

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA E INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**TEMA:
ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE QUINUA SILVESTRE (*Chenopodium quinoa*
Willd.) UTILIZANDO EL GEN *rpoB* EN MUESTRAS PROVENIENTES DE
LAS PROVINCIAS DE CARCHI, IMBABURA, COTOPAXI y CHIMBORAZO.**

**AUTORES:
STEPHANY JOHANNA NAVARRETE VERDEZOTO
BYRON ALEJANDRO SUASNAVAS CHACÓN**

**DIRECTORA:
MARÍA FERNANDA GUEVARA GRANJA**

Quito, mayo del 2015

DECLARATORIO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE GRADO

Nosotros, autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación sin fines de lucro.

Además, declaramos que todo el contenido investigativo, los estudios realizados y conclusiones vertidas sobre el trabajo, son de exclusiva responsabilidad de los autores

Quito, mayo del 2015

Stephany Johanna Navarrete Verdezoto
CI: 1723438691

Byron Alejandro Suasnavas Chacón
CI: 1720630092

DEDICATORIA

A mis padres, Elvis y Marlene por haberme brindado su apoyo y cariño incondicional en cada etapa de mi vida, ya que sin ellos no hubiera podido llegar a alcanzar mis sueños, a mi hermano Andy por estar pendiente de mi bienestar y siempre actuar como un buen consejero y amigo.

A mi abuelita Loli por ser mi segunda madre y asumir un rol muy importante en mi vida pues siempre está presente en cada momento de debilidad para ser mi fortaleza y en cada momento de alegría para compartir ese triunfo

A mis abuelitos, Carlos y Romeo que han sido un pilar importante en mi formación como persona al brindarme sus enseñanzas de vida. A mi familia, la que siempre me ha apoyado y ha estado pendiente de mi formación a pesar de la distancia.

A mis tres angelitos, Eva, María y Carlos que a pesar de que ya no estén en este mundo terrenal siempre he sentido su presencia y sé que desde el más allá me siguen cuidando y queriendo porque en vida dejaron una huella imborrable en mí.

A mis amigos Cate, Byron, Estefanía, Javier, Jhon, José, Katty, Karla, Natali, Victoria por todo el camino que hemos recorrido juntos, el apoyo mutuo que nos hemos brindado.

Stephany N.

A Dios por haberme dado las fuerzas y la sabiduría para llegar a la culminación de esta meta, y por permitir que cada situación sea la indicada para aprender más de quien soy y de cómo debo mejorar.

A mis padres: Mónica y Byron, porque han sido en toda mi vida un apoyo incondicional que con sus sabios consejos y su amor me han guiado a ser un hombre y un profesional de bien.

A mi hermana Wendy por estar siempre pendiente, apoyándome en todas las situaciones cotidianas, por brindarme más que una hermandad una amistad incondicional llena de alegrías y de tristezas.

A mi abuelita Lilian y a mi tío Jaime, por haberme brindado mucho cariño y comprensión en todos estos años de estudio, siendo más que unos familiares unos amigos, que siempre han estado conmigo en todo momento.

A mis amigos: Yuly, Tefa, Jessi, Anita, Katy, Cindy, Javier, Roberto y Andrés que han sido quienes me han apoyado ante cualquier dificultad, animándome a dar más de mí para salir adelante ante todo obstáculo que se encuentre en el camino.

Byron. S

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Politécnica Salesiana por habernos acogido durante todos nuestros años de estudio siendo un templo de enseñanza no solo académico sino también personal.

A la Ingeniera María Fernanda Guevara, directora de tesis, por su incansable esfuerzo, dedicación y apoyo que nos brindó para la realización del proyecto y a pesar de todas las dificultades que se presentaron en el camino supo guiarnos para culminar con éxito nuestra carrera.

A la Ingeniera Germania Karolys, quien fue un apoyo importante tanto en lo científico como personal, por apreciable colaboración y disposición de tiempo, a la Msc. Diana Calero, directora de la carrera de Biotecnología de los recursos naturales, por brindarnos las facilidades para poder desarrollar el trabajo de tesis.

Al Msc. Marco Cerna, por su contribución desinteresada en la consecución de este trabajo de investigación, brindándonos su ayuda en la amplificación del gen rpoB.

A la Pontificia Universidad Católica de Ecuador que mediante sus miembros; Dr. Rommel Montufar director del Laboratorio de Genética Molecular y al tesista Gabriel Rivadeneira, por la colaboración científica que se nos brindó.

Al Herbario Nacional del Ecuador, Dra. Marcia Peñafiel y Dr. Efraín Freire por su predisposición a la hora de realizar el trabajo de identificación botánica.

Al Msc. Germán Burgos y la Dra. Paola León, investigadores del Instituto de investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas, quienes fueron un apoyo importante tanto en lo científico como en lo personal, por apreciable colaboración y disposición de tiempo.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 1	
ANTECEDENTES	
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivo específico.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
1.3.1. Alternativa.....	3
1.3.2. Nula.....	4
CAPÍTULO 2	
MARCO TEÓRICO	
2.1. Características botánicas y morfológicas de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.....	5
2.2. Origen de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.....	6
2.3. Genética de poblaciones.....	7
2.3.1. Factores de la evolución.....	8
2.3.1.1. Mutación.....	8
2.3.1.2. Deriva genética.....	8
2.3.1.3. Endogamia.....	9
2.3.1.4. Selección natural.....	10
2.3.1.5. Flujo genético.....	11
2.4. Filogenia.....	12
2.4.1. Métodos de construcción de árboles filogenéticos.....	12
2.4.1.1. Cálculo de distancias génicas.....	13
2.4.1.2. Máxima parsimonia.....	13
2.4.1.3. Máxima verosimilitud.....	13
2.4.2. Secuencias conservadas.....	13
2.4.2.1. Gen rpoB.....	14
2.5. Modelos de distribución poblacional para establecer localidades de muestreo.....	15
2.5.1 Bases de datos para el modelamiento de poblaciones.....	15
2.6. Herramientas moleculares para el estudio de la variabilidad genética.....	16

2.6.1. PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa.....	17
2.6.2. Electroforesis.....	18
2.6.2.1. Tipos de Electroforesis.....	18
2.6.3. Secuenciación de ADN.....	19

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3.1. Determinación de localidades de muestreo	22
3.2. Toma de muestras	23
3.2.1. Cuantificación de proteínas y polifenoles en hojas de quinua.....	25
3.3. Identificación de las muestras.....	26
3.4. Extracción y purificación de ADN	26
3.5. Visualización y Cuantificación de ADN	27
3.5.1. Cuantificación de proteínas en la solución de extracción del ADN.....	29
3.5.2. Cuantificación de polifenoles en la solución de extracción del ADN.....	29
3.6. Genotipificación de ADN.....	31
3.6.1. Amplificación del Gen rpoB.....	31
3.7. Secuenciación de muestras	32
3.7.1. Purificación del amplicón.....	33
3.7.2. PCR de secuencia.....	33
3.7.3. Secuenciación de ADN.....	34
3.8. Análisis estadístico de datos	35
3.8.1. Análisis de componentes principales (ACP).....	35
3.8.2. Análisis filogenético.....	35
3.8.3. Análisis molecular de varianza (AMOVA).....	35

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de localidades de muestreo	36
4.2. Toma de muestras	41
4.2.1. Cuantificación de proteínas y polifenoles en hojas de quinua.....	42
4.3. Identificación de muestras	43
4.4. Extracción, purificación, visualización y cuantificación de ADN	44

4.4.1. Análisis de componentes principales (ACP).....	49
4.5. Genotipificación del ADN.....	52
4.5.1. Amplificación de gen rpoB.....	52
4.5.2. Secuenciación de las muestras.....	54
4.5.2.1. Análisis filogenético intrapoblacional.....	56
4.5.2.2. Análisis filogenético interpoblacional.....	58
4.5.2.3. Distancias genéticas.....	61
4.5.2.4. Análisis molecular de varianza (AMOVA).....	62
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	68
LISTA DE REFERENCIAS	70
Anexos.....	79

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Lugares de muestreo de Quinoa silvestre.....	23
Tabla 2. Master mix para amplificación de gen rpoB.....	30
Tabla 3. Master mix para PCR de Secuencia.....	33
Tabla 4. Características ambientales de las zonas de muestreo.....	41
Tabla 5. Codificación de muestras.....	44
Tabla 6. Cantidad de proteínas presentes en la extracción de ADN.....	48
Tabla 7. Cantidad de polifenoles presentes en la extracción de ADN.....	49
Tabla 8. Distancias genéticas interpoblacionales.....	62
Tabla 9. Distancias genética intrapoblacionales.....	62
Tabla 10. AMOVA interpoblacional de las cuatro localidades estudiadas.....	63
Tabla 11. AMOVA intrapoblacional de las cuatro localidades estudiadas.....	63

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Distribución potencial de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. en la Región Andina del Ecuador.....	23
Figura 2. Fotografías del paisaje de zonas de muestreo en el cantón Colta, parroquia Santiago de Quito	24
Figura 3. Sobrenadante producto del segundo lavado con cloroformo – alcohol isoamílico (24:1).....	27
Figura 4. Fotografía del gel de agarosa de las muestras de Colta.....	28
Figura 5. Metodología de la cuantificación en el Qubit.....	29
Figura 6. Concentración en ng/ul de las bandas Marcador de peso molecular <i>low DNA Mass Ladder</i>	31
Figura 7. Puntos de ocurrencia de <i>Chenopodium quinoa</i> Will. en Carchi, Imbabura y Pichincha de acuerdo a las bases de datos consultadas.....	37
Figura 8. Puntos de ocurrencia de <i>Chenopodium quinoa</i> Will. en Cotopaxi y Tungurahua de acuerdo a las bases de datos consultadas	37
Figura 9. Puntos de ocurrencia de <i>Chenopodium quinoa</i> Will. en Chimborazo y Bolívar de acuerdo a las bases de datos consultadas	38
Figura 10. Puntos de ocurrencia de <i>Chenopodium quinoa</i> Will. en Cañar y Azuay de acuerdo a las bases de datos consultadas	38
Figura 11. Ubicación de los sitios de estudio.....	40
Figura 12. Crecimiento de la Quinoa silvestre (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) en asociación a cultivos de Trigo (<i>Triticum spp.</i>).....	42
Figura 13. Comparación del borde y la forma de la hoja de quinua silvestre (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) y de Ashpa quinua (<i>Chenopodium álbum</i>).....	42
Figura 14. Corrida electroforética de las muestras provenientes de Belisario Quevedo con la adición de 1 µl de β- Mercaptoetanol. A: Ladder (standart), B: B1, C: B2, D: B3, E: B4, F: B5, G: B6, H: B7, I: B8, J: B9, K: B10, L: B11, M: B12.....	45
Figura 15. Corrida electroforética de las muestras provenientes de Belisario Quevedo con la adición de 9 µl de β- Mercaptoetanol. A: Ladder (standart), B: B1, C: B2, D: B3, E: B4, F: B5, G: B6, H: B7, I: B8, J: B9, K: B10, L: B11, M: B12.....	45
Figura 16. Muestras de Los Olivos-Imbabura contaminados con polifenoles.....	47

Figura 17. Diagrama de componentes principales (ACP) de las 16 muestras provenientes de las localidades de Belisario Quevedo y Colta (C).....	50
Figura 18. Diagrama de componentes principales (ACP) de las 16 muestras provenientes de las localidades del Hato (A) y Los Olivos (L).....	51
Figura 19. Diagrama de componentes principales (ACP) de las 32 muestras provenientes de las localidades del Hato (A), Los Olivos (L), Belisario Quevedo (B) y Colta (C).....	52
Figura 20. Electroforesis de los amplicones del gen rpoB de las muestras provenientes de Hato.....	54
Figura 21. Electroferograma de la muestra A20.....	55
Figura 22. Alineamiento de las muestras del Hato.....	56
Figura 23. Dendograma de las muestras de Carchi, Cantón Mira, localidad El Hato (A).....	56
Figura 24. Dendograma de las muestras de Cotopaxi, Cantón Latacunga, localidad Belisario Quevedo(B).....	57
Figura 25. Dendograma de las muestras de Chimborazo, Cantón Colta, localidad Santiago de Quito(C).....	58
Figura 26. Dendograma de las muestras de la localidad Los Olivos (L).....	58
Figura 27. Dendograma de las localidades del Hato (A) y los Olivos (L).....	59
Figura 28. Dendograma de las localidades de Belisario Quevedo (B) y Colta (C).....	60
Figura 29. Dendograma de las 32 muestras de estudio proveniente de las localidades del Hato A), Los Olivos (L), Belisario Quevedo (B) y Colta C.....	61

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Posiciones geográficas de las localidades de estudio.....	79
Anexo 2. Evaporación de etanol (70%) en pellets de las muestras provenientes de Belisario Quevedo.....	80
Anexo 3. Registros existentes del Herbario nacional acerca de la presencia de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.) en el Ecuador.....	81
Anexo 4. Certificado de identificación botánica de plantas.....	82
Anexo 5. Matriz de análisis de componentes principales.....	84
Anexo 6. Resumen de análisis bioinformática de secuencias.....	85

RESUMEN

La quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una de las especies de mayor importancia en el Ecuador por ser un recurso genético propio de nuestra serranía ecuatoriana. Las zonas de distribución de esta *Amaranthacea* abarca la gran mayoría de la región Andina de nuestro país, siendo las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo las de mayor relevancia, por lo cual en el presente estudio se realiza el muestreo de 8 individuos por localidad siendo las zonas seleccionadas: El Hato (Carchi), Los Olivos (Imbabura), Belisario Quevedo (Cotopaxi) y Colta (Chimborazo), todas estas muestras fueron utilizados para la genotipificación de ADN, con la finalidad de establecer sus relaciones filogenéticas.

La extracción y purificación del ADN se llevó a cabo mediante el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1987) modificado. La genotipificación de ADN se logró mediante la amplificación del fragmento del gen *rpoB* de 456 pb, posteriormente se secuenciaron los amplicones obtenidos en el equipo *ABI PRISM 3730XL Analyzer* de Macrogen. Los resultados del análisis genético permitieron la construcción de árboles filogenéticos los cuales revelaron que la diversificación genética es extremadamente alta de una manera interpoblacional e intrapoblacional obteniéndose un porcentaje de variabilidad de 77,4 % para los individuos procedentes de las provincias de Carchi e Imbabura y de 70,2 % para los individuos procedentes de las provincias de Cotopaxi y Chimborazo, estos datos fueron aseverados con los valores obtenidos mediante las pruebas estadísticas de la AMOVA y la distancia génica; la significancia estadística de AMOVA dio a entender que la similitud entre los individuos de las provincias del norte (Carchi e Imbabura) es de solo 15 %, mientras que de las provincias del centro (Cotopaxi y Chimborazo) es de 25 %.

Palabras claves: quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.), diversidad genética, flujo genético, gen *rpoB*

ABSTRACT

The wild quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) is one of the most important species in Ecuador for being a resource of our own genetic Ecuadorian highlands. The distribution areas of this *Amaranthacea* covers the vast majority of the Andean region of our country, being the provinces of Carchi, Imbabura, Cotopaxi and Chimborazo the most important, therefore in this study the sampling of 8 individuals is by locality being targeted areas: El Hato (Carchi), Los Olivos (Imbabura), Belisario Quevedo (Cotopaxi) and Colta (Chimborazo), all of these samples were used for DNA genotyping, in order to establish their phylogenetic relationships

The extraction and purification of DNA was performed by the method proposed by Doyle and Doyle (1987) modified protocol. Genotyping was accomplished by DNA amplification of the rpoB gene fragment of 456 bp amplicons obtained later in the ABI PRISM 3730XL equipment Macrogen Analyzer sequenced. The results of genetic analysis allowed the construction of phylogenetic trees which revealed that genetic diversity is extremely high for a population-way inter and intra-population variability obtaining a percentage of 77, 4% for individuals from the provinces of Carchi and Imbabura and 70.2% for individuals from the provinces of Cotopaxi and Chimborazo, these data were corroborated with the values obtained by statistical tests of the AMOVA and genetic distance; the statistical significance of AMOVA hinted that the similarity between individuals of the northern provinces (Carchi and Imbabura) is only 15%, whereas in the central provinces (Cotopaxi and Chimborazo) is 25%.

Keywords: quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), genetic diversity, gene flow, rpoB gene

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la quinua es considerada como un alimento potencialmente rico en nutrientes indispensables para la dieta, esto se debe al elevado contenido de aminoácidos, siendo el único alimento del reino vegetal que provee todos los aminoácidos esenciales, además desde el punto de vista económico ha logrado que el Ecuador se abra paso a la exportación de este grano (FAO, 2011).

El centro de origen de la quinua se encuentra ubicado en la zona andina comprendida entre los países de Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina, en la actualidad esta planta ha adquirido una mayor relevancia porque posee un concentración alta de aminoácidos esenciales para la vida (Restrepo, 2005).

Los parientes silvestres de esta *Amaranthaceae* no poseen tanta aceptación como las plantas cultivadas debido a que son consideradas como una “mala hierba” pues los granos de la quinua silvestre no son utilizados para la alimentación porque poseen un sabor amargo debido a la gran cantidad de saponinas que estos presentan, por lo tanto esta variedad de quinua se ve amenazada por la actividad humana siendo prioritaria su conservación, para evitar que se pierda los recursos genéticos que podrían generar información muy útil para el mundo científico (Jacobsen, Mujica, y Ortiz, 2003). Por otro lado el término de “mala hierba” solamente denota propiedades negativas a dichas variedades, pero la realidad es que contribuyen a la conservación del equilibrio del medio ambiente porque cumplen funciones en el control de la contaminación, de las plagas, en la lucha contra la erosión, incluso, muchas de estas malas hierbas podrían ayudar a colonizar medios alterados o abandonados, gracias a su gran capacidad de supervivencia y colonización, con lo que ayudarían a incrementar la fertilidad del suelo.

Los estudios moleculares en quinua aún tienen pocos años de haber empezado, por lo que la información existente es muy escasa, uno de los primeros pasos en la investigación es el estudio filogenético de (*Chenopodium quinoa* Willd.) ya que esta información permitiría conocer la dinámica poblacional que existe entre los individuos de una determinada región y comparar como es el flujo genético que

impera en dicha variedad de quinua tomando en cuenta las relaciones existentes entre regiones geográficas más distantes. Igea (2012) señala que la investigación filogenética también permite la obtención de marcadores moleculares útiles para el hallazgo de posibles genes que ayuden al mejoramiento genético de especies vegetales de interés comercial.

En la actualidad se utiliza para filogenia los genes *barcode* debido a que son genes que mutan con mayor facilidad dando información mucho más útil para determinar la posible variabilidad genética de los individuos estudiados, uno de estos genes de interés es el *rpoB* que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa, en estudios realizados en orquídeas por Subedi (2013) se encontró que el uso de este gen dio una alta variabilidad de esta especie.

El estudio del gen *rpoB* en quinua silvestre permite tener una visión más clara y amplia del flujo genético que prevalece tanto en la región norte como en el centro del Ecuador, de tal forma que se puedan realizar análisis sobre la dispersión de los genes de quinua silvestre, el fragmento del gen *rpoB* es muy informativo en cuanto a la variabilidad genética porque al ser un gen conservado permite obtener información de la diversidad molecular entre individuos de la misma población.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. Objetivo general

Analizar las relaciones filogenéticas presentes en quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) mediante el gen rpoB en muestras provenientes de las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo.

1.2. Objetivo específico

Determinar localidades que presenten poblaciones representativas de quinua silvestre, para toma de muestras, en las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo.

Extraer ADN de calidad que permita ser amplificado y secuenciado.

Amplificar y secuenciar el gen rpoB de las muestras obtenidas.

Analizar las relaciones filogenéticas entre los individuos de (*Chenopodium quinoa* Willd.) en Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Alternativa

Existen relaciones filogenéticas entre individuos de quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) en muestras provenientes de las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo.

1.3.2. Nula

No existen relaciones filogenéticas entre individuos de quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) en muestras provenientes de las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Características botánicas y morfológicas de *Chenopodium quinoa* Willd.

La quinua es una planta herbácea dicotiledónea y erecta que puede llegar a alcanzar una altura de 2 m, aunque dicha característica dependerá de varias condiciones edafológicas como: una precipitación oscile entre los 400 a 1000 mm anuales de agua, un fotoperiodo de 7 horas luz, un pH del suelo de 6,3 a 7,3 y una temperatura de 15 °C (Pinto, 2013).

Botánicamente la quinua es considerada como una hortaliza, pero muchos autores como Romo, Rosero, y Florero (2006) la consideran como un pseudocereal debido a que posee un alto contenido de carbohidratos (principalmente de almidón) y a una gran cantidad de proteínas, estas características hacen que la quinua tenga una mayor similitud con los cereales verdaderos que con los vegetales.

La *Amaranthaceae* presenta un sistema radicular pivotante y vigoroso, que puede alcanzar una profundidad de 20 a 30 cm, por lo tanto permite que la planta resista a sequías y tenga una gran estabilidad, en suelos poco compactos Aroa (2011). El tallo es erecto de una forma cilíndrica en la parte superior y angulosa en las cercanías de la raíz, el color de este órgano vegetal es de color verde predominante.

Las hojas son alternadas con una forma romboidal en la parte inferior y lanceolada en la parte superior, el borde de esta estructura foliar es de forma dentada alcanzando a tener de 3 a 20 dientes según lo describe Quelal (2009).

Las flores de están dispuestas en una inflorescencia tipo racimo. Mientras los frutos son un aquenio (fruto seco) de forma elipsoidal o redonda de color amarillo, café o rojo (Silva, 2006). La semilla tiene la principal característica de poseer en el

pericarpio las saponinas, que producen el sabor amargo de las mismas (Cuenca y Del Pilar, 2004).

2.2. Origen de *Chenopodium quinoa* Willd.

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una de las plantas más representativas de la región andina , ya que el centro de origen de esta *Amaranthaceae* está ubicado en esta zona de alta diversidad biológica, a pesar de esto no se encuentra bien dilucidado cuales son los ancestros de este pseudocereal (semillas de gramíneas con albumen rico en harina procedente de plantas dicotiledóneas), debido a que no se conoce desde que año las civilizaciones precolombinas comenzaron a utilizarla, porque se tienen pocos antecedentes arqueológicos y lingüísticos que permitan señalar los posibles años de origen de la domesticación de este grano milenario (Palahuachi, 2012).

A pesar de la falta de información antropológica, García y Cruz (2011) mencionan que hace 3000 años A.C esta *Chenopodiaceae* fue utilizado por primera vez en el norte de Chile como alimento de subsistencia (pág. 19), a pesar de esto la FAO (2011) señala que la quinua se encontraba distribuida desde Nariño al Norte (actual Colombia) hasta Tucumán al Sur (actual Argentina) hace más de 7000 A.C.

La quinua fue utilizada por las civilizaciones centroamericanas como una planta de inflorescencia y como un tributo que debían pagar todos los pueblos vasallos del Imperio Azteca (Tapia, 2012). En el sur del continente americano, la civilización Inca utilizó esta planta como una fuente alimenticia de alto valor energético, que permitió que las campañas de conquista puedan prolongarse por periodos de tiempo más largos (Terán, 2010), además otros indicios históricos señalan que los Incas ofrecían la quinua como un tributo al Dios del sol “Inti” antes del inicio de la siembra (Cornejo, 2007).

Con la llegada de los españoles a América, la quinua fue confundida con el bleado por el padre jesuita Bernabé Cobo, autor del libro “Historia del nuevo mundo”, debido a que estas dos plantas poseen una semilla idéntica, además Salcines (2009) cita que al confundir estos dos vegetales, los conquistadores trataron de llevar a este

pseudocereal a Europa, pero no se lo logro debido a que los niveles de humedad eran muy altos y las semillas no soportaban el viaje.

En esta época pre-republicana, la quinua perdió su importancia en el campo debido a que los conquistadores la denominaban como “alimento para indios” (Horton, 2014), además de que los Incas la utilizaban en ritos de propiciatorios y de purificación, por lo cual los españoles la prohibieron al considerarla impropia para la religión y un impedimento para la dominación europea (Rosas 2005).

Murillo y Mujica (2013) describen que hasta los años de 1960, la quinua fue despreciada por la presencia de otros cultivos de mayor importancia comercial como el maíz, debido a que las autoridades la consideraban como un alimento de la gente de “bajo nivel” y por lo tanto fue apartada de los centros de cultivo. En la actualidad esta *Chenopodiaceae* ha llegado a tener mucha importancia ,debido a que en los años 90 se realizaron estudios acerca de las propiedades nutricionales, esto conlleva a que el mercado norteamericano y europeo tomen un gran interés acerca de la planta (Vásconez, 2012).

Según Fuentes F. (2009) señala que en países como: Ecuador, Bolivia y Chile las plantas cultivadas de quinua crecen conjuntamente con una variedad silvestre que posee un grano negro de pequeño tamaño y de sabor amargo, por estas características esta especie es considerada como una mala hierba y según registros mencionados por García B. (2015) esta planta disminuye la calidad de las variedades cultivadas debido a que existe una mezcla de granos que causa la disminución del valor de las mismas.

2.3. Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es una ciencia que estudia los mecanismos por los cuales se da la distribución de alelos en una población, estos son cambios evolutivos a pequeña escala que contienen una de las bases en las cuales se sustenta la evolución de dichas poblaciones (Herrera E. , 2013).

Las dos bases de la evolución de organismos son la selección natural y la deriva genética, la primera tiene como consecuencia la adaptación de las especies, mientras que la segunda es la fuerza predominante cuando los alelos de un gen no difieren en los efectos sobre la supervivencia o reproducción (Cabrerero y Camacho, 2002). Casi todas las especies están formadas por más de una población de individuos que se cruzan entre sí dando como consecuencia una comunidad denominada población mendeliana en la cual existe intercambio genético.

Barbadilla (2014) asegura que en todas las poblaciones inevitablemente algunos individuos dejarán más descendencia que otros por ello este individuo tendrá más alelos que se expresarán en generaciones posteriores, de este modo las frecuencias de los alelos cambiarán irreversiblemente de generación en generación. Dichos cambios de las frecuencias alélicas está regida por 5 fuerzas evolutivas que son: mutación, deriva genética, endogamia, selección natural y migración o flujo genético. (Iturbe, 2010).

2.3.1. Factores de la evolución

2.3.1.1. Mutación

Una mutación es un cambio estable y heredable en el material genético, estas alteran ciertas secuencias del ADN y por tanto introducen nuevas variantes en la expresión génica que van a dar como consecuencia un aumento en la diversidad genética. Las mutaciones pueden ser recurrentes como en el caso de mutaciones genéticas y no recurrentes (ocurren una sola vez) en las que se encuentran las mutaciones cromosómicas, que tienen una probabilidad mayor de mantenerse en las poblaciones (Fisher, 1930).

Si el progenitor tiene más progeñie existe la posibilidad de que la mayoría hereden la mutación, pero las probabilidades de que estas mutaciones se mantengan de generación en generación es muy baja, por lo tanto no se produce un cambio permanente en la especie.

2.3.1.2. Deriva genética

La deriva génica es una fuerza evolutiva que modifica las frecuencias alélicas y produce cambios evolutivos por acontecimientos al azar lo que da como resultado cambios en el acervo génico entre generaciones sucesivas de una población (Pierce, 2010). Este aspecto tiene mucho que ver con la selección natural pues debido a este proceso se puede disminuir o eliminar por completo un alelo que no aporta de manera significativa a la adaptación de una determinada población.

Estudios realizados por Sewall Wright (1951) llevaron al reconocimiento de que la deriva génica es responsable de la fijación de características hereditarias neutras o no adaptativas en las poblaciones, esto quiere decir, que el alelo de una característica hereditaria dada permanece en determinado locus de un cromosoma en la población y que todos los individuos son homocigotos para él. Una vez que los alelos heredados de la población original se fijan, su frecuencia no cambia a menos que se introduzcan nuevos alelos en su acervo genético.

Los efectos de la deriva génica actúan sobre poblaciones pequeñas, si una población está constituida de pocos individuos un alelo que presente baja frecuencia en ella puede perderse por el simple azar y producir efectos evolutivos de gran importancia, esto se ha demostrado en el efecto fundador y el efecto cuello de botella.

El efecto fundador se produce cuando un grupo de individuos se separa de una población para colonizar una región diferente, esto implica que lleven consigo una parte de la variación genética de la población a la que inicialmente pertenecían y será esa carga genética la que transfieran a las generaciones futuras (Cortés, 2015).

El efecto cuello de botella se refiere a la pérdida de individuos en una población debido a diversos factores que no tienen que ver con la selección natural y la deriva génica se produce en los individuos que sobrevivieron a esos cambios por lo tanto la frecuencia de los alelos en esa pequeña parte de la población es distinta a la de la original.

2.3.1.3. Endogamia

La endogamia es el cruce entre individuos emparentados dando como consecuencia individuos homocigotos y a la población de este grupo de individuos se los denomina líneas puras, pero se necesita de varios cruces para que la frecuencia de homocigotos aumente en una población, de hecho nunca se llegará a un 100% de individuos homocigotos.

Como consecuencia de este proceso la consanguinidad aumenta y a su vez existe un incremento de la expresión de genes recesivos que en algunos casos resultan perjudiciales.

En especies autóгамas como la quinua la depresión por consanguinidad es mínima y los genotipos homocigotos se usan como cultivares para producción comercial. En especies alógamas como el maíz, los genotipos homocigotos se pueden producir rápidamente pero su rendimiento es menor que el de los cultivares híbridos que se usan para producción comercial. La depresión por consanguinidad es severa en algunas especies poliploides (alfalfa) ya que los genotipos homocigotos no sobreviven (Contreras, 2007).

2.3.1.4. Selección natural

La selección natural hace referencia a los mecanismos evolutivos que producen un cambio en las frecuencias relativas de los fenotipos y genotipos de acuerdo a la adaptación de los individuos dentro de una población y todas estas variaciones a nivel genético deben ser heredables. Sin embargo, debido a las nuevas técnicas para el análisis de la variación de ADN y proteínas se inicia una nueva tendencia que es el estudio de la evolución a nivel molecular en donde se postula que existe una gran variación genética contenida en las proteínas y genes, misma que no podía ser justificada del todo por efectos de la selección natural sino por un balance entre la deriva génica y las mutaciones neutras.

Según Li (1997) la selección natural a nivel molecular se puede considerar como una selección balanceadora que permite que se dé una diversidad genética, pero también tiende a homogenizar a una población eliminando los alelos poco comunes de un grupo de individuos.

Un resultado importante derivado del modelo neutro o selección a nivel molecular es que la tasa de cambio a la cual un nucleótido es remplazado o sustituido por otro dentro de una población es igual a la tasa de mutación sin importar el tamaño poblacional.

2.3.1.5. Flujo genético

El flujo genético se refiere a cualquier desplazamiento de genes desde una población a otra, si existe transferencia de genes que inicialmente no existen en una población el flujo genético puede ser una fuente importante para la variabilidad genética de dicha población.

La cantidad de flujo genético que se produce entre poblaciones va a variar de acuerdo al organismo al que se esté refiriendo, en el caso de especies vegetales en donde obviamente el individuo no puede desplazarse de un lugar a otro el flujo genético es menor, debido a que la movilidad del polen y de las semillas va a depender de la velocidad y dirección de viento y de la acción de los insectos polinizadores (González J. , 2006). Por el contrario se tiene un mayor flujo genético cuando se trata de organismos que puede movilizarse por su propia cuenta en este caso todos los organismos de esa especie evolucionarán de manera conjunta.

Existen tres tipos de flujo genético, el primero es flujo genético por hibridación en las plantas, el segundo es flujo génico neutro y por último flujo genético desde plantas domesticadas a sus parientes silvestres.

La homogeneización de la variación genética por flujo genético no origina necesariamente la mejora de la variedad local, más bien los cambios de esta variedad dependerán de los niveles de riqueza alélica y de diversidad genética de la población de la planta cultivada, en relación a las de la población sumidero o planta silvestre. Como los cultivares de plantas domésticas normalmente contienen menos variación que las poblaciones de sus parientes silvestres, se puede predecir que los niveles de

variación neutra en una población silvestre descenderán a los niveles de variación de las plantas cultivadas (Ellstrand , 1999).

Por su parte el flujo genético por hibridación se da naturalmente debido a que es un mecanismo evolutivo y autores como Barton y Hewitt (1985) señalan que más del 70% de las especies de plantas pueden descender de híbridos. Los híbridos tienen mejores características que sus parentales, esto explica que existan grandes probabilidades de introgresión, es decir, incorporación de alelos de una especie o taxón en otro diferente, por lo tanto, se puede producir flujo génico entre taxones.

2.4. Filogenia

La filogenia establece las relaciones evolutivas de los grupos vegetales permitiendo así distinguir que grupos vegetales son ancestrales y a cuales de los grupos actuales dieron origen.

Para establecer las líneas filogenéticas, se deben tomar muy en cuenta factores geográficos, espaciales y temporales en el que se ubican tanto el ancestro común como las poblaciones en estudio, debido a que factores como: aislamientos geográficos, cambios climáticos severos, desastres naturales y demás sucesos en el tiempo, ocasionan que la especie original se separe en dos o más especies diferentes que con el tiempo quedan aisladas, tanto geográfica como reproductivamente. (Achá, Fontúrbel, Mondaca y Zambrana, 1999). La finalidad de estos análisis taxonómicos consiste en la elaboración de un árbol filogenético que muestra la historia evolutiva del grupo en estudio, es decir que estos dendogramas representan una posible modificación de los caracteres morfológicos o moleculares de las especies.

En el estudio de la sistemática filogenética es vital encontrar caracteres homólogos porque son más fáciles de rastrear, mientras que los caracteres homoplásicos podrán ser causantes de errores en los árboles filogenéticos al inferir relaciones de parentesco erróneas (Peña, 2011).

2.4.1. Métodos de construcción de árboles filogenéticos

Según Cañizares (2014) existen 3 métodos diferentes para la obtención de los árboles filogenéticos que son: distancias génicas, máxima parsimonia y máxima verosimilitud.

2.4.1.1. Cálculo de distancias génicas

La distancia génica es una medida que expresa el grado de divergencia entre dos o más secuencias, esto se calcula a partir de una matriz de ausencia-presencia, en donde se compara la secuencia de cada individuo con las demás, para de esta manera obtener el número de sitios comunes (homólogos) o diferentes (polimórficos) dentro de la muestra, posteriormente los datos comparados son promediados logrando la disminución del tamaño de la matriz y la formación de grupos similares, que permitirán la construcción del árbol filogenético. En la actualidad el cálculo de la distancias génica se lleva a cabo en programas bioinformaticos como MEGA 6.0 que permite realizar esta operación mediante un algoritmo (Cañizares, 2014).

2.4.1.2. Máxima parsimonia

El método de máxima parsimonia para la construcción de árboles filogenética, se basa en la ley de la parsimonia que consiste en la solución de un problema de la forma más simple (Brocks, 2007).

Aplicado a la Sistemática Filogenética el criterio de parsimonia conduce a la elección del cladograma o árbol filogenético que explica la taxonomía de un grupo con el menor número de cambios evolutivos a diferencia de los métodos de distancias, por ello la premisa básica en Parsimonia es que los taxa que comparten una característica similar, lo hacen porque heredaron esa cualidad de un ancestro común (González, 2007).

2.4.1.3. Máxima verosimilitud

En este método se parte de un modelo de evolución o uno de sustitución de bases, a partir de esto se elige un modelo de mutación, una vez determinado la mutación a estudiar, se realiza un algoritmo de las probabilidades de cambio dentro del modelo seleccionado, a partir de esto se calcula la similitud entre los individuos, lo cual genera el tamaño de las ramas del árbol filogenético. Esta metodología es análoga al procedimiento de la máxima parsimonia, porque en los dos procedimientos se debe explorar todos los árboles posibles que representen a la especie estudiada. (Cañizares, 2014).

2.4.2. Secuencias conservadas

En el estudio de la filogenia se utilizan las secuencias conservadas que son genomas similares o idénticos que se conservan a través del tiempo y se pueden encontrar en ácidos nucleicos, proteínas o polisacáridos, dentro de múltiples especies de organismos o dentro de diferentes moléculas producidas por el mismo organismo.

Los científicos consideran estas similitudes de secuencias entre varias especies, como evidencia de que un gen específico desempeña algunas funciones básicas y esenciales para muchas formas de vida, es por ello que la evolución ha conservado su estructura, al no permitir que se acumulen en ellas muchas mutaciones.

Cuando decimos que un gen está altamente conservado, significa que la secuencia de este gen es muy similar en diversas especies. Por ejemplo, el gen *rpoB* está presente tanto en bacterias como plantas, y al ser un gen tan importante se conserva de generación en generación, lo cual permite el análisis filogenético de las especies (Muñoz, 2011).

2.4.2.1. Gen *rpoB*

El gen *rpoB* codifica la subunidad β de la ARN polimerasa tanto en bacterias como en organismos superiores como las plantas (Suay, 2008). En la actualidad se ha

utilizado dicho gen como un *barcode* o un código de barras genético que facilita la identificación taxonómica de plantas, el peso molecular del fragmento utilizada para este fin es de 456 pb (Jansen, 2009). Yap (2008) alude que los códigos genéticos pueden ayudar a investigar la variabilidad genética presente en los individuos debido a que este gen al ser conservado tiende a modificarse con mayor rapidez para facilitar la adaptación de las especies al entorno en el que habitan. El estudio del gen *rpoB* en la quinua silvestre es indispensable porque ayudaría a obtener una gran cantidad de información molecular, que permitiría obtener datos de la dinámica poblacional que posee *Chenopodium quinoa* Willd.

2.5. Modelos de distribución poblacional para establecer localidades de muestreo

Los modelos de distribución potencial son diseños matemáticos que permiten tener una idea de la forma en la que se distribuye una población dentro de un espacio geográfico delimitado, además estos modelos son muy útiles para la determinación de las especies invasoras, el calentamiento global, entre otras (Bermejo, 2011). Para realizar un modelamiento de los datos se puede utilizar técnicas discriminantes, descriptivas o mixtas, estas metodologías solo difieren en el tipo de datos que se utiliza, en las primeras se usa matrices de ausencia-presencia, mientras en las toras solo se utiliza datos de presencia (Mateo, 2011).

Las principales limitaciones de este modelamiento de datos son: las relaciones bióticas e hipótesis de pseudoequilibrio. Las relaciones bióticas son un factor muy importante en un ecosistema debido a que limitan hasta donde se encuentra un individuo dentro de una población, Nualart (2005) menciona que esta variable ocasiona que no siempre los modelamientos poblacionales sean totalmente exactos debido a que estos diseñados matemáticos asumen que todos los objetos de estudio ocupan un lugar similar dentro de un espacio geográfico determinado.

La hipótesis del pseudoequilibrio se refiere a que las especies de una población, se mantienen estables durante el tiempo y no sufren ninguna modificación, esto limita la veracidad de estas distribuciones matemáticas porque ningún ecosistema se mantiene estable durante el tiempo.

2.5.1 Bases de datos para el modelamiento de poblaciones

Las bases de datos facilitan no solo el registro de gran cantidad de datos si no que son también el acceso a los mismos, lo cual permite ahorrar tanto espacio físico como tiempo al momento de consultar información contenida en ellas.

Un avance significativo dentro del área de la ecología sólo se podrá lograr con la adopción generalizada de un sistema basado en el uso compartido de los datos entre científicos, en la actualidad, existe una revolución en el desarrollo de herramientas y protocolos que permiten a los ecólogos documentar, compartir y almacenar sus datos de manera adecuada para su uso a largo plazo. La utilización sistemática de estas herramientas facilitará la generación de conocimiento ecológico y supondrá un enorme ahorro de tiempo a los ecólogos, tiempo que podrán dedicar a la investigación en sí misma (Alonso y Valladares, 2006).

Algunas bases de datos utilizadas en el campo de la ecología son *Gbif – Global Biodiversity Information, Facility, Tropicos, Glosk, Plant List*, entre otras, estas proporcionan información sobre biodiversidad (colecciones botánicas y zoológicas) de todo el globo, así como también listas de trabajo de todas las especies vegetales conocidas con el objetivo de ser global para las especies de plantas vasculares (plantas con flor, coníferas, helechos y sus aliados) y de briófitas (musgos y hepáticas).

2.6. Herramientas moleculares para el estudio de la variabilidad genética

En la actualidad la biología molecular es la base para la investigación de estudios filogenéticos, la aplicación de marcadores genéticos moleculares a problemas de ecología y evolución es lo que se conoce como ecología molecular cuyo principal objetivo es la aplicación de marcadores de ADN que son estables, discretos y heredables a fin de identificar individuos, poblaciones o especies y estudiar las relaciones que se establecen entre éstos (Jordano, 2006).

Los análisis genéticos también permiten estudiar el efecto de la fragmentación y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas y el efecto de la acumulación y pérdida de mutaciones deletéreas (Rocha y Gasca, 2007).

2.6.1. PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa)

La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) es una técnica que fue desarrollada por Mullis en 1980, cuyo objetivo es la síntesis de varias copias de un fragmento de ADN utilizando reacciones enzimáticas *in vitro*. Para la obtención de estas moléculas específicas se utiliza una polimerasa que permita separar y sintetizar los segmentos deseados, la enzima más empleada es la Taq, debido a que es termoestable y sencilla de obtener. Tamay de Dios e Ibarra (2013) señalan que para sé de la reacción de esta enzima es necesario el uso de cebadores o *primers*, 4 desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y una solución Buffer de Magnesio y Tris-HCl.

Los cebadores son secuencias de oligonucleótidos, que flanquean al fragmento que se desea amplificar y son complementarias a esta, el tamaño de estas moléculas oscila entre 15 y 25 pares de bases, además contienen una cantidad de G y C inferior al 55 %, esto evita la formación de posibles dímeros que generen productos inespecíficos. Pinzón (2006) menciona que los *primers* utilizados en la PCR son dos, uno se lo denominada de sentido o "*forward*" y otro de anti sentido o "*reverse*", estas dos secuencias hibridan la cadena de ADN y permiten que la Taq polimerasa pueda extender la doble cadena, formando las réplicas del fragmento deseado.

Otro componente de la reacción son los dNTP's que permiten la síntesis de las nuevas cadenas de ADN, estas moléculas pueden ser un limitante del proceso enzimático debido a que necesitan de iones de Mg⁺ para sintetizar los nuevos fragmentos, si la concentración de estos desoxirribonucleótidos trifosfato es elevado la actividad de la enzima es inhibida y la amplificación no sucederá, Espinoza (2006) cita que la concentración óptima de estos reactivos debe encontrarse entre 0.2 a 1.0 mM. Por último el buffer es una solución amortiguadora que se usa en la reacción y generalmente está compuesta de Tris-HCL (pH = 8) y Cloruro de Magnesio, la

función de este compuesto es de mantener el pH estable, y de actuar como un cofactor de la polimerasa.

2.6.2. Electroforesis

La Electroforesis es la técnica más utilizada en la Biología Molecular debido a que permite visualizar los fragmentos de ADN para su posterior estudio, esta metodología fue utilizada por primera vez por Tiselius en 1937, pero con el pasar de los años los investigadores la modificaron hasta perfeccionarla totalmente, utilizando diferentes colorantes, buffers de carga y tipos de soporte (García H. , 2000).

El fundamento de esta técnica es la migración de solutos iónicos desde una carga negativa o ánodo hacia una positiva o cátodo, la velocidad en que viajan estas biomoléculas va a depender del peso molecular, la porosidad del gel y del voltaje aplicado. Morales y Gallo (2006) describen que si el voltaje es demasiado alto, el gel tiende a calentarse y podría derretirse, pero si el voltaje es muy bajo los fragmentos podrían no migrar de una forma correcta obteniéndose resultados poco confiables.

Las proteínas y los ácidos nucleicos poseen determinados tipos de carga eléctrica que dependen del pH de la solución en la que se encuentra, de la premisa anterior se puede deducir que la velocidad de las partículas en la electroforesis está íntimamente ligada al punto isoeléctrico, por lo tanto una molécula está cargada negativamente cuando el valor de esta característica Físico-química en la solución es menor a la cantidad real.

2.6.2.1. Tipos de Electroforesis

Fierro (2005) describe que se han desarrollado dos técnicas electroforéticas, la primera de ellas es la electroforesis libre, pero esta metodología ya no se utiliza en la actualidad debido a que no aportaba con una resolución adecuada para el análisis molecular porque al usar un fluido entre las dos placas magnéticas, no se podían diferenciar los fragmentos con facilidad.

El segundo tipo de electroforesis es la zonal que tiene como característica utilizar como soporte del campo eléctrico geles de agarosa o poliacrilamida para permitir la separación de soluciones químicamente complejas, esta disgregación de las moléculas se puede llevar a cabo porque se coloca una solución tampón que permite que el flujo eléctrico influya en la migración de fragmentos desde el más pesado hasta el más liviano, además la resolución de estas técnicas es mayor a la de la Electroforesis libre debido a que el ADN es marcado con un reactivo que emite fluorescencia al ser excitado por la luz Ultra violeta (UV).

Dependiendo del tipo de moléculas que se quiera separar, se utiliza geles de poliacrilamida o geles de agarosa, para la visualización de fragmentos muy pequeños y de proteínas se utiliza la poliacrilamida como soporte para las muestras, debido a que presentan un tamaño de poro adecuado para separar las moléculas complejas con mayor facilidad. Otra característica de estos geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, estables en un amplio rango de: pH, temperatura y fuerza iónica. (Maldonado y Jorrín, 2006).

La electroforesis capilar (EC) es una de las técnicas más utilizadas en la actualidad, debido a que permite la separación y cuantificación de una gran cantidad de analitos como: ácidos nucleicos, proteínas, vitaminas, fármacos; la versatilidad y eficacia de esta metodología es debido a que combina elementos de otros procedimientos analíticos como el uso de electrodos de alta sensibilidad al igual que en la cromatografía líquida o el uso de capilares de sílice fundido como en la cromatografía de gases. Además Chopin (2012) indica que la EC, tiene una ventaja con respecto a las demás herramientas moleculares electrodinámicas, debido a que el diseño de este procedimiento permite la generación de un campo magnético superior que facilita la separación de los compuestos obteniéndose picos mucho más simétricos y angostos, y hacia facilitando el análisis cuantitativo de los datos.

2.6.3. Secuenciación de ADN

Con el descubrimiento de la estructura del ADN por Watson y Crick en 1953, los científicos empezaron a desarrollar nuevas técnicas para el estudio de esta molécula

de gran importancia biológica; una de estas técnicas modernas es la secuenciación, esta metodología ha permitido tener grandes avances en la investigación forense, el estudio de genes de interés, entre otros (Moratalla, 2002).

La secuenciación es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es establecer el orden preciso de bases a lo largo de una cadena de ADN, esto se hace comúnmente al someter los fragmentos de ADN a electroforesis en gel, lo cual lleva a la separación de la cadena en fragmentos que difieren en tamaño sólo por una base. Para secuenciar los ácidos nucleicos, los investigadores desarrollaron dos técnicas una basada en las reacciones químicas y otra en las reacciones biológicas. La primera de estas técnicas fue creada por Maxam y Gilbert en 1977, quienes propusieron utilizar reacciones hidrolíticas selectivas del ADN mediante modificaciones químicas de las bases nitrogenadas (Castillo, 2005), estos cambios de la estructura de los nucleótidos se lograban con la adición de dimetil sulfato para las Guaninas, Ácido fórmico para las purinas (G+A) , hidracina para las pirimidinas (T+C) y cloruro de sodio e hidracina para las citosinas , todas estas reacciones generaban fragmentos del ADN , los cuales eran separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y leídos de abajo hacia arriba en sentido 3´- 5´. Esta técnica no tuvo tanto impacto en el mundo científico debido a que era más demorosa y no se lograba obtener fragmentos totalmente puros, lo que dificultaba la lectura en los geles.

En el mismo año Sanger describe la metodología para una secuenciación mediante reacciones enzimáticas, el fundamento de esta técnica es el uso de un solo iniciador y de un dideoxinucleóticos (ddNTPs) que carecen del grupo hidroxilo en el extremo 3´, esta cualidad permite inhibir la replicación del ADN debido a que no se pueden anclar nuevas cadenas de nucleótidos a la cadena molde (Márquez, Serrato, y Cerritos, 2010) , otra característica de estas moléculas es que poseen un grupo fluoróforo que emite una fluorescencia al ser excitados por la luz UV (Jia & et.al, 2008).

En la actualidad la secuenciación se encuentra automatizada, para permitir la lectura de la mayor cantidad de secuencias en el menor tiempo posible, todas estas metodologías están basadas en la técnica propuesta por Sanger debido a su gran efectividad. La automatización de esta reacción enzimática consiste en el uso de

cebadores marcados con 4 tipos de fluorescencia para que puedan dar un color diferente al ser excitados por la luz, estos colorantes corresponden a cada una de los ácidos nucleicos: guanina, citosina, timina y adenina; Bautista (2010) describe que otra forma de obtener luminiscencia de las estructuras del ADN es mediante la incorporación en la reacción de secuencia de dideoxinucleotidos marcadas con un fluoróforo diferente para cada una de las pirimidinas y purinas. Para la lectura de los nucleótidos el equipo tiene incorporado un polímero que separa los nucleótidos del fragmento a secuenciar, y un láser que va midiendo la absorbancia para posteriormente transformarla en un electroferograma.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

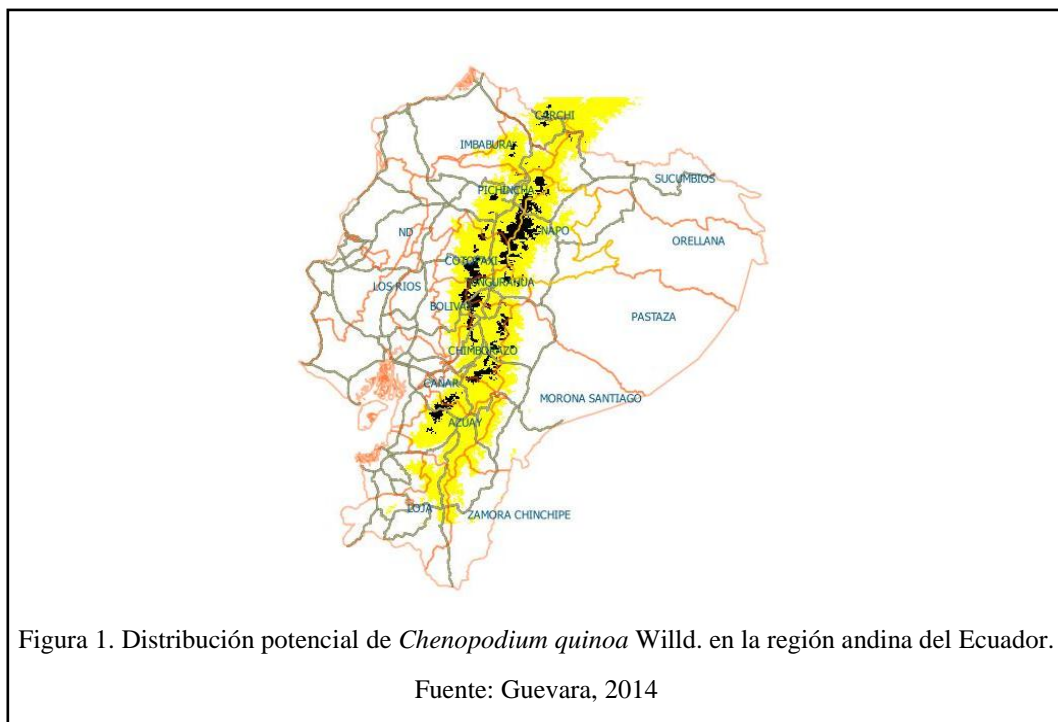
3.1. Determinación de las localidades de muestreo

Inicialmente se realizó el levantamiento de información referente a la ubicación de las plantas de quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd) presentes en la región Andina del Ecuador se consultó los registros existentes de dicha *Amaranthaceae* en institutos y herbarios nacionales como: Herbario Nacional del Ecuador, Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales, Herbario de la Universidad Central del Ecuador, Facultad de Agronomía de la Universidad Central del Ecuador y Jardín Botánico de Quito, de donde se obtuvieron todos los registros que mantienen.

Además de realizar un levantamiento de información de los registros nacionales también se indagó en bases de datos internacionales como: *Missouri Botanical Garden*, *Herbarium of Aarhus University*, *Genetic resources collection*.

De acuerdo a la información previamente obtenida, se realizó una base de datos con información geográfica sobre la ocurrencia de cada individuo de *Chenopodium quinoa* Willd., el documento generado sirvió para su proyección en DIVA-GIS, un programa informático diseñado para el mapeo y análisis de datos geográficos, es decir un sistema de información geográfica (SIG). DIVA-GIS permite hacer mapas de diferentes áreas, utilizando la ubicación de los sitios donde se observó una especie, o dicho de otra manera, la ocurrencia de la especie.

La información obtenida gracias a los sistemas de información geográfica empleados, permite establecer las zonas de muestreo para la realización de la fase de campo de la investigación, en la Figura 1 se puede observar el mapa de distribución potencial de *Chenopodium quinoa* Willd. en la región andina del Ecuador, proyectado con el software *Quantum GIS 2.2.0*.



La franja pintada en amarillo y negro hace referencia a la distribución potencial de quinua en la región andina del Ecuador, se destacan en negro las zonas con mayor probabilidad de ocurrencia de la especie. Se delimita en color anaranjado las provincias del Ecuador y en color gris se muestra la red vial.

3.2. Toma de muestras

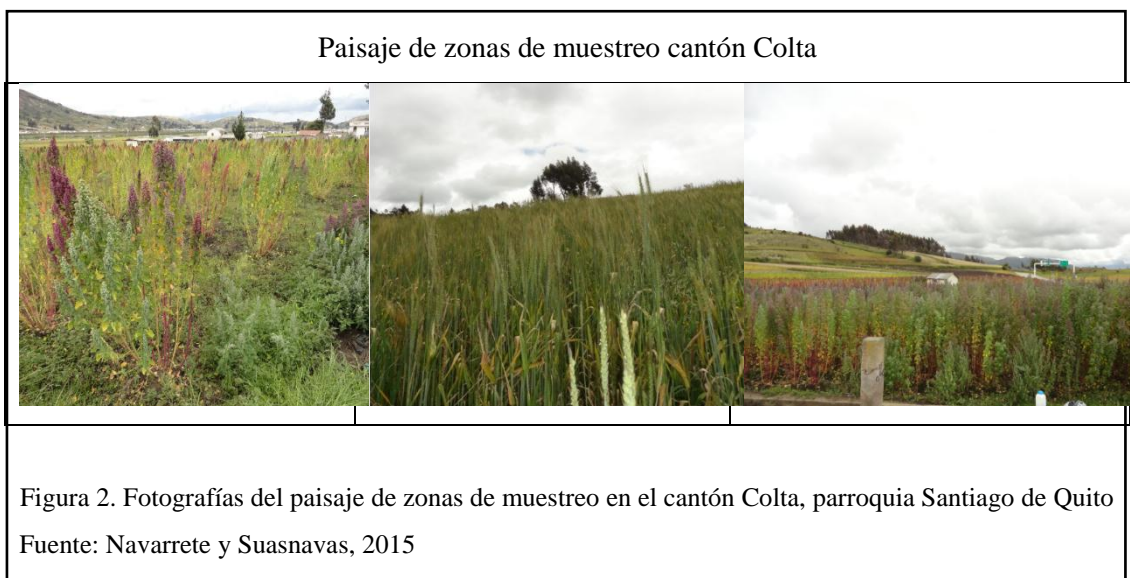
La colecta de muestras se realizó en 2 provincias de la zona Norte de la región andina: Carchi e Imbabura y de 2 provincias de la zona central: Cotopaxi y Chimborazo, en total se tomaron 32 muestras entre las 4 provincias. De cada provincia se escogió una localidad, la cual presenta las características ambientales y edafológicas idóneas para el crecimiento de este pseudocereal, a continuación se detallan los lugares escogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Lugares de muestreo de Quinoa silvestre

Provincia	Cantón	Parroquia / Localidad	Número de muestras
Carchi	Mira	Mira / Hato	8
Imbabura	Cotacachi	Los Olivos	8
Cotopaxi	Latacunga	Belisario Quevedo	8
Chimborazo	Colta	Santiago de Quito	8

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

Antes de la toma de muestras, se tomó fotografías del paisaje y relieve del terreno (Figura 2) para poder contrastar las características geográficas que rodean a la Quinua en los diferentes sitios de estudio.



De cada individuo se tomó la ubicación geográfica (Anexo 1) con el GPS marca Garmin modelo ETREX 30, para posteriormente tomar 10 hojas jóvenes de cada planta de estudio, teniendo en cuenta que el material foliar no debe presentar señales de enfermedad (manchas amarillas o negras) ni tampoco señales de plagas; este material vegetal se colocó en un sobre de papel previamente etiquetado con la simbología asignada para cada individuo y para cada sitio, por ultimo estas muestras se colocaron en un recipiente con silica gel para evitar la oxidación del ADN. Para fines de análisis del posible daño de la estructura foliar se tomó de cada individuo una hoja y se la dibujó en un papel milimetrado, posteriormente se contó el número de cuadrados que conforman la gráfica para de esta forma hallar el área total, la cual representa el 100 % de este órgano; por lo tanto el porcentaje del daño de la hoja se lo obtuvo mediante la multiplicación del área dañada por 100 dividido para el área total.

De cada quinua seleccionada se mido su altura y se procedió a extraerla de la tierra para posteriormente prensarla y realizar la identificación de cada individuo asegurando de esta manera que se trata de la variedad *Chenopodium quinoa* Willd.

3.2.1. Cuantificación de proteínas y polifenoles en hojas de quinua

En las salidas de campo a los sitios de muestreo se evidenció que empíricamente los agricultores consideran a esta planta como una “mala hierba” de poca importancia para la alimentación del ganado, debido a que posiblemente es tóxica puesto que el ganado no la utiliza como fuente de alimento, por lo cual fue indispensable realizar un análisis de la cantidad de proteínas y polifenoles presentes en la quinua silvestre, para comprobar la certeza de esta hipótesis no científica.

Para la cuantificación de proteínas primero se extrajo estos compuestos, mediante el procedimiento propuesto por García A. y Sánchez (1998) que consiste en pesar 100 mg de hojas secas y triturarlas en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se añade 1 ml de buffer de extracción (0,04 M de Tris HCl pH 8, 0,32 M de glucosa y 0,67 M de glicina) y se deja macerar durante 24 horas, de ahí se coloca una solución de sulfato amónico 60% v/v que permite obtener las proteínas del macerado. Por su parte para la cuantificación de estos compuestos se realizó una medición en un espectrofotómetro UV-1240 a dos longitudes de onda que son: 260 y 280, mientras la concentración de esta molécula se la realizó aplicando la ecuación propuesta por Reyes y Galván (2009) que dice que la concentración en nmol/ml es igual a la diferencia de la multiplicación de la absorbancia en 280 por 1,55 y la absorbancia en 260 por 0,76.

Por su parte la cuantificación de los polifenoles totales se la realizó mediante el protocolo descrito por González M. (2009), esta metodología consiste primeramente en pesar 50 mg de tejido foliar seco, para posteriormente añadir 500 ul de etanol acuoso 50 % v/v, y dejar macerar durante 24 horas a temperatura ambiente, luego se filtra al vacío obteniéndose un producto con los polifenoles que se suspende en la solución de etanol acuoso. Para la cuantificación de este extracto se midió su absorbancia en un espectrofotómetro UV-1240, a una longitud de onda de 725 nm, y para determinar su concentración se utilizó la ley de Lambert-beer que dice que la

concentración en molaridad es igual al cociente de la división entre la absorbancia y la multiplicación de la absortividad molar por la longitud de la celda.

3.3. Identificación de las muestras

La identificación de las muestras se realizó en el Museo Nacional de Ciencias Naturales en la sección del Herbario Nacional. Las características morfológicas evaluadas para el reconocimiento de los individuos fueron el tipo de borde y la forma de las hojas, debido a que el tipo de inflorescencia es algo común de las plantas pertenecientes a esta familia.

3.4. Extracción y purificación de ADN

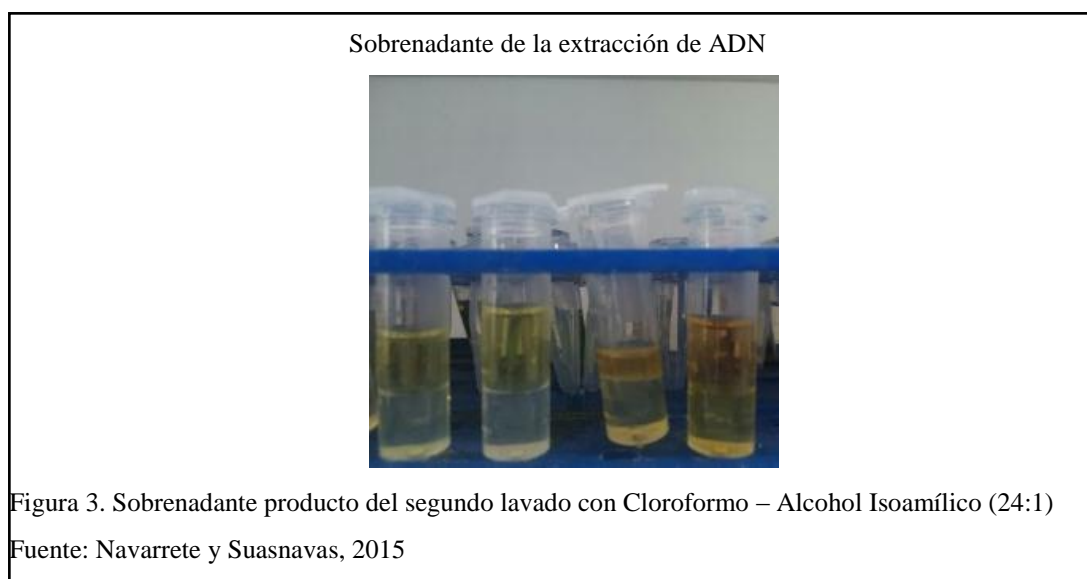
El método de extracción utilizado en esta investigación fue el propuesto por Doyle y Doyle (1987), con las modificaciones realizadas por el Dr. Rommel Montufar director del laboratorio de Genética Molecular de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

El material seco se trituró en un mortero hasta obtener un polvo fino, el cual fue pesado llegando a una masa de 50 mg de tejido vegetal, luego fue re-suspendido en 1 ml de CTAB (0,05 M de CTAB, 0,1 M de Tris HCl pH 8, 0,12 M de EDTA y 1,4 M de NaCl) y se añadió 9 μ l de β -mercaptoetanol 0,01 % v/v, esta solución se incubado durante una hora a 65 °C con agitación cada 5 minutos, posteriormente se colocó 1 ml de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se centrifugo a 13300 RPM durante 10 minutos, para obtener un sobrenadante libre de impurezas.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2 ml y se añadió un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1; el coloide se centrifugo a 13300 RPM durante 7 minutos, este paso permite obtener un producto celular libre de impurezas; al producto de la centrifugación se lo transfirió a un tubo de 1,5 ml, añadiendo un volumen igual de isopropanol frío y se dejó precipitar el ADN toda la noche a -20 °C.

Una vez que precipito el ADN (Figura 3), se centrifugó durante 10 minutos a 13300 RPM, se eliminó el sobrenadante y se colocó 1 ml de etanol al 70 %, se dejó reposar durante 10 minutos y se retiró el alcohol. El pellet que se formó se secó a 37 ° C durante 3 horas (Anexo 2).

Una vez que el pellet se secó se lo rehidrato con 100 µl de agua libre de ADNasas y 50 µl de TBE 1X , luego se añadió 15 µl de ARNasas y se incubó durante 35 minutos a 37 °C, por último se tomaron alícuotas del ADN y se lo almacenó a -20 °C.



3.5. Visualización y cuantificación de ADN

La calidad del ADN de cada muestra se visualizó mediante electroforesis horizontal, en geles de agarosa al 1 % con *SYBR Safe DNA gel stain*, el cual es un colorante fluorescente que se intercala entre la estructura del ADN y emite una fluorescencia la ser excitado por la luz UV.

La preparación de las muestras para la electroforesis, consistió en colocar 10 µl de ADN y 2 µl de *Blue Juice gel loading buffer*. En el primer carril del gel se colocó 2 µl de *DNA ladder* como patrón, el cual permite visualizar cuantas pares de bases (pb) tienen las muestras de estudio. Las condiciones de electroforesis fueron 120 V, 500

mA durante 30 minutos. En la Figura se visualiza una corrida electroforética de las muestras provenientes de Colta.



La cuantificación de las muestras se las realizó en el Qubit Fluorometer 2.0, para la lectura de las mismas se utilizó el kit *dsDNA Broad range assay* de Invitrogen, en este producto comercial se incluyen todos los reactivos necesarios para realizar la medición del ADN.

Para la medición de las muestras primero se prepara una solución madre compuesta por 199 μl de *Working solution* y 1 μl de *Reagent* por cada muestra a cuantificar, esta solución se preparó en un tubo de 2 ml. De la mezcla madre se tomó 190 μl y se dispensó en tubos de 0,5 ml, para posteriormente añadir 10 μl de ADN por cada muestra, estos microtubos se agitaron con la ayuda de un *vortex* e incubaron durante 2 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

Para realizar la medición de la concentración de ácidos nucleicos se selecciona la opción DNA de la pantalla de inicio del equipo, posteriormente se elige la alternativa *dsDNA Broad Range*, y el Qubit da un mensaje que pide introducir la primera muestra. Para la lectura se selecciona *Read* y el equipo nos da la concentración de DNA en mg/ml (Figura 5).

Metodología para la cuantificación en el Qubit



Figura 5. Metodología de la cuantificación en el Qubit

Fuente: Navarrete y Suasnavas, 2015

3.5.1. Cuantificación de proteínas en la solución de extracción de ADN

La cuantificación de las proteínas de la solución de extracción de ADN se realizó debido a que este pseudocereal presenta una gran cantidad de proteínas, las cuales pueden llegar a degradar el ADN, para la determinación de estos contaminantes las muestras se diluyeron en agua ultra-pura con un factor de dilución de 10, posteriormente se las midió en un espectrofotómetro UV-1240 a dos longitudes de onda: 280 y 260 nm, y mediante la ecuación descrita en el punto 3.2.1, se obtuvo la concentración de estos compuestos.

3.5.2. Cuantificación de polifenoles en la solución de extracción de ADN

La cuantificación de polifenoles se la hizo porque estos compuestos cíclicos inhiben la reacción de PCR, por lo cual es necesario determinar si existe o no una cantidad de estos compuestos presentes en la solución de extracción de ADN. Para medir la concentración de estos metabolitos secundarios se procedió a realizar la misma metodología que la descrita en el apartado 3.4.1, la única diferencia es que estas moléculas se midieron en una longitud de onda de 725 nm (Momteleone y Morábito, 2008), por su parte para el cálculo de la concentración se utilizó la ley de Lambert-beer.

3.6. Genotipificación de ADN

La genotipificación de las muestras se llevó a cabo mediante dos pasos que son: la amplificación del fragmento *rpoB* mediante PCR y la secuenciación de las muestras en el equipo ABI PRISM 3730XL *Analyzer*.

3.6.1. Amplificación del Gen *rpoB*

3.6.1.2. Condiciones de PCR

Para la amplificación del fragmento *rpoB*, se realizó una estandarización teniendo como principales variables: la gradiente de temperatura de annealing, el volumen de ADN de las muestras, la concentración de los *primers* y de dimetil sulfóxido (DMSO). El juego de *primer* del gen *rpoB* utilizado en este estudio presenta la siguiente secuencia para el *Forwar* 5'AAGTGCATTGTTGGAAGTGG'3 y para el *Reverse* 5'CCGTATGTGAAAAGAAGTATA'3.

Posterior a la estandarización de la reacción, se procedió a amplificar las muestras de estudio, realizando una master mix, cuyos componentes se describen en la Tabla 2; en esta experimentación se usó la *Go Taq green Master Mix* de Promega, este coctel comercial contiene: Taq-polimerasa, DNTPs, MgCl₂ y *Buffer* de carga.

Tabla 2. Master mix para amplificación de gen *rpoB*

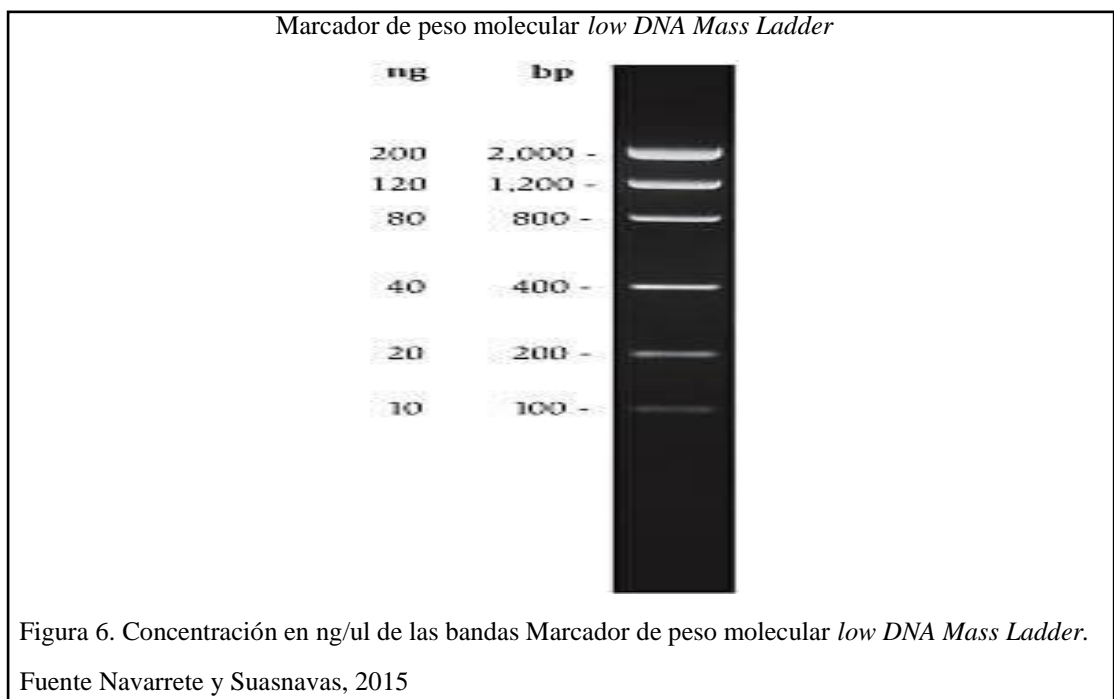
Reactivo	Volumen	Concentración final
<i>Go taq green master</i>	12,50 µl	1 X
<i>Primer Forwar</i>	0,80 µl	1nM
<i>Primer Reverse</i>	0,80µl	1 nM
DMSO	1,00 µl	0,04 % v/v
ADN	3,00 µl	10 ng
Agua	6,90 µl	
Volumen final	25,0 µl	

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

Las amplificaciones de las muestras se las realizó en un termociclador modelo TC9610 de Labnet. El programa para este gen consistió en un ciclo inicial de

desnaturalización inicial a 94 °C por 1 minuto, 40 ciclos de desnaturalización cíclica a 94 °C por 30 segundos, 40 segundos de anillamiento a 57,6 °C, 5 minutos de elongación a 32° C.

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa al 1 %, debido a que los fragmentos de interés tienen un peso de 456 pb; las condiciones para la electroforesis fueron un voltaje de 120 voltios durante 30 minutos a 500 mA. La cuantificación de los amplicones fue mediante una comparación visual de la intensidad de banda generada por el producto de la PCR y el marcador de peso molecular (*low DNA Mass Ladder*), en la Figura 6 se representa las bandas del marcador de peso molecular con sus respectivas concentraciones.



3.7. Secuenciación de muestras

La secuenciación de las muestras fue realizada por Macrogen que es una empresa dedicada a la investigación y desarrollo de la genómica hace ya 14 años, esta institución brinda sus servicios a nivel internacional colaborando con aproximadamente 12000 investigadores de 100 países diferentes. Uno de los servicios más importantes de Macrogen es la secuenciación de ácidos nucleicos mediante el cumplimiento de tres procedimientos que son: purificación del producto

de PCR, PCR de secuencia y reacción de secuenciación. Para esta investigación se enviaron 32 amplicones con una concentración promedio de ADN de 75 ng/ul.

3.7.1. Purificación del amplicón

Para la purificación del amplicón, Macrogen utiliza el producto comercial *AMPure XP* fabricado por Beckman coulter (2013) , el protocolo propuesto por la empresa consiste re suspender el *Agencourt AMPure XP* mediante agitación, hasta obtener una mezcla homogénea de las partículas magnéticas que se hayan precipitado, luego se añade 45 μL de *Agencourt AMPure XP* para un volumen de reacción de PCR de 25 μl (1.8 μL de *Agencourt AMPure XP* por cada 1 μl producto de PCR), se agita la mezcla y se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente para que se unan los productos de PCR mayores a 100 bp a las perlas magnéticas. Transcurrido este tiempo se coloca los tubos en la placa magnética (*Agencourt SPRIPlate 96R Magnet Plate, Beckman Coulter Genomics*) y se los deja en reposos durante 7 minutos hasta que se forme el anillo.

Se adicionas 200 μL de etanol al 70 % a cada tubo y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se elimina el etanol por inversión de la placa magnética, y se elimina el remanente de etanol de la parte inferior del tubo utilizando una micro pipeta multicanal.

Posteriormente se seca el producto durante 15 minutos a temperatura ambiente, con el fin de asegurar que todos los restos de etanol se eliminen, totalmente seco se retiran los tubos de la placa magnética y se añade 40 μL de tampón de elución (*TBE IX*) y se agita con *vortex* brevemente. Por último se coloca nuevamente los tubos en la placa magnética y se deja en reposos por 1 minuto, se transfiere 35 μL de eluyente (Producto de PCR) purificado a nuevos tubos rotulados adecuadamente.

3.7.2. PCR de secuencia

Una vez realizada la purificación del amplicón, Macrogen incorpora los dideoxi (ddNTPs) marcados fluorescentes en la reacción de PCR. Esta reacción de Marcaje

se realiza en el cuarto de secuenciación a oscuras empleando el Kit de secuenciación *ABI PRISM™ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. En la Tabla 3 se detallan la concentración de la master mix, propuesta por el fabricante. (Applied Biosystems, 2015).

Tabla 3. Master mix para PCR de Secuencia

Reactivo	Volumen	Concentración final
Producto PCR	2,40 µl	10 ng
Primer Reverse	3,20 µl	10 uM
Buffer BigDye 4	2,00 µl	1X
Buffer v3.1	1,00 µl	1X
Agua ultra pura	1,40 µl	
Volumen final	10,00 µl	

Nota: Elaborado por Applied Biosystems, 2015

El programa de PCR utilizada por Macrogen consiste en un ciclo inicial de desnaturalización inicial a 94 °C por 1 minuto, 40 ciclos de desnaturalización cíclica a 96 °C por 10 segundos, 5 segundos de anillamiento a 50°C y un ciclo final de elongación a 60°C por 4 minutos.

La purificación de los productos de la PCR de secuencia, se realiza siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante de *Agencourt Clean SEQ*), con el objetivo de limpiar los productos de extensión de la reacción de secuenciación, eliminando así ddNTPs libre, dNTPs libres, sales y contaminantes.

3.7.3. Secuenciación de ADN

Una vez terminada la purificación de los instrumentos, se procede a colocar las muestras en los platos con 96 pocillos del equipo. El secuenciador automático *ABI PRISM 3730XL Analyzer* inyecta automáticamente las muestras en el capilar previamente cargado con un polímero que tiene la misma función que un gel, esto permite la separación de los fragmentos marcados con fluorescencia de ADN, los cuales son detectados por el equipo y transformados en un electroferograma.

3.8. Análisis estadístico de datos

El análisis de datos estadístico se realizará para los datos obtenidos de la extracción, cuantificación y purificación de ADN, además de la secuenciación de las muestras.

3.8.1. Análisis de componentes principales (ACP)

El análisis de la extracción, purificación y cuantificación de ADN, permitió realizar un Análisis de componentes principales (ACP) debido a que la concentración del ADN no tuvo un patrón marcado entre las muestras de las poblaciones estudiadas, por lo cual la concentración de esta molécula se atribuye a 5 factores que son: altura sobre del nivel del mar, altura de la planta, porcentaje del daño de la hoja, concentración de proteínas y de polifenoles (Solano, 2009).

3.8.2. Análisis filogenético

El análisis de los datos de la secuenciación se realizó en dos pasos, el primero de ellos consistió en la comparación de las secuencias obtenidas con los datos que se encuentran en la Base de datos *Gen bank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/), por medio de la herramienta *Blast*, esto permitió asegurar que las secuencias correspondan a la especie estudiada.

El segundo paso fue un análisis estadístico realizado en el software gratuito bioinformático MEGA 6, en este programa se alinearon las secuencias obteniéndose sitios polimórficos y sitios homólogos entre los individuos estudiados; a partir del alineamiento se realizó un árbol filogenético, que permite visualizar la variabilidad intrapoblacional e interpoblacional. Para el alineamiento de las secuencias se tomaron las muestras que presentan un % de *Query cover* del 85 %.

3.8.3. Análisis molecular de varianza (AMOVA)

Para determinar la variabilidad genética intro y entrepoblacional de las muestras estudiadas es necesario realizar una AMOVA, utilizando el complemento de Microsoft Excel 2013 Gen Alex versión 6.0. Este análisis arroja estimados de las componentes de la varianza, además de que refleja cuales son los niveles de correlación entre los subgrupos estudiados.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de las localidades de muestreo

El levantamiento de información acerca de la quinua en los herbarios dio a conocer que en el país hay poca información de esta planta, debido a que en los últimos años no se le ha dado la relevancia necesaria. Uno de los lugares en donde se realizó esta investigación bibliográfica fue en el Museo de Ciencias Naturales de Quito, sección del Herbario nacional; en la colección de este instituto se pudo constatar que solamente existían 7 muestras de la *Amaranthaceae* de interés, en la Anexo 3 se detalla las características como: número en la colección, provincia, localidad, ciudad, año, mes, altitud y coordenadas.

Con los datos obtenidos de los registros existentes de los herbarios e institutos nacionales e internacionales se obtuvo un modelo de la distribución potencial (Figura 1), en donde se visualiza que el mayor número de individuos de esta planta se encuentran localizados en la zona central de los andes ecuatorianos, mientras que en los demás sitios la presencia de quinua silvestre se encuentran diezmada.

De acuerdo con los datos obtenidos por los diferentes programas utilizados se determinó las coordenadas geográficas de las localidades con mayor probabilidad de ocurrencia de quinua por provincias como se muestran en las Figuras 7, 8, 9 y 10, los puntos geográficos en donde existe mayor población de quinua silvestre se encuentran en las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Cañar y Azuay.

Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en la serranía ecuatoriana

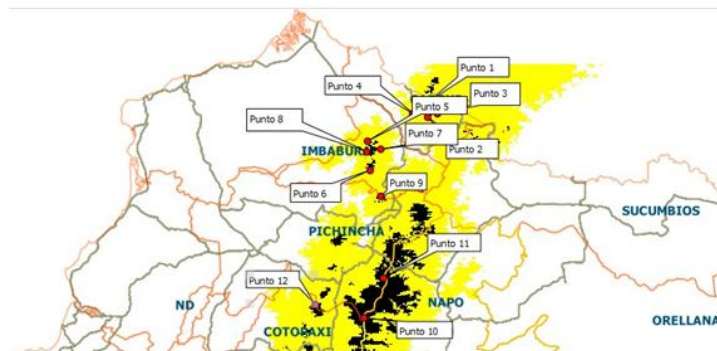


Figura 7. Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en Carchi, Imbabura y Pichincha de acuerdo a las bases de datos consultadas

Fuente: Guevara, 2014

Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en la serranía ecuatoriana

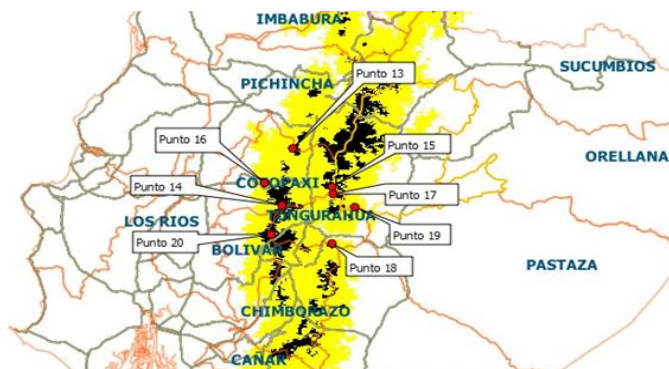


Figura 8. Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en Cotopaxi y Tungurahua de acuerdo a las bases de datos consultadas

Fuente: Guevara, 2014

Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en la serranía ecuatoriana

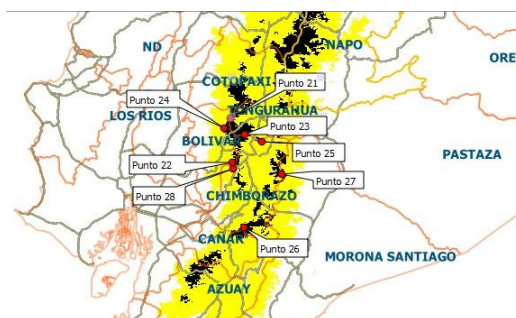


Figura 9. Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en Chimborazo y Bolívar de acuerdo a las bases de datos consultadas.

Fuente: Guevara, 2014

Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en la serranía ecuatoriana

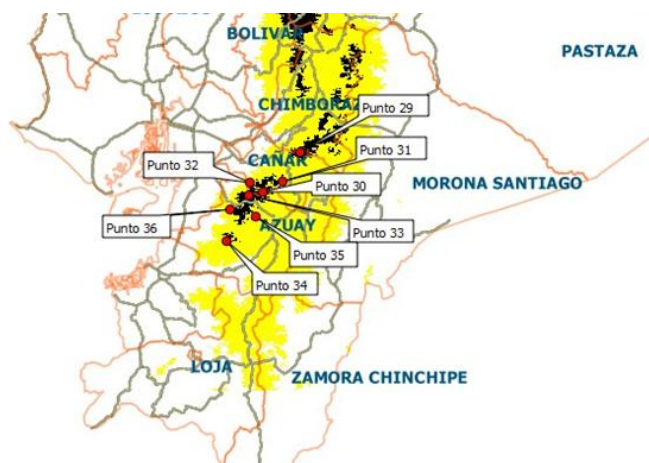


Figura 10. Puntos de ocurrencia de *Chenopodium quinoa* Willd. en Cañar y Azuay de acuerdo a las bases de datos consultadas

Fuente: Guevara, 2014

Estos mapas sirvieron para tener un fundamento previo a la realización de los muestreos, puesto que los datos de ocurrencia de quinua, tomados de diferentes

fuentes, son datos antiguos. Sin el modelo logrado por el uso de herramientas de SIG, al momento de diseñar el plan de muestreo hubiese contado con una baja probabilidad de encontrar quinua en las localidades seleccionadas, basado en los datos de las fuentes mencionadas. Ventajosamente, el modelo de distribución potencial permite recorrer la zona andina con mayor probabilidad de encontrar poblaciones de quinua.

Parte de la importancia del mapa logrado y la información que éste arroja, se debe a que se muestra nueva información en cuanto a las posibles ocurrencias de la especie en la región andina del Ecuador. La información obtenida es relevante, en especial dado que se ha generado información nueva aportando al conocimiento de la distribución de quinua en el Ecuador.

Los lugares elegidos para el muestreo de quinua silvestre fueron 4 provincias de la serranía ecuatoriana, 2 de la zona central (Chimborazo y Cotopaxi) y 2 de la zona Norte (Carchi e Imbabura), estos sitios se seleccionaron debido a que presentaron mayor número de individuos de interés, en la Figura 11 se aprecia las provincias y parroquias elegidas para el presente estudio.

Sitios de muestreo de quinua silvestre *Chenopodium quinoa* Willd.

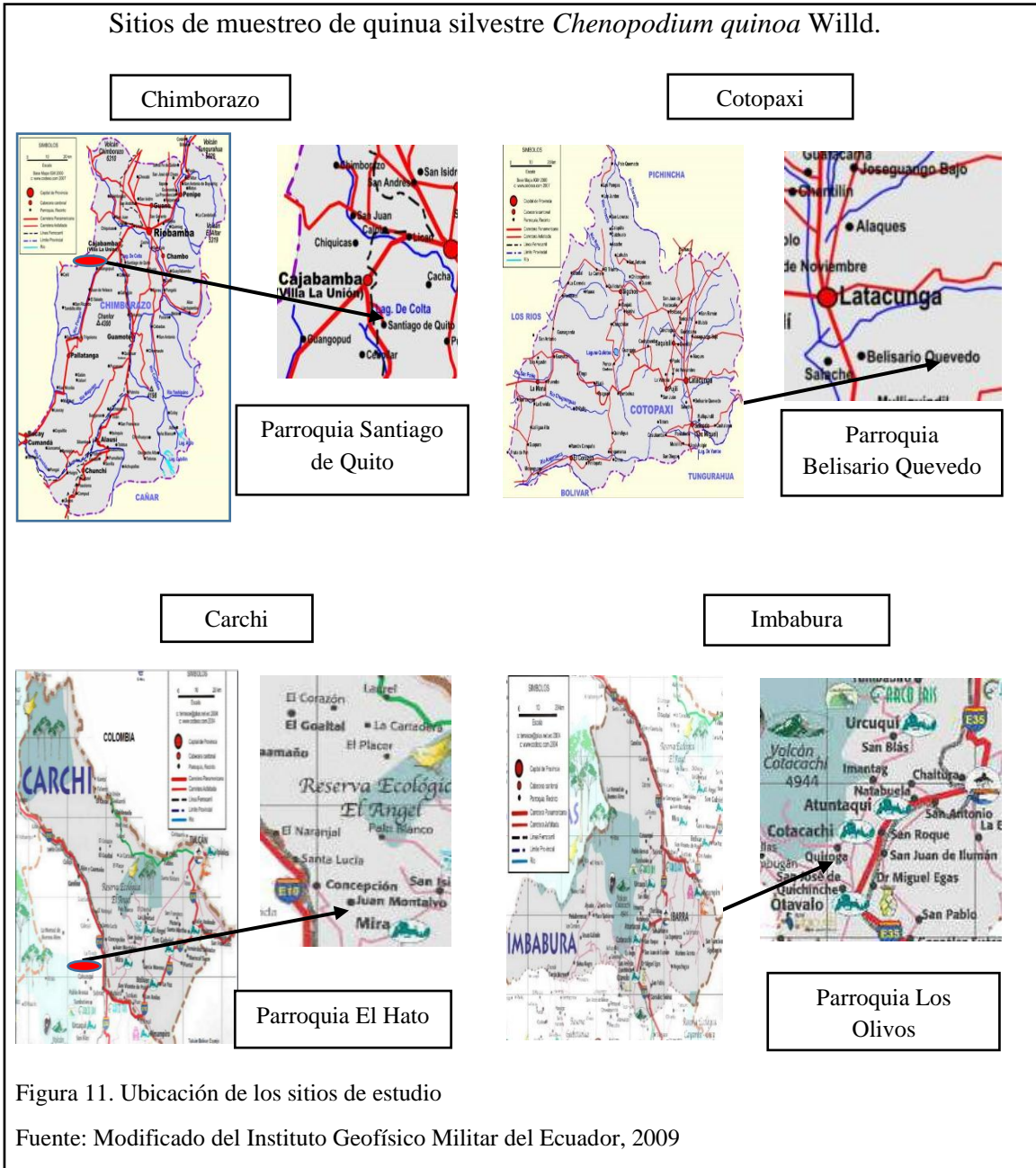


Figura 11. Ubicación de los sitios de estudio

Fuente: Modificado del Instituto Geofísico Militar del Ecuador, 2009

Las localidades muestreadas se encuentran en un rango de altitud de 2750 a 3330 msnm, presentan las condiciones ambientales óptimas como la cantidad de horas luz, la cantidad de precipitaciones y temperatura, factores que permiten el desarrollo de este pseudocereal andino. Peralta (2012) indica que para el crecimiento de la quinua se necesita de una temperatura promedio de 17- 22°C, una precipitación de 500 a 700

mm y una cantidad de 12 horas luz, los sitios de estudio presentan estas características según lo indica el anuario del INAMHI (2010); los datos de horas luz, temperatura y precipitación de los lugares muestreados se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Características ambientales de las zonas de muestreo

Localidad	Provincia	Estación INAMHI	Precipitaciones anuales (mm)	Temperatura promedio(°C)	Horas luz
Hato	Carchi	El Ángel	1152	14,5	12
Los Olivos	Imbabura	Cotacachi	1005	16,0	12
Belisario Quevedo	Cotopaxi	Universidad técnica de Cotopaxi	1003	18,0	12
Colta	Chimborazo	Alausí	1394	15,0	12

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

4.2. Toma de muestras

En los muestreos se halló que las plantas de quinua silvestre no se encontraban en un gran número y en su mayoría se encontraban distantes entre sí, esto se debe a que los agricultores no la consideran como un pseudocereal útil. Las plantas que se lograron muestrear tenían una altitud promedio de 0,30 m en la zona de Belisario Quevedo, mientras en El Hato, Los Olivos y Colta era de 1,10 m. El daño presentado en las hojas que se utilizaron en este estudio varía con 0 % hasta 80 %, detalles adicionales se presentan en el Anexo 5.

Además en los muestreos se pudo comprobar que la quinua silvestre siempre se encontró asociado con otras plantas de diferentes familias o de la misma familia. En Colta y Belisario Quevedo la quinua silvestre se encontró creciendo conjuntamente con cultivares de: trigo (*Triticum* spp), col (*Brassica oleraceae*), espinaca (*Spinaceae oleraceae*) y quinua cultivada (Figura 12), este comportamiento se debe a que la quinua demanda para su crecimiento condiciones ambientales y concentraciones similares de nutrientes a las que necesitan las plantas citadas anteriormente,

Crecimiento de la quinua silvestre *Chenopodium quinoa* Willd.

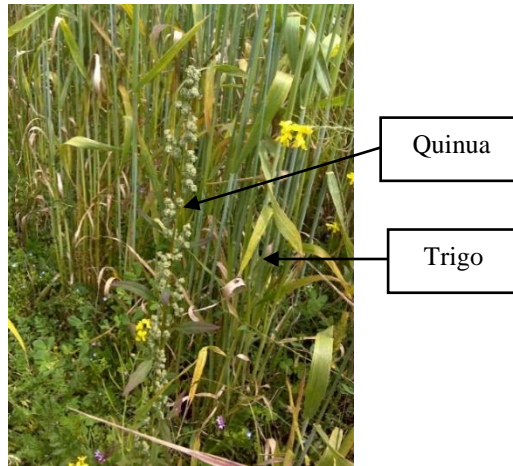


Figura 12. Crecimiento de la Quinoa silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) en asociacion a cultivos de Trigo (*Triticum spp.*)

Fuente: Navarrete y Suasnavas, 2015

4.2.1. Cuantificación de proteínas y polifenoles en hojas de quinua

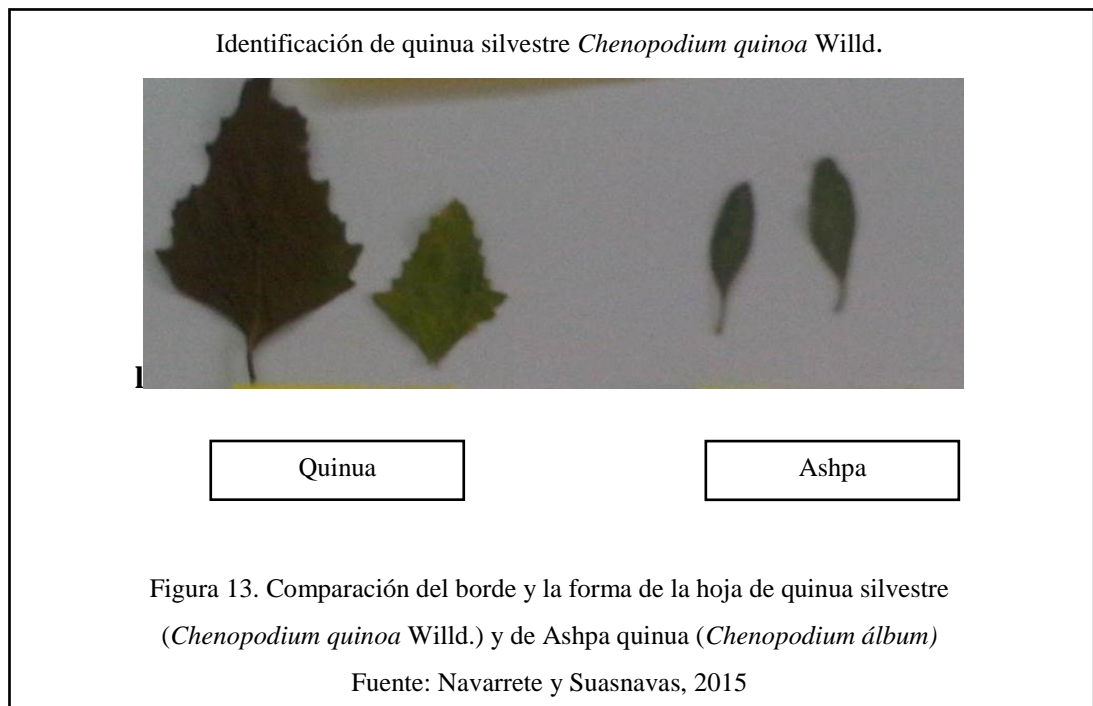
En los muestreos se pudo constatar que esta planta comercialmente no es viable debido a su alto contenido de metabolitos secundarios como saponinas y polifenoles que hacen que este pseudocereal sea tóxico para los animales de granja como: los cuyes, las vacas y los cerdos. Esta premisa empírica fue comprobada a nivel de laboratorio en donde se obtuvo que en 100 mg de hoja seca hay una concentración promedio de 0,0901 mol/l de polifenoles, este resultado es similar al obtenido por Repo y Encima (2008) quienes determinaron una concentración de 0,050 mol/l de polifenoles por cada 100 mg de material foliar seco los datos nos indican que la quinua silvestre posee una concentración mayor de estos metabolitos que la variedad cultivada y por lo tanto también se puede asumir que la planta puede llegar a causar daños a los animales pequeños de granja porque al consumir 0,836 g de hojas por kilogramo (kg) de peso del animal se llega a una proporción de letalidad de 0,380,

esto quiere decir que existiría una posibilidad del 38 % de la muerte del animal y un 62 % de supervivencia pero con daños en el organismo (Fernández, 2012).

En cuanto a la concentración de proteínas, Terán (2008) menciona que la cantidad de estos compuestos en quinua se encuentra entre 14 a 18 % en 1 gramo de tejido vegetal seco, esto causa que los animales de granja no puedan asimilarla totalmente dando como resultado un daño gástrico. Por ejemplo el cuy necesita de una cantidad del 14 al 17 % de proteínas en su nutrición diaria, pero al añadir tejido foliar de quinua se aumenta la cantidad de aminoácidos, generando que el roedor no los pueda asimilar por completo debido a que la cantidad de sustrato supera a la cantidad de enzimas, presentes en el tejido gástrico (Moreno y Ospina, 2008).

4.3. Identificación de muestras

Los resultados de la identificación botánica, indica que la quinua silvestre tiene una hoja con borde acerrado y es de forma lanceolada, en la Figura 13 se puede visualizar la comparación de las hojas de quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) y las de Ashpa quinua (*Chenopodium álbum*).



En la Figura se aprecia que la Ashpa quinua (*Chenopodium álbum*) tiene una hoja de forma lanceolada pero con un borde entero, mientras la hoja de la quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) es de forma aserrada. El certificado de identificación emitido por el Herbario Nacional del Ecuador, detalla que los individuos muestreados en Colta, Los Olivos y el Hato pertenecen a la familia de las *Amaranthaceas*, género *Chenopodiaceae* y especie *Chenopodium quinoa* Willd, en cuanto a las muestras de Belisario Quevedo las plantas: B2, B5, B10, B13, B18, B19 y B20 son *Chenopodium álbum*. En el presente estudio se seleccionaron 8 individuos de cada localidad, teniendo como factores de selección la altura de la planta y la distancia geográfica entre los individuos de cada población. En el Anexo 4 consta el certificado de identificación, pero por facilidad la nomenclatura utilizada por este instituto fue cambiada como se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Codificación de muestras

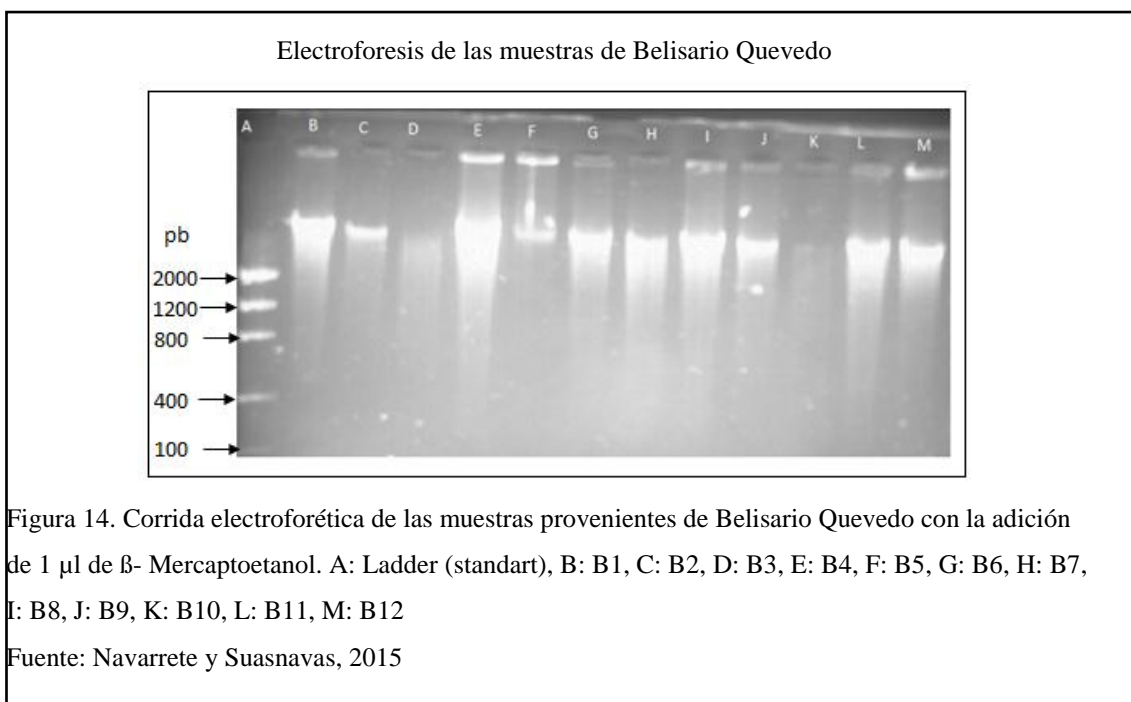
Colta		Belisario Quevedo		Los Olivos		El Hato	
Códigos Herbario	Códigos Investigación	Códigos Herbario	Códigos Investigación	Códigos Herbario	Códigos Investigación	Códigos Herbario	Códigos Investigación
CLT2	C2	BQL1	B1	LOV1	L1	ATO2	A2
CLT3	C3	BQL3	B3	LOV3	L3	ATO5	A5
CLT4	C5	BQL6	B6	LOV6	L6	ATO7	A7
CLT5	C6	BQL11	B11	LOV11	L11	ATO10	A10
CLT6	C7	BQL12	B12	LOV12	L12	ATO11	A11
CLT7	C8	BQL15	B15	LOV13	L13	ATO15	A15
CLT8	C9	BQL16	B16	LOV17	L17	ATO17	A17
CLT12	C12	BQL17	B17	LOV20	L20	ATO19	A19

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

El tipo de inflorescencia de quinua silvestre no es útil para una caracterización botánica debido que esta cualidad no es específica sino general para todos los individuos de esta familia, por lo cual a nivel de campo se torna muy complicada la identificación mediante la disposición de las flores de la planta.

4.4. Extracción, purificación cuantificación y visualización de ADN

Para la extracción del ADN de quinua se realizaron algunos cambios en el protocolo propuesto por Doyle y Doyle y modificado por Dr. Montufar, debido a que la planta presenta concentraciones muy altas de proteínas y de polifenoles que son compuestos contaminantes, los mismos que disminuyen la calidad de los ácidos nucleicos obtenidos, por esta razón se vio la necesidad de realizar nuestras propias modificaciones en cuanto a la cantidad de β -mercaptoetanol utilizada en la precipitación del tejido vegetal, en el protocolo original se recomendaba usar 1 μ l del agente reductor. En la Figura 14 se puede observar la corrida electroforética de las muestras de Belisario Quevedo, en donde se utilizó el volumen de β -mercaptoetanol indicada en el protocolo.



Para la obtención de un ADN mucho más purificado se aumentó el volumen del agente reductor a 9 μ l, de esta manera se eliminaron la mayoría de proteínas y metabolitos secundarios contaminantes de la molécula, en la Figura 15 se observa un gel de agarosa de las muestras de Latacunga con mayor pureza.

Electroforesis de las muestras de Belisario Quevedo

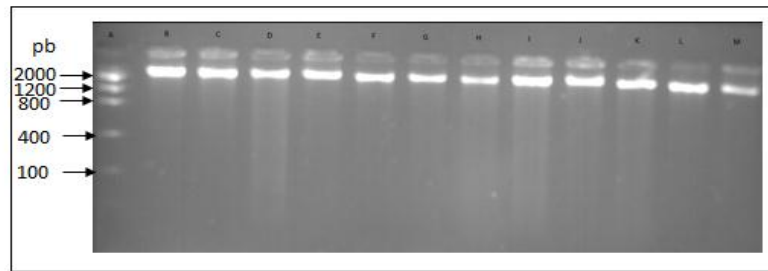


Figura 15. Corrida electroforética de las muestras provenientes de Belisario Quevedo con la adición de 9 μ l de β - Mercaptoetanol. A: Ladder (standart), B: B1, C: B2, D: B3, E: B4, F: B5, G: B6, H: B7, I: B8, J: B9, K: B10, L: B11, M: B12

Fuente: Navarrete y Suasnavas, 2015

Velasco (2004) menciona que en algunas plantas la cantidad de proteínas y de polifenoles intracelulares pueden llegar a ser un agente de degradación del ADN, por lo tanto es necesario aumentar la cantidad del agente reductor en la extracción de la molécula, dicha hipótesis fue demostrada en la presente experimentación como se observa en la Figura 14 en donde se colocó una cantidad mínima de β -mercaptoetanol, existiendo una degradación de la mayoría de las muestras, en cambio en la Figura 15 se aprecia que la “cola” o “*smear*” se encuentra casi ausente en la corrida electroforética.

En algunas muestras de quinua se evidenció que la cantidad de metabolitos secundarios (polifenoles) no se logró eliminar totalmente, debido a que no todo el tejido foliar utilizado en esta investigación presento concentraciones similares de estas moléculas, por lo tanto en varias muestras sobre todo de la provincia de Imbabura se incrementó el volumen de β - mercaptoetanol, llegando a volúmenes máximos de 15 μ l y mínimos de 10 μ l , lo cual ayudó a eliminar la degradación, pero además se perdieron fragmentos de interés debido a que el agente reductor desnaturaliza estructuras ricas en guanina y citosina.

El inconveniente de utilizar el β - mercaptoetanol es que este reactivo químico inhibe la acción de las enzimas ARNAsas (Velasco, 2004), por lo cual fue necesario añadir la 25 μ l de esta exonucleasa en las muestras en donde se añadió mayor cantidad del agente reductor, autores como Velásquez, Aragón y Cornejo (2006) aseguran que la adición de esta enzima ayuda a tener un ADN mucho más puro, que tendrá mejores rendimientos en posteriores técnicas como la de la PCR.

Otra posible razón por la cual el ADN se pudo haber degradado es por las enzimas nucleasas que se encuentran presentes en el agua bidestilada, en el ambiente o en el interior de las células, Valadez y Kahl (2000) aseveran que estas enzimas son unas de las principales razones por la cual el ADN no se mantiene integro a través del tiempo (pág. 147), por ello es necesario conservar el ADN en una solución de 100 μ l de TBE 1X (Tris-Boro-EDTA); este buffer al tener EDTA capta los cationes de Magnesio que son cofactores enzimáticos para las nucleasas. En la presente investigación se utilizó 50 μ l del buffer mencionado obteniéndose ADN de calidad adecuada para la amplificación del gen rpoB.

Aun cuando se realizó la purificación, las muestras 17, 18,19 de Los Olivos presentaron la mayor cantidad de polifenoles, debido a que en la rehidratación de las muestras la matriz se encontraba de un color amarillo (Figura 16), para estas muestras se realizó una nueva purificación, colocando 166 μ l de isopropanol frío y se dejó precipitar toda la noche a -20 °C. La adición de isopropanol permite una segunda purificación del ADN debido a que este compuesto químico remueve todas las sales y elementos cargados positivamente, permitiendo que los ácidos nucleicos puedan precipitar estando mucho más puros (Falcón y Valera, 2008); el inconveniente de realizar la segunda purificación es que la concentración de ADN disminuye a la mitad , esto indica que la primera lectura no es totalmente cierta, debido a que los polifenoles pueden absorber una longitud de onda de 260 a 280 nm (Núñez, 2009), generando falsos positivos en cuanto a la concentración del ADN.



Fuente: Navarrete y Suasnavas, 2015

Nota. La coloración amarilla es característica de los polifenoles.

Una vez extraído y purificado el ADN se procedió a determinar la contaminación de la molécula mediante la espectrofotometría, los datos obtenidos dieron como conclusión que el ADN no se encontraba totalmente puro, debido a la presencia de proteínas y de polifenoles. Para el análisis de proteínas se midió la absorbancia en una longitud de onda de 280 y 260 nm, con lo cual se pudo cuantificar la cantidad de proteínas contaminantes presentes en la solución de extracción del ácido nucleico; en la Tabla 6 se detallan los resultados obtenidos de esta prueba óptica, en donde se puede concluir que las muestras de Carchi presentan una mayor cantidad de proteínas degradadoras de ADN, debido a que las hojas provenientes de la localidad eran jóvenes y por lo tanto contenían una concentración mayor de estas moléculas (Palacio, 2013), igualmente las muestras de ADN que presentan una concentración inferior de proteínas son las muestras pertenecientes a la localidad de Colta, provincia de Chimborazo, la ausencia de contaminantes se debe a que el material vegetal no era tan joven.

Tabla 6: Cantidad de proteínas presentes en la extracción de ADN

Provincia	Localidad	Promedio mol/l	Concentración superior mol/l	Concentración inferior mol/l
Carchi	El Hato	0,054	0,198	0
Imbabura	Los Olivos	0,035	0,571	0
Cotopaxi	Belisario Quevedo	0,026	0,109	0
Chimborazo	Colta	0,020	0,094	0

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

Los polifenoles son contaminantes que estuvieron presentes en la solución de extracción de ADN, esto se debe a que el tejido foliar de la *Amarantaceae* posee dichos compuestos como mecanismo de defensa contra los insectos (Salgado, 2012). Los resultados de la cuantificación (Tabla 7) determinaron que el producto de la extracción de las hojas de quinua muestreadas en El Hato son las que presentan la mayor cantidad de polifenoles, mientras que el ADN de las muestras pertenecientes a Colta presentan la concentración más baja, esto se debe a que la localidad del Hato es una zona agrícola, por lo cual la población de insectos es mayor y la planta de quinua

necesita aumentar la generación de estos metabolitos secundarios para aumentar su supervivencia ya que estos sirven para evitar que la planta sea atacada por insectos que actúan como plagas.

Tabla 7: Cantidad de polifenoles presentes en la extracción de ADN

Provincia	Localidad	Promedio mol/l	Concentración superior mol/l	Concentración inferior mol/l
Carchi	El Hato	0,128	0,550	0
Imbabura	Los Olivos	0,095	0,571	0
Cotopaxi	Belisario Quevedo	0,066	0,786	0
Chimborazo	Colta	0,032	0,143	0

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

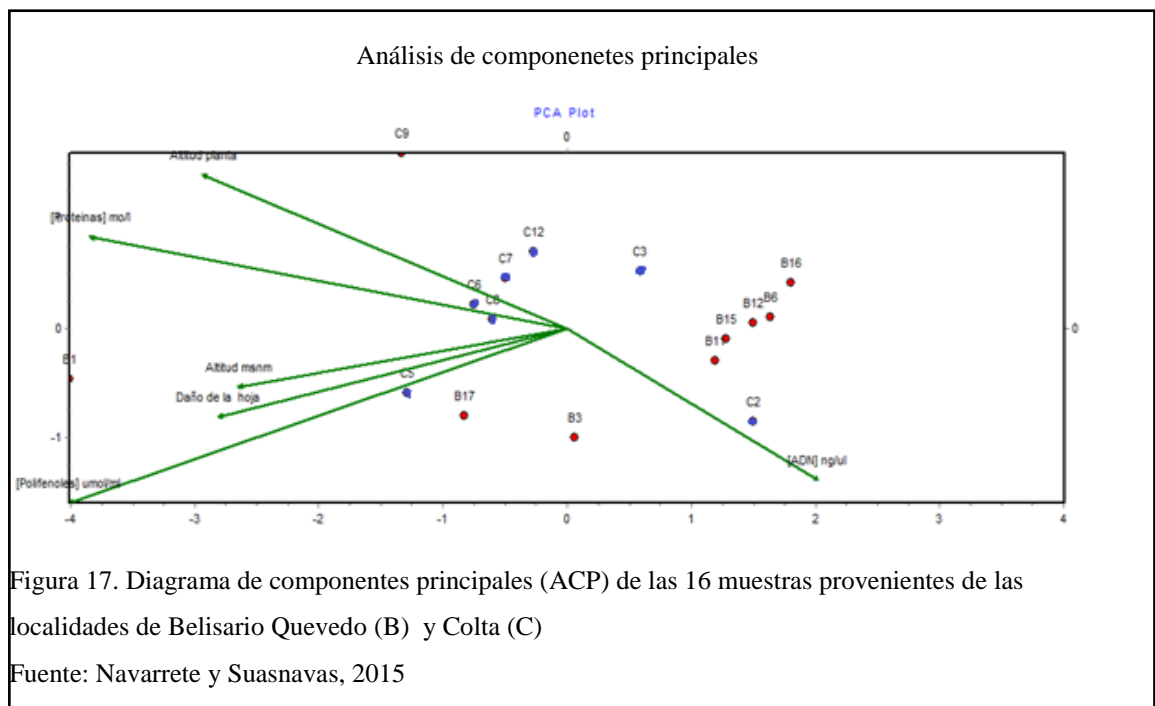
Al comparar los resultados de la contaminación de polifenoles con la altitud de los lugares muestreados se puede determinar que mientras mayor sea la altitud sobre el nivel del mar la concentración de estos compuestos químicos disminuye, lo que quiere decir que las dos variables son inversamente proporcionales entre sí, estudios realizados por Cubero (1992) señalan a que menor altura la concentración de los antioxidantes es mayor que la presentada en aturas sobre los 3000 msnm. Además, se puede aseverar que el tamaño de la planta es un factor que determina la cantidad de polifenoles en el tejido foliar, debido a que en este tipo de pseudocereales la longitud del tallo determina la edad de la planta y por ende la concentración de metabolitos secundarios, en conclusión se puede decir que las plantas que poseen un tamaño menor presentan una cantidad alta de compuestos cíclicos aromáticos y cuando las plantas sobrepasan 1 metro de altitud la cantidad es mínima, esta premisa se cumple en las muestras de quinua en donde la muestra 2 del Hato presenta una altura de 0,36 m y una concentración de 11,78 nmol/ml , mientras el individuo 7 presenta una altura de 0,82 m y una cantidad de polifenoles de 3,57 nmol/ml.

4.4.1. Análisis de componentes principales (ACP)

La cuantificación del ADN dio como resultado valores muy heterogéneos entre muestras provenientes de la misma provincia así como de diferentes provincias, por lo cual es indispensable realizar una prueba multivariada que permita obtener la

correlación entre los factores como: la altura de la planta, la altitud del lugar de muestreo, la concentración de proteínas, polifenoles, ADN y daño de la hoja.

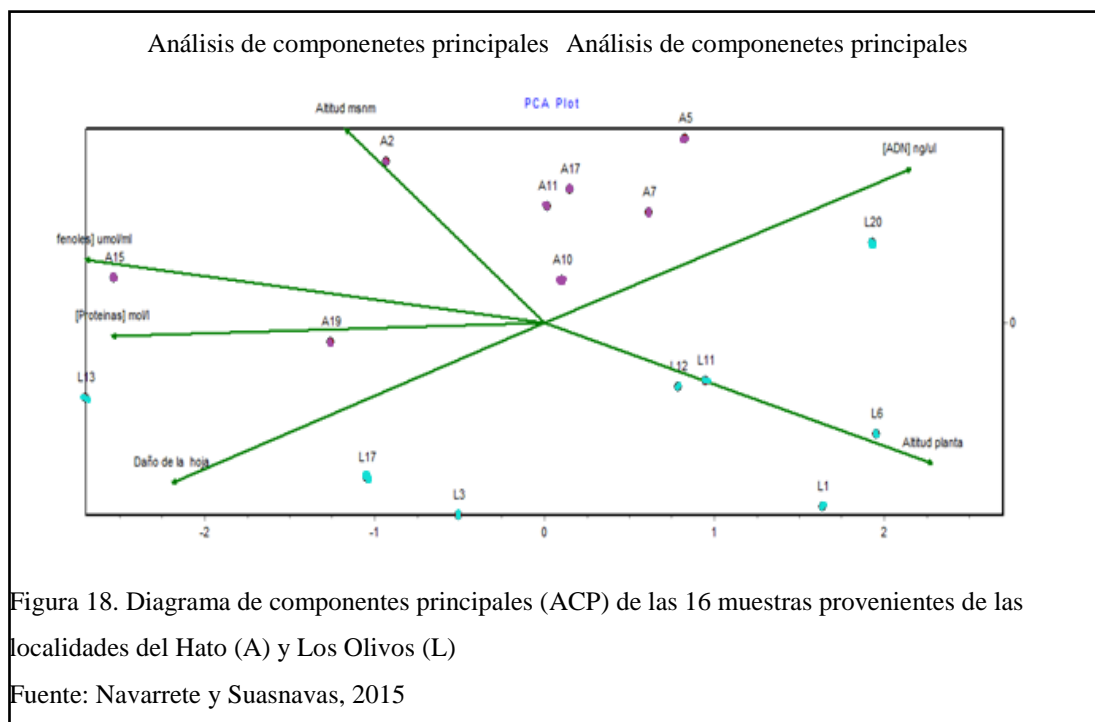
Las 2 localidades del centro de la serranía ecuatoriana (Belisario Quevedo y Colta) fueron correlacionadas en una prueba de ACP, como resultado se obtuvo que 6 muestras de Colta: C5, C6, C7, C8, C9 y C12, se encuentran cercanas al vector de la altitud sobre el nivel del mar y a la altura de la planta, esto se debe a que en este sitio de muestreo el tamaño de los individuos sobre pasan el metro de altura, además Colta se encuentra a una altitud de 3300 msnm; por su parte las muestras de la provincia de Cotopaxi se encuentran contrarias a los vectores de la altura, esto se produce debido a que los individuos de la zona de la serranía ecuatoriana poseían longitudes inferiores a 1 metro (m) y se encontraba a una altitud sobre el nivel del mar cercana a los 2900 m. La Figura 17 de ACP nos indica que existe una correlación entre la altura y la concentración del ADN, en el gráfico se puede apreciar que los individuos con menor tamaño y a una menor altitud poseen una concentración superior de ADN, a excepción de la muestra B15 que presenta una concentración inferior a las que poseen los individuos de Colta.



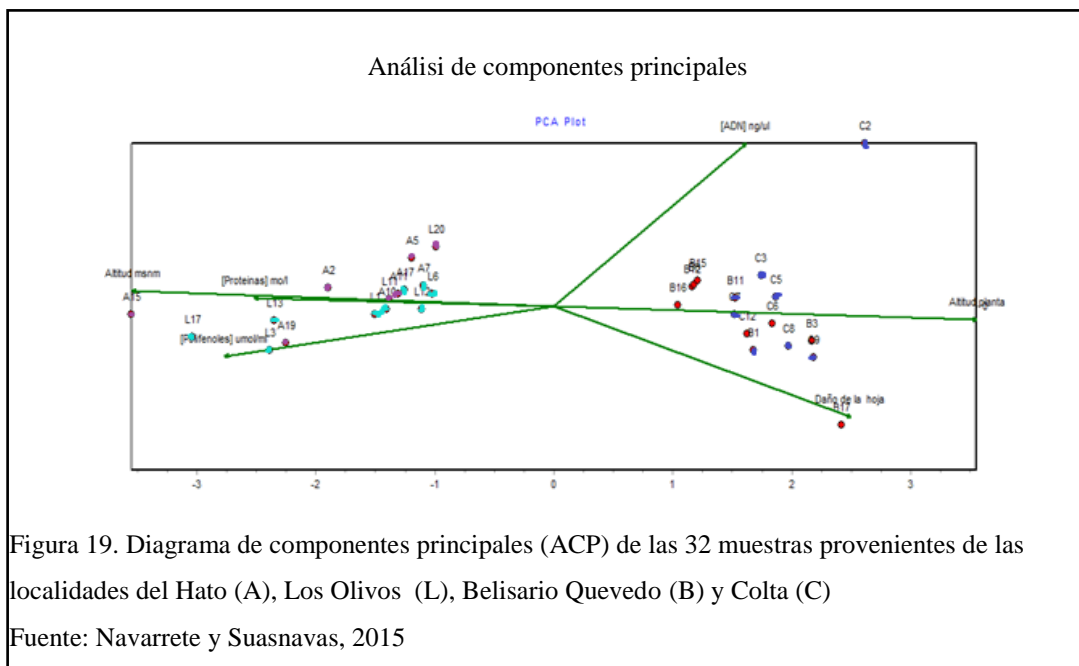
Otra correlación encontrada en la Figura de ACP es que la concentración de ADN es inversamente proporcional a la cantidad de contaminantes como las proteínas y polifenoles, esto se debe a que son contaminantes para los ácidos nucleicos por lo

que los degradan. En cuanto a daño de la hoja y la concentración de ADN se puede denotar que si la hoja se encuentra enferma, la cantidad de esta molécula vital disminuye considerablemente, Pérez I. (2011) señala que cuando las hojas se encuentra dañada la cantidad de ácidos nucleicos disminuye, debido a que la molécula se oxida por la generación de radicales libres.

La comparación de las muestras de las dos provincias del norte, demuestran que los datos entre estas dos localidades son más heterogéneos que los presentados en Cotopaxi y Chimborazo, una similitud entre estas dos localidades es que la cantidad de polifenoles y el daño de la hoja son inversamente proporcionales a la concentración de ADN. Además la Figura 18 demuestra que en cuanto a la altura de la planta y a la altitud sobre el nivel del mar, las muestras de la provincia de Carchi presentan el menor tamaño, pero se encuentran en una altitud superior a la presente en la provincia de Imbabura. En cuanto a la relación de la concentración de ADN con respecto a la altura, se puede asumir que mientras más pequeña sea la planta de quinua mayor cantidad de ácido nucleico existirá, este resultado es corroborado con los estudios realizados por Herrera, J. (2010) quien cita que la cantidad de es proporcional a la edad del tejido foliar del cual se va a extraer el ADN.



El análisis de componentes principales de las 32 muestras contrastadas en esta investigación da como resultado que la cantidad de proteínas aumenta en las provincias de Carchi e Imbabura con respecto a las de Cotopaxi y Chimborazo, esta característica se debe a que las muestras de las localidades del Norte presentan cualidades diferentes con respecto a las del centro como el tipo de suelo en el cual se desarrollan, puesto que según Casierra (2007) menciona que las plantas sintetizan proteínas a partir del nitrógeno que lo obtienen de los nitratos y el amoníaco del suelo, por ello al existir más nutrientes en el medio de crecimiento la planta tendrá más materia prima para producir proteínas. Además en la Figura 19 se puede observar que la calidad de las hojas del Hato y de Los Olivos no presentaron daño, esto se debe a que las condiciones del suelo son mejores para el crecimiento de estas plantas y además que la cantidad de insectos plaga es menor que la encontrada en Colta y Belisario Quevedo.



En el Anexo 5 se representa la matriz utilizada para realizar el diagrama de componentes principales.

4.5. Genotipificación del ADN

4.5.1. Amplificación del gen rpoB

La estandarización de la amplificación del fragmento del gen rpoB dio como resultado que la temperatura óptima de annealing es de 57,6 °C y que el volumen de DMSO a utilizar en la master mix es de 1,5 µl porque esta cantidad reduce satisfactoriamente la estructura secundaria del ADN, lo que ayuda a una mejor amplificación del fragmento de interés pues este posee un 60 % de Guanina-Citosina.

Al aumentar la concentración del dimetil sulfóxido al 9 % la temperatura de hibridación aumenta en 2 °C y la actividad de la taq polimerasa se inhibe, esto se debe a que la estructura del compuesto se intercala entre las purinas y pirimidinas lo que ocasiona que la enzima no pueda abrir la cadena de ADN y que la temperatura de unión de los cebadores se eleve al no encontrar los sitios específicos de hibridación dentro de la cadena molde (Santos, 2003).

En cuanto a la cuantificación de los amplicones mediante el método visual, se pudo constatar que el producto obtenido de la PCR es probablemente de 456 pb (Figura 20), además de que la concentración de los mismos es aproximadamente de 80 ng/ul, lo cual indica que estas amplificaciones son aptos para posteriores análisis moleculares, Pinilla (2008) menciona que esta metodología de cuantificación visual es poco precisa porque depende de la apreciación de la intensidad de banda que puede observar el investigador. Cabe mencionar que la fotografía no hace justicia a lo apreciado directamente en el gel.

En las amplificaciones del fragmento del gen rpoB se obtuvieron productos no deseados que son los dímeros de *primer* que se originan por la unión de los cebadores (*forwar* y *reverse*) por la complementariedad del extremo 3' (Bolívar y Rojas, 2013); los dímeros que se formaron en estas reacciones se originaron debido a que al cantidad de ADN utilizada en la master mix no fue la indicada y por lo tanto los *primers* se unieron entre si y la polimera los enlargo formando estos productos inespecíficos (Cultek, 2006).

Amplicones del gen rpoB

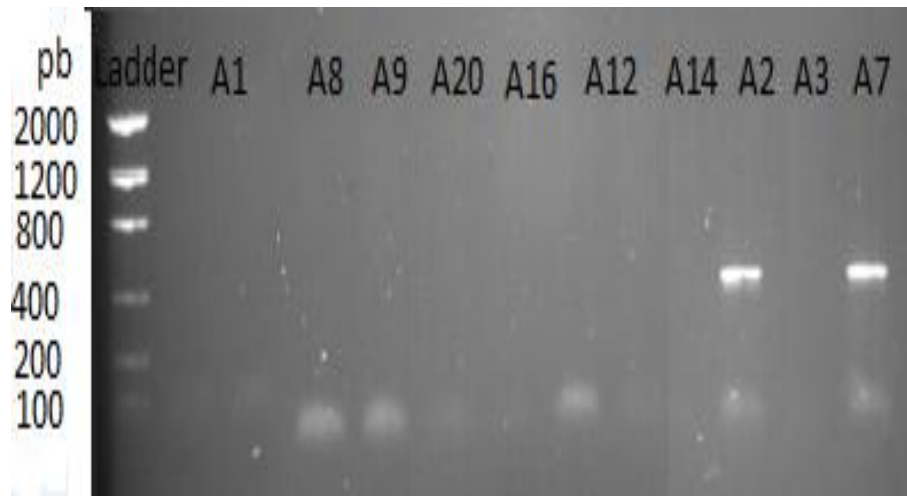


Figura 20. Electroforesis de los amplicones del gen rpoB de las muestras provenientes de Hato
Fuente: Navarrete y Suasnavas, 2015

4.5.2. Secuenciación de las muestras

La secuenciación de las muestras da como resultado la formación electroferogramas que es un conjunto de picos que representan cada uno de los ácidos nucleicos que forman el fragmento de interés (Figura 21). Márquez (2010) menciona que estos picos aparecen cada vez que el fluoróforo incorporado en la reacción de secuenciamiento es excitado por luz UV del equipo.

*= homólogos blanco=polimorfismos

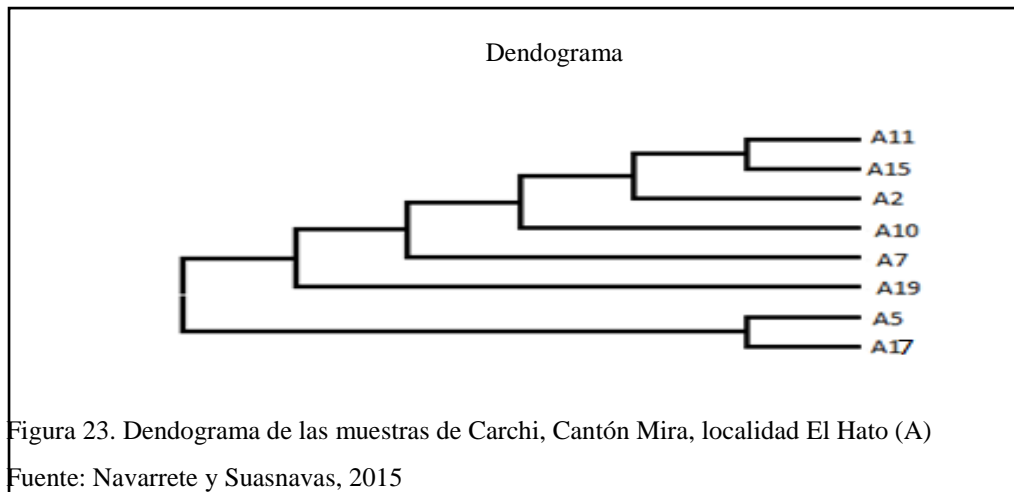
Figura 22. Alineamiento de las muestras elegidas mediante el *software* Mega 6

Fuente: Navarrete y Suasnavas, 2015

En los alineamientos de las 4 provincias se pudo evidenciar 2 tipos de cambio de nucleótidos, el primero de ellos consiste en la sustitución de una Timina (T) por una Citosina (C) o una Adenina (A), el segundo se da por el reemplazo de una Adenina (A) por una Guanina (G). Además en la Figura 21 así como en todas los demás alineamientos se aprecia que existen *gaps*, esto se da porque en estos sitios posiblemente hubo una deleción o una inserción de una base, lo cual generó este espacio vacío dentro del alineamiento. (Naranjo y Hernández, 2009).

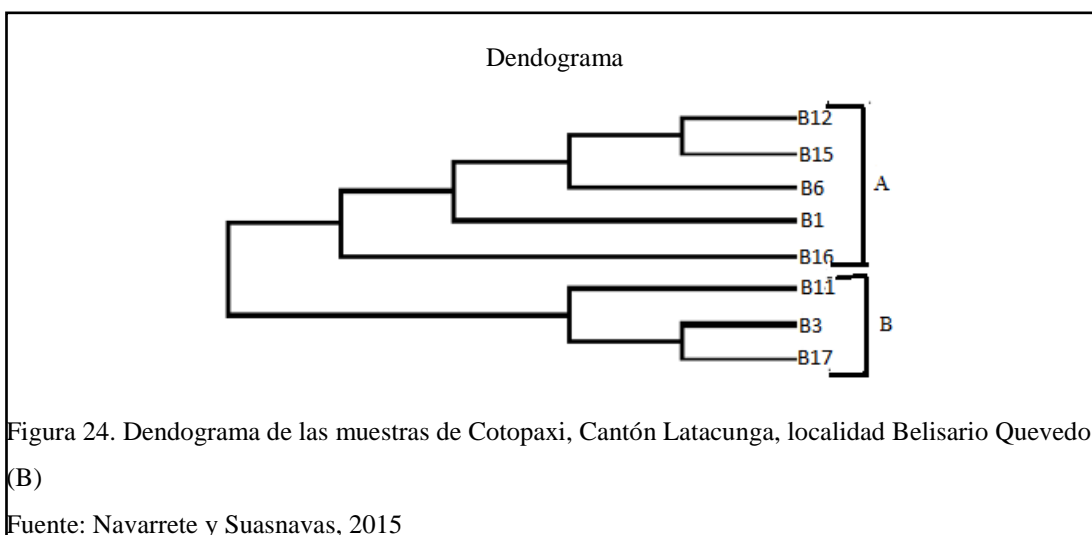
4.5.2.1. Análisis filogenético intrapoblacional

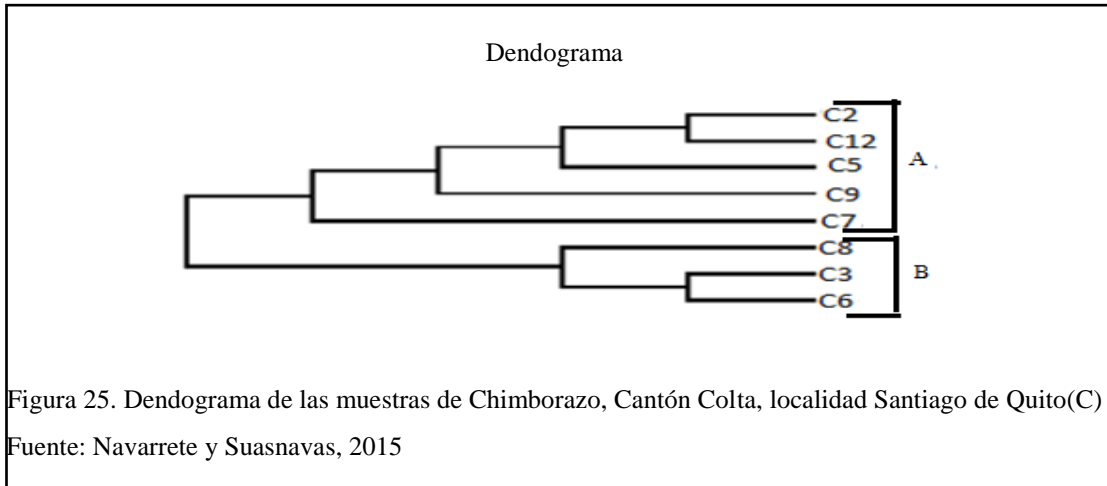
El análisis del dendograma intrapoblacional de las muestras provenientes del Hato (Figura 23), indica que la población de quinua silvestre es genéticamente heterogénea, debido a que se forman dos grupos, el primer está formado por las muestras A11, A15, A2, A10, A7 y A19, mientras que el otro grupo se conforma por A5 y A15.



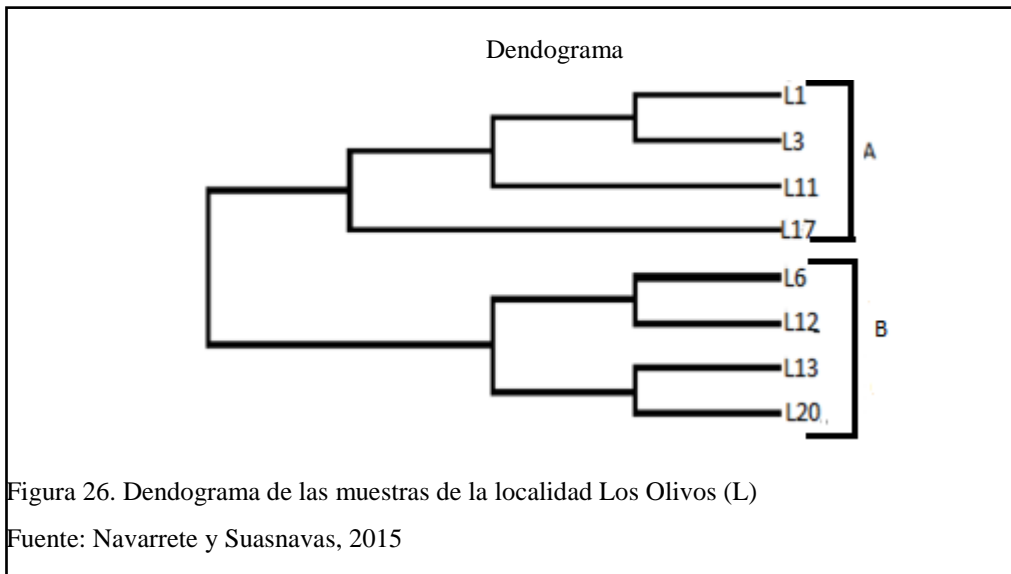
Los árboles filogenéticos de las localidades de: Belisario Quevedo (Figura 24) y Colta (Figura 25) presentan una disposición similar entre sí, debido a que existen dos grupos presentes en estos dendrogramas, el menor de ellos con tres individuos. El mayor subgrupo está formado por 5 individuos con una similitud.

La similitud genética de estas dos poblaciones (Belisario Quevedo y Colta) se da debido a que en estos sitios, esta planta se encontraba creciendo conjuntamente con otras especies de *Amaranthaceae* como la quinua cultivada (*Chenopodium quinoa* Willd.), así mismo con espinaca (*Spinacia oleraceae*) y con ashpa quinua (*Chenopodium album*). Por lo tanto se asume que la hibridación de este pseudocereal es similar en las dos localidades. Ellstrand (1999) asevera que las variedades silvestres de quinua tienden a hibridarse con mayor facilidad con variedades de plantas de su misma familia, esto se debe a que al ser una “mala hierba” crece conjuntamente con otras plantas y se diversifican.





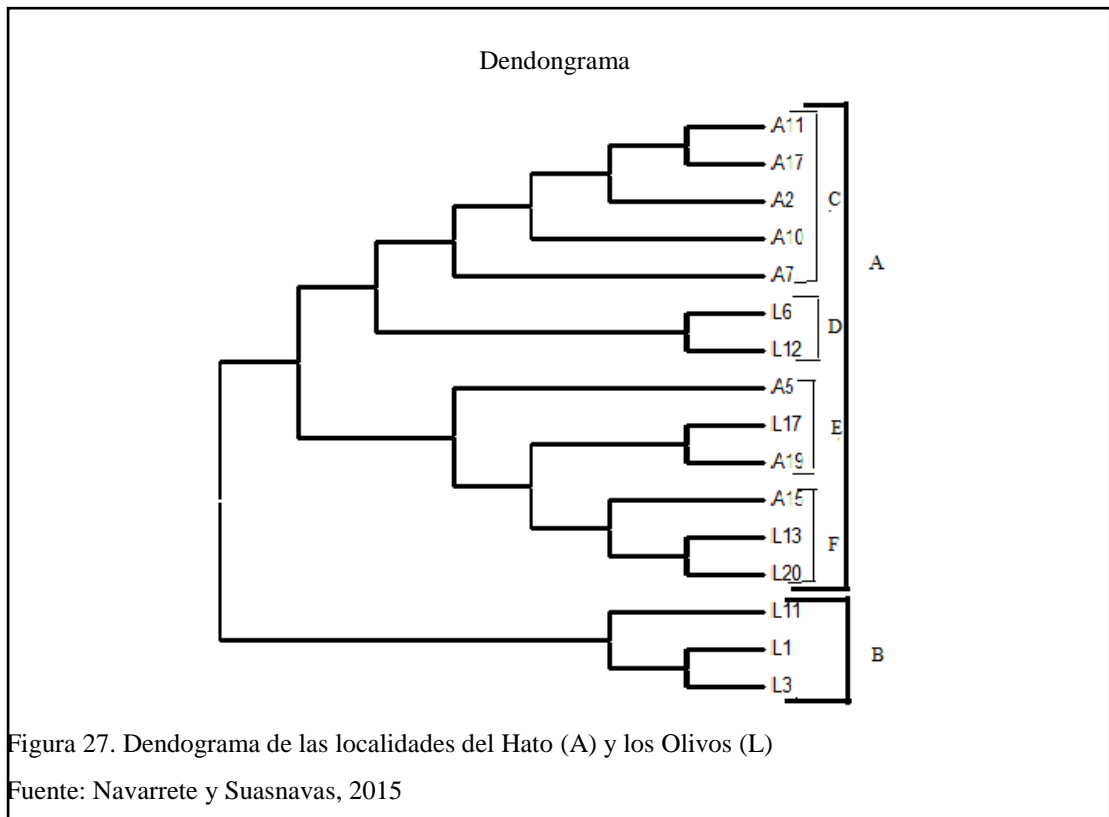
En el dendograma de la localidad de Los Olivos (Figura 26) se aprecia que se forman dos grupos: A y B, el primero está constituido por un subgrupo con las muestras L1, L3, L11 y L17, y por su parte el grupo B se compone de los pares: L6-L12 y L13-L20.



4.5.2.2. Análisis filogenético interpoblacional

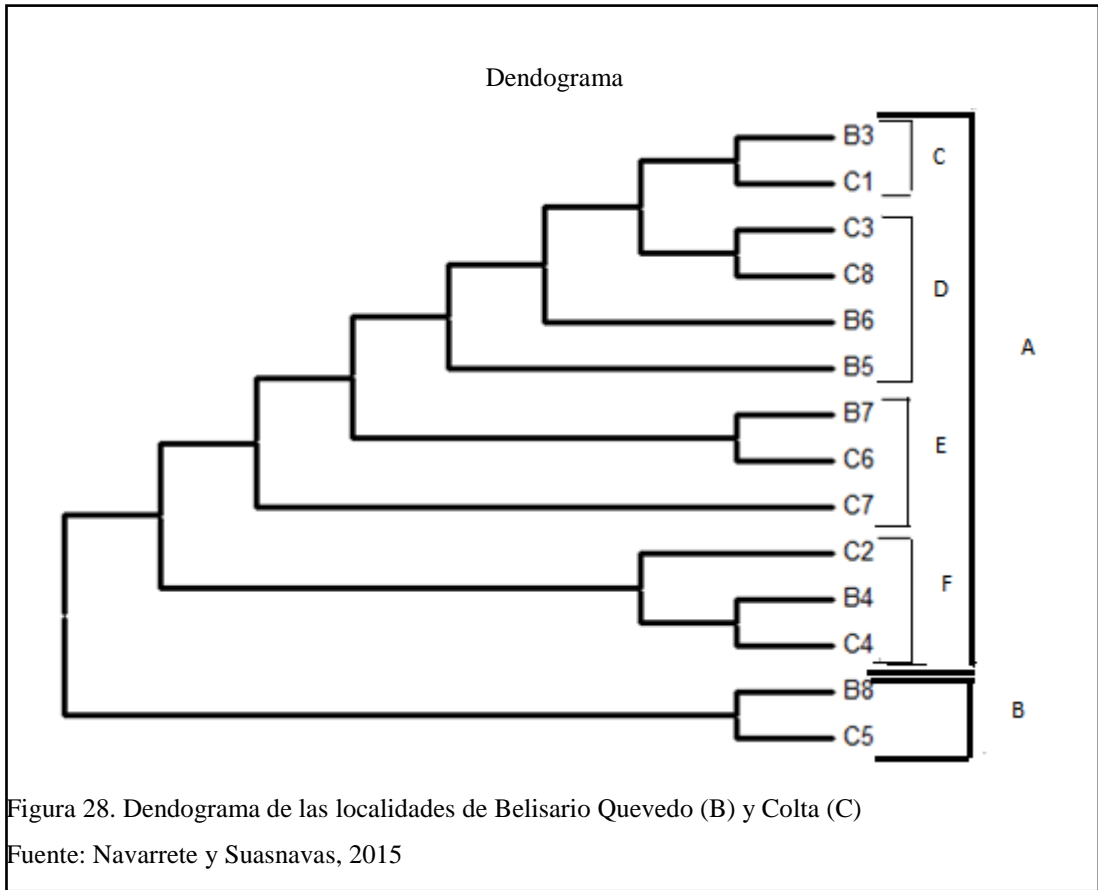
Los análisis del dendograma interpoblacionales de la zona norte de la serranía (Carchi e Imbabura), dieron como resultado la formación de dos grupos (A y B), el primer grupo se encuentra formado por 4 subgrupos: C, D, E y F, de los cuales los más llamativos son los subconjuntos E y F, porque se puede observar que a pesar de

la distancia geográfica a la que se encuentra estas localidades los individuos del Hato y de Los Olivos presentan una similitud (Figura 27).

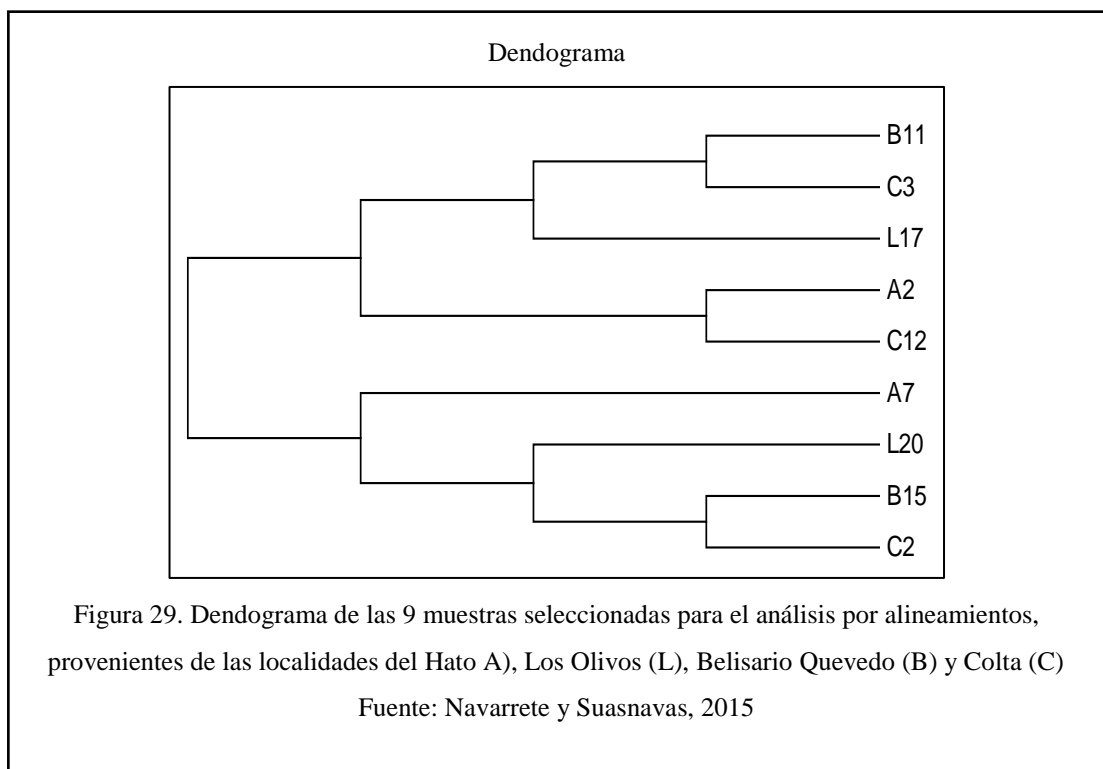


Además este gráfico señala que las muestras L11, L1 y L3 se encuentran agrupadas entre sí pero existe baja relación con el resto de individuos de su misma localidad (Los Olivos), pues forman un solo grupo alejado del resto de individuos.

La Figura 25 (Carchi e Imbabura) muestra un grupo que está conformado en su totalidad por individuos de la misma localidad (grupo B), mismo que se distancia filogenéticamente de los demás grupos; mientras que en la Figura 28 (Cotopaxi y Chimborazo), el único subgrupo formado individuos de la misma localidad (individuos C3 y C8) se encuentra más cercano filogenéticamente a diferentes subgrupos.



El análisis filogenético de las muestras seleccionadas para realizar los alineamientos debido a que cumplen con los parámetros de alto porcentaje tanto de *Query cover* y de similitud (Figura 29) dio como resultado que individuos de Los Olivos (L), de Colta (C), Hato (A) y de Belisario Quevedo (B) tienen una semejanza genética alta entre sí, esto se debe a que en las provincias de estas dos zonas estudias existe la mayor producción de la variedad fitomejorada de quinua, Mera (2010) menciona que la variedad sembrada en el los campos ecuatorianos es la INIAP-Tunkahuan, por lo tanto se asume que el flujo genético es parecido entre las plantas cultivadas y la de la quinua silvestre.



4.5.2.3. Distancias genéticas

La distancia génica promedio de los individuos estudiados es $D=1,89$, esto quiere decir que 1,89 % del fragmento de interés es variable entre todas las muestras estudiadas de las 4 localidades, mientras que el 98,18 % es similar, Hedrick (2000) menciona que cuando la distancia génica es superior a uno, el flujo genético es bajo entre las poblaciones y por, tanto la diversidad genética aumenta. En la Tabla 8 se detallan las distancias interpoblacionales de los sitios estudiados, estos resultados aseveran lo obtenido en los dendogramas, por ende se puede expresar que en las provincias centrales del Ecuador no existe una diferencia genética alta como la encontrada en las localidades del Norte, esta diversidad se debe a que las barreras geográficas como: lagos, ríos, y montañas evitan que exista un flujo genético entre las poblaciones, porque el polen de este tipo de plantas solo puede viajar 100 m. (Guaminga, 2011).

Tabla 8. Distancias genéticas interpoblacionales

Localidades analizadas	Distancia mayor	Distancia promedio	Distancia menor
El Hato-Los Olivos	4,34	2,20	0
Belisario Quevedo-Colta	2,76	1,49	0
El Hato, Los Olivos, Belisario Quevedo, Colta	2,13	1,89	0

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

El análisis de distancias intrapoblacionales (Tabla 9) revela que la distancia genética ($D=4,92$) de la población de Cotopaxi es la más alta, esto se produce porque los individuos se encontraban distantes entre sí, las muestras se recogieron en distintos campos ocasionando que su variabilidad aumente debido a que cada planta necesitaba diversificarse para poderse adaptar al entorno en donde se encontraba.

Tabla 9. Distancias genéticas intrapoblacionales

Localidades analizadas	Distancia mayor	Distancia promedio	Distancia menor
El Hato	2,13	1,89	0
Los Olivos	1,85	1,29	0
Belisario Quevedo	4,92	2,87	0,01
Colta	3,86	1,99	0

: Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

4.5.2.4. Análisis molecular de varianza (AMOVA)

El análisis molecular de varianza de los 4 sitios estudiados da como resultado que el índice de variabilidad es de 0,7545 ($p=0,001$), lo que significa que la variación genética entre estos individuos es del 75 % obteniéndose una significancia estadística bastante alta entre las poblaciones estudiadas (Tabla 10).

Tabla 10: AMOVA interpoblacional de las cuatro localidades estudiadas

Localidades analizadas	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de variación	% de variación
El Hato, Los Olivos, Belisario Quevedo, Colta	124	355,41	8,13	75,00
El Hato, Los Olivos	60	366,78	8,39	77,40
Belisario Quevedo, Colta	60	343,31	7,61	70,20
El Hato, Belisario	60	320,71	7,32	55,00
Los Olivos, Colta	60	330,32	7,44	65,00

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

En cuanto al resultado de la AMOVA de las localidades del norte y del centro del país, el porcentaje de variabilidad es de 77,4 % y de 70,2 % respectivamente, estos resultados corroboran lo obtenido mediante las distancias génicas y árboles filogenéticos (Tabla 12). Alonso y Rosales (1988) aluden que la diferenciación genética de plantas autógamias es alta y esto es corroborado con los resultados obtenidos en investigaciones en ajonjolí (*Sesamun indicum*), en donde se obtuvo un 85 % de variabilidad genética (Rocha, 2003).

El AMOVA de las localidades del Hato y Belisario Quevedo se lo realizó debido a que en el dendograma de la Figura 27, los individuos de estos dos sitios de estudio poseen una similitud entre ellas, en este análisis de varianza se determinó que la cantidad de variabilidad entre estas muestras es de un 55 % y esto se debe a que la diversificación genética de la quinua se produce por una hibridación entre plantas silvestres y cultivadas.

Por su parte las localidades de los Olivos en Imbabura y de Colta en Chimborazo, presentan un porcentaje de variabilidad del 65 %, este valor indica que lo expresado por el dendograma (Figura 29) es acertado y que aunque los individuos de estas dos zonas sean similares, igualmente existe una diversificación de las plantas debido a que estas necesitan modificarse genéticamente para adaptarse a las condiciones ambientales en donde se encuentran.

El análisis molecular intrapoblacional (Tabla 11) revela que en la Localidad de Los Olivos se tiene un 43,82 % de variabilidad, lo cual indica que las plantas no se diversificaron, porque en el lugar donde se muestreo estos individuos se encontraban cerca entre sí, lo que ocasiona que estas plantas tiendan a ser homocigotas (Bueno, 2011). En el caso de las localidades de: Colta, El Hato y Belisario Quevedo el porcentaje de variabilidad es del 67,60 %, 64,20 % y 88,12% respetivamente, porque en estos sitios se encontraba las muestras dispersas en una hectárea de terreno, lo cual genera que se de esta variación entre individuos de la misma población.

Tabla 11: AMOVA intrapoblacional de las cuatro localidades estudiadas

Localidades analizadas	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de variación	% de variación
El Hato	28	304,22	6,96	64,20
Los Olivos	28	207,64	4,75	43,82
Belisario Quevedo	28	461,97	10,57	88,12
Colta	28	320,32	7,33	67,60

Nota: Elaborado por Navarrete y Suasnavas, 2015

CONCLUSIONES

Las localidades del Hato en Carchi, Los Olivos en Imbabura, Belisario Quevedo en Cotopaxi y Colta en Chimborazo, presentan las condiciones edafológicas adecuadas para el crecimiento de la quinua silvestre como: una de altitud de 2750 a 3330 msnm, una cantidad de 12 horas luz, una temperatura promedio de 17- 22°C y una precipitación de 500 a 700 mm, lo que permitió tomar muestras adecuadas para el estudio.

A la quinua silvestre se la cataloga como una mala hierba desarrollándose conjuntamente con plantas cultivadas como el trigo (*Triticum spp.*), por lo tanto los agricultores la consideran como una maleza y no permiten su total desarrollo. Por lo tanto los sitios muestreados fueron lugares donde existía un cultivo de *Amarantaceae* o del trigo, debido a que así existe una mayor probabilidad de encontrar a este pseudocereal de interés.

La conservación de las muestras vegetales antes de realizar la extracción es uno de los pasos importantes, porque si no se la conserva con un agente desecante el ADN se oxida por acción del oxígeno que se encuentre presente en el aire y por lo tanto si esto sucede el rendimiento de esta molécula será inferior.

La extracción de ADN de la quinua se torna muy complicada debido a que las hojas presentan concentraciones altas de proteínas y polifenoles que disminuyen la probabilidad de obtener un ADN de calidad, necesario para realizar pruebas moleculares como la amplificación de fragmentos de interés o la secuenciación.

Para solucionar el inconveniente de la extracción del ADN de esta planta se realizaron cambios en el protocolo de Doyle y Doyle en cuanto a la cantidad de β -mercaptoetanol utilizada en la precipitación del tejido vegetal, en esta investigación se utilizó 9 μ l de este agente reductor eliminando de esta manera la mayoría de proteínas y metabolitos secundarios contaminantes de la molécula.

Los factores como: el daño foliar y la concentración de proteínas en las hojas tienen una relación inversamente proporcional a la concentración de ADN debido a que estas variables aumentan la degradación de esta molécula y disminuyen su pureza.

La concentración y calidad del ADN obtenido en esta investigación fue alto, obteniéndose valores iguales a los 600 ng/μl, esto da a entender que las modificaciones utilizadas en esta experimentación permiten obtener un ADN de calidad útil para realizar una gran cantidad de técnicas moleculares.

El fragmento del gen *rpoB* es muy informativo en cuanto a la variabilidad genética porque al ser muy conservado, permite obtener una mayor información de la diversidad molecular entre individuos de la misma población y de diferentes poblaciones debido a que el gen se encuentra sujeto a variaciones genéticas ocasionadas por factores ambientales.

La adición de dimetil sulfóxido (DMSO) en las reacciones de PCR es muy útil para aumentar el rendimiento en la amplificación de fragmentos de interés, debido a que este reactivo no permite la formación de la estructura secundaria del ADN y por lo tanto los cebadores o *primers*, tiene mayor posibilidad de unirse a los sitios de interés.

El programa de la PCR estandarizado en esta investigación fue adecuado para la amplificación del fragmento del gen *rpoB*, obteniéndose amplicones de 300 pb, que son útiles para la secuenciación de los mismos.

Las poblaciones de quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) provenientes de las provincias de Carchi, Imbabura, Cotopaxi y Chimborazo presentan una distribución filogenética que revela que la variabilidad existente entre estos individuos es alta, esta hipótesis se asevera con lo obtenido en el análisis molecular de varianza (AMOVA) en donde se presenta que la variabilidad genética entre los individuos de estas localidades se encuentra en un 75 % de diversidad genética, y esto se debe a que existe hibridación de los individuos para poderse adaptar a las nuevas condiciones ambientales en las que se encuentra.

El flujo genético por hibridación y por intercambio genético entre especies cultivadas y silvestres es bastante alto porque estas plantas se encuentran en cultivos asociados con otras, por lo que el intercambio genético aumenta ocasionando que la variabilidad genética entre los individuos se encuentra muy marcada.

El AMOVA reveló que de las 4 localidades estudiadas los individuos del Hato y de Belisario Quevedo son similares genéticamente en donde se tiene que un 55 % del material genético es parecido entre estas dos poblaciones geográficamente distantes, esto se debe a diversos factores como puede ser el transporte de polen de quinua de una localidad a otra gracias a la ayuda de los insectos polinizadores generando que la variabilidad entre localidades disminuya.

RECOMENDACIONES

La quinua silvestre (*Chenopodium quinoa* Willd.) es una de las plantas más representativas de la región andina del Ecuador debido a su importancia ancestral y a la actual relevancia agrícola de su pariente cultivado, por esta razón se torna de suma importancia la conservación *ex situ* de este pseudocereal para evitar una posible extinción, ya que en el campo esta *Amarantaceae* no cumple su ciclo vegetativo al ser considerada como una mala hierba, dañina para los animales de campo por su alto contenido en polifenoles.

Antes de la extracción de ADN vegetal es necesario realizar una revisión bibliográfica previa de los metabolitos secundarios y la cantidad de proteínas que presenta el tejido vegetal, esto permitirá estandarizar la extracción y purificación de la molécula, y así se podrá optimizar la amplificación de los fragmentos de interés mediante PCR.

Para obtener un ADN de calidad se recomienda utilizar un volumen de 200 μ l de isopropanol, porque esto permite eliminar moléculas contaminantes como las proteínas.

La cantidad de β mercaptoetanol (0,01 % v/v) utilizada en la extracción de ADN debe ser inferior a 10 μ l por 50 mg de tejido vegetal seco, debido a que si el volumen aumenta, existe una alta probabilidad de perder fragmentos ricos en guanina y citosina. El volumen óptimo de dicho agente reductor es de 9 μ l por 50 mg de tejido foliar seco porque a esa concentración este compuesto químico solo degrada los contaminantes y no los fragmentos de interés.

Se recomienda realizar una mayor cantidad de pruebas bromatológicas a la especie en estudio para obtener un conocimiento de los posibles usos que se la puedan dar en un futuro, en los diferentes campos de interés como la alimentación, el uso de energía alternativa y el fitomejoramiento de especies.

La quinua silvestre es una planta muy resistente a condiciones ambientales adversas por lo cual se recomienda realiza una mayor cantidad de pruebas moleculares para el descubrimiento de genes de posible interés comercial.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abarca y López. (2007). La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: Una interpretación de su significado evolutivo. En S. y. Eguiarte, *Ecología molecular* (págs. 183-185). México.
- Achá, Fontúrbel, Mondaca y Zambrana. (1999). *Introducción a la botánica*. La Paz.
- Alonso y Valladares. (2006). Bases de datos y metadatos en ecología: compartir para investigar en cambio global. *Asociación española de ecología terrestre*, 83-88.
- Alonso, D., y Rosales, R. (1988). Variabilidad genética y relaciones evolutivas entre variedades de alcaparra. *Departamento de Biología animal, Ecología y Genética de C.U de Almería*, 85-90.
- Applied Biosystems . (2015). *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*. Recuperado el 10 de febrero de: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_081527.pdf
- Aragón, M., y Cornejo, A. (2006). Extracción y purificación de ADN. En M. Aragón, & A. Cornejo, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología, aspectos teóricos y prácticos* (págs. 1-2). México: Coyacán.
- Aroa, C. (2011). *Quinoa "Chenopodium quinoa"*. Obtenido de <http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080/rddu/bitstream/123456789/1391/1/T-192.pdf>
- Barbadilla, A. (2014). *La genética de poblaciones*. Recuperado el 13 de 10 de 2014, de Universidad Autónoma de Barcelona: <http://bioinformatica.uab.es/divulgacio/la%20genetica%20de%20poblaciones.pdf>
- Barton y Hewitt. (1985). *Analysis of hybrid zones*. London, 112-114.
- Bautista, R. (2010). Las tres generaciones de la secuenciación . *Plataforma Andaluza de Bioinformática, Universidad de Málaga*, 128-129.
- Beckman coulter. (2013). *Agencourt AMPure XP Information For Use Guide*. Obtenido de <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B37419AA>
- Bermejo, M. (2011). Evaluating models to assess the distribution of *Buxus balearica* in southern Spain. *Vegetal science*, 256-267.

- Bolivar, M., y Rojas, A. (2013). PCR y PCR-múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización . *Avances en Biomedicina* , 27.
- Brocks, D. (2007). Análisis Filogenéticos Cuantitativos en el siglo XXI. *Revista mexicana de biodiversidad* , 252-255.
- Bueno, M. (2011). Cromosomas, vehículos en la organización y transmisión de los caracteres . *Acta biológica Colombiana*, 24.
- Cabrero y Camacho. (2002). *FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES*. Granada. 84-85.
- Cañizares, J. (2014). *Bioinformática*. Obtenido de Filogenia: <http://personales.upv.es/jcanizar/bioinformatica/filogenias.html>
- Casierra, F. (2007). Respuesta fisiológica de los vegetales al estrés por exceso de luz . *Revista colombiana de horticolas colombianas* , 115.
- Castillo, F. (2005). Secuenciación del DNA y análisis de secuencias . En F. Castillo, *Biotecnología ambiental* (pág. 350). Madrid: Tebar.
- Chopin, M. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de análitos . *Tecnología en salud*, 86-89.
- Contreras, M. (2007). *Universidad Nacional de Colombia*. Recuperado el 24 de Octubre de 2014, de Efecto de una generación de endogamia sobre caracteres vegetativos y productivos en yuca: <http://www.bdigital.unal.edu.co/711/1/07205012.2007.pdf>
- Cornejo, H. (2007). Alimentos Incas para enfrentarl el calentamineto global . *Revista digital universitaria* , 8(4), 5-6. Obtenido de http://www.revista.unam.mx/vol.8/num4/art22/abril_art22.pdf
- Cortés, A. (2015). Evaluación de la diversidad genética de *Lepidochelys olivacea* en la colonia de anidación Ixtapilla, Michoacán. *Revista de las ciencias biologicas de la Universidad de Michoacán*, 20.
- Cubero, E. (1992). Efecto de la altitud sobre la fermentación . *Revista interamericana de ciencias agrícolas* , 288.
- Cuenca, M., y Del Pilar, A. (2004). Plan de negocios para la creación de una empresa dedicada a la elaboración de maltedas a base de Quinoa en la ciudad de Bogota D.C. *Facultad de ingeniería comercial* , *Pontificia Universidad Javeriana* , 8.

- Cultek. (2006). *Amplificaciones de ácidos nucleicos in vitro*. Obtenido de <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/PCR/Aplicaciones-PCR-Amplificacion%20de%20acidos%20nucleicos%20in%20vitro.pdf>
- Ellstrand . (1999). *Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives*. Recuperado el 30 de Octubre de 2014, de http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/ecotrad.htm#_Toc483294973
- Espinoza, L. (2006). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Las herramientas moleculares* , 517.
- Falcón, L., y Valera, A. (2008). *Extracción de ácidos nucleicos*. Obtenido de Instituto Nacional de Biología : <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap16.pdf>
- FAO. (2011). *La quinua: cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial*. Oficina regional para America Latina y el Caribe.
- Fernández, M. (2012). *Byrsinomia crassiflora, estudio fitoquímico y farmacológico* . *Universidad Complutense de Madrid , facultad de Farmacia* , 80.
- Fierro, F. (2005). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* , 25-27.
- Fisher. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Clarendon, 396.
- Fuentes, F. (2009). Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite marker. *Sprigenr science*, 369-377.
- García, A., y Sánchez, J. (1998). Determinación de proteínas de hojas de Citrus, extraccion faccionamiento y cuantificación . *Universidad de Murcia*, 200.
- García, B. (2015). La cocina de los chullpas. Representaciones del pasado e identidades en el presente a partir de la alimentación en los Andes. *Revsitas científicas Complutensenes* , 12.
- García, H. (31 de Marzo de 2000). *Electroforésis en geles de poliacrilamida : fundamentos, actualidad e importancia* . Obtenido de Universo Diagnóstico : [http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm?iframe=true&w](http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm?iframe=true&width=95%&height=95%)
[idth=95%&height=95%](http://www.bvs.sld.cu/revistas/uni/vol1_2_00/uni07200.htm?iframe=true&width=95%&height=95%)
- García, M., y Cruz, M. (2011). El Ramal. En M. García, y M. Cruz, *Comunidades orgiginarias y grupos étnicos de la provincia de Jujuy* (pág. 19). Tucamán , Argentina: Subtrópico.

- González, F. (2007). *CEAMISH - UAEM*. Obtenido de MAXIMA PARSIMONIA:
http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/Cursos2RMBF/PDFs/C1/Tema6_parsimonia.pdf
- González, J. (2006). *Cultivo de tejidos: una herramienta para el fitomejoramiento*. Obtenido de
<http://www.inin.gob.mx/publicaciones/documentospdf/49%2037.pdf>
- González, M. (2009). *Extracción de polifenoles*. Obtenido de Editorial científica universitaria :
<http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/DIGITESIS/Tesis%20de%20Gomez/pdf/Capitulo%202.pdf>
- Guaminga, M. (2011). Respuesta del cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.) a tres tipos de abonos orgánicos con tres niveles de aplicación, bajo el sistema de labranza mínima en la comunidad Chacapamba Quishuar, provincia de Chimborazo . *Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de recursos naturales* , 18-20.
- Guevara, M.F. (2015). Distribución potencial de *Chenopodium quinoa* Wild. en la región andina del Ecuador, artículo no publicado.
- Hedrick, P. (2000). Population genetics and Ecology . *princepton* , 110-112.
- Herrera, E. (2013). La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Revista médica de Honduras*, 1. Obtenido de
<http://www.bvs.hn/RMH/pdf/2013/pdf/Vol81-1-2013-10.pdf>
- Herrera, J. (2010). Optimización de protocolos para la extracción de ADN y uso del marcador SCAPISPJ1 en Piñon (*Jatropha curcas* L.). *Falcutad de ciencias agrícolas, Universddad agropecuaria Zamorano* , 20-25.
- Horton, D. (2014). Investigación colaborativa de Granos Andinos en Ecuador . *Instituto nacional autónomo de investigaciones agropecuarias (INIAP)* , 18.
- Igea, J. (2012). Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos . *Universidad de Barcelona, Facultada de ciencias evolutivas* , 20.
- (INAMHI), I. n. (2010). Anuario metereológico 2010. *Anuarios metereológicos* , 122. Obtenido de Instituto nacional de Metereología e Hidrología (INAMHI).
- Iturbe, U. (2010). Adaptaciones y adaptación biológica. *Revista de la sociedad española de Biología Evolutiva*, 5-12.

- Jacobsen, S., y Mujica, A. Ortiz. (2003). La importancia de los cultivos andinos. *Fermentum* , 14-24.
- Jansen, M. (2009). DNA barcode for land plants . *University of Philadelphia* , 120-121.
- Jia, G., & et.al. (2008). *PNAS*, 9145-9150.
- Jordano, P. (2006). Utilidad y aplicaciones de técnicas moleculares en ecología y conservación. *Estación Biológica de Doñana, CSIC*, 1-3.
- Li, W. (1997). *Molecular evolution meets the genomics revolution*. Recuperado el 26 de Octubre de 2014, de Nature Genetics: <http://www.nature.com/ng/journal/v33/n3s/full/ng1088.html>
- Macrogen (2015). Electroferograma de la muestra A20. Artículo no publicado.
- Maldonado, M., y Jorrín, J. (2006). Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análiss de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana. *Departamento de Bioquímica y Biología molecular ,Campus Universitario de Rabanales* , 2.
- Márquez, J. (2010). Secueciamiento de fragmentos de ADN . *Herramientas moleculares aaplicadas a ecología* , 20.
- Márquez, L., Serrato, A., y Cerritos, R. (2010). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* . Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/secuenciacion.pdf>
- Mateo, R. (2011). Modelos de distribución de especies: Una revisión sintética. *Revista chilena de historia natural* , 201-240.
- Momteleone, J., y Morábito, J. (2008). *Efecto del riesgo deficitario controlado sobre el contenido de sustancias responsables de la estabilidad oxidativa en aceites virgenes de Oliva (Olea europaea L.)*. Obtenido de Conicet: <http://www.ina.gob.ar/pdf/CRA-VFERTI/CRA-RYD-21-Monteleone.pdf>
- Morales, D., y Gallo, L. (30 de Mayo de 2006). *Platoforma de Proteómica* . Obtenido de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf
- Moratalla, N. (25 de Febrero de 2002). *Tecnología genética aplicada al hombre* . Obtenido de Facultad de Medicina , Ciencia y Farmacia , Universidad de Navarra : <http://www.unav.es/cdb/dbcapo20b.html>
- Moreno, N., y Ospina, X. (2008). Inmovilización de inductores metálicos y co-sustrato para la remoción de negro reactivo 5 emleando Pleurotus ostreatus

- inmovilización in fique . *Facultad de ciencias, Pontificia universidad Javeriana* , 35.
- Muñoz, E. (17 de Octubre de 2011). *Instituto Roche*. Obtenido de Genómica aplicada: <http://www.institutoroche.es/genomicaAplicada>
- Murillo, A., y Mujica, Á. (2013). Quinoa: pasado, presente y futuro . *Universidad Nacional del Altiplano*, 2.
- Naranjo, Y., y Hernández, P. (2009). Alineamiento múltiple de secuencias con T-Coffee: Una aproximación Paralela. *Universidad Autónoma de Barcelona*, 7.
- Nualart, M. (2005). Modelización de la distribución potencial en Cataluña de 6 especies Pirenaicas. *Departamento de Biología Vegetal, Unidad de Botánica. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.* , 164-167.
- Núñez, C. (2009). Distribución radial de Polifenoles en troncos de *Eucalyptus grandis* . *Revista de ciencia y tecnología de* , 25.
- Palacio, J. (Noviembre de 2013). *Protocolo para la colecta, transporte y conservación de tejido vegetal para la extracción de ADN*. Obtenido de http://www.biogeniccolombia.org/uploads/9/3/9/5/9395218/colecta_robles.pdf
- Palahuachi, J. (2012). Propuesta de un microemprendimiento para la creación de un restaurante utilizando la Quinoa como producto principal . *Universidad de Cuenca* , 14-16.
- Peña, C. (2011). *Métodos de inferencia filogenética*. Laboratory of Genetics.
- Peralta, E. (2012). Manual agrícola de cultivos andinos. *Programa Nacional de Leguminosas y granos andinos INIAP*, 32.
- Pérez, A. (2011). *Reacción en Cadena de Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)* . Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia : <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%F3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf?sequence=1>
- Pérez, A. (2011). *Reacción en Cadena de Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)* . Obtenido de Universidad Politécnica de Valencia : <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10700/Reacci%F3n%20en%20cadena%20de%20la%20polimerasa.pdf?sequence=>
- Pérez, I. (2011). Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya spp.*) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro*, 27-34.

- Pierce. (2010). *Genética, un enfoque conceptual* (tercera ed.). Madrid, España: Médica Panamericana, 220.
- Pinilla, G. (2008). Bodas de plata de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Nova*, 65-75.
- Pinto, B. (7 de Octubre de 2013). *El cultivo de la Quinua y el clima en el Ecuador*. Obtenido de <http://186.42.174.231/meteorologia/articulos/agrometeorologia/El%20%20cultivo%20de%20la%20quinua%20y%20el%20clima%20en%20el%20Ecuador.pdf>
- Pinzón, A. (Junio de 2006). *Introducción al diseño "in silico" de primers*. Obtenido de Centro de bioinformática del Instituto de Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia : <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/cbib/estudiantes/1-07/primerDesign.pdf>
- Quelal, M. (2009). Análisis de la cadena agroproductiva de la Quinua (*Chenopodium quinoa* Wild.) , en las provincias de Chimborazo e Imbabura . *Facultad de ciencias químicas y agropecuarias de la Escuela Politécnica Nacional (EPN)* , 24.
- Repo, R., y Encima, C. (2008). Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua (*Chenopodium quinoa*), Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) y kiwicha (*Amaranthus caudatus*) . *Revista de la sociedad química del Perú* , 4-8.
- Restrepo. (2005). Análisis de las variables estratégicas para la conformación de una cadena productiva de quinua en Colombia . *Revista de ciencias administrativas y sociales* , 103-105.
- Reyes, E., y Galván, A. (2009). *Métodos para la cuantificación de proteínas*. Obtenido de Departamento de Bioquímica y Biología molecular: <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/27%20M%C3%89TODOS%20PARA%20LA%20CUANTIFICACI%C3%93N%20DE%20PROTE%C3%8DNAS.pdf>
- Rocha. (2003). Variabilidad y diferenciación genética en cuatro poblaciones de ajonjolí *Sesamun indicum*. *Agronomía costarricense*, 1047-1057.
- Rocha y Gasca. (2007). Ecología molecular de la conservación. En S. y. Eguiarte, *Ecología molecular* (págs. 251-253). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

- Romo, S., Rosero, A., y Florero, C. (2006). Potencial nutricional de harinas de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) variedad Paiartal en los Andes colombianos primera parte . *Ingeniería agroindustrial del Cauca* , 113.
- Rosas, S. (2005). Estudio de prefactibilidad para la exportación de harina de Quinoa al mercado estadounidense para el período 2005-2'14. *Repositorio de la Universidad tecnológica equinoccial (UTE)* , 8.
- Salcines, F. (2009). Cadena agroalimentaria de la Quinoa y la Maca Peruana y su Comercialización en el Mercado Español . *Universidad politécnica de Madrid, ingeniería agronómica* , 12.
- Salgado, M. (2012). Inductores de resistencia a TuMV en *Arabidopsis thaliana* . *Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas* , 5.
- Santos, N. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects . *Biochemical pharmacology*, 1035-1041.
- Silva, J. (2006). Obtención, caracterización y relación estructura-funcionalidad de un aislado proteico de Quinoa (*Chenopodiun quinoa*) orgánica proveniente de la región Vid de Chile . *Universidad de Chile , facultad de ciencias Químicas* , 11.
- Solano, G. (2009). Optimización de la extracción de ADN de *Passiflora ligularis* para el análisis por medio de marcadores moleculares . *Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana* , 20-22.
- Suay, M. (2008). Estabilidad del mRNA de rbcL en el cloroplasto de *Chlamydomonas reinhardtii* : papel de la región 5'utr . *universitat de valencia*, 20.
- Subedi, A. (2013). Collection and trade of wild-harvested orchids in Nepal . *Journal of ethnobiology and ethomedicine*, 9-64.
- Tamay de Dios, L., e Ibarra, C. (2013). Fundamntos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo Real. *Tecnología en medicina*, 70-78.
- Tapia, M. (Junio de 2012). *La Quinoa: historia, distribución geográfica, actual producción y usos*. Obtenido de Revista ambiente : <http://www.revistaambienta.es/WebAmbienta/marm/Dinamicas/secciones/articulos/quinoa.htm>

- Terán, E. (2010). Proyecto de factibilidad de la producción y exportación de Quinoa orgánica al mercado de Francia. *Repositorio digital de la Universidad tecnológica equinoccial (UTE)*, 10-12.
- Terán, S. (2008). Alimentación de codornices (*Coturnix japonica*), en fase de postura a base a tres harinas andinas: Amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*), Quinoa (*Chenopodium quinoa*) y Maíz (*Zea mays*). *Escuela de ciencias agrícolas y ambientales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador*, 34.
- Valadez, M., y Kahl, G. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas . *Universidad Autónoma Chapingo*, 147.
- Vásconez, M. (2012). Diseño de un producto a base de Avena (*Avena sativa*), Harina de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Will.) , Harina de Soya (*Glycine max*) y Espirulina (*Spirulina max*). *Facultad de ciencias agropecuarias, Universidad de las Américas (Udla)*, 18.
- Velasco, R. (2004). Marcadores moleculares y la extracción de ADN . *Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 16.
- Velásquez, L., Aragón, M., y Cornejo, A. (2006). *Herramientas moleculares aplicadas en la biotecnología*. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/extraccion.pdf>
- Wright. (1951). *The genetical structure of populations*. Recuperado el 10 de Noviembre de 2014, de This Week's Citation Classic: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1989/A1989AM72100001.pdf>
- Yap, A. (2008). AEF1/MPR25 is implicated in RNA editing of plastid atpF and mitochondrial nad5 and also promotes atpF splicing in Arabidopsis and rice. *The plant journal*, 12-15

ANEXOS

Anexo 1. Posiciones geográficas de las localidades de estudio

Muestra	Provincia	Localidad	Altitud (m)	Posición GPS
C1	Chimborazo	Colta	3319	17 M 0748882 UTM 9809111
C2	Chimborazo	Colta	3319	17 M 0748884 UTM 9809103
C3	Chimborazo	Colta	3321	17 M 0748796 UTM 9809178
C4	Chimborazo	Colta	3321	17 M 0748796 UTM 9809174
C5	Chimborazo	Colta	3320	17 M 0748794 UTM 9809178
C6	Chimborazo	Colta	3320	17 M 0748636 UTM 9809116
C7	Chimborazo	Colta	3330	17 M 0748635 UTM 9809116
C8	Chimborazo	Colta	3332	17 M 0748605 UTM 9809012
B1	Cotopaxi	Belisario Quevedo	3330	17 M 0770122 UTM 9890696
B3	Cotopaxi	Belisario Quevedo	2781	17 M 0770122 UTM 9890698
B6	Cotopaxi	Belisario Quevedo	2773	17 M 0770020 UTM 9890690
B11	Cotopaxi	Belisario Quevedo	2777	17 M 0770026 UTM 9890808
B12	Cotopaxi	Belisario Quevedo	2776	17 M 0770018 UTM 9890797
B15	Cotopaxi	Belisario Quevedo	2781	17 M 0770044 UTM 9890838
B16	Cotopaxi	Belisario Quevedo	2788	17 M 0770156 UTM 9890709
B17	Cotopaxi	Belisario Quevedo	2784	17 M 0770136 UTM 9890724
A2	Carchi	El Hato	2992	17 N 0828163 UTM 0064634
A5	Carchi	El Hato	2996	17 N 0828168 UTM 0064617
A7	Carchi	El Hato	2853	17 N 0828168 UTM 0066617
A10	Carchi	El Hato	2855	17 N 0828166 UTM 0064617
A11	Carchi	El Hato	2837	17 N 0828243 UTM 0064575
A15	Carchi	El Hato	2839	17 N 0822170 UTM 0064616

Muestra	Provincia	Localidad	Altitud	Posición GPS
A17	Carchi	El Hato	2837	17 N 0828157 UTM 0646228
A19	Carchi	El Hato	2848	17 N 0828193 UTM 0064851
L1	Imbabura	Los Olivos	2834	17 N 0812846 UTM 0032478
L3	Imbabura	Los Olivos	2830	17 N 0812846 UTM 0032466
L6	Imbabura	Los Olivos	2865	17 N 0812846 UTM 0032460
L11	Imbabura	Los Olivos	2834	17 N 0812868 UTM 0032436
L12	Imbabura	Los Olivos	2830	17 N 0812864 UTM 0032423
L13	Imbabura	Los Olivos	2848	17 N 0812845 UTM 0032418
L17	Imbabura	Los Olivos	2830	17 N 0812704 UTM 0032512
L20	Imbabura	Los Olivos	2830	17 N 0812705 UTM 0032568

Anexo 2. Evaporación de etanol al 70% en pellets de las muestras provenientes de Belisario Quevedo



Anexo 3. Registros existentes del Herbario nacional acerca de la presencia de quinua
(*Chenopodium quinoa* Willd.) en el Ecuador

Número de colección	Ciudad	Localidad	Provincia	Elevación	Coordenadas	Año de recolección	Mes de recolección
1154	Guaranda	Parroquia Moreno	Bolívar	3000	01°35'15" S, 79°01'51"W	1991	Junio
1253	Pelileo	San pedro de Pelileo	Tungurahua	2800	01°20'S, 78°30' W	1996	Julio
1234	Otavalo	Laguna de San Pablo	Imbabura	2680	78°19'W,00°14' N	1991	Abril
1589	Salcedo	Parroquia San pedro de Mulalillo	Cotopaxi	2700	78°31'W,01°06' S	1990	Marzo
1345	Cayambe	Reserva Cayambe-Coca	Imbabura	3400	78°20' N, 00°27'W	1996	Abril
1225	Ibarra	Parroquia Ambuqui	Imbabura	2800	77°59'W, 00°26'N	1990	Junio
1322	Ibarra	Parroquia Salinas	Imbabura	3100	00°27' N, 78°06' W	1991	Abril

Anexo 4. Certificado de identificación botánica de plantas

MUSEO ECUATORIANO DE CIENCIAS NATURALES (MECN)

HERBARIO NACIONAL (QCNE)

Avenida Río Coca, E6-115 e Isla Fernandina
 Casilla Postal 17-07-8976, Tel/Fax: (593-2) 2441-592, 2449 824
 Quito-Ecuador

Informe de identificación taxonómica de especímenes vegetales

SOLICITANTE: Universidad Politécnica Salesiana

Sr. Byron Suasnavus

CI: 1720630092

FECHA: 26 de febrero del 2015

N° Muestra	FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO
CLT2	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT3	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT4	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT5	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT6	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT7	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT8	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT9	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
CLT10	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV1	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV2	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV3	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV4	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV5	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV6	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV7	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV8	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV9	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV10	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV11	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV12	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV13	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV14	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV15	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV16	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV17	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV18	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV19	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
LOV20	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO1	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO2	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.

ATO5	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO6	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO7	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO8	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO9	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO10	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO11	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO12	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO13	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO14	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO15	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO16	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO17	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO18	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO19	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
ATO20	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL1	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL2	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.
BQL3	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL4	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL5	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.
BQL6	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL7	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL8	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL9	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL10	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.
BQL11	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL12	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL13	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.
BQL14	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL15	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL16	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL17	Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.
BQL18	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.
BQL19	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.
BQL20	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.

Total de especies: 69

Fuente para nomenclatura

1. www.tropicos.org

Identificado por: Efraim Pizarro



Anexo 5. Matriz de análisis de componentes principales

Muestra	[ADN] ng/ul	Altitud msnm	Altitud planta (m)	[Proteínas] mol/l	[Polifenoles] umol/ml	Daño de la hoja
C2	816,00	3319,00	0,62	10,00	0,01	0,00
C3	280,00	3319,00	0,56	11,00	0,01	0,01
C5	240,00	3321,00	1,61	20,00	0,01	0,04
C6	159,20	3321,00	1,30	25,00	0,01	0,01
C7	128,00	3320,00	1,30	12,00	0,01	0,01
C8	120,00	3320,00	1,30	35,00	0,00	0,01
C9	126,00	3330,00	0,50	45,00	0,09	0,00
C12	90,99	3332,00	0,93	20,00	0,01	0,01
B1	55,70	3330,00	0,90	26,00	0,10	0,10
B3	200,00	2781,00	1,00	47,00	0,01	0,01
B6	177,00	2773,00	0,30	0,00	0,01	0,01
B11	204,00	2777,00	0,54	15,00	0,01	0,01
B12	171,00	2776,00	0,44	0,00	0,01	0,01
B15	197,00	2781,00	0,45	0,00	0,01	0,01
B16	91,60	2788,00	0,37	0,00	0,03	0,03
B17	52,00	2784,00	0,40	0,00	0,06	0,06
A2	141,00	2984,00	0,36	0,10	11,78	20,00
A5	240,00	2990,00	0,78	0,05	7,14	5,00
A7	120,00	2992,00	0,82	0,03	3,57	0,00
A10	40,20	2994	0,88	0,03	3,92	9,00
A11	94,80	2990	0,61	0,03	5,00	5,00
A15	75,20	2993	0,83	0,19	27,50	55,00
A17	102,00	2992	0,60	0,00	5,71	0,00
A19	20,90	2996	0,42	0,02	0,00	70,00
L1	76,80	2853	1,60	0,00	0,00	35,00
L3	12,30	2855	0,80	0,01	0,00	80,00
L6	109,00	2837	1,43	0,01	0,35	9,00
L11	125,00	2839	0,89	0,01	1,42	28,00
L12	51,00	2837	0,79	0,01	0,01	10,00
L13	24,60	2848	0,70	0,71	14,28	30,00
L17	30,90	2834	0,88	0,00	14,28	70,00

Anexo 6. Resumen de análisis bioinformático de secuencias

Muestras	Localidad	% de similitud	% Query cover	Pares de bases (Pb)
C2	Colta	97	98	460
C3	Colta	95	98	460
C5	Colta	82	77	434
C6	Colta	88	44	500
C7	Colta	89	78	500
C8	Colta	91	67	419
C9	Colta	90	84	451
C12	Colta	98	97	500
B1	Belisario Quevedo	88	50	540
B3	Belisario Quevedo	89	68	500
B6	Belisario Quevedo	90	83	475
B11	Belisario Quevedo	98	97	540
B12	Belisario Quevedo	97	77	475
B15	Belisario Quevedo	97	96	462
B16	Belisario Quevedo	82	77	500
B17	Belisario Quevedo	96	77	475
A2	El Hato	96	97	464
A5	El Hato	82	83	500
A7	El Hato	97	98	450
A10	El Hato	92	80	504
A11	El Hato	97	98	490
A15	El Hato	98	88	500
A17	El Hato	98	82	437
A19	El Hato	98	82	459
L1	Los Olivos	88	99	459
L3	Los Olivos	90	88	420
L6	Los Olivos	88	89	500
L11	Los Olivos	92	89	480
L12	Los Olivos	92	80	422
L13	Los Olivos	93	88	468
L17	Los Olivos	94	92	420
L20	Los Olivos	92	90	500