



Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones
Agropecuarias

| | |
|----------------------------------|--|
| FECHA DE PRESENTACIÓN: | 2008 - 06 |
| ESTACIÓN EXPERIMENTAL: | Santa Catalina |
| DEPARTAMENTO: | Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) |
| PROYECTO: | Fortalecimiento de los laboratorios de Biotecnología y sus prestaciones de servicios, Código 21.00.050.001 |
| RESULTADO: | Consolidación de biotecnologías mediante actividades de investigación |
| ACTIVIDAD: | Estudio de flujo de genes en quinua (<i>Chenopodium quinua</i> W.) en campo de agricultores mediante el uso de marcadores microsatélites |
| UBICACIÓN: | Estación Experimental Santa Catalina |
| AUTOR: | Egda. Paola González Marín |
| COAUTORES: | Dr. Eduardo Morillo |
| COLABORADORES: | DENAREF Proyecto FAO-MAG-QUINUA (PL-480) |
| FECHA DE INICIO: | 2008-05 |
| FECHA DE TERMINACIÓN: | 2009-05 |
| PRESUPUESTO: | 8579.5 USD |
| FUENTE DE FINANCIAMIENTO: | CEREPS 90% INIAP 10% |

1. ANTECEDENTES:

El flujo de genes entre cultivos y sus parientes silvestres es un proceso con implicaciones importantes en materia de conservación de la diversidad genética y el mejoramiento. La introgresión entre poblaciones silvestres y formas domesticadas es un fenómeno recurrente en la mayoría de especies, tanto autogamas como alogamas, y que puede llevar a la incorporación de genes en una población desde una u otras poblaciones (Papa, 2005). En la última década, se ha centralizado mucha atención en la hibridación cultivo-maleza como un potencial canal para el escape de transgenes en poblaciones naturales (Ellstrand *et al*, 1999). Así, la documentación actual sugiere que la hibridación natural y la introgresión de formas silvestres con los cultivos ocurrirían en la mayoría de plantas domesticadas cuando las condiciones de contacto existen. Ellstrand *et al* (1999) reportan evidencias de hibridación espontánea e introgresión en 12 de los 13 cultivos de mayor importancia para la alimentación y la agricultura, y Groot *et al* (2003) reportan una amplia lista de la literatura disponible respecto a flujo de genes de cultivos con formas silvestres con un enfoque hacia el análisis de riesgo de la introducción de OGMs en los sistemas de agricultura. Es importante señalar que la documentación disponible es inferior en los centros de origen, y particularmente en la región andina no existen casos documentados de flujo de genes espontáneos entre cultivos y formas silvestres. En este contexto, las observaciones e información actuales hacen que la quinua sea una especie de interés potencial para abordar esta temática.

La quinua (*Chenopodium quinoa* W.) es un pseudo cereal andino de gran valor alimenticio cuyas cualidades nutritivas han sido reconocidas en el mundo entero: alto contenido de proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, minerales y otros elementos (González, 2007). Es originaria de los valles andinos y fue domesticada en Bolivia, Ecuador y Perú hace unos 3000 a 5000 años ocupando un rol destacado en la seguridad alimentaria de los pueblos autóctonos. Su gran adaptabilidad a las condiciones ambientales adversas de los Andes altos donde el maíz no crece, permitió su domesticación como lo evidencia incremento en el tamaño del grano, cambio de coloración y fácil dispersión del grano (Martínez, 2005). Es una especie tetraploide ($2n=4x= 36$ cromosomas) de régimen reproductivo predominantemente autógamo y con un bajo porcentaje de alogamia (Gandarillas, 1982).

En los últimos 10 años, este cultivo ha tenido una gran proyección comercial tanto en el mercado nacional como internacional por ser un alimento exótico y nutritivo, siendo Perú, Bolivia y Ecuador los mayores países productores (Martínez 2005). En Ecuador según información obtenida del III Censo Nacional Agropecuario realizado en el 2000, se han registrado 1700 ha, principalmente en las provincias de Azuay, Cotopaxi, Chimborazo, Imbabura, Pichincha y Tungurahua (Junovich, 2000). Además la producción de quinua se está impulsando desde el 2004 por medio de un proyecto de la FAO y el MAG a través de créditos a los agricultores en las Provincias de Cotopaxi y Bolívar con el fin de contribuir a la seguridad alimentaria de la población y el mejoramiento de los ingresos rurales (Angulo, 2005). No obstante, en los lotes de producción se observa la presencia de granos oscuros y pequeños en la producción de la variedad INIAP-Tunkahuan, estimado en un 5 a 6% del rendimiento pero que según las últimas informaciones estaría en progresivo aumento (Jorge Ortega, proyecto FAO-MAG-QUINUA). La presencia de granos negros en el grano de INIAP- Tunkahuan u otras variedades criollas, se explicaría por mezclas indeseadas ocurridas al momento de la cosecha manual o mecánica, ya que solo una panoja de quinua maleza puede ocasionar mezcla en cantidades superiores a los 10000 granos. Otra posibilidad sería el flujo de genes entre las variedades cultivadas y las quinuas maleza, a pesar de que las silvestres son más precoces (Peralta E. com. pers). Por ejemplo Wilson y Manhart (1993), detectan que cerca del 30% de la progenie de la especie *Ch. berlandieri* creciendo en contacto espacial con *Ch. quinoa* en el estado de Washington, USA (región donde la quinua fue introducida), corresponden a genotipos híbridos interespecíficos de tipo F₁ ocurriendo en forma espontánea. Estos autores explican que esta tasa de flujo genético es alta considerando que se traten de especies alógamas facultativas, y predicen con una alta probabilidad el hecho de que estas poblaciones híbridas, parcialmente fértiles, puedan introgresar genes en las poblaciones naturales. También señalan que una dinámica similar podría estar ocurriendo en la región andina, aunque esto no ha sido aun demostrado. En el Ecuador se han reportado cuatro especies de quinuas silvestres conocidas indistintamente como “ashpa quinua”, “mallas” o “cuchi quinua” correspondientes a las especies *Ch. album*, *Ch. hircinum*, *Ch. murale* y *Ch. quinoa* var. *millianum*. Martínez (2005); su asociación con las quinuas cultivadas es observada y la posibilidad de flujo genético existe.

2. JUSTIFICACIÓN:

Este proyecto aportará al conocimiento de la variabilidad y la dinámica genética de la quinua en zonas productoras (provincias de Bolívar, Carchi y Chimborazo), comparando la diversidad en campo de agricultores vs. la diversidad de la variedad Tunkahuan originalmente liberada y conservada en el Banco Nacional de Germoplasma del INIAP. Para esto se utilizarán marcadores microsatélites, cuya información permitirá establecer cambios relativos en las frecuencias alélicas (si los hubiere) en 20 años de producción de esta variedad en campo de agricultores y por lo tanto sometida a la presión y selección del hombre y del medio ambiente. El análisis molecular permitirá identificar la existencia de alelos cuya presencia pueda atribuirse a flujo de genes (si los hubiere); lo cual permitirá discriminar entre una mezcla mecánica o genética. Cabe señalar del interés adicional de este proyecto para los productores, procesadores, consumidores y exportadores de quinua, quienes demandan una mayor cantidad y calidad de semilla de la variedad INIAP-Tunkahuan. En función de los resultados se justificará un programa de regeneración de la variedad INIAP-Tunkahuan con el fin de proveer de semilla certificada a los productores de este importante cultivo andino.

3. OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GENERAL:

- Monitorear la integridad genética de quinua (*Chenopodium quinua* W.) de la variedad INIAP-Tunkahuan de materiales provenientes de las principales zonas productoras de la sierra ecuatoriana a través de marcadores moleculares

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analizar la variabilidad genética de la variedad INIAP-Tunkahuan original y la producida en campo de agricultores.
- Determinar si existen interacciones genéticas entre formas silvestres y cultivadas de quinua en campo de agricultores, y si este mecanismo es bi-direccional
- Establecer si la introgresión genética a partir de formas silvestres explica la mezcla observada en campos de producción de quinua

4. HIPÓTESIS

Ho. La mezcla que se observa en campos de producción no se explica por un proceso de flujo genético entre formas silvestres y cultivadas de quinua.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. MUESTREO EN CAMPO DE AGRICULTORES Y COLECTA DE MATERIAL VEGETAL:

Se realizará una inspección a los lotes de producción, a fin de identificar áreas aptas para el estudio es decir áreas de producción en diferentes provincias donde se cultiva la variedad INIAP-Tunkahuan y en donde se encuentran en contacto con formas silvestres o variedades criollas; complejo maleza-cultivo), además se muestrearán lotes de quinua de otras variedades criollas donde se observe mezcla de semilla y poblaciones de quinua silvestre. Una vez identificadas estas áreas, se realizará un muestreo para comparar la diversidad genética entre los diferentes lotes de producción con el fin de compararlas con la variedad INIAP-Tunkahuan almacenada en el Banco Nacional de Germoplasma de INIAP.

Se coleccionarán hojas tiernas de 10 plantas seleccionadas aleatoriamente por lote para la extracción de ADN; así mismo, en caso de disponibilidad se muestreará semilla diferenciada por el color de grano para su posterior germinación y extracción de ADN. Cada lote será codificado con un número secuencial, y cada planta muestreada con un número subalterno. Para comparar la diversidad de los lotes de producción con la variedad almacenada en Banco Nacional de Germoplasma, se pondrá a germinar semillas del material original.

5.1.2. DESINFECCIÓN DE SEMILLAS Y GERMINACIÓN:

Para la desinfección de semillas, se utilizarán vasos de precipitación, pinzas, material vegetales (semillas), papel aluminio, papel toalla y reactivos (Hipoclorito de sodio 3%, alcohol y agua estéril). Para la germinación de las

semillas de la variedad INIAP-Tunkahuan, se utilizará un Germinador Jackson BLVD – 60607.

5.1.4. REACTIVOS, EQUIPOS E INSTALACIONES:

Los reactivos, equipos e instalaciones necesarios para la realización de esta investigación se hallan descritos en el Anexo 1.

5.2.1. CARACTERÍSTICAS DEL LABORATORIO

Los análisis moleculares se realizarán en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina. Dicho laboratorio cuenta con una sala de extracción, dos salas de PCR, una sala de electroforesis, una sala de cámaras de flujo laminar y una sala de revelado de geles.

5.2.3. MANEJO ESPECÍFICO DEL EXPERIMENTO

5.2.3.1 Extracción de ADN:

Una vez germinadas las semillas se procederá a transplantarlas y ambientarlas en semilleros hasta que se desarrollen los primeros primordios foliares para la extracción de DNA. Las hojas colectadas en campo se conservarán en sílica gel para su maceración y posterior extracción de ADN. Para la extracción de ADN se utilizará el protocolo detallado en el Anexo 2.

5.2.3.2 Genotipage de SSR:

Se probarán 20 microsatélites de los reportados por Mason, *et al.* (2005) seleccionados por ser secuencias de motivo SSR perfecto y dinucleótidos (Anexo 3), lo cual minimiza el riesgo de homoplasia alélica sobre todo al hacer comparaciones interespecíficas. El protocolo de amplificación a utilizarse se describe en el Anexo 4. Los primers seleccionados serán marcados por fluorescencia en 700 o 800 nm con una secuencia M13 (método *M13-tailing*) para ser detectados por los lectores laser del secuenciador LI-COR 4300S (IR2; LI-COR Biosciences). Los productos de amplificación serán cargados en un gel

de acrilamida 6.5% para una migración de 2 horas a 1500 V. La adquisición de imágenes del gel será efectuada por el secuenciador para su lectura en el asistente de lectura SAGA MX - AFLP®.

5.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El software SAGA GT – MICROSATÉLITES es un asistente de lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR 4300s que permite registrar los genotipos minimizando el error de lectura y la ambigüedad de bandas. La matriz de datos obtenidos de SAGA será importada a EXCEL para los análisis de agrupamientos y multivariados, para lo que se utilizarán varios paquetes de genética poblacional como Genalex, Power Maker Microsatellite, y NTSYS. Además se realizará un test de asignación bayesiano en el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2001) para la determinación o no de flujo genético.

6. CRONOGRAMA DE TRABAJO:

| <i>Actividad</i> | Mes 1 | Mes 2 | Mes 3 | Mes 4 | Mes 5 | Mes 6 | Mes 7 | Mes 8 | Mes 9 | Mes 10 | Mes 11 | Mes 12 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| Preparación de anteproyecto y comité técnico | ■ | | | | | | | | | | | |
| Identificación de áreas de estudio | ■ | | | | | | | | | | | |
| Muestreo en campo | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | | | | |
| Extracción de ADN | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | | | | |
| Screening y selección de microsatélites | | ■ | ■ | ■ | | ■ | | | | | | |
| Standardización genotipage SSR | | | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | | | | |
| Genotipage SSR | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | |
| Registro de datos | | | | | | | | ■ | ■ | | | |
| Análisis estadístico e interpretación | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Informe final, artículo científico | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ |

7. PRESUPUESTO:

| ETAPA I. MUESTREO EN CAMPO | \$/Total |
|---|-----------------|
| Misiones de muestreo en campo de agricultores y poblaciones silvestres (viáticos y subsistencias) | 1300 |
| Combustible | 200 |
| TOTAL | 1500 |

| ETAPA II. ANÁLISIS MOLECULARES | | | | |
|---------------------------------------|---------------|-----------------|----------------|------------------|
| ACTIVIDAD | Unidad | Cantidad | \$/Unit | \$/Total |
| Extracción de ADN | 1 | 120 | 2.45 | 294 |
| Cuantificación de ADN | 20 | 6 | 2.98 | 17.9 |
| PCR marcada 700/800 | 1 | 2640 | 1.5 | 3960 |
| Análisis en LI-COR | 1 | 22 | 22.55 | 496.1 |
| TOTAL | | | | \$ 4768,0 |

| ETAPA IV. ELABORACIÓN DEL DOCUMENTO FINAL | | | | |
|--|---------------|-----------------|----------------|------------------|
| ACTIVIDAD | Unidad | Cantidad | \$/Unit | \$/Total |
| Fotocopias, impresión y otros | hojas | 500 | 0.2 | \$ 100,00 |
| Empastados. | und. | 6 | 20 | \$ 120,00 |
| TOTAL | | | | \$ 220,00 |

III PERSONAL REQUERIDO PARA EL PROYECTO

| | Costo mes | Costo 6 meses |
|---------|------------------|----------------------|
| Becario | 280,5 | 1683 |

| RUBRO | COSTO |
|---------------------------------|-----------------|
| MUESTREO EN CAMPO | \$1500 |
| ANÁLISIS MOLECULARES | \$4768 |
| ELABORACIÓN DEL DOCUMENTO FINAL | \$220 |
| BECARIO | \$1683 |
| SUBTOTAL | \$8171 |
| IMPREVISTOS (5%) | \$408.5 |
| COSTO TOTAL | \$8579.5 |

| FUENTE DE FINANCIAMIENTO | % Aporte |
|---|-----------------|
| Proyecto CEREPS D212-023 (reactivos, transporte, viáticos, impresiones, imprevistos) | 90 |
| INIAP (Instalaciones del Departamento de Biotecnología) | 10 |
| TOTAL | 100 |

8. BIBLIOGRAFÍA CITADA:

Angulo, I. 2005. Proyecto Quinoa: La importancia de la Quinoa dentro de la Alimentación. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Quito – Ecuador. (en línea). Consulta: 23 de enero de 2008. Disponible en <http://www.fao.org/ec/archivos/boletines/Comunicado%20de%20prensa%20quinua.pdf>

Ellstrand, N., Prentice, H., Hancock, J. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst* 30, 539-563.

Jhingan, A. 1992. A novel technology for DNA isolation. *Methods Mol. Cells. Biol.*, 3 : 15 -22

Junovich, A. 2000. *Proyecto SICA - Banco Mundial: La Quinoa en el Ecuador a través de los datos del III censo nacional agropecuario.* (en línea). Consulta: 23 de enero de 2008. Disponible en <http://sica.gov.ec/censo/contenido/quinua.pdf>

Gandarillas, H. 1982. El cultivo de la Quinoa. Ministerio de Asuntos Campesinos Y Agropecuarios. Bolivia, pp: 7 - 10

González, M., López, E. 2007. Tradicional nutriente Andino: La quinoa. (en línea). Consulta: 24 de enero de 2008. Disponible en http://www.visionchamanica.com/alimentacion_sana/quinua.htm

Groot, M., Van de Wiel, Tienderen, V., Nijs, D. 2003 Hybridisation and introgression between crops and wild relatives. *University of Amsterdam & Plant Research International, Amsterdam & Wageningen, COGEM research* 112: 517-527.

Martínez, J. 2005. La quinoa en el Ecuador. Editorial Publicación MAG. Ecuador, pp: 117.

Mason, S., Stevens, M., Jellen, N., Bonifacio, A., Fairbanks, D., Coleman, C. 2005. Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science* 45: 1618-1630.

Morillo, E. 2002. Protocolos de marcadores moleculares. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP): Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF), pp : 22-23.

Nieto, C., Castillo, R., Peralta, E. 1986. Guía para la producción de semilla de quinua. Boletín Divulgativo N°. 186. Estación Experimental Santa Catalina. Ecuador, pp 5-6

Papa, R. 2005. Gene flow and introgression between domesticated crops and their wild relatives. The role of biotechnology, pp :71-75

Peralta, E. 2006. Los cultivos andinos en Ecuador. Bancos de germoplasma, fitomejoramiento y usos: pasado, presente y futuro. Resumen Conferencia. In. Resúmenes XII Congreso de Cultivos Andinos, pp: 15.

Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of populations structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959

Wilson, H., Manhart, J. 2005 Crop/weed gene flow: *Chenopodium quinua* Willd. and *C. berlandieri* Moq. Theoretical Applied Genetics 86: 642-648.

ANEXOS

Anexo 1. REACTIVOS Y EQUIPOS

| Reactivos | Equipos e Instalaciones | Materiales |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Tris HCl</i> | <i>Invernadero</i> | <i>Papel filtro</i> |
| <i>NaCl</i> | <i>Baño maría</i> | <i>Tubos eppendorf</i> |
| <i>EDTA PH8,0,5M</i> | <i>Centrífuga</i> | <i>Maceradores</i> |
| <i>PVP</i> | <i>Vórtex</i> | <i>Puntas 1 ml, 200 ul y 1000 ul</i> |
| <i>CTAB</i> | <i>Refrigerador</i> | <i>Papel parafilm</i> |
| <i>B-mercaptoetanol</i> | <i>Transiluminador UV</i> | <i>Pipetas</i> |
| <i>CIA</i> | <i>Termocicladores</i> | <i>Papel absorbente</i> |
| <i>Etanol</i> | <i>Cámaras electroforéticas</i> | <i>Placas de vidrio</i> |
| <i>Tris/EDTA</i> | <i>Estufa</i> | <i>Separadores, peines</i> |
| <i>Bromuro de etidio</i> | <i>Sorbona</i> | |
| <i>Blue juice</i> | <i>Balanza analítica</i> | |
| <i>Agarosa</i> | <i>Germinador</i> | |
| <i>TAE</i> | <i>Secuenciador LICOR</i> | |
| <i>MgCl₂</i> | | |
| <i>10XPCR buffer</i> | | |
| <i>dNTP's</i> | | |
| <i>Primers</i> | | |
| <i>Taq polimerasa</i> | | |
| <i>Agua ultrapura</i> | | |
| <i>Aceite mineral</i> | | |
| <i>Marcador de peso molecular</i> | | |
| <i>Acrilamida/ Bisacrilamida</i> | | |
| <i>Buffer TBE 10 X</i> | | |
| <i>APS</i> | | |
| <i>TEMED</i> | | |

Anexo 2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN PARA *CHENOPODIUM QUINUA*: Jhingan (1992)

- **Buffer de extracción** (para 100 ml)

| Reactivo | Concentración | Cantidad |
|-------------------|----------------------|-----------------|
| Tris HCl pH 8, 1M | 200 mM | 20 ml |
| NaCl 5M | 1.7 M | 34 ml |
| EDTA pH 8, 0.5M | 10 mM | 2 ml |
| PEX | 20% | 10 g |

- **76% Etanol/0.2M de acetato de sodio** (para 1000 ml)
790 ml de etanol 96%

80 ml de Acetato de sodio 2.5M, pH 5
130 ml de agua

- **76% Etanol/10 mM de acetato de amonio**
790 ml de etanol 96%
10 ml de Acetato de amonio 1M
200 ml de agua

PROTOCOLO:

1. Pesar 1-3 g. de hojas jóvenes
2. Colocar el tejido triturado en un tubo eppendorf (1.5 ml) esterilizado
3. Adicionar 50 ul del tampón de extracción PEX y proceder a moler el tejido con una varilla de plástico con la punta aguzada (de la misma forma del tubo) hasta obtener una pasta espesa.
4. Llenar el tubo con 450 ul del mismo tampón y agitado por 20 a 30 segundos .
5. Incubar esta mezcla a 65 °C por 45 min. (Este tiempo puede variar hasta una hora dependiendo de los resultados)
6. Agitar nuevamente en vórtex y centrifugar a 13000 rpm por 5 a 10 min.
7. Tomar el sobrenadante (aprox. 400 ul) y añadir igual volumen de cloroformo: alcohol isoamilico (CIA) en otro tubo
8. Agitar y centrifugar a 10000 rpm por un minuto.
9. Tomar el sobrenadante y precipitarlo con 2 a 3 volúmenes de etanol 95%, acetato de amonio 10 M para mantenerlo a -20°C por una noche
10. Centrifugar a 10000 rpm por 20 min.
11. Descartar el sobrenadante directamente cuidando de no romper la pastilla de DNA formada después de la centrifugación
12. Al DNA precipitado agregar aproximadamente 500 ul de etanol 70%. Dar pulso de centrifuga y descartar directamente el sobrenadante.
13. Dejar evaporar el etanol restante en una estufa a 37°C por 10 min. Aprox. (o una hora a TA)
14. Resuspender el pellet de DNA dependiendo de su tamaño en 100, 200 o 300 ul de TE 0.1X (Tris – HCl 1mM, EDTA 0.1 mM, pH 8) incubando a 65°C por una hora. Se puede conservar a 4°C por pocos días o a 20°C a largo plazo.
15. Para descartar el RNA existente en la solución de ADN digerir con RNA asa A (10 ug/ml) incubando a 37 °C por 30 min. o a 4 °C por toda la noche. Según el volumen de la solución de ADN (100, 200 o 300 ul) se añade 1,2 o 3 ul de RNAsa respectivamente.

16. Para separar el material particulado que aparece en esta etapa, centrifugar brevemente y transferirlo a un nuevo tubo.
17. Precipitar el ADN agregando aproximadamente 6 volúmenes de etanol 9%, acetato de sodio 3M (20:1) y mantener a -20 °C por 30 min.
18. Centrifugar por 10 min. a máxima velocidad.
19. Descantar el sobrenadante y secar el precipitado de ADN
20. Resuspender el pellet en 200 ul de TE 0.1X y calentar a 65 °C hasta observar la completa homogenización del medio
21. Conservar a 4 °C las precipitaciones de ADN hasta cuantificar
22. Cuantificar el ADN en el espectrofotómetro .

Cuantificación del ADN

La concentración de ADN será analizado por electroforesis en geles de agarosa 0,8% en tampón TAE 1X y cuantificado comparativamente utilizando el estándar ADN *Low Mass Ladder* y un fluorímetro. La electroforesis se realizará a 110 V por 15 min. Sobre la base de estas determinaciones, la concentración de ADN de cada una de las accesiones se estandarizará en tampón TE 0,1M hasta lograr una concentración final de 2.5 ng / μ l.

**Anexo 3. MICROSATÉLITES Y PRIMERS DE *Chenopodium quinua* A
UTILIZARSE EN EL PRESENTE ESTUDIO (Mason *et al.* 2005)**

| Núm. | Nombre del marcador | Secuencia SSR | Forward primer (5' _3') | Reverse primer (5' _3') | Size (pb) | Núm alelos | Heterozig |
|------|---------------------|---------------|--------------------------|--------------------------|-----------|------------|-----------|
| 1 | QCA005 | (CA)16 | gtggttcattggtgatcctt | cttgccalcagggcatactt | 185 | 5 | 0.75 |
| 2 | QCA012 | (TG)9 | tcccatatgcctacgtaccaa | tggtcatcaacatccaaagg | 180 | 3 | 0.53 |
| 3 | QCA013 | (CA)12 | tccgaactatgaaatctgactctg | tccgaactatgaaatctgactctg | 224 | 3 | 0.53 |
| 4 | QCA015 | (AC)17 | tgggaccctgatagcttgac | tgtcctttgcatgtctatga | 190 | 2 | 0.49 |
| 5 | QCA021 | (CA)16 | cagggtatcagaataactgggaaa | ccaagattggaggacaggaa | 191 | 3 | 0.51 |
| 6 | QCA026 | (TG)12 | ttccaatacagcaccacctc | Tgcaagcatalaagacagtca | 187 | 2 | 0.5 |
| 7 | QCA027 | (CA)15 | atlgctccaaacctgcaaa | tttcgggatataatgaggctgt | 177 | 2 | 0.20 |
| 8 | QCA029 | (CA)10 | tctacttgcaaccggaatgc | cgcaaaagcaaatcaggatca | 163 | 3 | 0.66 |
| 9 | QCA030 | (CA)13 | tcattggttagatggaggaaatg | ccctctagtgcataaggatttctg | 177 | 4 | 0.60 |
| 10 | QCA034 | (CA)16 | agggagaatgaggagaaga | tcacaacaagcaggaagg | 170 | 6 | 0.73 |
| 11 | QCA040 | (CA)13 | tgtggtagacaagcaacttga | aacctactcaatagaccaactcc | 198 | 2 | 0.48 |
| 12 | QCA046 | (CA)18 | gcaggtaaatcaacccttgc | tgcataaaaactaagcagacga | 165 | 2 | 0.36 |
| 13 | QCA048 | (CA)13 | acaatacatacaaccaalattcaa | tggaaatgtcactatgattgga | 235 | 3 | 0.40 |
| 14 | QCA052 | (TG)17 | tgatttcagaaactgatttcal | gcacctcctaaacacctt | 296 | 3 | 0.54 |
| 15 | QCA053 | (TG)25 | agatgtggtgcgttggatct | aaggagagctctaaccgcttg | 189 | 3 | 0.63 |
| 16 | QCA055 | (TG)14 | gggcataatctgaagagaatcca | acgcaggtagcacttccagt | 198 | 5 | 0.75 |
| 17 | QCA056 | (TG)13 | ttggaagagctccacaaggt | cctctgaataggatacccttctgt | 172 | 3 | 0.61 |
| 18 | QCA058 | (GT)17 | ctcgaccagcagggtctg | ctagctaggcgttcctgac | 183 | 3 | 0.64 |
| 19 | QCA066 | (CA)32 | agagttcttataaagggaagagt | tttctttgtagtttctgtt | 176 | 5 | 0.64 |
| 20 | QCA067 | (CA)12 | gcaagacctgtccacaaca | tatcaacagcaacggaagca | 199 | 3 | 0.53 |

Anexo 4. PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES
(Morillo, 2002).

1. Preparar una solución con los siguientes reactivos de acuerdo al número de muestras:

| Reactivo | Cantidad |
|---------------------------|-----------------|
| DNA (2.5 ng/ul) | 5 ul |
| MgCl ₂ (25 mM) | 1.5 ul |
| 10X PCR buffer | 1.5 ul |
| dNTP's (10 mM) | 0.6 ul |
| Primers (20mM) | 0.6 ul |
| Taq polimerasa 5 u/ul | 0.06 ul |
| Agua | 6.5 ul |
| Total | 10 ul |

2. Dispensar en cada tubo eppendorf 10 ul del mix preparado, añadir 10 ul de aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra.
3. Amplificar las muestras de acuerdo al siguiente protocolo: 94 ° C por 1 min, seguido de 5 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 55 ° C durante 30 s (disminución de 1 ° C cada ciclo), 72 ° C por 1 min, 10 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 50 ° C por 30 s, 72 ° C por 1 min, 5 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 50 ° C durante 30 s (disminución de 1 ° C cada ciclo), 72 ° C por 1 min, 10 ciclos de 94 ° C durante 30 s, 45 ° C por 30 s, 72 ° C para 1 min; mantener a 72 ° C durante 5 min.
4. Visualizar los fragmentos amplificados en un gel de agarosa 2% utilizando siempre un marcador de peso molecular.
5. Si se visualiza en el gel de agarosa, se utilizara el marcaje de primers con fluorescencia IRD a 700 y 800nm para la visualización de productos de amplificación en un secuenciador LI-COR modelo 4300S. (Morillo, 2002).