50 ml y se autoclavar.

### 2. SOLUCIÓN EDTA 0.5 M pH 8 100 ml (Hoefler, 2012)

Stock	Concentración final	100 ml
EDTA	0.5 M	18.6 g
Agua bidestilada		70 ml
NaOH (10 M) pH 8		5.0 ml
H2O bidestilada		Completar a 100 ml

### 3. TAMPÓN DE CARGA (Hoefler, 2012)

Componente	10ml
Azul de bromofenol	25 mg
Sacarosa	4 gr

#### 4. AGAROSA 1% Y 1.6% (CIP, 1998)

Disolver 1 g ó 1,6 g de agarosa en 100 ml de TBE 1X, homogeneizar y disolver la agarosa en horno microondas o en baño María, antes de verter en la cámara agregarle 3 µl de Br-et 1 (µg/ml) agitar y verter en la cámara electroforética.

#### 5. PREPARACIÓN DE BUFFER STOCK PARA LA CORRIDA ELECTROFORÉTICA. (CIP, 1998)

Composición del Tampón Tris/Borato/EDTA (TBE 10X).

Componente	Concentración final	1 L
Tris base	0.89 M	108 g
Ácido bórico	0.89 M	55 g
EDTA 0.5 M	0.02 M	pH 8.0 40 ml
Agua ultra pura		Aforar a 1 000 ml

#### TBE 1X

Disolver 50 ml de TBE 10X en 500 ml de agua bidestilada o desionizada.

#### 6. SOLUCIÓN STOCK DE BROMURO DE ETIDIO (10 mg/mL) (INS, 2003)

Nota: El bromuro de etidio es un agente mutagénico, teratogénico y moderadamente tóxico. Usar guantes para manipular este reactivo

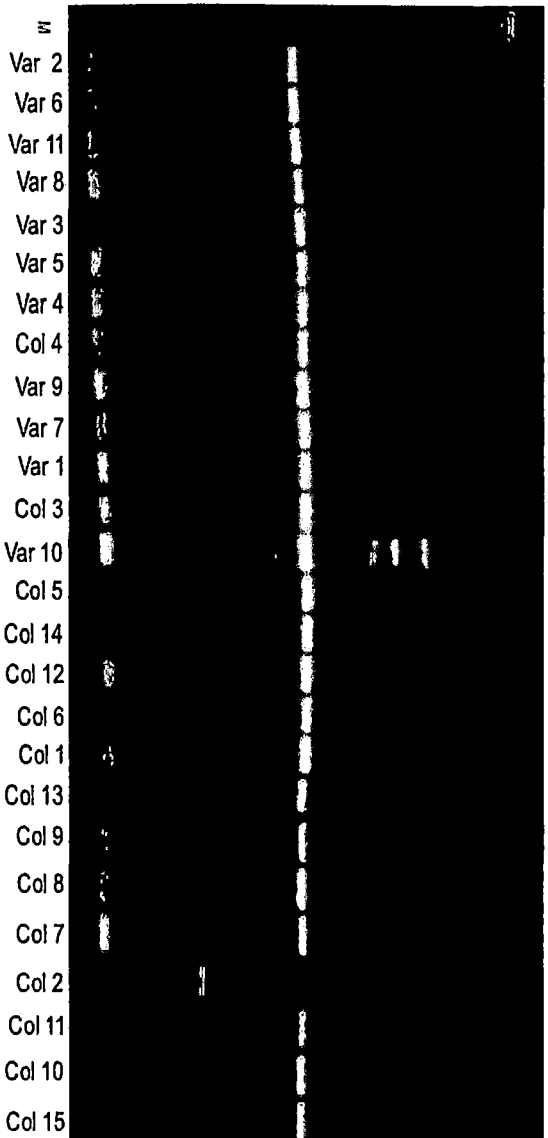
Pesar 100 mg de bromuro de etidio en 10 mL de agua bidestilada. Forrar el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

#### 7. SOLUCIÓN DE TRABAJO DE BROMURO DE ETIDIO (1 µg/mL) (INS, 2003)

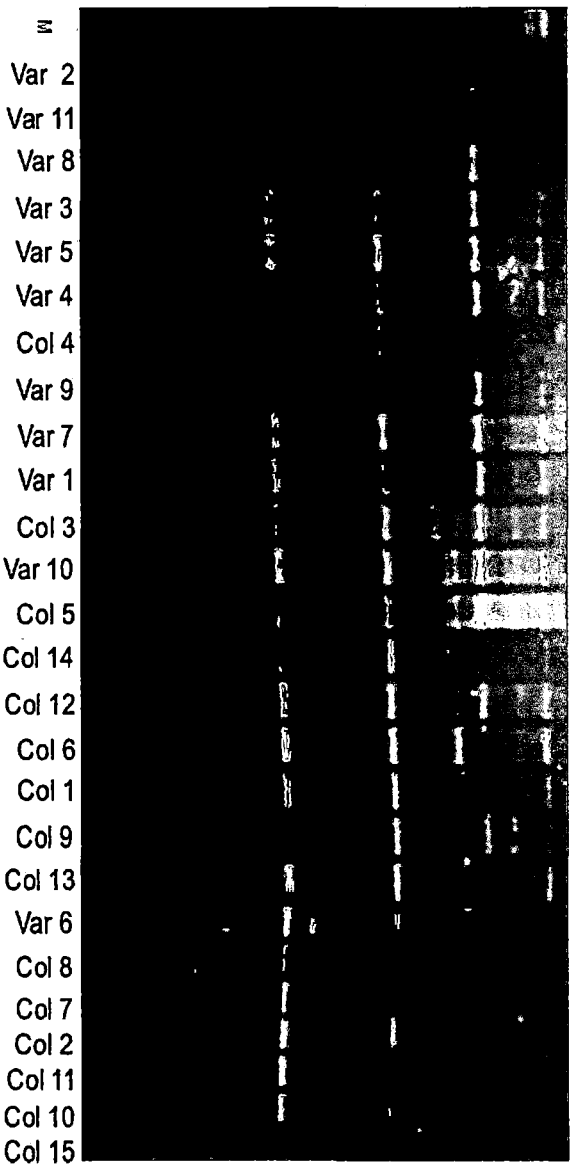
Diluir 100 µL de bromuro de etidio a partir de la solución stock en 100 mL de agua bidestilada. Forrar el recipiente con papel aluminio u otro que impida el paso de la luz.

## ANEXO B

BANDAS POLIMÓRFICAS OBTENIDAS CON 6 INICIADORES EN  
VARIEDADES TOLERANTES A TEMPERATURAS ALTAS Y COLECTAS SIN  
REPORTES DE TOLERANCIA



BANDAS POLIMÓRFICAS OBTENIDAS CON EL INICIADOR Pr-1.



BANDAS POLIMÓRFICAS OBTENIDAS CON EL INICIADOR Pr-2

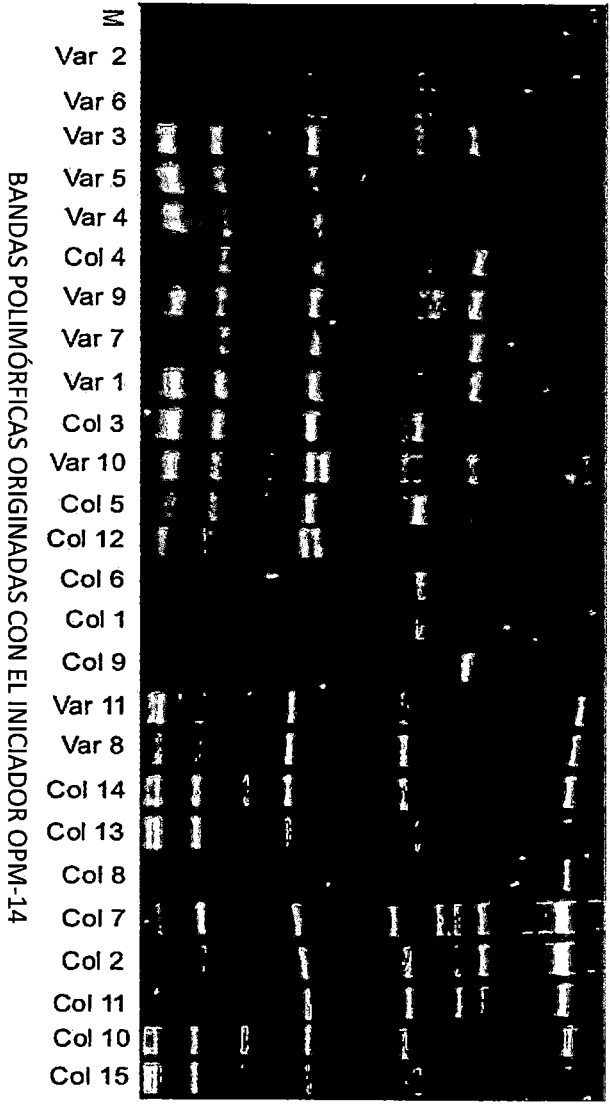


M  
Var 2  
Var 6  
Var 11  
Var 8  
Var 3  
Var 5  
Var 4  
Col 4  
Var 9  
Var 7  
Var 1  
Col 3  
Var 10  
Col 5  
Col 14  
Col 6  
Col 1  
Col 13  
Col 12  
Col 9  
Col 8  
Col 7  
Col 2  
Col 11  
Col 10  
Col 15

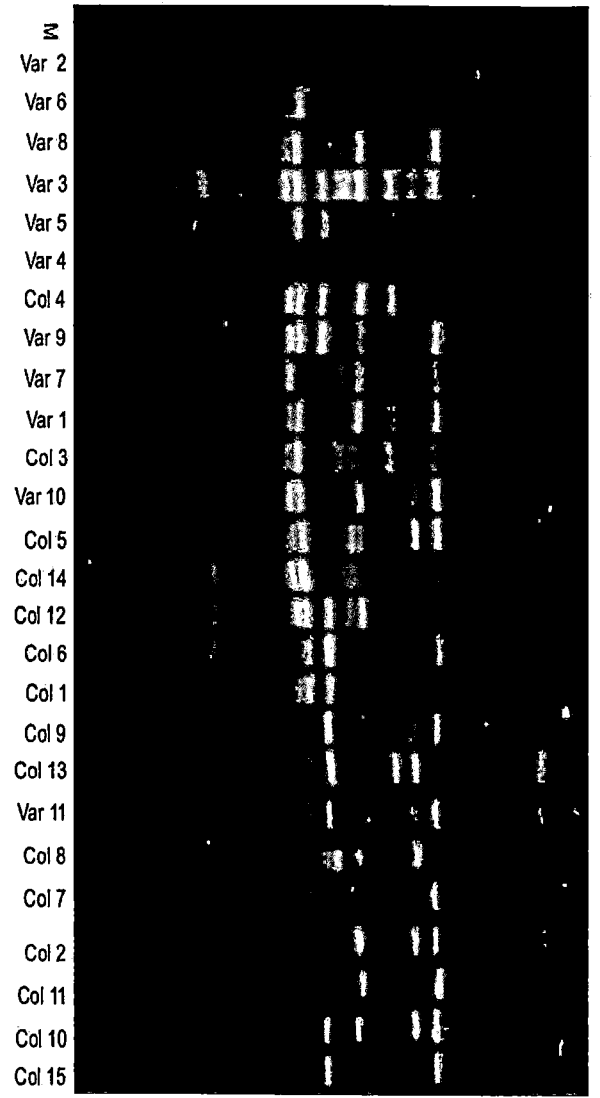
BANDAS POLIMÓRFICAS ORIGINADAS CON EL INICIADOR Pr 4

M  
Var 2  
Var 6  
Var 11  
Var 8  
Var 3  
Var 5  
Var 4  
Col 4  
Var 9  
Var 1  
Col 3  
Var 10  
Col 5  
Col 12  
Col 1  
Col 9  
Col 13  
Var 7  
Col 14  
Col 6  
Col 8  
Col 7  
Col 2  
Col 11  
Col 10  
Col 15

BANDAS POLIMÓRFICAS ORIGINADAS CON EL INICIADOR Pr 8



BANDAS POLIMÓRFICAS ORIGINADAS CON EL INICIADOR OPM-14



BANDAS POLIMÓRFICAS ORIGINADAS CON EL INICIADOR OPS-13