

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Análisis de expresión diferencial e identificación de genes asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas en 6 ecotipos de Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) mediante la técnica cDNA-AFLP

Jennifer Liliana Fiallos Jurado

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Directora y Miembro del Comité



Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité



Antonio León, Ph.D.

Miembro del Comité



Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales



Quito, Enero del 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:



Nombre: Jennifer Liliana Fiallos Jurado

C. I.: 1712709235

Fecha: Quito, Enero de 2013

DEDICATORIA

Dedico este trabajo al Ing. Patricio
Andrade Marín por su ejemplo,
confianza y apoyo incondicional a lo
largo de mi carrera universitaria.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mi familia por el amor y la confianza que han depositado en mí. De manera especial, agradezco a mi hermana por su ayuda, paciencia y palabras de ánimo a lo largo de mi vida universitaria.

En segundo lugar, pero no menos importante, agradezco a María de Lourdes Torres por sus consejos, enseñanzas y por permitirme ser parte del grupo de investigadores del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Expreso también mi gratitud a Venancio Arahana, Antonio León y Jacob Pollier por su guía y su valiosa ayuda que me permitió culminar con éxito este proyecto.

Finalmente, quiero agradecer todos mis amigos tesistas y voluntarios del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y del Laboratorio de Biotecnología Vegetal que estuvieron prestos a ayudarme en todo momento durante la realización de este trabajo, en especial a: Pao González, Caro González, Sofia Moya, Cris Salgado, Vivi Jaramillo, Bernardo Gutiérrez, Juan José Guadalupe y Vero Yumiceba.

Resumen

La quinoa es un cultivo originario de la región andina, altamente apreciado por su valor agronómico y nutricional. La quinoa es una importante fuente de saponinas: un grupo de metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal a los cuales se les atribuye una amplia gama de actividades biológicas, lo que las ha convertido en compuestos importantes desde el punto de vista comercial gracias a sus potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.

El presente estudio tuvo como objetivo realizar un análisis de expresión genética diferencial en seis ecotipos de quinoa mediante la técnica de cDNA-AFLP (*one gene – one tag*) para identificar genes asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas cuya expresión es elicitada por el metiljasmonato (MeJA). En total, diez combinaciones de primers fueron empleadas en las reacciones de amplificación selectiva, cuyos productos fueron visualizados y analizados en geles de acrilamida teñidos con nitrato de plata. Ciento ochenta bandas mostraron expresión diferencial entre plantas control y plantas tratadas con metiljasmonato: ciento cuarenta y tres mostraron sobreexpresión y treinta y siete mostraron subexpresión a causa del tratamiento con metiljasmonato (MeJA). Veinticinco bandas que mostraron sobreexpresión fueron secuenciadas, lo cual permitió identificar veinte genes asociados principalmente a procesos metabólicos, transducción de señales, regulación de la transcripción y mecanismos de defensa y respuesta a estrés en plantas. Finalmente, se pudo identificar genes potencialmente asociados a la síntesis de saponinas triterpénicas, principalmente enzimas implicadas en las reacciones tardías de la ruta metabólica, tal es el caso de las enzimas monooxigenasas del citocromo P450 (CYP), aciltransferasas (AT) y metiltransferasas (MT).

El aislamiento y clonación de los genes descubiertos en este estudio, así como la aplicación de técnicas de ingeniería genética, permitirán a largo plazo garantizar la producción sustentable de saponinas triterpénicas naturales y obtener saponinas novedosas mediante procesos de biosíntesis combinatoria.

Abstract

Quinoa is an Andean crop highly appreciated because of its agronomic benefits and nutritional value. Quinoa is an important source of saponins: a class of secondary metabolites widely spread in the plant kingdom, that display a wide range of biological activities; for that reason saponins have become commercially important compounds with multiple applications in pharmaceutical, food and cosmetics industries.

Thus, the aim of this study was to carry out a differential gene expression analysis in six ecotypes of quinoa by performing a cDNA-AFLP (*one gene – one tag*) procedure to identify methyl jasmonate (MeJA) – responsive genes involved in triterpene saponins biosynthesis. In total, ten different primer combinations were used for selective amplification reactions. PCR products were visualized and analyzed in silver-stained acrylamide gels. One hundred and eighty differentially expressed bands between control and MeJA-treated plants were identified, including one hundred and forty three MeJA up-regulated and thirty seven MeJA down-regulated bands. Sequencing of twenty five up-regulated fragments allowed the identification of twenty genes implicated in metabolic processes, signal transduction, defense, and stress response mechanisms in plants. Finally, it was possible to identify genes encoding candidate triterpene saponins enzymes, for instance: P450-monooxygenases (CYP), acyltransferases (AT) and methyltransferases (MT).

Isolation and cloning of the genes discovered in this study and the performance of genetic engineering techniques will have a long term impact by ensuring sustainable production of natural triterpene saponins and allowing the creation of novel saponins through processes of combinatorial biosynthesis.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción	1
1.1. Quinoa (<i>Chenopodium quinoa</i> W.)	1
1.1.1. Producción local y mercados internacionales.....	2
1.1.2. Valor agronómico.....	3
1.1.3. Valor nutricional y potencial industrial de la quinoa.....	4
1.2. Saponinas.....	5
1.2.1. Clasificación y función de las saponinas en la planta	6
1.2.2. Aplicaciones de las saponinas en la industria.....	8
1.2.3. Biosíntesis de saponinas triterpénicas.....	9
1.3. Elicitores en plantas.....	11
1.3.1. Jasmonatos	12
1.3.2. Ácido jasmónico y metiljasmonato.....	13
1.3.3. Jasmonatos como elicitores para la síntesis de saponinas	14
1.4. Análisis de expresión genética.....	15
1.4.1. Despliegue diferencial.....	17
1.4.2. cDNA-AFLP	18
1.4.2.1. cDNA-AFLP “one gene – one tag”	20
2. Objetivo General	23
3. Objetivos Específicos	23
4. Área de Estudio	24
5. Justificación	25
6. Materiales	28
6.1. Recepción del material vegetal	28
6.2. Siembra de semillas.....	28
6.3. Riego y aporte de nutrientes a las plantas.....	28
6.4. Aplicación de tratamiento con ácido jasmónico.....	28
6.5. Colecta de hojas	29
6.6. Extracción de ARN	29
6.7. Cuantificación y Electroforesis en Agarosa.....	30
6.8. cDNA-AFLP	30
6.8.1. Síntesis y purificación de cDNA	30
6.8.2. Corte con enzimas de restricción <i>Bst</i> YI y <i>Mse</i> I y Ligación de Adaptadores.....	31
6.8.3. Pre-amplificación y Electroforesis en Gel de Agarosa	32

6.8.4.	Amplificación Selectiva	33
6.9.	Electroforesis en gel de Acrilamida.....	33
6.10.	Tinción con Nitrato de Plata	34
6.11.	Aislamiento y Re-amplificación de bandas diferenciales	35
7.	Métodos	36
7.1.	Siembra de semillas.....	36
7.2.	Riego y aporte de nutrientes.....	37
7.3.	Aplicación de tratamiento con metiljasmonato	37
7.4.	Colecta de hojas de plantas control y plantas tratadas con metiljasmonato.....	38
7.5.	Extracción y cuantificación de ARN	39
7.6.	Síntesis y purificación de cDNA	41
7.7.	Digestión del cDNA con enzimas y ligación de adaptadores	41
7.8.	Pre-amplificación	42
7.9.	Amplificación selectiva	43
7.10.	Electroforesis en gel de acrilamida.....	44
7.11.	Tinción con nitrato de plata	45
7.12.	Extracción de bandas y Re-amplificación.....	46
7.13.	Preparación de muestras y secuenciación	46
7.14.	Análisis de resultados	47
8.	Resultados	48
8.1.	Germinación de semillas y colecta de hojas	48
8.2.	Extracción y cuantificación de ARN.....	49
8.3.	cDNA-AFLP <i>one gene – one tag</i>	49
8.4.	Amplificación selectiva y electroforesis en gel de acrilamida.....	50
8.5.	Re-amplificación de bandas diferenciales y selección de muestras para secuenciación ...	54
8.6.	Secuenciación.....	55
9.	Discusión.....	58
9.1.	Germinación de semillas.....	58
9.2.	Tratamiento con metiljasmonato	58
9.3.	cDNA-AFLP <i>one gene – one tag</i>	60
9.4.	Análisis de expresión diferencial y selección de bandas	61

9.5.	Secuenciación y análisis de resultados	64
10.	Conclusiones	74
11.	Recomendaciones	75
12.	Bibliografía	76
13.	Tablas	85
14.	Figuras	91
15.	Anexos	104

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Ecotipos de Quinoa analizados mediante cDNA-AFLP.....	85
Tabla 2. Adaptadores empleados en el cDNA-AFLP <i>one gene – one tag</i>	85
Tabla 3. Secuencia de Primers empleados en la Pre-amplificación.....	85
Tabla 4. Secuencia de Primers empleados en las reacciones de Amplificación Selectiva.....	86
Tabla 5. Cuantificación de ARN extraído para 30 muestras empleadas en la técnica cDNA-AFLP <i>one gene – one tag</i>	86
Tabla 6. Total de bandas diferenciales extraídas de geles de acrilamida por cada ecotipo.....	87
Tabla 7. Bandas diferenciales que se sobre expresaron como resultado de la aplicación de metiljasmonato y que fueron seleccionadas para el análisis de secuenciación.....	88
Tabla 8. Homologías encontradas para las bandas diferenciales en la base de datos del GenBank (NCBI) y cDNA (TAIR) mediante las herramientas BLASTn y BLAST cDNA ref/seq respectivamente	89
Tabla 9. Función asociada a los 20 genes descubiertos	90
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la extracción de ARN total. Las dos bandas de mayor intensidad corresponden a las subunidades 28S y 18S de ARN ribosomal. Las bandas de menor intensidad representan el ARN mensajero. Los pocillos 1, 4, 6, 9, 12 y 14 corresponden al ARN extraído de muestras colectadas de plantas de quinoa sin aplicación de tratamientos. Los pocillos 2, 5, 7, 10, 13 y 15 corresponden al ARN extraído de muestras colectadas de plantas de quinoa luego de 8 horas de aplicar el tratamiento con metiljasmonato. Los pocillos 3, 8, 11 y 16 corresponden al ARN extraído de muestras colectadas de plantas de quinoa luego de 24 horas de aplicar el tratamiento con metiljasmonato.	91
Figura 2. Porcentajes de Germinación de Semillas de Quinoa en los 6 ecotipos analizados.	91
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la retrotranscripción en las 30 muestras de quinoa empleadas en el cDNA-AFLP. Ladder 100bp (Axygen). Los códigos corresponden a las muestras listadas en la Tabla 5. Un barrido en el rango de 100 a 1000pb es indicativo de una síntesis de cDNA exitosa. Para cada ecotipo se procesó 5 muestras en los tiempos T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato).	92
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la pre-amplificación en las 30 muestras de quinoa analizadas empleando la combinación de primers <i>BstYI</i> + <i>T</i> y <i>MseI</i> . Ladder 100bp (Axygen). Los códigos corresponden a las muestras listadas en la Tabla 5. Se evidenció amplificación en todas las muestras, pues se observa un barrido sustancial entre 50 y 500 pares de bases. Para cada ecotipo se procesó 5 muestras en los tiempos T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato).	92
Figura 5. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers <i>BstYI</i> + <i>T2/MseI</i> 42. Ladder 10bp (Invitrogen). La	

flecha roja indica la banda diferencial extraída de este gel que posteriormente fue secuenciada. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.93

Figura 6. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 12. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.94

Figura 7. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 21. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.95

Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 22. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.96

Figura 9. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 31. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.97

Figura 10. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 44. Ladder 10bp (Invitrogen). No se secuenció bandas extraídas de este gel. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato).98

Figura 11. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 11. Ladder 10bp (Invitrogen). La flecha roja indica la banda diferencial extraída de este gel que posteriormente fue secuenciada. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con

- metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.99
- Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 33. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda. 100
- Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 34. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda. 101
- Figura 14. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 41. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda. 102
- Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la re-amplificación de las 180 bandas diferenciales aisladas. En la mayoría de casos se observa una sola banda, lo cual es indicativo de una re-amplificación exitosa. Los números que se observan en los geles corresponden a los códigos designados a cada banda diferencial aislada. Se observa la re-amplificación de las 180 bandas extraídas en total a partir de los 10 geles de acrilamida. 103
- Anexo 1. Diagrama de la técnica cDNA-AFLP one gene – one tag. Imagen tomada de Vuylsteke et al, 2007. 104
- Anexo 2. Composición de la Solución Nutricional Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) 105
- Anexo 3. Aplicación de tratamiento con metiljasmonato en invernaderos caseros construidos para plantas de Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.)..... 105
- Anexo 4. Programas de PCR empleados en la reacción de pre-amplificación y amplificación selectiva 106

1. Introducción

1.1. Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.)

Chenopodium quinoa Willd. fue descrita por primera vez por Willdenow en 1778, como una especie nativa de Sudamérica (FAO, 2011). La quinoa es una especie alotetraploide perteneciente a la división Magonoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Caryophyllales, familia Chenopodiaceae, género *Chenopodium*, sección Chenopodia y subsección Cellulata (Cronquist, 1995; Wilson, 1980; Stevens, *et al*, 2006). El género *Chenopodium* está ampliamente distribuido en el mundo y es el principal dentro de la familia Chenopodiaceae con aproximadamente 250 especies (FAO, 2011).

Se trata de una planta dicotiledónea y herbácea anual que puede llegar a medir de 0,2 a 3 metros de altura y su inflorescencia puede presentar colores diversos desde verde a morado. El tallo suele ser ramificado y sus hojas pueden presentar coloración amarilla, verde o violeta según la variedad. Asimismo, las hojas pueden presentar diferentes formas en una misma planta; las basales suelen ser grandes y romboidales; mientras que las superiores son lanceoladas. Ambos tipos de hojas poseen unos gránulos con apariencia de arena en su superficie. Estos gránulos están formados por células ricas en oxalato de calcio y son capaces de retener agua, incrementando la humedad relativa alrededor de la hoja y disminuyendo de manera notable la transpiración (FAO, 2011). La inflorescencia es racimosa y se denomina panoja. Sus flores pueden ser hermafroditas, pistiladas o androestériles y son de tamaño pequeño; al igual que el grano, que mide aproximadamente 2,6 mm (Peralta, 1985; Heisser y Nelson, 1974). La quinoa es una especie originaria de la región andina y ha sido cultivada en Sudamérica, principalmente en Ecuador, Chile, Perú y

Bolivia, por más de 7000 años (Mujica y Jacobsen, 2006). La quinoa posee un centro de origen de amplia distribución; sin embargo, se considera que las orillas del Lago Titicaca constituyen la zona de mayor diversidad y variación genética de este cultivo (Mujica, 1992).

1.1.1. Producción local y mercados internacionales

En Ecuador, la quinoa es cultivada principalmente en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar y Cañar (Villacrés, *et al*, 2011). La época de siembra varía dependiendo de la zona: en el norte ocurre durante los meses de junio o julio, mientras que en el centro y sur comprende los meses de octubre y noviembre (Peralta, 2011). En nuestro país se conservan 642 accesiones de quinoa en el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) para fines de conservación e investigación científica (FAO, 2011).

Hasta el año 2009, la producción de quinoa en la región andina fue aproximadamente 70.000 toneladas, de las cuales, 40.000 t fueron producidas por Perú, 28.000 t por Bolivia y 746 t por Ecuador (FAO, 2011). En nuestro país, la quinoa, junto con el amaranto y el chocho, conforman el grupo de los “Granos Andinos Subutilizados” según reporta el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP) (Villacrés, *et al*, 2011). A nivel local, el consumo de quinoa se ve limitado en gran parte debido al desconocimiento de sus cualidades nutritivas por parte del consumidor. En cuanto a la producción nacional de quinoa, ésta se destina principalmente a la preparación de harinas, fideos y papillas; mientras que la quinoa importada se enfunda en

presentaciones perladas. De igual manera, en los últimos años, se ha incorporado a la quinoa en los programas de alimentación, “Aliméntate Ecuador” y “Desayuno Escolar”, que promueve el Gobierno Nacional (Peralta, 2011; Villacrés, *et al*, 2011).

La quinoa, como producto de exportación, ha ganado espacio en mercados comerciales importantes tales como: Estados Unidos, Reino Unido, Francia, Alemania, España, Dinamarca, Holanda, Canadá, Japón, Israel y Brasil (Villacrés, *et al*, 2011; Mujica & Jacobsen, 2006; FAO, 2011).

1.1.2. Valor agronómico

El interés en el cultivo de quinoa está centrado en dos factores fundamentales: en primer lugar, la adaptación de dicho cultivo a situaciones ambientales hostiles; y en segundo lugar, el excepcional valor nutricional de su grano (Stevens, *et al*, 2006).

La quinoa es una especie de gran interés agrícola, no sólo por su bajo costo de producción y su amplia variabilidad genética, sino también porque se trata de un cultivo capaz de resistir condiciones ambientales adversas que pueden presentarse en su entorno andino, por ejemplo: salinidad y alcalinidad de los suelos ($\text{pH} > 8.0$), estrés hídrico y heladas (Jacobsen, *et al*, 2003; Stevens *et al*, 2006; FAO, 2011). Dicha resistencia ha permitido que la quinoa tenga a su disposición una amplia área para cultivo. No obstante, las principales limitaciones para su producción en la región radican en la escasa disponibilidad de semillas de buena calidad y en la susceptibilidad de este cultivo a plagas como el mildiu (*Peronospora farinosa*) y la polilla de la quinoa (*Eurysacca quinoae*) (Mazón, *et al*, 2009, Mujica, *et al*, 2001, Danielsen, *et al*, 2003). A causa de las limitaciones mencionadas, gran parte de la investigación científica en torno a la quinoa se ha centrado en el mejoramiento

genético de esta especie con el fin de obtener variedades con mayor rendimiento, resistencia a plagas y grano de mayor tamaño (Mazón, *et al*, 2009).

1.1.3. Valor nutricional y potencial industrial de la quinoa

Desde el punto de vista nutricional, la quinoa es considerada como “el alimento más completo para la nutrición humana basada en proteínas de la mejor calidad en el reino vegetal” (Mujica y Jacobsen, 2006). Su valor especial no radica únicamente en la cantidad de nutrientes que posee, sino también en la calidad de los mismos. El grano de quinoa contiene un elevado porcentaje proteico (13,81% - 21,9%) y un balance ideal de aminoácidos esenciales muy cercano a los estándares de nutrición humana establecidos por la FAO. Además, posee niveles equilibrados de vitaminas (A, B2, E) y minerales (hierro, calcio, zinc). El grano de quinoa es libre de gluten y presenta un alto contenido de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 que contribuyen a la disminución del colesterol LDL (colesterol malo) del organismo (Repo-Carrasco, *et al*, 2006; Mujica y Jacobsen, 2006; FAO, 2011; Jacobsen, 2003).

En el campo de la medicina, a la quinoa se le ha atribuido históricamente propiedades cicatrizantes, analgésicas y desinfectantes (Mujica y Jacobsen, 2011). De igual manera, se ha demostrado que la quinoa posee dos fitoestrógenos: la daidzeína y genisteína que contribuyen a prevenir la osteoporosis (FAO, 2011). Un 6% del peso total del grano de quinoa corresponde a fibra dietaria, lo cual facilita la ingesta de este alimento y, al mismo tiempo, estimula el desarrollo de flora bacteriana benéfica y ayuda a prevenir el cáncer de colon (FAO, 2011). No en vano, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) reconoce a este cultivo como parte de los “Sistemas

Importantes de Patrimonio de la Agricultura Mundial” y la Organización Mundial de la Salud (OMS) recientemente lo ha declarado como “Grano del Futuro” debido a sus atributos nutraceuticos (Canahua, 2012). Asimismo, la Asamblea General de las Naciones Unidas ha declarado que el año 2013 será el “Año de la Quinoa”, como un reconocimiento a los pueblos andinos y también a las cualidades que hacen de la quinoa un alimento imprescindible para la dieta humana (FAO, 2012).

Gracias a sus peculiares propiedades, este alimento ya no es de uso exclusivamente tradicional, como por ejemplo en comidas o bebidas; sino que hoy en día, como resultado de varias investigaciones, existen en el mercado productos innovadores de uso alimenticio, cosmético y farmacéutico generados a partir de materias primas como la quinoa (FAO, 2011).

1.2. Saponinas

Varias investigaciones han determinado que las sustancias nutritivas que posee la quinoa no se encuentran del todo disponibles para quien la consume. Esto, debido a la existencia de moléculas que interfieren en el uso biológico de los nutrientes mencionados anteriormente (FAO, 2011). Dichas moléculas se denominan saponinas y constituyen un importante grupo de metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en el reino vegetal; aunque también se ha reportado su presencia en organismos marinos como las estrellas y los pepinos de mar (Lambert, *et al*, 2011; Mazza y Güçlü-Üstündağ, 2007). En la quinoa y otras plantas comestibles como la espinaca, alfalfa, soya y espárrago, las saponinas representan un importante factor antinutricional (Villacrés, *et al*, 2011; Repo-Carrasco, *et al*, 2006). Varios autores manifiestan que estas moléculas pueden causar hemólisis de los

eritrocitos y resultan muy tóxicas para peces y anfibios ya que poseen la capacidad de bajar la tensión superficial. En *Chenopodium quinoa* W. se ha reportado la presencia de saponinas en hojas, flores y semillas (Kuljanabhagavad y Wink, 2009). Ventajosamente, en el grano de quinoa, las saponinas se localizan en el pericarpio por lo que resulta sencillo eliminarlas mediante un proceso de lavado con agua. Cuando se realiza el lavado del grano se puede observar la formación de espuma en el agua también a causa de dichas moléculas (Koziol, 1993; Lambert, *et al*, 2011). A parte de estas propiedades, las saponinas son poderosos agentes surfactantes y le otorgan un sabor amargo característico a la quinoa (Repo-Carrasco, *et al*, 2006). El contenido de saponinas en el grano puede variar entre 0.1 y 5%; de hecho, el contenido de saponinas es un criterio importante en base al cual se puede clasificar a una variedad de quinoa como “amarga” o “dulce”. Se considera que una variedad de quinoa es amarga cuando el contenido de saponinas es superior a 0,11% (peso fresco); por el contrario, una variedad es dulce cuando el contenido de saponinas es inferior a dicho porcentaje (Villacrés, *et al*, 2011; Repo-Carrasco, *et al*, 2006; Koziol, 1993). En este sentido, es importante destacar que en el Ecuador, la investigación en torno a este cultivo ha incrementado en los últimos años. En la Estación Experimental Santa Catalina – INIAP, mediante selección de accesiones del banco de germoplasma, se ha logrado identificar líneas de quinoa con alto rendimiento, buenas características de precocidad y bajo contenido de saponinas (Mazón, *et al*, 2009).

1.2.1. Clasificación y función de las saponinas en la planta

El grupo de las saponinas está conformado por esteroides (C₂₇) y triterpenos glicosilados (C₃₀). Ambos grupos son muy diversos, por lo que no resulta extraño encontrar múltiples saponinas distintas en una misma planta (Osbourn, *et al*, 2003; Lambert, *et al*,

2011; Raju y Mehta, 2009). Las saponinas esteroidales son moléculas tetracíclicas que ocurren comúnmente en el grupo de las Monocotiledóneas (*Agavaceae*, *Dioscoreaceae* and *Liliaceae*). Mientras tanto, las saponinas triterpénicas son moléculas pentacíclicas que frecuentemente se encuentran entre las plantas Dicotiledóneas (*Leguminosae*, *Araliaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*) (Mazza y Güçlü-Üstündağ, 2007). En la quinoa predominan las saponinas triterpénicas pentacíclicas, cuya diversidad de estructuras químicas es muy grande. Cerca de 30 diferentes tipos de saponinas triterpénicas se describieron en la quinoa hasta el año 2009 (Kuljanabhagavad y Wink, 2009). Actualmente varias investigaciones están orientadas al análisis, descubrimiento y aislamiento de saponinas novedosas en éste y otros cultivos, gracias al desarrollo de técnicas de análisis molecular y químico como el cDNA-AFLP, espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta eficiencia (Kuljanabhagavad y Wink, 2009).

Al igual que otros metabolitos secundarios, las saponinas no se encuentran en altas concentraciones y tampoco están involucradas directamente en el crecimiento y desarrollo de una planta; de hecho, su producción y acumulación frecuentemente son resultado de estímulos o cambios ambientales (Yendo, *et al*, 2010). En las plantas, las saponinas desempeñan actividades alelopáticas, antimicrobianas y anti-insectos, por lo que se encuentran asociadas directamente con sus mecanismos de defensa. La literatura consultada cataloga a las saponinas como moléculas “fitoprotectoras” por el rol que desempeñan en la resistencia al ataque de patógenos, así como en la supervivencia de las plantas a condiciones de estrés abiótico (Yendo, *et al*, 2010; Lambert, *et al*, 2011).

No obstante, la presencia de estas moléculas en plantas comestibles puede resultar perjudicial. Por una parte, las saponinas presentan toxicidad para el ser humano y otros

animales que las ingieren. Por otro lado, las saponinas constituyen un factor negativo para la palatabilidad de los alimentos que las contienen (Suzuki, *et al*, 2002; Lambert, *et al*, 2011).

1.2.2. Aplicaciones de las saponinas en la industria

No se puede dejar de mencionar la amplia gama de propiedades físico-químicas y actividades biológicas que se les atribuye a las saponinas; las cuales convierten a estas moléculas en un “target” desde el punto de vista industrial. Las saponinas son particularmente apreciadas en la industria alimentaria, agroquímica, cosmética y farmacéutica (Mazza y Güçlü-Üstündağ, 2007).

En la industria de los alimentos y bebidas, las saponinas pueden servir como agentes espumantes, emulsificantes y antimicrobianos; así como para la remoción de colesterol en productos lácteos (Mazza y Güçlü-Üstündağ, 2007). De igual manera, en la industria cosmética, las saponinas se emplean como surfactantes naturales en productos de cuidado personal tales como: geles, shampoo, acondicionadores, jabón de baño, lociones, crema dental, entre otros (Mazza y Güçlü-Üstündağ, 2007).

Para ciertos organismos, especialmente insectos, las saponinas resultan tóxicas. Por tal razón se ha evaluado sus capacidades como insecticidas naturales y se ha promovido su uso en programas de control de plagas (FAO, 2011). Por otra parte, las aplicaciones de las saponinas en la industria farmacéutica implican su uso como materia prima en la producción de: hormonas (síntesis de progesterona a partir de diosgenina), inmunoadyuvantes (saponina del Quillay) y fármacos (antibióticos y antifúngicos). De igual forma, pueden constituir ingredientes activos en productos de salud, como por

ejemplo extractos herbales (Mazza y Güçlü-Üstündağ, 2007; Rajput, *et al*, 2007; FAO, 2011). Hay varias investigaciones en el campo farmacéutico, cuyo objetivo primordial es sacar provecho de la inmensa variedad de actividades biológicas que se relacionan a las saponinas, como son: analgésicas, antialérgicas, antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antiparasitarias, antiespasmódicas, antivirales, diuréticas, expectorantes, hepatoprotectoras, hipocolesterolemicas, neuroprotectoras, antitumorales, anticancerígenas, anti-leishmaniasis, entre otras (Mazza y Güçlü-Üstündağ, 2007; Raju y Mehta, 2009; Yendo, *et al*, 2010; Meesapyodsuk, *et al*, 2007; Wink, *et al*, 2012).

1.2.3. Biosíntesis de saponinas triterpénicas

Los triterpenos glicosilados son un grupo de saponinas, también conocidas con el nombre de saponinas triterpénicas. Respecto a la biosíntesis de las saponinas en general, es muy poco lo que se conoce; en parte debido a la complejidad de estas moléculas, así como por la falta de estudios que permitan dilucidar por completo su vía metabólica. No obstante, el conocimiento a nivel molecular en torno a la biosíntesis de estos compuestos ha crecido recientemente gracias a la identificación de enzimas que actúan en dicho proceso. Exceptuando el descubrimiento de ciertos genes que codifican para enzimas tempranas como oxidasas y glicosiltransferasas, la ruta metabólica que conduce a la síntesis de estas moléculas aún no ha sido dilucidada por completo (Osborn, *et al*, 2003; Yendo, *et al*, 2010).

De manera general se sabe que la estructura de las saponinas triterpénicas deriva de un compuesto precursor llamado óxido escualeno (Yendo, *et al*, 2010). La formación de este precursor depende de 2 rutas metabólicas: la ruta del mevalonato y la ruta del metil-

eritritol que permiten la formación del isopentenil-difosfato (IPP) y su isómero dimetil-alil-difosfato (DMAPP) respectivamente. Tanto el IPP, como el DMAPP, son los precursores para la síntesis de los terpenos. La reacción de condensación entre ambos compuestos da origen al geranil difosfato (GPP). A continuación, una molécula de isopentenil-difosfato se une a la recién formada molécula de geranil difosfato para generar un nuevo compuesto llamado farnesil difosfato (FPP). Finalmente la condensación de dos moléculas de farnesil difosfato (FPP) da lugar al escualeno, compuesto precursor tanto de las saponinas esteroideas como de las saponinas triterpénicas (Lambert, *et al*, 2011).

Posteriormente, el escualeno atraviesa una fase de oxidación para dar lugar al precursor inmediato de las saponinas triterpénicas: el óxido escualeno. La formación del óxido escualeno es el punto de partida para que ocurra una serie de reacciones de ciclación. El tipo de enzima ciclasa que catalice dichas reacciones determinará el tipo de saponina triterpénica a formarse. Hasta el momento se han documentado algunos tipos de enzimas ciclasas y sus mecanismos han sido bien descritos. Dentro de este grupo de ciclasas, se destacan las siguientes: dammarenediol sintasa (DDS) que da origen al dammarano; la β -amirin sintasa (β AS) que da origen al oleanano; y por último la sintasa α -amirina (α AS) que permite la síntesis de ursano (Lambert, *et al*, 2011). El proceso no concluye con las reacciones de ciclación; más adelante en la ruta metabólica, los compuestos sintetizados pueden sufrir aún más modificaciones a través de reacciones de oxidación, glicosilación y otras sustituciones químicas. Esto explica la gran diversidad de moléculas que posee este grupo de saponinas. Por ejemplo, en *Medicago truncatula* el compuesto oleanano, que se produce como resultado de las reacciones de ciclación, posteriormente atraviesa reacciones de oxidación que dan lugar a por lo menos 10 nuevas sapogeninas (Pollier, *et al*, 2011). Se

sabe con certeza que las enzimas de tipo glicosiltransferasas, metiltransferasas, aciltransferasas y monooxigenasas dependientes del citocromo P450 están implicadas en estas reacciones tardías de la ruta metabólica. Esta última etapa de la ruta de biosíntesis sigue siendo la menos estudiada, y es muy poco lo que se conoce sobre otras enzimas involucradas en estas reacciones químicas, razón por la cual resulta necesario realizar más investigaciones en torno a este tema (Hadacek, 2002; Lambert, *et al*, 2011). En la actualidad se sabe que la síntesis de saponinas en una planta puede ocurrir tanto de forma constitutiva, así como por causa de estímulos externos. Por tal razón, la siguiente sección aborda el tema de los inductores vegetales.

1.3. Elicitores en plantas

De manera general el término elicitor hace referencia a cualquier factor físico o químico, biótico o abiótico, que provoca una respuesta morfológica o fisiológica en organismos vivos. En las plantas, dicha respuesta se activa a través de mecanismos de transducción de señales que en última instancia promueven la acumulación de metabolitos secundarios (Lambert, *et al*, 2011). En primera instancia, el elicitor es reconocido por receptores de la membrana celular. A continuación ocurre la formación de moléculas mensajeras como los jasmonatos, el etileno y/o el ácido salicílico, que a su vez suprimen o inducen la expresión de ciertos genes asociados con la biosíntesis de metabolitos secundarios (Lambert, *et al*, 2011; Yendo, *et al*, 2010). En la actualidad el uso de elicitores es extendido y es considerado como una gran herramienta para incrementar la producción de alcaloides, terpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos y fitoalexinas en plantas (Babar Ali, *et al*, 2006). Dentro de los elicitores de tipo abiótico se encuentran los iones metálicos y compuestos inorgánicos. Mientras tanto, los jasmonatos, el ácido salicílico y

los extractos de levadura son empleados frecuentemente como elicitores bióticos para la producción de metabolitos secundarios en plantas (Lambert, *et al*, 2011; Yendo, *et al*, 2010).

1.3.1. Jasmonatos

Los jasmonatos constituyen un importante grupo de fitohormonas, ampliamente distribuidas en el reino vegetal. El ácido jasmónico (JA), el metiljasmonato (MeJA), el ácido 12-oxofitodienoico (12-OPDA), así como el ácido jasmónico conjugado con los aminoácidos leucina o isoleucina, conforman el grupo de los jasmonatos. Estos compuestos son reguladores endógenos involucrados en procesos fisiológicos, metabólicos y reproductivos de vital importancia en las plantas (Avanci, *et al*, 2010; Rohwer y Erwin, 2008). Dentro de esta familia de fitohormonas, el ácido jasmónico y el metiljasmonato son los compuestos más estudiados y mejor caracterizados. Es importante mencionar otros jasmonatos que también presentan actividades biológicas, como es el caso del ácido tuberónico, el ácido dihidrojasmónico o el ácido cucúrbico (Rohwer y Erwin, 2008).

Los jasmonatos son moléculas lipídicas derivadas del metabolismo del ácido α – linolénico, el cual proviene de las membranas lipídicas y se localiza en el interior de los cloroplastos. En el interior de estos organelos se desarrollan varias reacciones químicas catalizadas por enzimas que permitirán la formación del precursor inmediato del ácido jasmónico. En el primer paso de la síntesis de los jasmonatos una enzima lipooxigenasa cataliza la incorporación de una molécula de oxígeno al ácido α – linolénico para la formación del ácido 13-hidroperoxi- 9,11,15– octadecatrienoico (13-HPOT). A continuación, esta molécula es oxidada en una reacción catalizada por la enzima aleno

óxido sintasa (AOS) dando lugar a un compuesto inestable, el cual gracias a la acción de una enzima aleno óxido ciclasa es convertido en ácido 12-oxofitodienoico (12-OPDA), precursor inmediato del ácido jasmónico. El último paso en la formación de los jasmonatos ocurre en los peroxisomas, donde el ácido 12-oxofitodienoico (12-OPDA) atraviesa por tres ciclos de beta oxidación hasta dar lugar al ácido jasmónico. Una vez formado, el ácido jasmónico puede sufrir diversas transformaciones químicas y metabólicas que dan origen a otros jasmonatos (Avanci, *et al*, 2010).

1.3.2. Ácido jasmónico y metiljasmonato

El ácido jasmónico fue aislado e identificado por primera vez en cultivos del hongo patógeno *Botryodiploidi theobromae*; mientras que su éster volátil, el metiljasmonato, fue aislado a partir de los aceites esenciales de *Jasminum grandiflorum*. Tanto el ácido jasmónico, como el metiljasmonato, se pueden considerar ubicuos en el reino vegetal pues han sido identificados en más de 160 géneros diferentes de plantas (Hadacek, 2002). Por su carácter volátil, el metiljasmonato fue apreciado inicialmente en la industria de los perfumes. Sin embargo, durante la década de 1980 creció el interés sobre éste y otros jasmonatos relacionados, ya que se publicaron los primeros estudios en torno a su actividad biológica y su importante rol en el desarrollo, crecimiento y defensa de las plantas (Avanci, *et al*, 2010). Dichas moléculas están involucradas en varios procesos fisiológicos y de desarrollo en la planta, tales como: crecimiento de raíces, producción de polen, senescencia de hojas, maduración de frutos, formación de pigmentos, e incluso, desempeñan un papel fundamental en la defensa de una planta frente al ataque de patógenos e insectos (Tae Kim, *et al*, 2009; Yendo, *et al*, 2010; Gaspar, *et al*, 1996; Buchanan, *et al*, 2000). Adicionalmente, varios estudios han demostrado que la aplicación exógena de

dichos jasmonatos también genera diversos efectos en el metabolismo de las plantas. Por ejemplo: se ha reportado la inducción de inhibidores de proteasas, regulación del metabolismo de fitoalexinas, así como el incremento en la síntesis de metabolitos secundarios (Singh, *et al*, 1998; Sathiyamoorthy, *et al*, 2010). Se sabe que una planta tratada de manera exógena con jasmonatos, percibe sus señales a través de proteínas receptoras, luego de lo cual se activa una cascada de transducción de señales que culmina con la activación o represión de genes. Un estudio realizado en el año 2007 por Pauwels y colaboradores en *Arabidopsis*, identificó varios genes que se activaron en respuesta a un tratamiento exógeno con metiljasmonato, varios de ellos asociados a la biosíntesis del ácido jasmónico y muchos otros relacionados a procesos de regulación transcripcional, principalmente factores de transcripción JAZ/TIFY, AP2/ERF, WRKY, MYB. Parte de esta reprogramación genética también incluye la activación de genes implicados en la biosíntesis de metabolitos secundarios; por tal razón, varias investigaciones recomiendan el uso de ácido jasmónico o metiljasmonato como potenciales elicitores en estudios orientados al descubrimiento de genes relacionados con estas rutas metabólicas (Kazan y Manners, 2008; Tae Kim, *et al*, 2009; Pauwels, *et al*, 2007). En la actualidad, el reto es valerse de estos elicitores en conjunto con técnicas de análisis transcripcional y metabólico para analizar estos procesos bioquímicos y potencialmente descubrir genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos importantes, caracterizar enzimas que intervienen en dichos procesos y finalmente aislar moléculas novedosas de gran interés industrial.

1.3.3. Jasmonatos como elicitores para la síntesis de saponinas

Como se mencionó previamente, la síntesis de saponinas en las plantas ocurre tanto de forma constitutiva, así como por acción de elicitores. En el caso específico de las

saponinas triterpénicas, los jasmonatos y el ácido salicílico (SA) son los elicitores más importantes y su uso está vastamente documentado (Lambert, *et al*, 2011). En *Panax ginseng*, *Medicago truncatula*, *Glycyrrhiza glabra*, *Quillaja brasiliensis*, *Nigella sativa* y otras especies de plantas se ha demostrado el incremento en la concentración de saponinas triterpénicas como resultado de la aplicación de tratamientos con metiljasmonato, en diferentes concentraciones y con distintos métodos de aplicación, tanto en cultivo celular como en plantas cultivadas (Choi, *et al*, 2005; Lambert, *et al*, 2011; Yendo, *et al*, 2010; Babar Ali, *et al*, 2006). Los tratamientos a base de metiljasmonato se los puede aplicar ya sea en solución o en spray. Cualquiera sea su forma de aplicación, el tratamiento se lo realiza en un ambiente cerrado por el carácter volátil de dicho compuesto (Rohwer y Erwin, 2008). No sólo se ha podido identificar un aumento en el contenido de saponinas triterpénicas a causa de la elicitación con jasmonatos, sino que varios estudios han logrado evidenciar el efecto regulador que éstos ejercen sobre la expresión de ciertos genes entre ellos se puede mencionar genes codificantes para factores de transcripción citados anteriormente y enzimas quinasas, fosfatasa y sintasa (Goossens, *et al*, 2003; Lambert, *et al*, 2011).

1.4. Análisis de expresión genética

Hace más de dos décadas ya se habían descrito las primeras metodologías orientadas al estudio de la expresión genética. Con el advenimiento de las técnicas de secuenciación de ADN, se hizo aún más necesario crear y perfeccionar técnicas no sólo para analizar la expresión de genes, sino también para definir su función en el organismo. De especial interés en esta área es el análisis de la expresión diferencial de genes, pues se trata de un hecho que ocurre de manera natural en los seres vivos y que también puede ser

inducido en los mismos por acción de factores bióticos o abióticos. Gracias al surgimiento de técnicas de análisis de expresión genética y otros avances relacionados a la transcriptómica, hoy es posible analizar los cambios en los patrones de expresión genética de cualquier organismo vivo en diferentes escenarios. Por ejemplo: los cambios en la expresión genética durante los diferentes estadios de desarrollo de un tejido, diferencias en la expresión de genes entre organismos sanos y enfermos ó entre organismos control y organismos expuestos a distintos tipos de estrés (Hu, *et al*, 2004).

Históricamente la expresión diferencial de genes era analizada de manera indirecta a través de metodologías como la comparación de perfiles proteicos o antigénicos de dos o más muestras experimentales. Posteriormente, mediante técnicas extremadamente laboriosas como la hibridación sustractiva (Sturtevant, 2000). Más adelante, en la década de los 80, tiene lugar un acontecimiento de suma importancia en la historia de la biología molecular: el descubrimiento y desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una de las más importantes aplicaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es en el campo de los marcadores genéticos, pues la gran mayoría de marcadores moleculares de uso actual se basan en esta técnica, tal es el caso de los marcadores RAPD, SSR y AFLP (Azofeifa, 2006). Además de ésta y otras aplicaciones, la técnica del PCR también ha permitido la creación de metodologías innovadoras para el análisis de expresión genética diferencial tales como el Despliegue Diferencial (DD), y más recientemente, la técnica de cDNA-AFLP (Moody, 2001).

1.4.1. Despliegue diferencial

La técnica del despliegue diferencial se desarrolló con el objetivo principal de superar las limitaciones de metodologías que inicialmente se empleaban en el análisis de expresión genética, principalmente en términos de laboriosidad y falta de sensibilidad. Con el fin de cumplir este objetivo, el despliegue diferencial integró tres de las más importantes técnicas de la biología molecular: la retrotranscripción del ARN, la electroforesis de ácidos nucleicos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Liang, 2002). El principio del despliegue diferencial fue descrito por Liang y Pardee en 1992, como una herramienta de gran utilidad para el análisis de la expresión genética diferencial y con un procedimiento más sencillo en comparación a técnicas predecesoras como la hibridación sustractiva (Hu, *et al*, 2004). El procedimiento inicia con la retrotranscripción del ARN mensajero (ARNm) de una muestra para formar ADN complementario de doble cadena (cDNA), para este paso se emplea un primer poliT que se empareja con la cola de poliA en el extremo 3' del ARN mensajero. A continuación, el cDNA sintetizado es amplificado por PCR empleando múltiples combinaciones de primers. En la técnica original, el primer *forward* es arbitrario mientras que el primer *reverse* es el mismo empleado para la retrotranscripción inicial. Luego, se realiza la electroforesis en gel de poliacrilamida con los productos de la reacción de PCR y un posterior revelado del gel para visualizar los resultados. Lo más común es realizar la tinción del gel con nitrato de plata. En comparación a otras técnicas de revelado, la tinción con plata es más sencilla, segura y menos costosa (Xiao, 2009). En este punto se debe analizar y comparar los patrones de bandas de las muestras en el gel. Se asume que las bandas de un mismo tamaño que están presentes en una muestra y están ausentes en otras, o que difieren en intensidad, representan transcriptos de expresión diferencial. El proceso

culmina con el aislamiento, re-amplificación y secuenciación de las bandas diferenciales extraídas del gel. Finalmente, la secuencia obtenida es analizada y comparada con la información disponible en bases de datos genómicas para encontrar homología con genes o secuencias de ADN reportadas en varias investigaciones alrededor del mundo (Moody, 2001).

El despliegue diferencial ha sido empleado con éxito en numerosas investigaciones gracias a las ventajas que presenta en comparación a técnicas anteriores, entre ellas: su simplicidad, reproducibilidad, la posibilidad que ofrece esta metodología para analizar múltiples muestras de manera simultánea y su utilidad para identificar tanto la activación como la supresión de genes entre las muestras analizadas. Sin embargo, el despliegue diferencial en su formato original no está libre de limitaciones, pues su principal desventaja radica en la gran cantidad de resultados falsos positivos que puede arrojar (Moody, 2001; Hu, *et al*, 2004). Desde la primera descripción de este procedimiento hace dos décadas, la técnica del despliegue diferencial ha sufrido modificaciones para adecuarse de la mejor manera a los requerimientos de la ciencia actual. Un claro ejemplo es el desarrollo de la técnica conocida como cDNA-AFLP (Complementary-DNA based Amplified Fragment Length Polymorphism), la cual emplea el principio general del despliegue diferencial y además incorpora algunas técnicas como el AFLP, con el fin de superar las limitaciones de técnicas convencionales de análisis de expresión genética mencionadas previamente.

1.4.2. cDNA-AFLP

El cDNA-AFLP es una técnica empleada para el análisis de cDNAs expresados diferencialmente y en los últimos años su popularidad en el campo de la transcriptómica ha

incrementado notablemente (Yu, *et al*, 2011; Ji, *et al*, 2011). Fue descrita por primera vez en el año de 1996, y desde entonces ha sido empleada exitosamente en estudios de fisiología y biología vegetal tales como: interacciones planta-patógeno, mecanismos de señalización hormonal, identificación de genes implicados en el metabolismo secundario de plantas y descubrimiento de genes regulados por distintos tipos de estrés abiótico (Xiao, 2009; Agarwal, *et al*, 2008; Yang, *et al*, 2012). Frente a otras técnicas de análisis de expresión genética como el despliegue diferencial, la hibridación sustractiva o los *microarrays*, la técnica de cDNA-AFLP presenta importantes ventajas. Entre las más importantes se puede mencionar su mayor reproducibilidad y sensibilidad, menor costo y facilidad de aplicación en todo tipo de organismos vivos. La aplicación de la técnica de cDNA-AFLP no se limita a organismos modelo, pues no se requiere un conocimiento previo sobre el genoma a analizar. No obstante, su principal limitación radica en la necesidad de incorporar procesos de purificación y secuenciación de ADN para lograr identificar los genes expresados diferencialmente (Xiao, 2009; Stölting, *et al*, 2009; Vuylsteke, *et al*, 2007).

La técnica de cDNA-AFLP inicia con la síntesis de cDNA mediante la retrotranscripción de ARNm extraído de una muestra experimental. A partir de este punto, el procedimiento a seguir es muy similar a un protocolo de AFLP convencional. En primer lugar, el cDNA sintetizado es digerido con dos enzimas de restricción distintas; una de corte raro y una de corte frecuente. A continuación, se lleva a cabo la ligación de adaptadores de secuencia conocida, en ambos extremos de los fragmentos generados por la digestión. Una vez ligados los adaptadores, se lleva a cabo una pre-amplificación de los fragmentos mediante PCR. Para este fin, se emplea *primers* cuya secuencia es

complementaria a la de los adaptadores ligados previamente más una base nitrogenada arbitraria adicional en el extremo 3'. De esta manera, sólo aquellos fragmentos que presenten absoluta complementariedad tanto en la secuencia del adaptador como en la base adicional serán amplificados. Posteriormente se realiza una segunda amplificación por PCR. En esta etapa se emplea *primers* similares a los de la pre-amplificación, la única diferencia es la incorporación de 2 bases arbitrarias adicionales. De igual forma, únicamente aquellos fragmentos pre-amplificados que presenten complementariedad para las bases arbitrarias adicionales serán amplificados. Gracias a esta etapa de amplificación selectiva, el número de fragmentos amplificados a partir del cDNA inicial (TDFs) se reduce para facilitar así su visualización y análisis. Finalmente, los productos de la amplificación pueden ser visualizados a través de una electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior revelado (de Vienne, 2003). La literatura consultada indica que se pueden obtener cientos de TDFs asociados a un rasgo de interés si se emplea la técnica de cDNA-AFLP convencional. Por tal razón, recientemente se han desarrollado protocolos con ciertas mejoras que permiten reducir aún más el número de fragmentos amplificados, evitando así la generación de múltiples TDFs derivados de un mismo gen (Stölting, *et al*, 2009; Wang, *et al*, 2009). Una de dichas modificaciones es la técnica denominada cDNA-AFLP *one gene – one tag*, que se describe a continuación.

1.4.2.1. cDNA-AFLP “*one gene – one tag*”

El protocolo de cDNA-AFLP “*one gene – one tag*”, descrito en 2007 por Vuylsteke y colaboradores, es una variante de la técnica convencional de cDNA-AFLP. La principal diferencia frente al protocolo original radica en la reducción del número de fragmentos (TDFs) generados a partir de cada transcrito. Esto es posible mediante el marcaje con

biotina de la molécula de cDNA en su extremo 3' antes de realizar las amplificaciones selectivas (Anexo 1).

El procedimiento inicia con la síntesis de cDNA a partir de una muestra experimental de ARN, para lo cual se emplea un primer poliT marcado con biotina que hibridará con la cola poliA del ARN mensajero. En consecuencia, se obtendrá un cDNA de doble hebra marcado con biotina en el extremo poliT. Luego, el recién sintetizado cDNA es digerido con la enzima de restricción *Bst*YI para generar varios fragmentos. Sin embargo, únicamente el fragmento terminal que está marcado con biotina será seleccionado. La selección de dicho fragmento (TDF) se realiza mediante el uso de microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina denominadas *Dynabeads*. En esta etapa del proceso, las microesferas magnéticas se mezclan con los fragmentos generados a partir de la primera digestión del cDNA. Por un principio de afinidad, únicamente el fragmento marcado con biotina se unirá a las esferas recubiertas con estreptavidina y los fragmentos restantes se descartan. La separación se la realiza en un campo magnético, por ejemplo, empleando un imán. A continuación, el fragmento seleccionado atraviesa por una segunda digestión con la enzima de restricción *Mse*I. Luego de dicha reacción, al fragmento se le añaden adaptadores en ambos extremos, y de allí en adelante el proceso es idéntico al cDNA-AFLP convencional descrito previamente (Vuylsteke, *et al*, 2007).

La variante cDNA-AFLP *one gene – one tag* ofrece las siguientes ventajas con respecto al protocolo original de cDNA-AFLP: de 1 a 2 TDFs son generados por cada transcrito, lo cual reduce el número total de fragmentos a ser analizados luego de la electroforesis aliviando así la carga de trabajo. Además, la cobertura del genoma puede

llegar a ser muy alta mientras más combinaciones de *primers* se empleen en las amplificaciones (Vuylsteke, *et al*, 2007).

A pesar de que esta técnica ha demostrado ser útil para el análisis transcriptómico en *Arabidopsis thaliana* y especies del género *Nicotiana*; hasta la actualidad ésta técnica no ha sido evaluada en ninguna especie del género *Chenopodium*. Por tal razón, el presente trabajo empleó la metodología descrita de cDNA-AFLP *one gene – one tag* para el análisis de expresión diferencial de genes asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas en 6 ecotipos de *Chenopodium quinoa* W provenientes del banco de germoplasma del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).

2. Objetivo General

Realizar un análisis de expresión genética diferencial en 6 ecotipos de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) mediante la técnica de cDNA-AFLP (*one gene – one tag*) para la identificación de genes asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas.

3. Objetivos Específicos

- Elicitar la producción de saponinas triterpénicas en 6 ecotipos de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.), 3 ecotipos de quinoa amarga y 3 ecotipos de quinoa dulce, por medio de la aplicación de un tratamiento con metiljasmonato (MeJA).
- Analizar y comparar, mediante la técnica de cDNA-AFLP (*one gene – one tag*), la expresión genética diferencial entre los 6 ecotipos de quinoa empleando 10 diferentes combinaciones de primers *BstYI/MseI*.
- Identificar y aislar, en geles de acrilamida, bandas con expresión diferencial entre plantas no tratadas (control) y plantas tratadas con metiljasmonato (MeJA) dentro de cada ecotipo; principalmente, bandas cuya presencia ocurre exclusivamente en las plantas tratadas con metiljasmonato, o bandas cuya intensidad es mayor en las plantas tratadas con respecto a las plantas control.
- Seleccionar 25 bandas diferenciales de interés para emplearlas en análisis de secuenciación; y posteriormente, comparar los resultados de la secuenciación con la información disponible en la base de datos BLAST del

NCBI y la base de datos TAIR de *Arabidopsis thaliana* para identificar potencialmente genes asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas.

- Determinar el mejor ecotipo de quinoa amarga y el mejor ecotipo de quinoa dulce, que presenten expresión diferencial marcada para en el futuro secuenciar por completo su genoma, como parte de un Convenio de Investigación entre la Universidad San Francisco de Quito y la Universidad Ghent de Bélgica.

4. Área de Estudio

Las semillas correspondientes a los 6 ecotipos de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.) analizados en el presente trabajo, provienen del banco de germoplasma del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) ubicado en la Estación Experimental Santa Catalina, cantón Mejía - Ecuador. La siembra de semillas se realizó en el invernadero del Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición de la Universidad San Francisco de Quito localizado en Cumbayá. La técnica de cDNA-AFLP se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales) y el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos (Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición), ambos con sede en la Universidad San Francisco de Quito, Cumbayá.

5. Justificación

Durante muchos años el ser humano se ha beneficiado de las plantas, ya sea directamente empleándolas como base de su alimentación, o bien aprovechando productos naturales derivados de las mismas con fines principalmente terapéuticos. A pesar de esto, aún es muy grande la demanda por encontrar nuevos compuestos con usos potenciales en la industria farmacéutica, pues continuamente surgen nuevas enfermedades y varios organismos patógenos desarrollan resistencia a los fármacos actualmente disponibles en el mercado. En este contexto, el desarrollo de nuevas tecnologías en las áreas de la genómica, transcriptómica y metabolómica ha sido de vital importancia para llevar a cabo investigaciones orientadas al descubrimiento de nuevos fármacos.

En el área de la metabolómica, el desarrollo de técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución y la espectrometría de masa (HPLC - MS), ha permitido el descubrimiento de un gran número de moléculas bioactivas en plantas, entre las cuales se encuentran varios alcaloides, terpenoides e isoflavonoides (Pollier, *et al*, 2011). Por su parte, los avances en el área de la biología molecular, tales como el desarrollo de las tecnologías de secuenciación de ADN y las herramientas para el análisis de expresión genética (cDNA-AFLP *one gene – one tag*), han sido indispensables para descubrir los genes responsables de la producción de dichas moléculas, así como para esclarecer su ruta metabólica de biosíntesis.

Un grupo sumamente importante de moléculas bioactivas en las plantas es el de las saponinas. Como se mencionó previamente, las saponinas constituyen una clase de metabolitos secundarios a los cuales se les atribuye una amplia gama de actividades

biológicas. En las plantas, se destacó el rol de las saponinas como agentes alelopáticos, anti-insectos y anti-fúngicos. Mientras tanto, desde el punto de vista industrial, las saponinas presentan propiedades surfactantes, emulsificantes, antimicrobianas, antioxidantes, inmunoadyuvantes, entre otras; lo cual las convierte en un blanco atractivo no sólo para la industria farmacéutica, sino también para las industrias agrícola, alimentaria e incluso cosmética (Pollier, *et al*, 2011).

A pesar del gran potencial que poseen estas moléculas, muy poco es lo que se conoce sobre su producción en la planta. Por este motivo, es necesario emprender investigaciones que permitan identificar los genes asociados a la síntesis de saponinas. En los últimos años, la investigación en torno a este tema se ha centrado en un grupo reducido de plantas. Sin embargo, existen cientos de especies aún por investigar, una de ellas es la quinoa (*Chenopodium quinoa* W.). El estudio de este cultivo resulta interesante por varias razones: no sólo por su alto contenido de saponinas; también por tratarse de un cultivo originario de nuestra región, por su excelente aporte nutricional a la dieta humana y por sus características genéticas que le otorgan resistencia a varios tipos de estrés abiótico. Paradójicamente, muy pocos estudios en el ámbito genético y molecular se han llevado a cabo en la quinoa. Entre ellos, la mayoría están relacionados al análisis de diversidad genética. No obstante, hasta la actualidad no se han reportado investigaciones orientadas al análisis de expresión genética diferencial y mucho menos enfocadas al descubrimiento de genes relacionados a la síntesis de saponinas en la quinoa mediante la técnica de cDNA-AFLP. El único estudio relacionado a cDNA-AFLP dentro del género *Chenopodium* fue reportado en 2001 por Bret Cooper; en el cual se identificó genes asociados a los mecanismos de respuesta a virus en *Chenopodium amaranticolor* (Cooper, 2001). Por

consiguiente, la presente investigación representa el primer análisis de expresión diferencial e identificación de genes en la especie *Chenopodium quinoa* W. y en el género *Chenopodium*, mediante la técnica del cDNA-AFLP (*one gene – one tag*), nunca antes desarrollada en el Ecuador por tratarse de una metodología novedosa y de alta demanda técnica.

El descubrimiento de reguladores transcripcionales o enzimas potencialmente asociados a la síntesis de saponinas permitiría posteriormente contar con una base genética robusta para llevar a cabo procesos de mejoramiento genético en plantas. Por una parte, permitiría estimular una mayor producción de saponinas en la quinoa y otras especies de plantas. Por otro lado, sería posible llevar a cabo procesos de “biosíntesis combinatoria” para obtener saponinas novedosas e incluso con propiedades biológicas superiores a las de las saponinas que naturalmente se aíslan de las plantas (Pollier, *et al*, 2011).

Finalmente, es importante recalcar que el potencial desconocido de genes, especies y ecosistemas del Ecuador es inestimable y ciertamente muy valioso (Estrella, *et al*, 2005). En este sentido, la estandarización de técnicas como el cDNA-AFLP (*one gene – one tag*), implicaría un gran aporte metodológico para el descubrimiento de genes importantes en bacterias, hongos, plantas y animales de nuestro país.

6. Materiales

6.1. Recepción del material vegetal

Las semillas de quinoa correspondientes a los 6 ecotipos analizados en este estudio fueron proporcionadas por el Banco de Germoplasma de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP (Tabla 1). Junto con el Acta de Entrega Recepción y el Acuerdo de Transferencia de Material firmado con el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, se recibió un sobre con semillas para cada uno de los siguientes ecotipos: ECU – 382 (Quinoa dulce), ECU – 524 (Quinoa dulce), ECU – 225 (Quinoa dulce), ECU – 323 (Quinoa amarga), ECU – 234 (Quinoa amarga) y ECU – 229 (Quinoa amarga).

6.2. Siembra de semillas

- Agua destilada
- Bandejas plásticas (58cm x 38cm x 8.5cm)
- Semillas de los 6 ecotipos de quinoa (*Chenopodium quinoa* W.)
- Sustrato Promix (Alaska S.A)
- Tierra autoclavada

6.3. Riego y aporte de nutrientes a las plantas

- Agua destilada
- Solución nutritiva Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950; Anexo 2)

6.4. Aplicación de tratamiento con ácido jasmónico

- Agua destilada

- Etanol al 70%
- Metiljasmonato 95% (Sigma Aldrich)

6.5. Colecta de hojas

- Bisturí estéril
- Mini Invernadero casero (Anexo 3)
- Nitrógeno líquido
- Papel aluminio
- Simplified Freezing System (WiseCryo)
- Termo metálico de acero inoxidable 500mL

6.6. Extracción de ARN

- Acetato de Sodio 3M (pH 5.2) (Laboratorios Químicos HVO)
- Agitador vórtex (Scientific Industries)
- Buffer de Extracción (0,35M Glicina, 0,048M NaOH, 0,34M NaCl, 0,04M EDTA, 4%SDS para 100mL)
- Cámara de Flujo Laminar (LABCONCO)
- Centrifuga refrigerada (Sigma)
- Cloroformo/Alcohol Isoamílico (24:1 v/v)
- Cloruro de Litio 8M
- DEPC treated water (Invitrogen)
- Etanol al 70%
- Etanol al 96%

- Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1 v/v)
- pH-metro (Mettler Toledo)
- Microtubos 1.5mL (Axygen)
- Microtubos 2.0mL (Axygen)
- Morteros y pistilos
- Muestras de hojas de quinoa colectadas
- Nitrógeno líquido
- Sorbona (LABCONCO)

6.7. Cuantificación y Electroforesis en Agarosa

- Agarosa 2% (Seakem)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Cámara de electroforesis Enduro GEL XL (Labnet)
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)
- Fuente de poder Scientific Co. EPS-300 II C.B.S
- Ladder 100bp (Axygen)
- NanoDrop Thermo Scientific 1000
- SYBR Safe (10000X, Invitrogen)
- TBE 1X

6.8. cDNA-AFLP

6.8.1. Síntesis y purificación de cDNA

- 10X Buffer Ligasa (Invitrogen)

- 5X buffer primera hebra (Invitrogen)
- ADN polimerasa I 10U/ μ l (Invitrogen)
- ARN extraído de hojas de quinoa
- Centrífuga 5415D (Eppendorf)
- DEPC treated water (Invitrogen)
- dNTP mix 10mM (Invitrogen)
- DTT (0.1M, Invitrogen)
- *Escherichia coli* ligasa 10U/ μ l (Invitrogen)
- Kit Purelink Quick Gel Extraction and PCR Purification (Invitrogen)
- Microtubos PCR 0.2mL (Axygen)
- NAD (10mM, Sigma Aldrich)
- Primer Oligo dT₂₅ 5' Label Biotin (Biolegio)
- Ribonucleasa H 2U/ μ l (Invitrogen)
- Superscript II 200U/ μ l (Invitrogen)
- Termociclador Multigene (Labnet)
- UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen)

6.8.2. Corte con enzimas de restricción *Bst*YI y *Mse*I y Ligación de Adaptadores

- Adaptador *Bst*YI (5 pmol/ μ l, Tabla 2)
- Adaptador *Mse*I (50 pmol/ μ l, Tabla 2)
- ATP (100mM, GE Healthcare)
- Buffer 10X RL (1M Tris-HAc, 1M MgAc, 4M KAc, 0.077g DTT, 50ng/ μ l BSA)
- Buffer 2X STEX (5M NaCl, 1M Tris-HCl, 0.5M EDTA, 2mL TritonX-100)

- Buffer T₁₀E_{0.1} (1M Tris-HCl, 0.5M EDTA)
- cDNA previamente sintetizado
- Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen)
- Enzima *Bst*YI (10U/μl, New England Biolabs)
- Enzima *Mse*I (10U/μl, New England Biolabs)
- Ligasa DNA T4 (1U/μl, Invitrogen)
- Microtubos PCR 0.2mL (Axygen)
- Termociclador Multigene (Labnet)
- UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen)

6.8.3. Pre-amplificación y Electroforesis en Gel de Agarosa

- Agarosa 1% (Seakem)
- Agua PCR
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Buffer 10X PCR (Invitrogen)
- Buffer T₁₀E_{0.1} (1M Tris-HCl, 0.5M EDTA)
- Cámara de electroforesis Enduro GEL XL (Labnet)
- cDNA molde con adaptadores ligados
- dNTP mix (10mM, Invitrogen)
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)
- Fuente de poder Scientific Co. EPS-300 II C.B.S
- Ladder 100bp (Axygen)
- MgCl₂ (50mM, Invitrogen)

- Microtubos PCR 0.2mL (Axygen)
- Primer *Bst*YI + T (50ng/ μ l, Tabla 3)
- Primer *Mse*I + 0 (50ng/ μ l, Tabla 3)
- SYBR Safe (10000X, Invitrogen)
- Taq DNA Polimerasa Recombinante (5U/ μ l, Invitrogen)
- TBE 1X
- Termociclador T Personal (Biometra)

6.8.4. Amplificación Selectiva

- Buffer 10X PCR (Invitrogen)
- dNTP mix (10mM, Invitrogen)
- MgCl₂ (50mM, Invitrogen)
- Microtubos PCR 0.2mL (Axygen)
- Primer *Bst*YI+T + N (10ng/ μ l, Tabla 4)
- Primer *Mse*I + N (5ng/ μ l, Tabla 4)
- Taq DNA Polimerasa Recombinante (5U/ μ l, Invitrogen)
- Termociclador T Personal (Biometra)
- UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen)

6.9. Electroforesis en gel de Acrilamida

- Acrilamida (Invitrogen)
- Agua deionizada
- Bind Silane (Sigma Aldrich)

- Bisacrilamida (Invitrogen)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Buffer de carga (Dilución 1:10 de: 0.0025g azul bromofenol, 0.0025g xileno, 5mL glicerol, 5mL urea 5M)
- Cámara de Electroforesis vertical BIORAD Sequi-Gen GT
- Cámara fotográfica XPOSZ (Canon)
- cDNA producto de PCR
- Etanol al 70%
- Fuente de Poder BIORAD PowerPac HV
- Ladder 10bp (Invitrogen)
- Persulfato de Amonio (J. T. Baker)
- RainX
- Separadores y Peines
- Sigmacote (Sigma)
- Solución Etanol – Ácido acético (96% - 0.5%)
- TBE 10X
- TEMED (Invitrogen)
- Urea (Invitrogen)

6.10. Tinción con Nitrato de Plata

- Ácido acético glacial (MERCK)
- Agua deionizada
- Formaldehido al 37% (MERCK)

- Hidróxido de Sodio (MERCK)
- Solución de Fijación (Ac. acético 10mL, etanol absoluto 200mL, agua 1790mL)
- Solución de Tinción (AgNO₃ 4g, formaldehído 3mL, agua deionizada 2L)
- Solución Reveladora (NaOH 30g, formaldehído 4mL, agua deionizada 2L)

6.11. Aislamiento y Re-amplificación de bandas diferenciales

- Bisturí
- Buffer 10X PCR (Invitrogen)
- Buffer T₁₀E_{0.1} (1M Tris-HCl, 0.5M EDTA)
- dNTP mix (10mM, Invitrogen)
- Incubadora con agitación (Lab-Line MaxQ 4000)
- MgCl₂ (50mM, Invitrogen)
- Microtubos 1.5mL (Axygen)
- Microtubos PCR 0.2mL (Axygen)
- NanoDrop Thermo Scientific 1000
- Primer *Bst*YI+T + N (10ng/μl, Tabla 4)
- Primer *Mse*I + N (5ng/μl, Tabla 4)
- Taq DNA Polimerasa Recombinante (5U/μl, Invitrogen)
- Termociclador T Personal (Biometra)
- Transiluminador
- UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (Invitrogen)

7. Métodos

La presente investigación fue realizada una vez otorgado el permiso de investigación científica N°30-2011-IC-FLO-DPAP/MA por parte del Ministerio del Ambiente del Ecuador, para llevar a cabo el análisis molecular cDNA-AFLP de 6 variedades de quinoa del banco de germoplasma del INIAP.

7.1. Siembra de semillas

Las semillas de los seis ecotipos de quinoa fueron sembradas en un sustrato compuesto por tierra autoclavada y turba Promix en proporción 50/50. Para la preparación del sustrato, se mezcló igual cantidad de tierra y promix en una bandeja plástica y se humedeció ligeramente la mezcla con agua destilada. A continuación, se repartió el sustrato en vasos plásticos desechables de 9 onzas; a los cuales, previamente, se les realizó tres agujeros en la base para permitir el paso de agua y nutrientes hacia la planta a través de las raíces. De igual manera, los vasos fueron rotulados con los códigos de los ecotipos correspondientes. Luego, se colocó 3 semillas de quinoa en disposición triangular encima del sustrato colocado en cada vaso y se agregó un poco de tierra autoclavada para cubrir las semillas. Para cada ecotipo, un total de 30 semillas fueron sembradas (10 vasos por cada ecotipo). Cada vaso, ya con las semillas sembradas, fue colocado en el interior de un pequeño plato desechable para controlar las condiciones de riego de manera individual. El procedimiento descrito en esta sección se llevó a cabo en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito.

7.2. Riego y aporte de nutrientes

El riego fue controlado dos veces por semana; al inicio y al final de cada semana se regó de manera individual las plantas colocando aproximadamente 20mL de agua destilada en cada plato. Asimismo, una vez por semana, entre los períodos de riego con agua, se aplicó aproximadamente 20mL de solución Hoagland de manera individual en cada plato para proveer de macro y micronutrientes a las plantas. Estas condiciones de riego y nutrición se mantuvieron de manera constante a lo largo del desarrollo de las plantas.

7.3. Aplicación de tratamiento con metiljasmonato

El tratamiento de metiljasmonato fue aplicado una vez que las plantas de quinoa alcanzaron un estadio de crecimiento 4, en base a la escala BBCH (Meier, 2001). De acuerdo a Meier (2001), hacia el estadio fenológico 4 ya se han formado las hojas y se ha elongado el tallo, luego de lo cual empieza a emerger la inflorescencia dando paso al estadio de crecimiento 5. En base a este criterio, entre todas las plantas de quinoa que germinaron, se seleccionó de manera uniforme únicamente aquellas plantas que se ajustaban al estadio de crecimiento 4. De esta manera, alrededor de 85 plantas fueron seleccionadas entre las 180 plantas sembradas, 14 por cada ecotipo, para ser empleadas en las siguientes etapas de la investigación. Las 14 plantas elegidas de cada ecotipo fueron separadas en dos grupos: 7 plantas para aplicar el tratamiento con metiljasmonato y las 7 restantes sirvieron como control. Es importante mencionar que las condiciones ambientales, de crecimiento y nutrición fueron idénticas para todas las plantas seleccionadas, siendo la aplicación de agua destilada en lugar de metiljasmonato la única variante entre las plantas control y las plantas tratadas.

Previo a la aplicación del tratamiento, los vasos que contenían las plantas fueron retirados de los platos desechables empleados para su riego y nutrición, y fueron transferidos al interior de dos bandejas plásticas (58cm x 38cm x 8.5cm), en las cuales se colocaría posteriormente la solución de metiljasmonato y el agua destilada en el caso de las plantas tratadas y control respectivamente. De esta manera, en cada bandeja existían 42 plantas, 7 por cada ecotipo; en una de las bandejas se adicionó 1.5 litros de solución de metiljasmonato a una concentración $100\mu\text{M}$, mientras que en la otra bandeja se añadió el mismo volumen de agua destilada. Lambert y colaboradores (2011) recomiendan dicha concentración de metiljasmonato para elicitar genes asociados a la producción de saponinas triterpénicas. Tomando en cuenta que el metiljasmonato es un compuesto volátil se construyó 2 mini invernaderos caseros para cubrir cada bandeja plástica luego de la aplicación del tratamiento (Anexo 3). Así, no sólo se fomentó la concentración del metiljasmonato dentro del mini invernadero de las plantas tratadas, sino que también se evitó que las plantas control tuvieran contacto con este compuesto.

7.4. Colecta de hojas de plantas control y plantas tratadas con metiljasmonato

Los tiempos de colecta de hojas establecidos para esta investigación fueron 0, 8 y 24 horas, denominados T0, T1 y T2 respectivamente. En cada tiempo se colectó entre 3 y 4 hojas de cada planta. En el tiempo 0 (T0), se colectó hojas entre las 14 plantas seleccionadas de cada ecotipo antes de tener contacto con el tratamiento de metiljasmonato o agua destilada. En el tiempo 1 (T1), se colectó por separado hojas de las plantas control (T1c) y las plantas tratadas con MeJA (T1t) luego de 8 horas transcurridas desde la aplicación del tratamiento; el mismo procedimiento se aplicó en el tiempo de colecta 2 (T2), luego de 24 horas de haber aplicado el tratamiento. El tratamiento fue aplicado a

tempranas horas de la mañana (7:00 am), de manera que la colecta luego de 8 horas (T1) pudiera ser realizada en la tarde antes de la puesta del sol (3:00 pm); evitando así tener expresión diferencial de genes asociada a la presencia o ausencia de luz, sino principalmente debido a la aplicación del tratamiento con metiljasmonato.

La colecta de hojas se realizó con ayuda de pinzas y bisturí para cortar los peciolo, luego de lo cual se envolvió las hojas colectadas en pequeños sobres de papel aluminio correctamente rotulados con el tiempo de colecta y el ecotipo correspondiente. Los sobres fueron almacenados en un termo metálico con nitrógeno líquido hasta finalizar el procesamiento de todos los ecotipos, minimizando así la degradación de los ácidos nucleicos en las muestras. Se colectó hojas verdes jóvenes y se excluyó aquellas hojas cercanas a la inflorescencia y de coloración ligeramente amarillenta. Una vez finalizada la colecta, las muestras fueron retiradas del nitrógeno líquido y se las conservó en un congelador a -80°C para su posterior uso en la extracción de ARN.

7.5. Extracción y cuantificación de ARN

El ARN total se extrajo a partir de un pool de 5 a 7 hojas colectadas para cada ecotipo en un tratamiento y tiempo de colecta específico. La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por van Wees y colaboradores (2000). Todo el procedimiento se realizó en recipientes y racks fríos y con materiales libres de RNasas. En un mortero limpio y previamente enfriado en un congelador a -80°C , se añadió nitrógeno líquido e inmediatamente después se agregó las hojas colectadas de una muestra. Las hojas fueron maceradas con ayuda de un pistilo hasta conseguir un polvo de textura muy fina. En un microtubo de 2.0mL se colocó el polvo macerado aproximadamente hasta la mitad del

volumen del tubo y se adicionó 500 μ l de buffer de extracción (previamente calentado para disolver el SDS). Esta mezcla fue agitada en un vórtex y luego, dentro de la sorbona, se añadió 500 μ l de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v), nuevamente se agitó el tubo para homogeneizar la mezcla y se centrifugó a 13500 rpm. La fase acuosa localizada en la parte superior del tubo se transfirió a un nuevo microtubo de 2.0mL y se descartó el precipitado. Este procedimiento se repitió una vez más; luego de lo cual, la fase acuosa fue transferida a un nuevo microtubo, al cual se le añadió 500 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v), se agitó y centrifugó la mezcla a 13500 rpm por 1 minuto. A continuación, se transfirió la fase superior a un nuevo microtubo y se añadió 150 μ l de cloruro de litio 8M. Esta mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche para precipitar el ARN. Al día siguiente, se centrifugó el microtubo a 14000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga refrigerada Sigma y posteriormente se descartó el sobrenadante. Al microtubo con el pellet se agregó 500 μ l de etanol al 70% y se centrifugó durante 1 minuto a 14000 rpm, luego de lo cual se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 1 minuto dentro de la cámara de flujo. Luego, se añadió 400 μ l de agua libre de RNAsas y se incubó durante 45 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se agitó vigorosamente el microtubo para disolver el pellet. Una vez disuelto, se añadió 40 μ l de acetato de sodio (pH 5.2) y 1mL de etanol al 96%. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a -80°C, luego de lo cual se centrifugó el microtubo durante 2 minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 400 μ l de etanol al 70% y nuevamente se centrifugó el tubo a 14000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante 1 minuto en la cámara de flujo laminar. Finalmente, se resuspendió el pellet en 25 μ l de agua libre de RNAsas y se conservó el ARN a -20°C. Este procedimiento se repitió con cada una de las muestras. Al finalizar la etapa de las extracciones, se verificó la integridad del ARN

extraído por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 2) y la cuantificación se llevó a cabo empleando el NanoDrop 1000 Thermo Scientific (Tabla 5).

7.6. Síntesis y purificación de cDNA

Para la síntesis de la primera hebra de cDNA se incubó durante 2 horas a 42°C, 20µl del ARN total extraído (concentración aprox. 75ng/µl) con 20µl del primer mix de síntesis (1µl primer oligo dT₂₅ bio, 8µl 5X strand buffer, 2µl dNTP mix, 1µl Superscript II, 4µl DTT, 4µl agua-DEPC). A continuación se añadió 120µl del segundo mix para la síntesis de la segunda hebra de cDNA (16µl 10X Ligase buffer, 3µl dNTP mix, 6µl DTT, 1.5µl *E. coli* Ligasa, 0.8µl Ribonucleasa H, 1.6µl NAD, 5µl DNA polimerasa I, 86.1µl agua PCR). Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 12°C seguido de 1 hora a 22°C. Una vez sintetizado, el cDNA fue purificado siguiendo las instrucciones del kit *Purelink Quick Gel Extraction and PCR Purification* de Invitrogen. Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar si la síntesis y purificación de cDNA fue exitosa.

7.7. Digestión del cDNA con enzimas y ligación de adaptadores

La primera digestión del cDNA purificado se realizó con la enzima *Bst*YI; para tal propósito, se incubó 20µl de cDNA con 20µl del primer mix de digestión (1µl *Bst*YI, 4µl 10X RL buffer, 15µl agua PCR) durante 2 horas a 60°C. Poco antes de finalizar la primera restricción se preparó los Dynabeads rodeados de estreptavidina, para lo cual se lavó y resuspendió los beads con buffer 2X STEX. Una vez finalizada la incubación con *Bst*YI, se adicionó 40µl de los beads resuspendidos a los 40µl de la primera reacción de corte y se incubó la mezcla por 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se colocó un imán cerca de la base del microtubo para atraer los beads magnéticos hacia el fondo y de

manera simultánea se retiró el líquido sobrenadante con ayuda de una micropipeta. En este punto, los beads atraídos se habrán unido a los fragmentos de cDNA marcados con biotina en su extremo. Luego se retiró el imán, se resuspendió los beads en 100µl de buffer 1X STEX y se transfirió esta mezcla a un nuevo microtubo de 0.2mL. El procedimiento de atracción magnética y resuspensión de beads se repitió 4 veces de forma idéntica, salvo que en la última repetición se resuspendió los beads en 30µl de buffer T₁₀E_{0.1}.

Para llevar a cabo el segundo corte con la enzima *MseI* se incubó los 30µl de beads resuspendidos con 10µl del segundo mix de digestión (1µl *MseI*, 4µl 10X RL buffer, 5µl agua PCR) durante 2 horas a 37°C. Finalizada la incubación, se añadió 10µl del mix de ligación (1µl adaptador *Bst*YI, 1µl adaptador *MseI*, 1µl 10x RL buffer, 1µl DNA T4 Ligasa, 1µl ATP, 1µl *Bst*YI, 4µl agua PCR) y se incubó esta mezcla por 3 horas a 37°C. Los adaptadores fueron preparados a partir de secuencias forward y reverse correspondientes a *Bst*YI y *MseI* (Tabla 2). Terminada la ligación, se colocó el imán en la base del tubo para atraer los beads al fondo y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Finalmente, el sobrenadante recuperado fue diluido en 80µl de buffer T₁₀E_{0.1}.

7.8. Pre-amplificación

La pre-amplificación se realizó en un volumen final de 50µl y constó de 5µl de los fragmentos de cDNA con adaptadores preparados en el paso anterior y 45µl del mix de pre-amplificación (1.5µl primer *Bst*YI + T, 1.5µl primer *MseI* + 0, 0.2µl Taq polimerasa, 5µl 10X PCR buffer, 2.5µl MgCl₂, 1µl dNTP mix, 33.3µl agua PCR). Los primers empleados fueron resuspendidos de acuerdo a las instrucciones del proveedor a una concentración stock de 500ng/µl, a partir de la cual se obtuvo las diluciones a una concentración de

50ng/ μ l requerida para la pre-amplificación. La reacción de PCR fue realizada en un termociclador Biometra T Personal bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 94°C por 10 s; 25 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 1 min y 72° por 1 min; y una extensión final de 72°C por 1 min (Anexo 3). Con el propósito de determinar si existió amplificación, los productos del PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y, más adelante, se realizó una dilución 1/10 de dichos productos para proseguir con la amplificación selectiva.

7.9. Amplificación selectiva

Para esta etapa, se dispuso de 124 posibles combinaciones de primers cuyas secuencias fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología de Plantas de la Universidad Ghent de Bélgica. Entre éstas, diez diferentes combinaciones de primers fueron escogidas al azar para emplearlas en las reacciones de amplificación selectiva, tal como se puede observar en la Tabla 4. La reacción de PCR estuvo compuesta por 5 μ l de la dilución 1/10 del producto pre-amplificado y 15 μ l del mix de PCR (0.5 μ l primer *Bst*YI T+N 10ng/ μ l, 6 μ l primer *Mse*I + N 5ng/ μ l, 0.12 μ l Taq polimerasa 5U/ μ l, 2 μ l 10X PCR buffer, 1 μ l MgCl₂, 0.4 μ l dNTP mix, 4.98 μ l agua PCR). En esta etapa se llevó a cabo un tipo de amplificación conocida con el nombre de “touchdown PCR” (TD-PCR). El TD-PCR es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa que permite optimizar PCR's de forma rápida y simple. Esta metodología emplea una temperatura de annealing inicial alta, la misma que decrece progresivamente a medida que transcurren los ciclos de la reacción (Korbie y Mattick, 2008). De esta manera, cada primer se alinearé e hibridará con la secuencia molde a una temperatura específica dentro del rango de temperatura establecido por el investigador. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes para todos los

casos: 94°C por 10 min; 13 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 30 s (-0.7°C cada ciclo) y 72°C por 1 min; 23 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1 min; y finalmente 72°C por 2 minutos (Anexo 3).

7.10. Electroforesis en gel de acrilamida

Los productos de la amplificación selectiva fueron separados mediante electroforesis en gel de acrilamida para visualizar y aislar bandas diferenciales. Para la elaboración del gel se preparó 500mL de una solución stock de acrilamida al 6% (100mL agua deionizada, 50mL TBE 10X, 28.5gr acrilamida, 1.5gr bisacrilamida, 150.15gr urea 5M). Antes de proseguir con la preparación del gel se realizó el tratamiento del vidrio y la cámara de electroforesis vertical con la finalidad de facilitar la remoción del vidrio con el gel una vez finalizada la electroforesis. El vidrio fue tratado con etanol al 70% y solución bind silane homogeneizada en todo el largo y ancho del vidrio; mientras que la cámara fue tratada con etanol al 70%, rain-X y sigmacote. Adicionalmente se limpió los espaciadores y el peine con etanol al 70%. Una vez listos los materiales se ensambló la cámara de electroforesis y se preparó la solución de acrilamida, para lo cual se colocó 100mL de acrilamida al 6% en un vaso de precipitación y se adicionó 109 μ l de TEMED y 545 μ l de persulfato de amonio 10%. Esta mezcla fue absorbida con una jeringa, y luego de eliminar las burbujas existentes, se inyectó la solución en el espacio comprendido entre la cámara y el vidrio. En este punto se introdujo el peine con las puntas hacia afuera y se dejó polimerizar el gel durante 1 hora. Una vez polimerizado, se colocó el gel en la base para realizar la corrida. A continuación se retiró el peine, se limpió el frente de corrida y se reintrodujo el peine con las puntas hacia abajo para formar los pocillos. Luego se realizó una pre-corrida a 85 Wattios y 45°C durante 30 minutos empleando buffer de carga para

verificar la calidad de los pocillos y del gel. Durante este intervalo de tiempo se preparó el ladder y las muestras para la corrida agregando 1 μ l de Blue Juice a 10 μ l del producto de la amplificación selectiva y posteriormente se denaturó esta mezcla a 95°C durante 5 minutos. Una vez finalizada la pre-corrida se cargó 5 μ l de las muestras denaturadas y el mismo volumen de ladder 10bp Invitrogen en los pocillos y se corrió una electroforesis a 85 Wattios y 45°C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se desarmó la cámara de electroforesis y se procedió a realizar la tinción con nitrato de plata (Benbouza, *et al*, 2006).

7.11. Tinción con nitrato de plata

Una vez desarmada la cámara, se colocó el vidrio con el gel adherido en una bandeja con solución fijadora, previamente enfriada, durante 5 minutos. A partir de este punto, todo el procedimiento de tinción se realizó en la oscuridad ya que las soluciones de tinción y revelación no pueden ser expuestas a la luz. Se retiró el vidrio de la solución de fijación y se lo transfirió a una bandeja con solución de tinción durante 7 minutos con agitación constante. Al finalizar los 7 minutos se lavó el gel con agua deionizada durante 8 segundos y se lo colocó en una bandeja con solución reveladora durante 7 minutos con agitación muy leve para evitar que el gel se desprege. Una vez realizado el revelado, se transfirió el vidrio nuevamente a la bandeja con solución fijadora durante 3 minutos, y finalmente se realizó un último lavado del gel con agua deionizada para retirar el ácido acético. El gel, ya teñido, se dejó secar durante 40 minutos para continuar posteriormente con el análisis y extracción de bandas diferenciales.

7.12. Extracción de bandas y Re-amplificación

El vidrio con el gel teñido se colocó sobre un transiluminador de luz blanca para facilitar la visualización de las bandas. Se analizó el patrón de expresión genética en cada una de las muestras y se identificó las bandas de expresión diferencial por sobre 100 pares de bases entre controles y tratamientos. Para cada banda diferencial se registró la siguiente información: fotografía, código de la banda, ecotipo en el que se expresa, primers utilizados, tamaño de la banda en pares de bases y finalmente el detalle de expresión (ej. subexpresión o sobreexpresión en controles o tratamientos). Una vez tomados los datos, la banda identificada fue aislada del gel realizando un corte preciso con ayuda de un bisturí, luego de lo cual, el pedazo de gel con la banda de interés fue transferido a un microtubo de 1.5mL correctamente rotulado con 50 μ l de buffer T₁₀E_{0.1}. Este microtubo fue incubado a 37°C con agitación durante toda la noche y al día siguiente el sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo de 1.5mL. El sobrenadante recuperado fue empleado para llevar a cabo la reacción de re-amplificación. En dicha reacción se mezcló 5 μ l del sobrenadante y 15 μ l del mix empleado en la amplificación selectiva con los primers correspondientes para la banda aislada. Así también, las condiciones del PCR touchdown fueron las mismas empleadas para la amplificación selectiva.

7.13. Preparación de muestras y secuenciación

De un total de 180 bandas aisladas y re-amplificadas, se seleccionó 25 muestras para llevar a cabo la secuenciación de ambas hebras de ADN. Principalmente se eligió bandas de sobreexpresión en el tratamiento con metiljasmonato luego de 8 horas de su aplicación, así como bandas con sobreexpresión en ambos tratamientos con metiljasmonato luego de 8 y

24 horas con respecto a los controles. Dichas bandas son consideradas y denominadas como “bandas de interés” más adelante en la sección de resultados y discusión. Este criterio de selección se aplicó en base a la literatura consultada, la cual reporta que los genes asociados a la síntesis de metabolitos secundarios (factores de transcripción o enzimas) se sobreexpresan entre las 4 y 24 horas luego de haber aplicado un tratamiento con metiljasmonato (Pollier, *et al*, 2011). El ADN de las 25 muestras seleccionadas fue cuantificado en el NanoDrop 1000 Thermo Scientific, para verificar que exista una concentración adecuada de ADN para proseguir con el secuenciamiento. La secuenciación de las muestras fue realizada por la empresa Functional Biosciences, Inc. situada en Wisconsin, Estados Unidos; por lo cual, las muestras y las alícuotas de primers fueron cuidadosamente etiquetadas y selladas para su envío por correo. Las muestras fueron etiquetadas con el código de la banda y los primers con los que fueron amplificados. Además, se envió 100µl de primers diluidos a una concentración 10µM. Los tubos fueron sellados con parafilm e introducidos en un sobre junto con la orden de secuenciación, para su posterior envío. Los resultados de la secuenciación fueron publicados en el portal de internet de Functional Biosciences Inc. luego de 72 horas del envío de muestras.

7.14. Análisis de resultados

En primera instancia los resultados de la secuenciación fueron procesados empleando el software informático STADEN, que consta del programa “pregap4” para el procesamiento y preparación de secuencias; y el programa Gap4 que permite el ensamblado y edición de secuencias. Únicamente 13 de las 25 secuencias fueron procesadas con el programa STADEN. Cuando las secuencias no son de buena calidad, el programa “pregap 4” no las admite y por lo tanto no es posible procesarlas (STADEN, 2007). Por tal razón,

las 12 muestras no admitidas por “pregap 4” fueron procesadas empleando el programa de alineación de secuencias MEGA5. Una vez ensambladas las secuencias, éstas fueron comparadas con la información disponible en la base de datos GenBank del NCBI mediante el software BLAST y la base de datos cDNA-ref/seq de *Arabidopsis thaliana* (TAIR) para encontrar homologías con genes o secuencias reportadas en otras especies de plantas.

8. Resultados

8.1. Germinación de semillas y colecta de hojas

Se obtuvo buenos porcentajes de germinación de semillas en 5 de los 6 ecotipos de quinoa analizados como se puede observar en la Figura 2. La menor tasa de germinación fue 60%. Para todos los ecotipos hubo suficientes plantas para llevar a cabo la aplicación de tratamientos con agua (control) y metiljasmonato.

Entre las 14 plantas seleccionadas de cada ecotipo, 7 fueron tratadas con metiljasmonato y 7 sirvieron como control. Para cada tiempo (T0, T1c, T1t, T2c, T2t) se colectó en promedio 14 muestras (aprox. 7 muestras control y 7 muestras de plantas tratadas). Cada muestra estaba conformada por 2 a 3 hojas tomadas de una misma planta de quinoa. Alrededor de 90 a 96 muestras de hojas fueron recolectadas en total para cada ecotipo. A partir de las 7 muestras que aproximadamente se tomaron en un mismo tratamiento y tiempo de colecta en cada ecotipo (T0, T1c, T1t, T2c, T2t) se realizó un pool de hojas para llevar a cabo la extracción de ARN.

8.2. Extracción y cuantificación de ARN

El método de extracción de ARN demostró ser muy efectivo pues se obtuvo ARN limpio e íntegro. Tal como se puede observar en la Figura 1, se obtuvo ARN total intacto pues se puede apreciar la presencia de las bandas correspondientes al ARN ribosomal y ARN mensajero en el gel de agarosa. Además, el protocolo aplicado permitió obtener ARN de buena calidad y altas concentraciones, como se puede ver en la Tabla 5. Estos resultados son importantes, ya que el éxito de la técnica de cDNA-AFLP depende en gran parte de la calidad del ARN del que se parte. Debido a las altas concentraciones del ARN aislado, éste fue diluido a una concentración aproximada de 75ng/ μ l para ser empleado posteriormente en la técnica de cDNA-AFLP.

8.3. cDNA-AFLP *one gene – one tag*

Para desarrollar la técnica de cDNA-AFLP se escogió 5 muestras de ARN por cada ecotipo, una por cada tiempo de colecta (T0: antes de aplicar tratamiento, T1: 8 horas control, T1: 8 horas tratamiento, T2: 24 horas control y T2: 24 horas tratamiento). La síntesis de cDNA fue exitosa para las 30 muestras escogidas, lo cual se evidenció mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 3) donde se puede observar un barrido en el rango de 100 – 500 pares de bases. El resultado en la primera etapa del proceso fue satisfactorio, por lo cual se continuó con la preparación del template para la pre-amplificación.

La pre-amplificación de las 30 muestras fue realizada con los primers *Bst*YI+T y *Mse*I. Con una temperatura de annealing de 56°C, se evidenció amplificación en todas las muestras. En la Figura 4 se puede apreciar un barrido sustancial entre 50 y 500 pares de bases, lo cual se puede interpretar como una pre-amplificación exitosa. El resultado

positivo luego de la pre-amplificación fue de gran importancia. Por un lado permitió continuar hacia la etapa de la amplificación selectiva, y por otra parte permitió corroborar que el proceso de corte, atracción magnética de beads y ligación de adaptadores fue correctamente realizado.

8.4. Amplificación selectiva y electroforesis en gel de acrilamida

En la fase final de la técnica de cDNA-AFLP se amplificó selectivamente las 30 muestras pre-amplificadas, empleando 10 diferentes combinaciones de primers (Tabla 4). Los resultados fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de acrilamida (Figura 5 - 14).

De manera global, a partir de las 10 combinaciones de primers, se extrajo 180 bandas diferenciales. Entre las 180 bandas diferenciales identificadas, 37 fueron bandas de subexpresión en los tratamientos con metiljasmonato. Por su parte, las 143 bandas restantes fueron de sobre-expresión en los tratamientos. La información detallada sobre las bandas extraídas en cada uno de los ecotipos se observa en la Tabla 6.

Para la mayoría de combinaciones de primers se observó amplificación en las 30 muestras; salvo la combinación de primers BstYI + T2/MseI 42. Empleando ésta combinación, 29 de las 30 muestras amplificaron; mientras que la muestra correspondiente al tratamiento con MeJA a las 8 horas no amplificó en el ecotipo ECU-229; por tal razón no se extrajo bandas diferenciales de dicho ecotipo (Figura 5). Para los 5 ecotipos restantes fueron extraídas del gel 7 bandas diferenciales de interés, de las cuales 5 presentaron subexpresión en el tratamiento con MeJA a las 24 horas, 1 subexpresión en los tratamientos

con MeJA (8 y 24 h) y 1 sobreexpresión en ambos tratatamientos con MeJA (8 y 24h) (Figura 5).

La segunda combinación de primers analizada fue BstYI + T2/MseI 12, en la cual se observó amplificación en las 30 muestras; y en relación a la combinación de primers anterior, las bandas generadas fueron más intensas. En total se extrajo 20 bandas diferenciales: 8 bandas de subexpresión en el tratamiento con MeJA a las 24 h, 6 de sobreexpresión en el tratamiento con MeJA a las 24 h y 6 bandas que mostraron sobreexpresión en ambos tratamientos con MeJA (8 y 24 h) (Figura 6).

Para la tercera combinación de primers, BstYI + T2/MseI 21, se extrajo 16 bandas diferenciales, de las cuales 10 fueron bandas de sobreexpresión en el tratamiento MeJA a las 24 h, 4 bandas de sobreexpresión en el tratamiento con MeJA a las 8 y 24 h, 1 banda de subexpresión en el tratamiento a las 8 h y 1 banda de subexpresión en los tratamientos a las 8 y 24 horas. Adicionalmente, como se puede apreciar en la Figura 7, en todas las muestras analizadas se observó amplificación.

La cuarta combinación de primers empleada fue BstYI + T2/MseI 22, a partir de la cual se extrajo un total de 15 bandas diferenciales. De las 15, 9 fueron bandas de sobreexpresión en tratamiento con MeJA a las 24 h, 2 de sobreexpresión en tratamientos a las 8 y 24h de colecta, 3 bandas de subexpresión en tratamiento a las 24 h y 1 banda de subexpresión a las 8 y 24 h en tratamientos. La muestra control (T0) para el ecotipo ECU-225 no amplificó; las 29 muestras restantes si mostraron amplificación (Figura 8).

En la combinación de primers BstYI + T2/MseI 31 se observó amplificación en las 30 muestras, como se aprecia en la Figura 9. Un total de 26 bandas diferenciales fueron

aisladas del gel: 13 bandas correspondientes a sobreexpresión en tratamiento con MeJA a las 24 h, 6 bandas de sobreexpresión en los tratamientos a las 8 y 24 h, 6 bandas de subexpresión en el tratamiento a las 8h y 1 banda de subexpresión en los tratamientos a las 8 y 24 horas de colecta.

La sexta combinación de primers analizada fue BstYI + T2/MseI 44. A partir de la amplificación con estos primers se pudo extraer 9 bandas de interés, de las cuales 5 presentaron sobreexpresión en tratamiento con MeJA a las 24 h, 3 bandas de sobreexpresión en tratamiento tanto a las 8 como a las 24 horas y 1 banda de subexpresión en tratamientos a las 8 y 24 horas. Para las 30 muestras analizadas se evidenció amplificación en el gel de acrilamida (Figura 10).

De igual manera, se observó amplificación en las 30 muestras analizadas con la combinación de primers BstYI + T2/MseI 11 (Figura 11). En total se aisló 24 bandas diferenciales: 21 bandas de sobreexpresión a las 24 h en el tratamiento con MeJA, 1 banda de sobreexpresión a las 8 y 24 h en los tratamientos y 2 bandas de subexpresión a las 8 y 24 horas de colecta en los tratamientos con metiljasmonato.

La siguiente combinación de primers que se probó fue BstYI + T2/MseI 33, en la cual se obtuvo amplificación exitosa en las 30 muestras analizadas (Figura 12). Para esta combinación de primers se extrajo 25 bandas de expresión diferencial: 6 bandas de sobreexpresión en tratamiento a las 8 h, 7 bandas de sobreexpresión a las 24 h en tratamiento, 8 bandas de sobreexpresión a las 8 y 24 horas en los tratamientos con MeJA, 3 bandas de subexpresión en tratamiento a las 24 h y 1 banda de subexpresión a las 8 y 24 horas de colecta después de la aplicación de MeJA.

A partir de la combinación BstYI + T2/MseI 34 se pudo extraer 20 bandas diferenciales, de las cuales 4 bandas fueron de sobreexpresión en el tratamiento de MeJA a las 8 h de colecta, 13 bandas presentaron sobreexpresión en los tratamientos con MeJA a las 24 h y finalmente 3 bandas de subexpresión a las 8 y 24 h después de aplicar el tratamiento de metiljasmonato. En la Figura 13 se puede observar amplificación en las 30 muestras.

La última combinación de primers analizada fue BstYI + T2/MseI 41, a partir de la cual se obtuvo 18 bandas diferenciales: 10 bandas de sobreexpresión a las 8 h en el tratamiento con MeJA, 4 bandas de sobreexpresión a las 24 h en tratamientos y 4 bandas de sobreexpresión a las 8 y 24 h en los tratamientos con MeJA. Como se aprecia en la Figura 14, todas las muestras amplificaron empleando esta combinación de primers.

Se pudo observar que la combinación de primers BstYI + T2/MseI 42 no fue muy informativa, pues no se identificó mayor número de bandas diferenciales; además, la mayoría de bandas generadas eran tenues (Figura 5). Mientras tanto, las combinaciones BstYI + T2/MseI 11, BstYI + T2/MseI 12, BstYI + T2/MseI 31, BstYI + T2/MseI 33 y BstYI + T2/MseI 34 fueron altamente informativas. A partir de estas combinaciones se pudo extraer 115 bandas diferenciales en total.

ECU-225 y ECU-229 fueron los ecotipos de quinoa dulce y amarga respectivamente de los cuales se extrajo el mayor número total de bandas diferenciales. No obstante, a partir de los ecotipos ECU-524 y ECU-225 de quinoa dulce y ECU-323 y ECU-234 de quinoa amarga se extrajo el mayor número de "bandas diferenciales de interés" (sobreexpresión en

tratamientos con MeJA a las 8h ó a las 24 y 8h) en base al criterio planteado en la sección de métodos.

8.5. Re-amplificación de bandas diferenciales y selección de muestras para secuenciación

Las 180 bandas extraídas fueron re-amplificadas, luego de lo cual, el producto de dicha reacción fue visualizado en geles de agarosa al 1%. Como se puede observar en la Figura 15, la re-amplificación fue exitosa para la mayoría de muestras y salvo unas pocas excepciones, se observó una sola banda en las muestras re-amplificadas. Entre las 180 bandas re-amplificadas, apenas 25 muestras presentaron doble banda o bandas múltiples (13.88%), 8 muestras no re-amplificaron (4.44%) y las 147 muestras restantes presentaron una sola banda en agarosa (81.66%). Para la posterior selección de bandas a secuenciar, se descartó las muestras en las que se observó múltiples bandas en el gel de agarosa, al igual que las muestras no re-amplificadas.

Entre las 180 bandas diferenciales aisladas, se seleccionó 25 muestras para llevar a cabo el análisis de secuenciación. El número de muestras a secuenciar fue determinado principalmente en función del presupuesto del proyecto para la fase de secuenciación. El criterio de selección estuvo basado en el siguiente parámetro: se seleccionó únicamente bandas correspondientes a sobreexpresión en tratamientos con metiljasmonato respecto a los controles. Entre éstas, se seleccionó aquellas que presentaron sobreexpresión únicamente a las 8 h de colecta ó a las 8 y 24 h de colecta después del tratamiento con MeJA. Tal como se mencionó en la sección 7.13, este criterio de selección fue determinado

en base a la literatura consultada y por recomendación de investigadores con amplia experiencia en este campo de estudio.

De esta manera, el número de bandas se redujo a 55. Entre este grupo, se seleccionó 25 bandas que presentaron una sola banda en agarosa luego de la re-amplificación y cuya sobreexpresión fue muy notoria en el gel de acrilamida. Las 25 muestras seleccionadas fueron cuantificadas en NanoDrop 1000 Thermo Scientific. Entre las 25 bandas seleccionadas, 12 fueron aisladas a partir de ecotipos de quinoa dulce y 13 a partir de ecotipos de quinoa amarga. En la Tabla 7 se presenta detalles adicionales de las 25 muestras seleccionadas para la secuenciación, incluyendo los códigos de banda, primers empleados y tamaño de las bandas en pares de bases.

8.6. Secuenciación

Como se mencionó en la sección 7.14, 13 de las 25 secuencias fueron analizadas con el programa STADEN; mientras que las 12 secuencias restantes fueron analizadas con el programa MEGA5. Una vez procesadas las 25 secuencias con los programas STADEN y MEGA5, éstas fueron comparadas con la información disponible en el GenBank a través de la herramienta BLASTn del NCBI. Adicionalmente, las 25 secuencias también fueron analizadas a través de la herramienta BLAST ref/seq exclusiva de cDNA, disponible en la base de datos TAIR de *Arabidopsis thaliana*.

El análisis de las 25 secuencias con el programa “nucleotide blast” del NCBI permitió identificar los siguientes 6 genes de función conocida: succinato deshidrogenasa, proteína arabinogalactano, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, quinona reductasa, O-aciltransferasa y proteína asociada a lípidos. Estos genes fueron identificados en las bandas

diferenciales a las cuales se les asignó los siguientes códigos: 10.3, 40.2, 58.1, 166, 46.3 y 72.1; las mismas fueron amplificadas con las siguientes combinaciones de primers: BstYIT2/MseI12, BstYIT2/MseI21, BstYIT2/MseI22, BstYIT2/MseI41, BstYIT2/MseI22 y BstYIT2/MseI31 respectivamente. Siguiendo el mismo orden de los códigos de las bandas, dichas secuencias se aislaron en los siguientes ecotipos: ECU-225, ECU-234, ECU-234, ECU-524, ECU-524 y ECU-323, 3 de quinoa dulce y 3 de quinoa amarga. De éstas 6 secuencias, 2 fueron obtenidas a partir de bandas sobreexpresadas en el tratamiento con MeJA a las 8 h de colecta. Dichas secuencias corresponden a las enzimas succinato deshidrogenasa y quinona reductasa. Las demás secuencias, correspondientes a la proteína arabinogalactano, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, O-aciltransferasa y proteína asociada a lípidos, se obtuvieron a partir de bandas que presentaron sobreexpresión en los tratamientos con MeJA a las 8 y 24 h de colecta de hojas. A parte de estas 6 secuencias, las 19 restantes mostraron homología con secuencias de ARN ribosomal, proteínas no caracterizadas de *Glycine max* y secuencias cDNA-AFLP sin función conocida en especies tales como *Catharanthus roseus*, *Medicago truncatula*, *Sesbania rostrata*, *Vitis vinifera* y *Capsicum annum*.

Por su parte, el análisis de las 25 secuencias con el programa "BLAST cDNA ref/seq" de la base de datos TAIR permitió identificar 16 genes de función conocida reportados en *Arabidopsis thaliana*; sin embargo, los "e-value" fueron mayores en comparación a los obtenidos con la herramienta BLASTn. De los 16 genes identificados con la base de datos TAIR, únicamente 2 (succinato deshidrogeansa y quinona reductasa) coincidieron con los resultados obtenidos empleando la herramienta BLASTn del NCBI; mientras tanto, los 14 genes restantes no mostraron relación alguna con los resultados

obtenidos a partir del análisis con BLASTn. A parte de los 16 genes identificados, 4 secuencias fueron homólogas a proteínas de función desconocida en *Arabidopsis thaliana*, 1 secuencia mostró homología con RNA ribosomal y 3 secuencias no presentaron ninguna homología con la información disponible en esta base de datos. Entre los 16 genes identificados, se pudo hallar enzimas de la familia del citocromo P450, reguladores y factores de transcripción y otras enzimas involucradas en reacciones de transferencia de grupos funcionales (Tabla 8). Cuatro de las 16 secuencias que mostraron homología con genes de *Arabidopsis* fueron amplificadas con la combinación de primers BstYIT2/MseI33, 3 fueron amplificadas con la combinación BstYIT2/MseI21, 3 más fueron amplificadas empleando la combinación BstYIT2/MseI22 y las 6 secuencias restantes fueron amplificadas con las siguientes combinaciones: BstYIT2/MseI31, BstYIT2/MseI41, BstYIT2/MseI11, BstYIT2/MseI12, BstYIT2/MseI34 y BstYIT2/MseI42. Asimismo, los 16 genes identificados provinieron de 8 secuencias aisladas de ecotipos de quinoa amarga (4 de ECU-234 y 3 de ECU-323) y 8 secuencias aisladas de ecotipos de quinoa dulce (5 de ECU-524 y 3 de ECU-225). Finalmente, de los 16 genes identificados, 8 fueron secuencias de sobreexpresión en tratamientos a las 8 y 24 h; los 8 restantes fueron secuencias de sobreexpresión a las 8 h de haber aplicado el tratamiento con MeJA.

En total 20 genes fueron identificados a partir del análisis con las herramientas BLASTn y BLAST cDNA ref/seq. La información detallada sobre los resultados obtenidos a partir de ambas bases de datos pueden ser apreciados en la Tabla 8 y 9.

9. Discusión

9.1. Germinación de semillas

El sustrato escogido para la germinación y el método de nutrición empleado demostraron ser efectivos para el desarrollo de plántulas de la mayoría de ecotipos de quinoa analizados. Sin embargo, para ciertos ecotipos, en particular ECU-225 y ECU-382 se obtuvo bajos porcentajes de germinación; lo cual puede ser atribuido directamente a la calidad de la semilla. Como se mencionó previamente en este trabajo, las semillas provinieron del banco de germoplasma del INIAP. Usualmente, la viabilidad de las semillas que son conservadas en bancos de germoplasma decrece con el paso del tiempo (Rao et al, 2007); ésta puede ser una explicación a los bajos porcentajes de germinación observados en ciertos ecotipos. Por ésta razón, los responsables de los bancos de germoplasma deben monitorear continuamente la viabilidad de las semillas para evaluar su capacidad de germinación y generación de plantas viables.

9.2. Tratamiento con metiljasmonato

El método de “*drench*” y aislamiento (mini invernadero casero) escogido para la aplicación del tratamiento con metiljasmonato fue exitoso para inducir la expresión de diversos genes en las plantas de quinoa. En un ensayo anterior, se había probado un método de aplicación por “*spray*”, el cual no fue efectivo debido a la presencia de una capa cerosa presente en la superficie de las hojas de quinoa, lo cual impidió la absorción del metiljasmonato. El método de aplicación por *drench*, así como las condiciones de aislamiento en las que se aplicó el metiljasmonato, fueron efectivos para inducir la expresión diferencial de genes entre las plantas tratadas y las plantas control. Esto se pudo

verificar a través de los resultados de amplificación observados con cada combinación de primers en los geles de acrilamida; de los cuales se extrajo un total de 180 bandas diferenciales entre controles y tratamientos. Como se mencionó anteriormente, diversos tipos de estrés biótico o abiótico pueden ocasionar una respuesta a nivel genético en las plantas. En el presente estudio, tanto las plantas control como las plantas que recibieron metiljasmonato, fueron tratadas en condiciones idénticas de temperatura, humedad, riego, exposición a la luz, etc. De esta manera, la única variante entre ambos grupos de plantas fue la aplicación de metiljasmonato. En consecuencia, las diferencias en cuanto a expresión genética entre plantas control y tratamiento podían ser atribuidas casi de manera exclusiva a la aplicación de metiljasmonato. Algunos de los resultados de la secuenciación corroboraron esta aseveración, pues ciertos genes tales como: O-metiltransferasa, succinato deshidrogenasa, proteína quinasa, sulfotransferasa, factor de respuesta al etileno, dedos de zinc y fosfoshikimato sintasa ya han sido reportados en estudios previos en respuesta a tratamientos con metiljasmonato (Sathiyamoorthy, *et al*, 2010; Sasaki, *et al*, 2001; de Rosa, *et al*, 2005; Jung, *et al*, 2007).

Los tiempos de colecta de muestras establecidos en este trabajo, concuerdan con los tiempos reportados en estudios relacionados al descubrimiento de genes de la ruta metabólica de las saponinas en especies como *Panax ginseng*, *Centella asiática*, *Medicago truncatula* y *Maesa lanceolata* (Pollier, *et al*, 2011). Además, gracias a la experiencia de estas investigaciones, se sabe que entre las 4 y 24 horas posteriores al tratamiento con metiljasmonato tiene lugar la sobreexpresión de la mayoría de genes potencialmente involucrados en el metabolismo de las saponinas (Pollier, comunicación personal). Por lo tanto, no sólo los tiempos de colecta, sino también los criterios de selección de bandas

diferenciales para la secuenciación, son factores de suma importancia para poder cumplir con el objetivo general planteado en el presente estudio.

9.3. cDNA-AFLP *one gene – one tag*

Como se mencionó al inicio de este documento, la técnica de cDNA-AFLP es una herramienta basada en la amplificación selectiva de fragmentos de cDNA generados a partir del corte con enzimas de restricción, separación electroforética de dichos fragmentos y análisis de patrones de expresión genética diferencial entre muestras tratadas y controles (Weiberg, *et al*, 2008). No obstante, la distribución desigual de los sitios de corte para las enzimas empleadas afecta negativamente la eficiencia del cDNA-AFLP; siendo una de las principales limitaciones de esta técnica la alta redundancia debido a que más de un fragmento puede ser generado a partir de un mismo transcrito (Weiberg, *et al*, 2008). En el presente estudio se pudo aplicar un protocolo modificado de esta técnica, denominado *one gene- one tag*, el cual permitió superar la limitación de la técnica original con respecto a los altos niveles de redundancia. Por medio de la atracción magnética de las micro esferas “Dynabeads” se redujo a 1 o 2 el número de fragmentos generados a partir de un mismo transcrito. Además de reducir los niveles de redundancia, el éxito de la aplicación de la técnica *one gene – one tag* facilitó el análisis de los resultados. Como se observa en las fotografías de los geles de acrilamida (Figura 5 – Figura 14), no se generó una enorme cantidad de bandas, lo cual hizo más sencillo el análisis y comparación de los patrones de expresión genética. Asimismo, la reducción del número total de bandas generadas, facilitó el aislamiento y corte preciso de las bandas diferenciales de interés, lo cual puede ser ratificado gracias a los resultados de la re-amplificación, en donde más del 80% de muestras mostraron una sola banda en agarosa.

La combinación de endonucleasas de restricción empleada permitió generar varias bandas diferenciales de interés. Varios estudios que han aplicado la técnica de cDNA-AFLP en plantas de los géneros *Nicotiana*, *Brassica* y *Arabidopsis* también han remarcado la capacidad de las enzimas *MseI* y *BstYI* para producir fragmentos altamente informativos (Fusco, *et al*, 2005; de Paepe, *et al*, 2004).

Como se puede observar en la Tabla 8, varias muestras secuenciadas y analizadas con la herramienta BLASTn del NCBI mostraron homología con secuencias de tipo cDNA-AFLP en diversas especies de plantas. Aunque el objetivo primordial de este estudio era descubrir entre las 25 secuencias genes asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas, el haber hallado homología con fragmentos cDNA-AFLP es también un resultado positivo, pues indirectamente es un indicativo de que la técnica pudo ser replicada con éxito en *Chenopodium quinoa*.

9.4. Análisis de expresión diferencial y selección de bandas

Se sabe que mientras mayor sea el número de combinaciones de primers analizadas, mayor es la cobertura en el análisis del transcriptoma empleando la técnica de cDNA-AFLP (Vuylsteke, *et al*, 2007). En este estudio se probaron únicamente 10 combinaciones de primers para realizar un análisis inicial de expresión diferencial. A largo plazo, el objetivo del convenio entre la Universidad San Francisco y la Universidad Ghent es secuenciar el genoma completo de una variedad dulce y una variedad amarga de quinoa. Por tal razón, no fue necesario probar más combinaciones de primers para lograr una mayor cobertura del genoma, ya que de cualquier forma se piensa secuenciar el genoma completo de 2 ecotipos

de quinoa. Además, la información generada a partir las 10 combinaciones analizadas fue suficiente como para continuar con los objetivos del presente estudio.

A partir del análisis de 10 combinaciones de primers se pudo identificar ecotipos de quinoa con una marcada expresión genética diferencial. Con respecto a los ecotipos de quinoa dulce, ECU-225 fue el ecotipo del cual se extrajo mayor número de bandas diferenciales totales (48 bandas). Por su parte, del ecotipo ECU-524 no sólo se extrajo un número considerable de bandas diferenciales (33 bandas), sino que fue el ecotipo de quinoa dulce que mayor número de “bandas de interés” presentó (7 bandas de sobreexpresión en tratamientos a las 8 h y a las 24 y 8 h). Además, fue el ecotipo de quinoa dulce que mayor número de bandas aportó para los análisis de secuenciación (6 bandas). Por otra parte, dentro de los ecotipos de quinoa amarga, ECU-323 fue el ecotipo del que mayor número de “bandas diferenciales de interés” se extrajo (21 bandas). Adicionalmente, fue el ecotipo de quinoa amarga que mayor número de muestras aportó a la secuenciación (6 bandas). Ambos ecotipos suman casi la mitad del total de bandas diferenciales de interés extraídas y la mitad de muestras escogidas para los análisis de secuenciación. Por esta razón, estos ecotipos pueden ser considerados como los más adecuados para llevar a cabo la secuenciación de última generación de todo su genoma. No obstante, hay que mencionar que el número de bandas totales, así como el número de bandas de interés identificadas en cada ecotipo puede ser considerado hasta cierto punto como un criterio subjetivo, pues depende en gran parte de la persona que realiza el análisis. Esta etapa de la técnica de cDNA-AFLP puede ser considerada como la más crítica, ya que la identificación de bandas diferenciales está directamente relacionada a la capacidad de detectar cambios en la intensidad de las bandas que a criterio del investigador son significativos (Hu, *et al*, 2005).

En este estudio, todos los geles fueron analizados por una misma persona, justamente para reducir la subjetividad en los resultados. Por este motivo podemos considerar que la información generada a partir de los 10 primers analizados es útil para poder seleccionar los ecotipos apropiados para llevar a cabo la secuenciación de última generación.

En base al número de bandas diferenciales extraídas a partir de cada combinación de primers, se pudo distinguir combinaciones de primers altamente informativas tales como BstYIT2/MseI11, BstYIT2/MseI31 y BstYIT2/MseI33. A partir de éstas y otras combinaciones escogidas al azar se pudo extraer un promedio de 30 bandas diferenciales por combinación de primers analizada, 5 por cada ecotipo en cada combinación de primers. En un estudio muy similar realizado en un ecotipo de *Brassica napus* se empleó la misma combinación de enzimas y se probaron 16 combinaciones de primers al azar. En dicho estudio se identificó aproximadamente 100 TDFs de sobreexpresión y subexpresión después de un tratamiento con metiljasmonato; un promedio de 6 TDFs por cada combinación de primers analizada (Sarosh y Meijer, 2007). En el estudio de Sarosh y Meijer, 2007, se identificó un mayor número de TDFs, en primer lugar debido a que se probó una mayor cantidad de primers. Además, los autores reportan que la identificación de TDFs en el gel de acrilamida se realizó en el rango de tamaño de 50 a 500pb. Mientras tanto, en el presente estudio se empleó un menor número de primers y el análisis de bandas diferenciales se realizó en un rango de tamaño más reducido (100 – 330pb). Si tomamos en cuenta estos criterios, podemos considerar que los resultados obtenidos en esta investigación fueron coherentes, específicamente en lo que respecta al número de TDFs identificados.

Todas las bandas escogidas para la secuenciación correspondieron a TDFs que mostraron sobreexpresión en las muestras tratadas con metiljasmonato en el rango de 8 a 24 horas después de la aplicación del tratamiento. Este criterio de selección concuerda con los resultados obtenidos en investigaciones similares orientadas al descubrimiento de genes del metabolismo secundario. Jost y colaboradores, 2005, emplearon un tratamiento con metiljasmonato para investigar cambios en la expresión de 2467 genes asociados al metabolismo primario y secundario en *Arabidopsis thaliana* mediante microarrays. Los resultados de dicha investigación demostraron que ciertos genes fundamentales del metabolismo secundario, tales como genes de enzimas sintasas, oxigenasas, transferasas y fosfatasas se sobreexpresaron como consecuencia del tratamiento con metiljasmonato. De igual manera, un estudio realizado en *Panax ginseng* orientado al descubrimiento de genes asociados a la síntesis de una clase de saponinas triterpénicas denominadas ginsenósidos, reportó la sobreexpresión de genes importantes en la biosíntesis de tales compuestos en respuesta a un tratamiento con metiljasmonato. Genes codificantes para las enzimas escualeno sintasa, escualeno epoxidasa y cicloartenol sintasa mostraron sobreexpresión luego de 8 a 72 h de haber aplicado el tratamiento con MeJA (Kim, *et al*, 2009). Por lo expuesto, la prevalencia de bandas de sobreexpresión por sobre las bandas de subexpresión para llevar a cabo los análisis de secuenciación en este estudio, pudo haber ocasionado un incremento significativo en las probabilidades de encontrar genes asociados a la biosíntesis de las saponinas.

9.5. Secuenciación y análisis de resultados

La expresión de las 25 bandas seleccionadas fue casi uniforme entre los ecotipos de quinoa amarga y los ecotipos de quinoa dulce, con una ligera supremacía a favor de los

ecotipos de quinoa amarga. Ya que todos los ecotipos recibieron el mismo tratamiento con metiljasmonato; se asume que en todos ellos la síntesis de saponinas se vio elicitada. Por lo tanto, es normal que haya existido uniformidad en los resultados con respecto a la expresión diferencial de genes entre los ecotipos dulces y amargos.

Tal como se mencionó previamente en los resultados, sólo 2 de los genes descubiertos con BLASTn fueron también descubiertos con BLAST cDNA ref/seq; mientras que las 23 secuencias restantes mostraron diferentes resultados con cada base de datos. Aunque este resultado puede parecer negativo por la falta de coincidencia, es en realidad un resultado esperado debido a las diferencias existentes entre las bases de datos empleadas. Por una parte, la herramienta BLASTn realiza la búsqueda de homologías de una secuencia desconocida frente a millones de secuencias disponibles en una amplia base de datos genómica. Por tal razón, para varias de las secuencias consultadas en esta base de datos fue normal el obtener homología con diversas secuencias de diferentes especies de plantas. Por otra parte, la herramienta BLAST cDNA ref/seq realiza la búsqueda de homologías en un ámbito más reducido, pues se enfoca estrictamente en una base de datos de cDNA. El GenBank, al ser una base de datos genómica, incluye información de secuencias tanto de exones como de intrones; mientras que la base de datos cDNA ref/seq únicamente incluye secuencias de exones. Por tal razón es evidente que los resultados no van a ser los mismos entre ambas bases de datos. Ya que las muestras empleadas en el cDNA-AFLP fueron de cDNA, es comprensible que se haya identificado un mayor número de homologías en la base de datos de cDNA de *Arabidopsis*. Adicionalmente, el análisis mediante la herramienta BLASTn permitió identificar genes homólogos con valores E muy lejanos a cero y altos *scores*, en comparación a los valores arrojados por la herramienta

BLAST cDNA ref/seq de *Arabidopsis*. El valor E “es el número de secuencias, respecto al tamaño de la base de datos que estamos usando, que obtendrían la misma puntuación por azar al ser alineadas” (UNAM, 2006). Por lo tanto, mientras mayor sea el tamaño de la base de datos empleada, menor será el valor E y más significativos serán los valores esperados. En este sentido, es normal que los valores E obtenidos con BLASTn sean mucho menores que los obtenidos con la base de datos de *Arabidopsis*. De igual manera, la obtención de valores E altos no necesariamente indica que la homología encontrada fue por causa del azar, ya que dicho valor no sólo es dependiente del tamaño de la base de datos empleada, sino que también depende del tamaño de la secuencia analizada. Entonces, es normal que secuencias de menor tamaño puedan presentar valores E altos debido a que existe mayor probabilidad de que estas secuencias cortas encuentren homología en la base de datos por simple casualidad (UNAM, 2006).

La técnica de cDNA-AFLP es una herramienta con gran potencial para ser empleada en investigaciones orientadas al descubrimiento de genes (Breyne, *et al*, 2003). A diferencia de otras tecnologías que actualmente se emplean para el análisis de expresión genética tales como los *microarrays*, ésta técnica permite identificar genes que son expresados de manera diferencial sin tener conocimiento siquiera sobre la secuencia de aquellos genes. Mientras tanto, los *microarrays* están limitados al análisis de la expresión de genes ya identificados y secuenciados (Hu, *et al*, 2005). Es así que, mediante el análisis comparativo con bases de datos genómicas y de cDNA, se pudo identificar algunos genes entre las muestras escogidas para la secuenciación.

Dos de las 25 secuencias analizadas mostraron resultados similares luego del análisis con BLASTn y BLAST cDNA ref/seq. Estas secuencias correspondieron a las

enzimas succinato deshidrogenasa y quinona reductasa. El complejo enzimático succinato deshidrogenasa (SDH) está involucrado en procesos biológicos tales como el transporte de electrones, reacciones de oxido reducción y el ciclo del ácido tricarboxílico (Popov, *et al*, 2010). Por otra parte, la enzima quinona reductasa (FQR-1) participa entre otras cosas en la regulación de la transcripción y en procesos de óxido reducción; adicionalmente, la sobreexpresión de ambos genes ha sido reportada en respuesta a tratamientos con metiljasmonato, auxinas y estrés osmótico en estudios relacionados (Sathiyamoorthy, *et al*, 2010; Nemhauser, *et al*, 2006). Aunque no existe literatura o referencias que asocien a estos genes directamente a la biosíntesis de saponinas triterpénicas, puede considerarse que forman parte importante de varios procesos fisiológicos y mecanismos de respuesta a estrés en la planta (Popov, *et al*, 2010; Sathiyamoorthy, *et al*, 2010).

Los 4 genes restantes identificados con BLASTn corresponden a: proteína arabinogalactano, 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa, O-aciltransferasa y proteína asociada a lípidos. La proteína arabinogalactano (FLA) está implicada en procesos de adhesión celular, desarrollo de raíces y ha sido reportada en respuesta a diversos tipos de estrés abiótico (Johnson, *et al*, 2003; Goossens, *et al*, 2003). Mientras tanto, poco es lo que se conoce acerca de la proteína asociada a lípidos. Un estudio realizado por Zeng y colaboradores, 2011, determinó que este tipo de proteínas están asociadas a la síntesis y almacenamiento de carotenoides, así como a los mecanismos de respuesta a estrés en las plantas. Al igual que los genes anteriormente identificados, estas enzimas parecen desempeñar una función en los mecanismos de respuesta al estrés, más no ha sido sugerida su participación en la biosíntesis de saponinas triterpénicas. Por otra parte, la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa desempeña un rol importante en la síntesis de

aminoácidos aromáticos. Enzimas relacionadas como la shikimato transferasa o shikimato deshidrogenasa han sido reportadas en respuesta a tratamientos con metiljasmonato (Sathiyamoorthy, *et al*, 2010). La importancia de esta enzima en relación al presente estudio, radica en su participación en la biosíntesis de metabolitos tales como los flavonoides, isoflavonoides, terpenoides y quinonas, a través de la vía del shikimato y los terpenoides (Dewick, 2002). Dentro del grupo de genes identificados con BLASTn, uno de los más interesantes fue el correspondiente a la enzima O-aciltransferasa. Las enzimas de tipo aciltransferasas son en gran parte responsables de la inmensa diversidad de metabolitos secundarios existentes en plantas. Varias enzimas de este tipo han sido reportadas en respuesta a elicitores como el metiljasmonato (Hadacek, 2002; Lenka, *et al*, 2012; Sathiyamoorthy, *et al*, 2010). Como se mencionó al inicio de este documento, la ruta de síntesis de las saponinas triterpénicas aún no ha sido completamente caracterizada, apenas se conoce los genes que participan en las etapas tempranas de síntesis. Es escasa la información en torno a las etapas tardías de la ruta, en donde el esqueleto de las saponinas atraviesa por varias modificaciones, principalmente oxidación, glicosilación y reacciones de sustitución (Haralampidis, *et al*, 2002). Enzimas de tipo glicosiltransferasas y monooxigenasas participan en esta etapa de la ruta metabólica; no obstante otras enzimas aún no descubiertas podrían estar implicadas también en estas reacciones. Por lo tanto, es posible que enzimas de tipo aciltransferasas estén involucradas en reacciones de sustitución en las etapas tardías de la ruta metabólica; y en consecuencia, serían importantes para generar una gran diversidad de saponinas (Hadacek, 2002; Lambert, *et al*, 2011).

Por otra parte, empleando la base de datos BLAST cDNA ref/seq se pudo identificar 16 genes, de los cuales 2 correspondieron a las enzimas succinato deshidrogenasa y

quinona reductasa que también fueron descubiertos con la herramienta BLASTn. Los 14 genes restantes fueron muy variados en cuanto a la función que desempeñan en la planta. Entre los genes hallados se encontró una proteína rica en glicina; la cual constituye un componente importante de la pared celular vegetal y se ha demostrado que su síntesis es parte de los mecanismos de defensa de la planta (Mousavi y Hotta, 2005). También se identificó una proteína facilitadora principal implicada en la miristoilación de proteínas: una modificación lipídica que sufren ciertas proteínas y que desempeña un rol importante en procesos fisiológicos y de señalización celular asociados a la inmunidad de las plantas (Traverso, *et al*, 2008). En base a la literatura consultada, se puede descartar la participación directa de estas enzimas en la ruta metabólica de las saponinas triterpénicas.

Gran parte de los genes identificados están relacionados a los mecanismos de respuesta de la planta frente a factores de estrés biótico y abiótico. Es el caso de la enzima oxidasa alternativa, la cual está implicada en procesos de oxidación y su sobreexpresión ha sido reportada en respuesta a tratamientos con metiljasmonato (Fung, *et al*, 2003). Así también, fue identificado el gen LOS1 codificante para el factor de elongación 2 en *Arabidopsis*. Este gen ha sido identificado en estudios relacionados a la respuesta a la aplicación de hormonas, entre ellas el metiljasmonato. (Goossens, *et al*, 2003). Otra enzima asociada principalmente a mecanismos de respuesta a hormonas y factores de estrés abiótico como salinidad y sequía es la proteína quinasa CIPK23. Además esta proteína está asociada a importantes procesos biológicos como la transducción de señales y la ruta del ácido absísico y (Xiang, *et al*, 2007). De igual forma, se identificó una proteína de la familia F-box cuya función principal radica en la degradación de proteínas reguladoras mediante ubiquitinación. También se conoce que esta proteína participa en

mecanismos fisiológicos y moleculares de gran importancia tales como: transducción de señales, respuesta a hormonas (MeJA), desarrollo floral, mecanismos de defensa y regulación de la expresión genética (Andrade, *et al*, 2001; Schumann, *et al*, 2011). El rol de las proteínas F-box es de gran importancia y su expresión puede estar determinada por varios factores. En el presente estudio podemos suponer que la expresión de este gen podría deberse en parte al inicio del desarrollo floral en las plantas de quinoa empleadas. Por otra parte, su expresión pudo haber ocurrido en respuesta al tratamiento con metiljasmonato. Sin embargo, dado que este gen únicamente se expresó en plantas tratadas y no en controles, se asume que su expresión fue regulada netamente por la aplicación de la hormona.

Dentro de los genes analizados se pudo identificar también importantes reguladores de la transcripción. Por ejemplo, una de las secuencias mostró homología con el factor de transcripción de respuesta al etileno. Este es un importante regulador de la expresión genética en plantas ante la presencia de diferentes factores de estrés (Oñate y Singh, 2002). La expresión de este gen ha sido reportada en respuesta a tratamientos con ácido jasmónico y metiljasmonato en varios estudios. Además, se ha demostrado que estos factores de transcripción regulan la expresión de genes estimulados con MeJA asociados a la síntesis de terpenoides (Goossens, *et al*, 2003; Vom Endt, *et al*, 2002). Otro regulador identificado fue el cofactor MBF-1, el cual está asociado a la regulación de la transcripción y a mecanismos de respuesta al etileno, metiljasmonato y ácido salicílico (Jung Kim, *et al*, 2007).

Finalmente, un grupo de genes identificados mostraron relación a diversos procesos metabólicos en plantas, aunque no han sido asociados en particular a la biosíntesis de saponinas. Dentro de este grupo se pudo identificar la enzima glicosil hidrolasa la cual está

involucrada principalmente en el metabolismo de carbohidratos. Es poco lo que se conoce sobre la participación de esta enzima en otros procesos metabólicos. Se ha documentado que el estrés salino, así como la aplicación de ácido abscísico y metiljasmonato pueden inducir una sobreexpresión de este gen (Tyler, *et al*, 2010). Otro de los genes identificados fue ACR4 (ACT domain repeat 4), un dominio presente en enzimas asociadas al metabolismo de aminoácidos y cuya expresión ha sido reportada en respuesta al estímulo de auxinas (Hsieh y Goodman, 2002). También fueron identificadas 2 enzimas pertenecientes al grupo de las transferasas. Una de ellas es la sulfotransferasa 4A, la cual está asociada al metabolismo de brasinoesteroides y a mecanismos de respuesta a citoquininas (Clouse, 2011; Klein y Papenbrock, 2004). Adicionalmente, se pudo identificar la enzima metionina S – metiltransferasa, involucrada en el metabolismo de aminoácidos. Esta enzima forma parte de la familia de las metiltransferasas, las cuales se sabe que desempeñan un rol importante en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Hadacek, 2002). Se desconoce el rol que esta enzima en particular podría desempeñar en la biosíntesis de las saponinas triterpénicas.

Uno de los hallazgos más interesantes fue el de las enzimas monooxigenasas del citocromo P450: CYP94D2 y CYP71A23. Las monooxigenasas del citocromo P450 constituyen la familia más numerosa y diversa de enzimas asociadas a la biosíntesis de metabolitos secundarios (Hadacek, 2002). Se ha sugerido que varias enzimas de este tipo están involucradas en la biosíntesis de las saponinas triterpénicas en diversas especies, tal es el caso de las enzimas CYP88D6 y CYP93E1 en *Glycine max* y CYP51H10 en *Avena spp.* (Lambert, *et al*, 2011). Se sabe que estas enzimas son responsables de llevar a cabo reacciones de oxidación en las etapas finales de la biosíntesis de las saponinas. Por tal razón

se puede proponer que los genes descubiertos están asociados a la biosíntesis de estas moléculas en la quinoa. Un aspecto importante es que las enzimas descubiertas CYP94D2 y CYP71A23 no han sido reportadas en ninguna especie en la que se haya llevado a cabo un estudio orientado al descubrimiento de genes asociados a la ruta metabólica de las saponinas.

Los resultados obtenidos en la etapa final del estudio son coherentes, ya que los genes identificados están asociados a procesos biológicos inducidos por la aplicación del tratamiento con metiljasmonato e incluso fue posible identificar genes novedosos relacionados a la ruta metabólica de las saponinas.

Los genes codificantes para las enzimas monooxigenasas, metiltransferasas, aciltransferasas y sulfottransferasas posiblemente estarían asociados a la biosíntesis de las saponinas triterpénicas (Hadacek, 2002; Lambert, *et al*, 2011). Los genes de las enzimas sulfottransferasa, aciltransferasa y monooxigenasa CYP94D2 se expresaron tanto en ecotipos de quinoa dulce, como en ecotipos de quinoa amarga. El gen de la enzima monooxigenasa CYP71A23 se expresó exclusivamente en las quinoas amargas y el gen de la enzima metiltransferasa se expresó únicamente en el ecotipo 524 de quinoa dulce. Es normal que algunos de estos genes se expresen sólo en quinoa amarga, pues son variedades con un elevado contenido de saponinas (Repo-Carrasco, *et al*, 2006). Por otra parte, la expresión de genes en todos los ecotipos analizados puede ser un indicativo de que estos genes no sólo estén asociados a la biosíntesis de saponinas, que es la principal diferencia entre los ecotipos amargos y dulces. Probablemente, estos genes también están asociados a la producción de otros metabolitos secundarios cuya concentración y producción no varía entre los ecotipos amargos o dulces. Finalmente, la expresión de genes en ecotipos de

quinoa dulce resulta interesante, especialmente si se trata de genes que potencialmente estarían asociados a la síntesis de saponinas (monoxigenasa CYP94D2, aciltransferasa y metiltransferasa). De comprobarse que dichos genes están relacionados a la ruta metabólica de las saponinas, se podría plantear que la aplicación de metiljasmonato es capaz de estimular la expresión de estos genes. En consecuencia, la aplicación de dicha hormona sería capaz de restablecer la producción e incrementar el contenido de saponinas en ecotipos de quinoa dulce y amarga respectivamente. De esta forma, la aplicación de metiljasmonato podría convertirse en una estrategia efectiva para estimular la producción de saponinas en quinoa, sin necesidad de recurrir a metodologías de mayor complejidad y demanda técnica, como es el caso de la biosíntesis combinatoria y otras técnicas de ingeniería genética.

10. Conclusiones

El tratamiento de metiljasmonato fue exitosamente aplicado por *drench* y permitió elicitarse en las plantas de quinoa la expresión de varios genes, entre ellos, genes asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas.

En el presente estudio, la técnica cDNA-AFLP *one gene – one tag* fue aplicada por primera vez en *Chenopodium quinoa* W, obteniendo resultados satisfactorios en la identificación de genes expresados diferencialmente como consecuencia de la aplicación de un tratamiento con metiljasmonato.

La amplificación selectiva empleando 10 combinaciones diferentes de primers permitió identificar 180 bandas de expresión diferencial entre plantas control y plantas tratadas con metiljasmonato entre los 6 ecotipos de quinoa analizados.

El análisis de expresión genética diferencial mediante la técnica cDNA-AFLP *one gene – one tag* permitió identificar a los ecotipos ECU-524 y ECU-323, de quinoa dulce y amarga respectivamente, como posibles candidatos para llevar a cabo futuros análisis de secuenciación de última generación, ya que a partir de los mismos se extrajo el mayor número de bandas diferenciales de interés.

La secuenciación de 25 bandas de sobreexpresión en plantas de quinoa tratadas con metiljasmonato permitió identificar 20 genes asociados principalmente a procesos metabólicos, transducción de señales, regulación de la transcripción y mecanismos de defensa y respuesta a estrés en plantas.

Se pudo identificar genes potencialmente asociados a la síntesis de saponinas triterpénicas, principalmente enzimas implicadas en las reacciones tardías de la ruta metabólica, tal es el caso de las enzimas monooxigenasas del citocromo P450, aciltransferasas, sulfotransferasas y metiltransferasas.

11. Recomendaciones

Varios estudios consultados reportan la expresión de genes asociados al metabolismo secundario en intervalos de tiempo muy cortos a partir de la aplicación de un tratamiento con metiljasmonato. Por lo tanto, es recomendable incrementar el número de muestras mediante la elección de nuevos tiempos de colecta de hojas a partir de la aplicación del tratamiento con metiljasmonato (ej. 2, 4, 12 horas).

Realizar un análisis preciso acerca de la función asociada a los genes descubiertos. Para tal propósito, se recomienda aislar y clonar los genes identificados en organismos tales como levaduras o plantas en los cuales se pueda confirmar la asociación de dichos genes a la biosíntesis de saponinas triterpénicas.

Aplicar en un futuro la técnica cDNA-AFLP *one gene – one tag* en otras especies de plantas para llevar a cabo estudios de expresión diferencial y descubrimiento de genes asociados a características de interés.

12. Bibliografía

- Agarwal, M, Shrivastava, N. y Padh, H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 617-631. 2008.
- Andrade, M, Gonzalez, M, Serrano, R. y Rodriguez, P. A combination of the F-box motif and kelch repeats defines a large *Arabidopsis* family of F-box proteins. *Plant Mol Bio.* 603-614. 2001.
- Avanci, N. C, Luche, D, Goldman, G. y Goldman, M. H. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research.* 484-505. 2010.
- Azofeifa, A. Uso de Marcadores Moleculares en Plantas: Aplicaciones en Frutales del Trópico. *Agronomía Mesoamericana.* 221-242. 2006.
- Babar Ali, M, Yu, K, Hahn, E. y Paek, K. Methyl jasmonate and salicylic acid elicitation induces ginsenosides accumulation, enzymatic and non-enzymatic antioxidant in suspension culture *Panax ginseng* roots in bioreactors. *Plant Cell Rep.* 613-620. 2006.
- Benbouza, H, Jacquemin, J, Baudoin, J. y Mergeai, G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10: 77 – 81. 2006.
- Breyne, P, Dreesen, R, Cannoot, B, Rombaut, D, Vandepoele, K. y Zebeau, M. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Gen Genomics.* 173-179. 2003.
- Buchanan, B, Gruissem, W. y Jones, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists. 2000.
- Canahua, A. Año Internacional de la Quinua. *Rev Agro Enfoque.* 84-85. 2012.
- Choi, D. W, Jung, J, Im, Y, Park, H, In, D. S, Chung, H. y Liu, J. Analysis of transcripts in methyl jasmonate – treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosidos and other secondary metabolites. *Plant Cell Rep.* 557-566. 2005.
- Clouse, S. Brassinosteroids. *The Arabidopsis Book.* American Society of Plant Biologists. 2-28. 2011.

- Cooper, B. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor*. *The Plant Journal*. 339-349. 2001.
- Cronquist, A. Botánica Básica. Primera Edición. México: Editorial CECSA. 1995.
- Danielsen, S, Bonifacio, A. y Ames, T. Diseases of Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Food Reviews International*. 43-59. 2003.
- De Paepe, A., Vuylsteke, M., Van Hummelen, P., Zabeau, M. y Van Der Straeten, D. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J*. 537-559. 2004.
- De Rosa, V, Nogueira, F, Menossi, M, Ulian, E. y Arruda, P. Identification of methyl jasmonate – responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. *Braz. Journal of Plant Physiology*. 173-180. 2005.
- de Vienne, D. *Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology*. USA: Science Publishers Inc. 2003.
- Dewick, P. *The Shikimate Pathway: Aromatic amino acids and Phenylpropanoids. Medicinal Natural Products*. 2002.
- Estrella, J, Manosalvas, R, Mariaca, J. y Ribadeneira, M. Biodiversidad y Recursos Genéticos: Una guía para su uso y acceso en el Ecuador. Quito: Abya-Yala. 2005.
- FAO. Año Internacional de la Quinoa AIQ-2013. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012.
- FAO. La Quinoa: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2011
- Fusco, N., Micheletto, L., Dal Corso, G., Borgato, L. & Furini, A. Identification of cadmium-regulated genes by cDNA-AFLP in the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L. *J. Exp. Bot*. 3017-3027. 2005.
- Gaspar, T, Kevers, C, Greppin, H, Reid, D. y Thorpe, T. Plant Hormones and Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture. *In vitro Cell Dev Biology*. 272-288. 1996.

- Goossens, A, Laakso, I, Biondi, S, de Sutter, V, Lammertyn, F, Nuutila, A. M, Zabeau, M, Inzé, D. y Oksman, K. A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *PNAS*. 8595-8600. 2003.
- Hadacek, F. Secondary Metabolites as Plant Traits: current Assessment and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Science*. 273-322. 2002.
- Haralampidis, K, Trojanowska, M. y Osbourn, A. Biosynthesis of Triterpenoid saponins in plants. *Adv Biochem Eng Biotechnology*. 31-49. 2002.
- Heisser, C.B. y D.C. Nelson. On the origin of the cultivated chenopods (*Chenopodium*). *Genetics*. 503-505. 1974.
- Hoagland, D. y Arnon, D. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station*. 347: 1-32. 1950.
- Hsieh, M. y Goodman, H. Molecular Characterization of a novel gene family encoding ACT Domain Repeat Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 1707-1806. 2002.
- Hu, W, Jones, P, DeCoen, W, Newsted, J. y Giesy, J. Comparison of gene expression methods to identify genes responsive to perfluorooctane sulfonic acid. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 153-160. 2005.
- Jacobsen, S. E, Mujica, A. y Jensen, C. R. The resistance of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. *Food Reviews International*. 99-109. 2003.
- Jacobsen, S. E. The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Reviews International*. 167-177. 2003.
- Ji, R. Q, Song, X, Xin, X, Zhou, X. y Feng, H. Isolation of fertility – related genes of multiple alle inherited male sterility in *Brassica rapa* spp *pekinensis* by cDNA-AFLP. *Genetics and Molecular Research*. 4073-4083. 2011.
- Johnson, K, Jones, B, Bacic, A. y Schultz, C. The Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins of *Arabidopsis*. A Multigene Family of Putative Cell Adhesion Molecules. *Plant Physiology*. 1911-1925. 2003.
- Jost, R, Bloem, E, Bogs, J, Kopriva, S, Watcher, A. Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveals regulation of genes of primary and secondary sulfur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*. 491-508. 2005.

- Jung, C, Hyun, S, Yeu, S, Ae Kim, M, Rhee, S, Kim, M, Lee, J, Choi, Y. y Cheong, J. Microarray-based analysis screening of jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 1053-1063. 2007.
- Jung Kim, M, Hyun, G, Seon, E, Beom, C, Yeol, K. y Soo Kim, C. Abiotic and biotic stress tolerance in *Arabidopsis* overexpressing the *Multiprotein bridging factor 1a (MBF1a)* transcriptional coactivator gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 354: 440-446. 2007.
- Kazan, K. y Manners, J. Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. *Plant Physiology.* 1459-1468. 2008.
- Kim, Y, Han, J, Lim, S. y Choi, Y. Ginseng metabolic engineering: Regulation of genes related to ginsenoside biosynthesis. *Journal of Medicinal Plants.* 1270-1276. 2009.
- Klein, M. y Papenbrock, J. The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species. *Journal of Experimental Botany.* 1809-1820. 2004.
- Korbie, D. y Mattick, J. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols.* 1452-1456. 2008.
- Koziol, M.J. Quinoa: A potential new oil crop. *New crops.* 328-336. 1993.
- Kuljanabagavad, T. y Wink, M. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry Reviews.* 473-490. 2009.
- Lambert, E, Faizal, A. y Geelen, D. Modulation of Triterpene Saponin Production: In vitro cultures, Elicitation, and Metabolic Engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 220-237. 2011.
- Lenka, S, Boutaoui, N, Paulose, B. y Normanly, J. Identification and Expression analysis of methyl jasmonate responsive ESTs in paclitaxel producing *Taxus cuspidate* suspension culture cells. *BMC Genomics.* 2012.
- Liang, P. A Decade of Differential Display. *BioTechniques.* 338-346. 2002
- Mazón, N, Peralta, E, Villacrés, E, Rivera, M. y Subía, C. Investigación y Desarrollo en Granos Andinos: Chocho y Quinoa un aporte a la Soberanía y Seguridad

- Alimentaria de Comunidades del canton Saquisilí, Cotopaxi, Ecuador. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. 2009.
- Mazza, G y Güçlü-Üstündağ, O. Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 231-258. 2007.
- Meesapyodsuk, D, Balsevich, J, Reed, D. y Covello, P. Saponin Biosynthesis in *Saponaria vaccaria*. cDNAs Encoding β -Amyrin Synthase and a Triterpene Carboxylic Acid Glucosyltransferase. *Plant Physiology*. 959-969. 2007.
- Meier, U. Estadios de las plantas mono y dicotiledóneas. Centro Federal de Investigaciones Biológicas para Agricultura y Silvicultura. 2001.
- Moody, D. E. Genomics Techniques: An overview of methods for the study of gene expression. *J. Animal Science*. 128-135. 2001.
- Mousavi, A. y Hotta, Y. Glycine-Rich Proteins: a class of novel proteins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169-175. 2005.
- Mujica, A, Jacobsen, S. E, Izquierdo, J y Marathe, J. P. Resultados de la Prueba Americana y Europea de la Quinoa. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2001.
- Mujica, A. Granos y leguminosas andinas. Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 1992.
- Mujica, A. y Jacobsen, S. E. La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 449-457. 2006.
- Nemhauser, J, Hong, F. y Chory, J. Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell*. 467-475. 2006.
- Oñate, L. y Singh, K. Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiology*. 1313-1322. 2002.
- Osborn, A, Qi, X, Townsend, B. y Qin, B. Dissecting plant secondary metabolism – constitutive chemical defences in cereals. *New Phytologist*. 101-108. 2003.
- Pauwels, L, Morreel, K, de Witte, E, Lammertyn, F, Montagu, M, Boerjan, W, Inzé, D. y Goossens, A. Mapping methyl jasmonate – mediated transcriptional reprogramming

- of metabolism and cell cycle progression in cultured *Arabidopsis* cells. PNAS. 1380-1385. 2008.
- Peralta, E. La quinua en Ecuador: Estado del Arte. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. 2011.
- Peralta, E. La quinua: un gran alimento y su utilización. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. 1985.
- Pollier, J, Gonzalez, M, Ardiles, W, Geelen, D. y Goossens, A. An Integrated PCR Colony Hybridization Approach to screen cDNA Libraries for Full-Length Coding Sequences. Plos One. 2011.
- Pollier, J, Morreel, K, Geelen, D. y Goossens, A. Metabolite Profiling of Triterpene Saponins in *Medicago truncatula* Hairy Roots by Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. Journal of Natural Products. 1462-1476. 2011.
- Pollier, J, Moses, T. y Goossens, A. Combinatorial Biosynthesis in Plants: A (p)review on its potential and future exploitation. Natural Prod Rep. 1897-1916. 2011.
- Popov, V, Eprintsev, A, Fedorin, D. y Igamberdiev, A. Succinate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* is regulated by light via phytochrome A. FEBS Letters. 584: 199-202. 2010.
- Rajput, Z, Hu, S, Xiao, C. y Arijo, A. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. Journal of Zhejiang University. 153-161. 2007.
- Raju, J. y Mehta, R. Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin. Nutrition and Cancer. 27-35. 2009.
- Repo-Carrasco, R, Espinoza, C. y Jacobsen, S. E. Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*). Food Reviews International. 179-189. 2003.
- Rohwer, C. L y Erwin, J. E. Horticultural applications of jasmonates: A review. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 283-304. 2008.
- Sarosh, B. y Meijer, J. Transcriptional profiling by cDNA-AFLP reveals novel insights during methyl jasmonate, wounding and insect attack in *Brassica napus*. Plant Molecular Biology. 425-438. 2007.

- Sasaki, Y, Asamizu, E, Shibata, D, Nakamura, Y, Kaneko, T, Ohta, H. y Tabata, S. Monitoring of Methyl Jasmonate-responsive Genes in *Arabidopsis* by cDNA Macroarray: Self-activation of Jasmonic Acid Biosynthesis and Crosstalk with Other Phytohormone Signaling Pathways. DNA Research. 153-161. 2001.
- Sathiyamoorthy, S, Gayathri, S, Kim, Y. y Yang, D. Gene Ontology Study of Methyl Jasmonate – Treated and Non-Treated Hairy roots of *Panax ginseng* to identify genes involved in Secondary Metabolic Pathway. Russian Journal of Genetics. 828-835. 2010.
- Schumann, N, Navarro, A, Ullrich, K, Kuhl, C. y Quint, M. Molecular Evolution and Selection Patterns of Plant F-Box Proteins with C-terminal Kelch Repeats. Plant Physiology. 835-850. 2011.
- Singh, G, Gavrieli, J, Oakey, J. S. y Curtis, W. Interaction of methyl jasmonate, wounding and fungal elicitation during sesquiterpene induction in *Hyoscyamus muticus* in root cultures. Plant Cell Reports. 391-395. 1998.
- STADEN: "Sequence Assembly using the Staden Package". Consultado: 2012-12-03. <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/training/Staden%20course.pdf> >
- Stevens, M. R, Coleman, C. E, Parkinson, S. E, Maughan, P. J, Zhang, H, Balzotti, M. R, Kooyman, D. L, Bonifacio, A, Fairbanks, D. J, Jellen, E. N, Stevens, J. Construction of a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) BAC library and its use in identifying genes encoding seed storage proteins. Theoretical and Applied Genetics. 1593-1600. 2006.
- Stölting, K, Gort, G, Wüst, C. y Wilson, A. Eukaryotic transcriptomics *in silico*: Optimizing cDNA-AFLP efficiency. BMC Genomics. 2009.
- Sturtevant, J. Applications of Differential Display Reverse Transcription PCR to Molecular Pathogenesis and Medical Mycology. Clinical Microbiology. 408-427. 2000.
- Suzuki, H, Achnine, L, Xu, R, Seiichi, P. T. y Dixon, R. A genomic approach to the early stages of triterpene saponin biosynthesis in *Medicago truncatula*. The Plant Journal. 1033-1048. 2002.
- Tae Kim, O, Bang, K, Chang, K, Yun, D, Young, M. y Woo, S. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. Plant Cell Tiss Organ Cult. 25-33. 2009.

- TAIR: "Gene Search Tool". Consultado: 2012-10-30.
<http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=gene>
- Traverso, J, Meinnel, T. y Giglione, C. Expanded impact of protein N-myristoylation in plants. *Plant Signaling and Behavior*. 501-502. 2008.
- Tyler, L, Bragg, J, Wu, J, Yang, X, Tuskan, G. y Vogel, J. Annotation and comparative analysis of the glycoside hydrolase genes in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics*. 11: 600. 2010.
- UNAM: "Alineamientos Locales y BLAST". 2006. Consultado: 2012-11-02.
<<http://www.ccg.unam.mx/~contrera/bioinfo/node58.html>>
- Van Wees, S, de Swart, E, Van Pelt, J, Van Loon, L. y Pieterse, C. Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate and jasmonate dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci*. 8711-8716. 2000.
- Villacrés, E, Peralta, E, Egas, L. y Mazón, N. Potencial Agroindustrial de la Quinua. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. 2011.
- Vom Endt, D, Kijne, W. y Memelink, J. Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators?. *Phytochemistry*. 107-114. 2002.
- Vuylsteke, M, Peleman, J. y van Eijk, M. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols*. 1399-1413. 2007.
- Wang, X, Tang, C, Zhang, G, Li, Y, Wang, C, Liu, B, Qu, Z, Zhao, J, Han, Q, Huang, L, Chen, X. y Kang, Z. cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*. *BMC Genomics*. 2009.
- Weiberg, A, Pölher, D, Morgenstern, B. y Karlovsky, P. Improved coverage of cDNA-AFLP by sequential digestion of immobilized cDNA. *BMC Genomics*. 2008.
- Wilson, H.D. Artificial hybridization among species of *Chenopodium* section *Chenopodium*. *Systematic Botany*. 253-263. 1980.

- Wink, M, Ashour, M. y Zaki, M. Secondary metabolites from plant inhibiting ABC transporters and reversing resistance of cancer cells and microbes to cytotoxic and antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*. 1-15. 2012.
- Xiang, Y, Huang, Y. y Xiong, L. Characterization os Stress-REsponsive CIPK Genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology*. 1416-1428. 2007.
- Xiao, X, Li, H. y Tang, C. A Silver-Staining cDNA-AFLP Protocol Suitable for Transcript Profiling in the Latex of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Molecular Biotechnology*. 91-99. 2009.
- Yang, D, Ma, P, Liang, X, Liang, Z, Zhang, M, Shen, S, Liu, H. y Liu, Y. Metabolic Profiles and cDNA-AFLP Analysis of *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia castanea*. *PLOS ONE*. 2012.
- Yendo, A, de Costa, F, Gosmann, G. y Fett-Neto, A. Production of Plant Bioactive Triterpenoid Saponins: Elicitation Strategies and Target Genes to Improve Yields. *Molecular Biotechnology*. 94-104. 2010.
- Yu, G, Duan, J, Yan, H, Song, B. y He, Z. cDNA-AFLP analysis of gene expression differences between the flower bud and sprout-shoot apical meristem of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Genetics and Molecular Biology*. 274-279. 2011.
- Zeng, Y, Pan, Z, Ding, Y, Zhu, A, Xu, Q. y Deng, X. A proteomic analysis of the chromoplasts isolated from sweet orange fruits. *Journal of Experimental Botany*. 5297-5309. 2011.

13. Tablas

Tabla 1. Ecotipos de Quinoa analizados mediante cDNA-AFLP

Código	Localidad	Fenotipo
ECU-524	Carchi - San Gabriel	Quinoa dulce. Grano blanco opaco.
ECU-382	Cotopaxi - Salcedo	Quinoa dulce. Planta amarilla, grano negro.
ECU-225	Pichincha - Mejía	Quinoa dulce. Madurez no uniforme. Grano blanco.
ECU-323	Tungurahua	Quinoa amarga. Grano amarillo intenso.
ECU-229	Pichincha - Mejía	Quinoa amarga. Grano amarillo intenso.
ECU-234	Imbabura - Otavalo	Quinoa amarga. Grano amarillo intenso.

Información proporcionada por la Estación Experimental Santa Catalina - INIAP

Tabla 2. Adaptadores empleados en el cDNA-AFLP *one gene – one tag*

Adaptadores	Iniciales	Secuencia (5' a 3')
MseI adaptador forward	MseI - F	GACGATGAGTCCTGAG
MseI adaptador reverse	MseI - R	TACTCAGGACTCAT
BstYI adaptador forward	BstYI - F	CTCGTAGACTGCGTAGT
BstYI adaptador reverse	BstYI - R	GATCACTACGCAGTCTAC

Tomado de: Vuylsteke, 2007

Tabla 3. Secuencia de Primers empleados en la Pre-amplificación

Primers	Iniciales	Secuencia (5' a 3')	Annealing
<i>BstYI</i> + T primer	<i>BstYI</i> + T	GACTGCGTAGTGATCT	56°C
<i>MseI</i> + 0 primer	<i>MseI</i> + 0	GATGAGTCCTGAGTAA	

Tomado de: Vuylsteke, 2007

Tabla 4. Secuencia de Primers empleados en las reacciones de Amplificación Selectiva

Primers	Iniciales	Secuencia (5' a 3')
<i>Bst</i> YI+T + T Forward	<i>Bst</i> YI-T2	GACTGCGTAGTGATCTC
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 11	GATGAGTCCTGAGTAAA
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 12	GATGAGTCCTGAGTAAAC
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 21	GATGAGTCCTGAGTAACA
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 22	GATGAGTCCTGAGTAACC
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 31	GATGAGTCCTGAGTAAGA
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 33	GATGAGTCCTGAGTAAGG
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 34	GATGAGTCCTGAGTAAGT
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 41	GATGAGTCCTGAGTAATA
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 42	GATGAGTCCTGAGTAATC
<i>Mse</i> I+ N Reverse	<i>Mse</i> I+ 44	GATGAGTCCTGAGTAATT

*Secuencias proporcionadas por: Dr. Jacob Pollier – Universidad Ghent (Bélgica)

*En color rojo se observan los nucleótidos selectivos de los primers empleados en la amplificación selectiva.

Tabla 5. Cuantificación de ARN extraído para 30 muestras empleadas en la técnica cDNA-AFLP *one gene – one tag*.

Ecotipos Dulces	Muestra	(ng/μl)	Ecotipos Amargos	Muestra	(ng/μl)
ECU-524	15	401.86	ECU-323	22	199.84
	59	3302.2		71	276.56
	128	103.00		106	281.57
	102	452.41		91	608.31
	164	183.08		162	183.08
ECU-382	13	1332.32	ECU-229	28	1620.46
	40	273.94		62	230.84
	116	607.73		124	144.73
	82	692.66		97	375.06
	146	282.78		154	469.59
ECU-225	5	103.67	ECU-234	32	820.52
	48	243.31		37	289.16
	113	2566.98		135	105.88
	75	1092.77		84	738.08
	136	300.24		152	160.98

*Cuantificación realizada en NanoDrop Thermo Scientific 1000

Tabla 6. Total de bandas diferenciales extraídas de geles de acrilamida por cada ecotipo

Ecotipo	Fenotipo	10 Primers						n° Total de Bandas
		Sobre expresión			Sub expresión			
		8hs	24hs	8hs y 24hs	8hs	24hs	8hs y 24hs	
ECU-524	Dulce	6	15	1		7	4	33
ECU-382	Dulce		4	2			1	7
ECU-225	Dulce	2	31	4		10	1	48
ECU-323	Amarga	6	4	15			3	28
ECU-229	Amarga	2	28	2		9		41
ECU-234	Amarga	4	6	11			2	23
Total Bandas		20	88	35	0	26	11	180

8hs: expresión sólo a las 8 horas de haber aplicado el tratamiento con metiljasmonato (MeJA)

24hs: expresión sólo a las 24 horas de haber aplicado el tratamiento con metiljasmonato (MeJA)

8hs y 24hs: expresión a las 8 y 24 horas luego de haber aplicado el tratamiento con metiljasmonato (MeJA)

*Los números indican el número de bandas diferenciales totales extraídas en cada tratamiento y cada ecotipo

Tabla 7. Bandas diferenciales que se sobre expresaron como resultado de la aplicación de metiljasmonato y que fueron seleccionadas para el análisis de secuenciación

Código	Ecotipo	Primers Re-amplificación	Tamaño (pb)	Expresión
10.3	225	BstY+T2-MseI 12	180	Sobreexpresión 8hs
30	524	BstY+T2-MseI 21	140	Sobreexpresión 8hs y 24hs
40.2	234	BstY+T2-MseI 21	320	Sobreexpresión 8hs y 24hs
45.1	524	BstY+T2-MseI 22	255	Sobreexpresión 8hs y 24hs
58.1	234	BstY+T2-MseI 22	180	Sobreexpresión 8hs y 24hs
62	225	BstY+T2-MseI 31	270	Sobreexpresión 8hs
75.1	229	BstY+T2-MseI 31	330	Sobreexpresión 8hs
79	229	BstY+T2-MseI 31	165	Sobreexpresión 8hs y 24hs
101	225	BstY+T2-MseI 11	155	Sobreexpresión 8hs y 24hs
123	524	BstY+T2-MseI 33	165	Sobreexpresión 8hs
130	323	BstY+T2-MseI 33	330	Sobreexpresión 8hs
132	323	BstY+T2-MseI 33	255	Sobreexpresión 8hs
135	323	BstY+T2-MseI 33	180	Sobreexpresión 8hs
143	234	BstY+T2-MseI 33	135	Sobreexpresión 8hs
148	382	BstY+T2-MseI 34	165	Sobreexpresión 8hs y 24hs
163	234	BstY+T2-MseI 34	230	Sobreexpresión 8hs
166	524	BstY+T2-MseI 41	315	Sobreexpresión 8hs
168	524	BstY+T2-MseI 41	215	Sobreexpresión 8hs y 24hs
176	323	BstY+T2-MseI 41	155	Sobreexpresión 8hs
182	234	BstY+T2-MseI 41	125	Sobreexpresión 8hs
4.2	225	BstY+T2-MseI 42	330	Sobreexpresión 8hs y 24hs
17.1	382	BstY+T2-MseI 12	110	Sobreexpresión 8hs y 24hs
38.1	323	BstY+T2-MseI 21	290	Sobreexpresión 8hs y 24hs
46.3	524	BstY+T2-MseI 22	240	Sobreexpresión 8hs y 24hs
72.1	323	BstY+T2-MseI 31	330	Sobreexpresión 8hs y 24hs

Código: código de identificación de banda

Ecotipo: ecotipo de quinoa del cual se aisló la banda

Primers: primers empleados para re-amplificación

Tamaño: tamaño de la banda diferencial aislada en gel de acrilamida

Expresión: detalle de expresión de banda en tratamientos a las 8 y 24 hs de haber aplicado metiljasmonato.

Tabla 8. Homologías encontradas para las bandas diferenciales en la base de datos del GenBank (NCBI) y cDNA (TAIR) mediante las herramientas BLASTn y BLAST cDNA ref/seq respectivamente

Banda	Homología			
	BLASTn	valor-E	BLAST cDNA ref/seq	valor-E
10.3	Succinato deshidrogenasa	4E-31	Succinato deshidrogenasa	1E-13
30	ARN ribosomal		Proteína rica en glicina	0.33
40.2	Proteína arabinogalactano	0.0003	Oxidasa alternativa (AOX1C)	0.3
45.1	No se encontró homología		Metionina S-metiltransferasa	0.62
53.1	β -enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintasa	1E-17	Proteína facilitadora principal	0.31
62	No se encontró homología		Proteína desconocida	
75.1	Fragmento cDNA-AFLP <i>Catharanthus roseus</i>	0.51	Factor de Transcripción de respuesta al etileno (ERF38)	1.3
79	Fragmento cDNA-AFLP <i>Medicago truncatula</i>	0.51	ARN ribosomal	
101	Fragmento cDNA-AFLP <i>Medicago truncatula</i>	0.73	Proteína de la familia F-box	1.5
123	Fragmento cDNA-AFLP <i>Sesbania rostrata</i>	0.17	Monooxigenasa (CYP94D2)	0.49
130	Fragmento cDNA-AFLP <i>Vitis vinifera</i>	2E-20	Proteína Glicosil Hidrolasa	0.39
132	Proteína no caracterizada <i>Glycine max</i>	6E-55	Proteína con dominio ACT (ACR4)	0.0006
135	No se encontró homología		Proteína desconocida	
143	Fragmento cDNA-AFLP <i>Medicago truncatula</i>	0.57	Factor de Elongación EF-2 (LOS1)	1.4
148	Fragmento cDNA-AFLP <i>Vitis vinifera</i>	0.068	Proteína desconocida	
165	No se encontró homología		Monooxigenasa CYP71A23	0.55
166	Quinona reductasa	2E-17	Quinona reductasa	0.0002
168	Fragmento cDNA-AFLP <i>Vitis vinifera</i>		Proteína desconocida	
176	No se encontró homología		No se encontró homología	
182	No se encontró homología		No se encontró homología	
4.2	Fragmento cDNA-AFLP <i>Catharanthus roseus</i>	0.19	Sulfotransferasa 4A	0.33
17.1	No se encontró homología		No se encontró homología	
53.1	No se encontró homología		Serina/ treonina-Proteína quinasa 23 (CIPK23)	0.62
46.3	O- aciltransferasa	7E-16	Coactivador transcripcional (MBF1B)	0.053
72.1	Proteína asociada a lípidos	0.0002	Proteína desconocida	0.047

BLASTn: Nucleotide Blast – Base de datos genómica del NCBI

BLAST cDNA ref/seq: Base de datos de cDNA para *Arabidopsis thaliana* (TAIR)

Tabla 9. Función asociada a los 20 genes descubiertos

Respuesta a estrés / Mecanismos de Defensa

Gen	Base de Datos	Accession
Succinato deshidrogenasa	NCBI	XM_003537535.1
Proteína arabinogalactano	NCBI	XM_003596884.1
Quinona reductasa	NCBI	XM_003634644.1
Proteína asociada a lípidos	NCBI	XM_002275671.1
Proteína rica en glicina	TAIR	NM_124073.3
Oxidasa alternativa (AOX1C)	TAIR	NM_113678.2
Proteína facilitadora principal	TAIR	NM_128372.2
Proteína con dominio ACT (ACR4)	TAIR	NM_105575.2
Factor de Elongación EF-2 (LOS1)	TAIR	NM_179487.1
Serina/treonina-Proteína quinasa 23 (CIPK23)	TAIR	NM_102766.5

Reguladores de la Transcripción

Gen	Base de Datos	Accession
Factor de Transcripción de respuesta al etileno (ERF38)	TAIR	NM_129125.1
Proteína de la familia F-box	TAIR	NM_120090.1
Coactivador transcripcional (MBF1B)	TAIR	NM_115730.3

Metabolismo

Gen	Base de Datos	Accession
5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintasa	NCBI	FJ861243.1
O- aciltransferasa*	NCBI	XM_003552469.1
Metionina S-metiltransferasa*	TAIR	NM_124359.3
Monooxigenasa (CYP94D2)*	TAIR	NM_115522.3
Proteína Glicosil Hidrolasa	TAIR	NM_114571.1
Monooxigenasa CYP71A23*	TAIR	NM_148856.2
Sulfotransferasa 4A	TAIR	NM_127056.1

* Genes potencialmente asociados a la biosíntesis de saponinas triterpénicas

14. Figuras

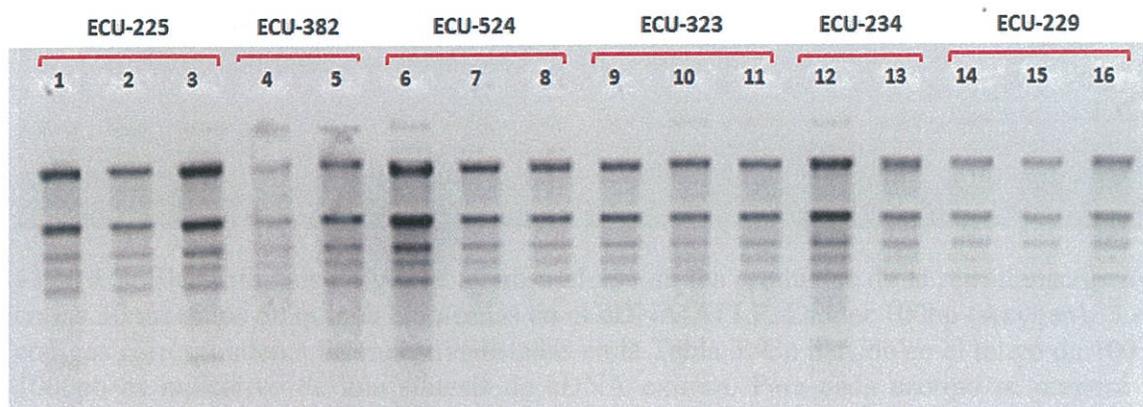
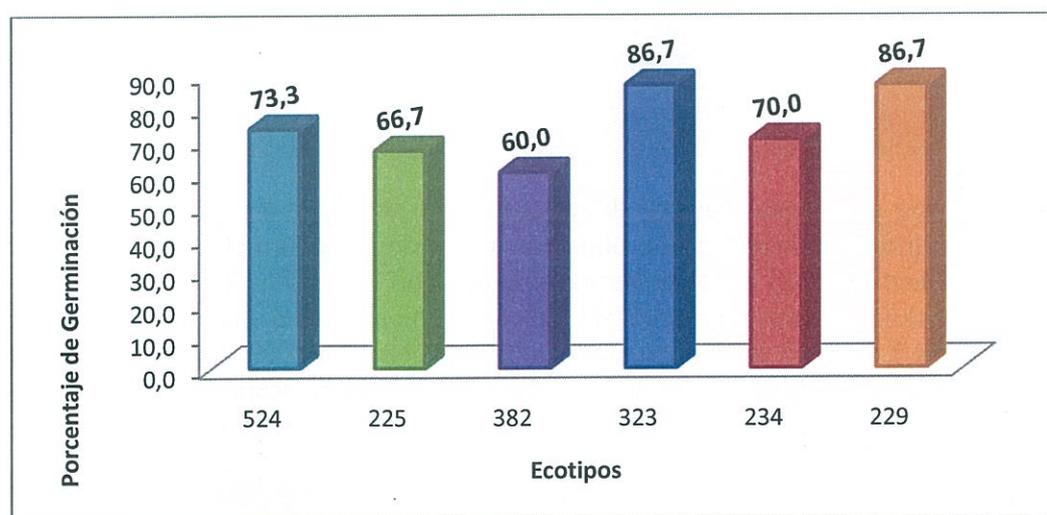


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la extracción de ARN total. Las dos bandas de mayor intensidad corresponden a las subunidades 28S y 18S de ARN ribosomal. Las bandas de menor intensidad representan el ARN mensajero. Los pocillos 1, 4, 6, 9, 12 y 14 corresponden al ARN extraído de muestras colectadas de plantas de quinoa sin aplicación de tratamientos. Los pocillos 2, 5, 7, 10, 13 y 15 corresponden al ARN extraído de muestras colectadas de plantas de quinoa luego de 8 horas de aplicar el tratamiento con metiljasmonato. Los pocillos 3, 8, 11 y 16 corresponden al ARN extraído de muestras colectadas de plantas de quinoa luego de 24 horas de aplicar el tratamiento con metiljasmonato.



Los porcentajes fueron calculados en función del número de semillas germinadas del total de 30 semillas sembradas para cada ecotipo de quinoa.

Figura 2. Porcentajes de Germinación de Semillas de Quinoa en los 6 ecotipos analizados.

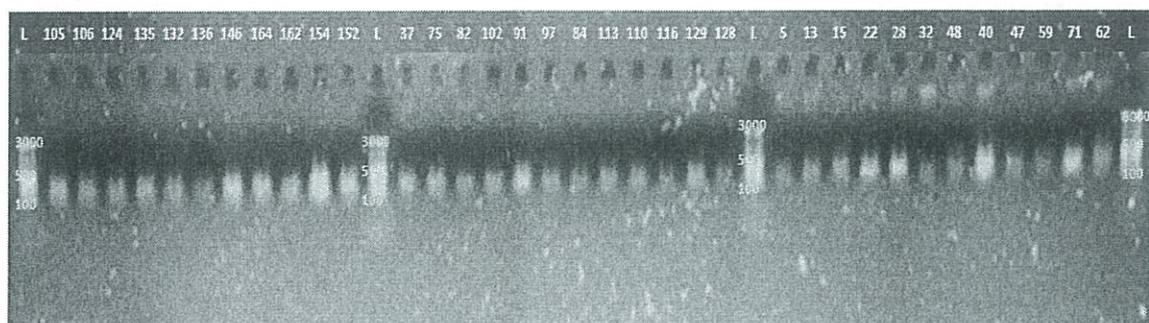


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la retrotranscripción en las 30 muestras de quinoa empleadas en el cDNA-AFLP. Ladder 100bp (Axygen). Los códigos corresponden a las muestras listadas en la Tabla 5. Un barrido en el rango de 100 a 1000pb es indicativo de una síntesis de cDNA exitosa. Para cada ecotipo se procesó 5 muestras en los tiempos T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato).

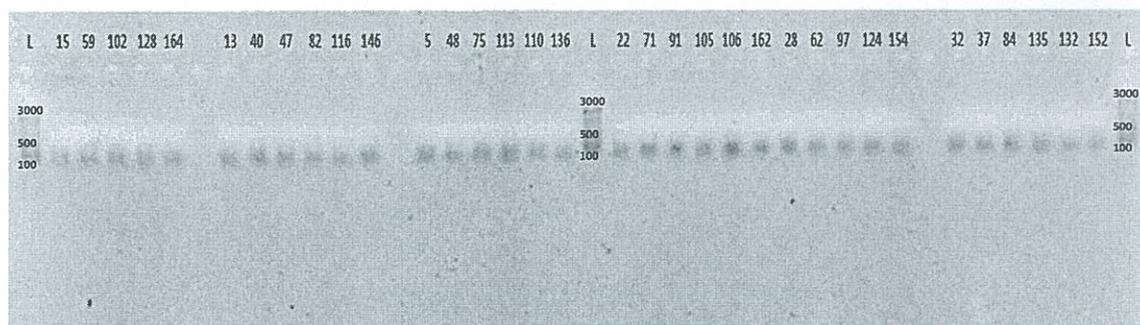


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la pre-amplificación en las 30 muestras de quinoa analizadas empleando la combinación de primers *Bst*YI+T y *Mse*I. Ladder 100bp (Axygen). Los códigos corresponden a las muestras listadas en la Tabla 5. Se evidenció amplificación en todas las muestras, pues se observa un barrido sustancial entre 50 y 500 pares de bases. Para cada ecotipo se procesó 5 muestras en los tiempos T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato).

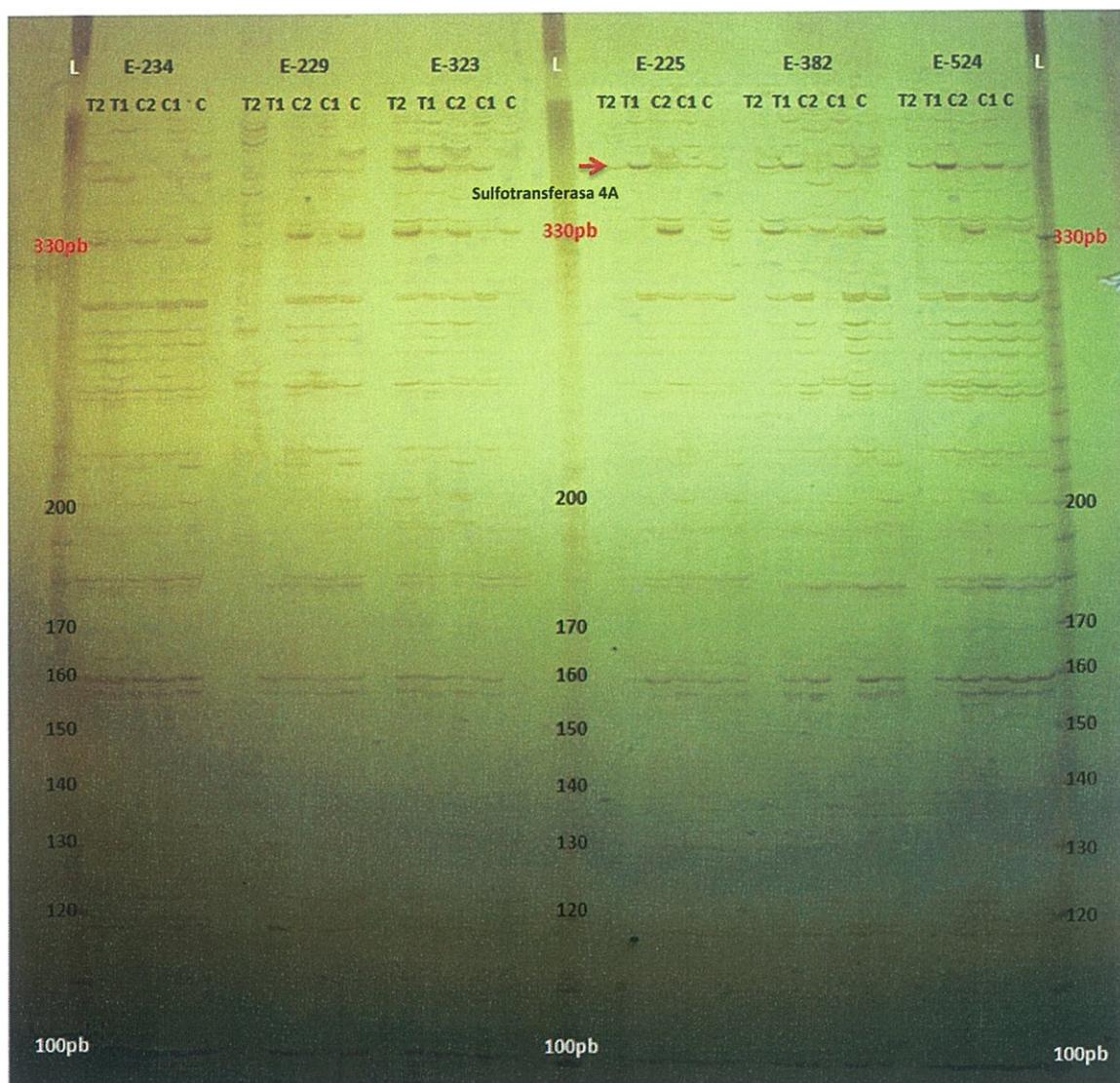


Figura 5. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 42. Ladder 10bp (Invitrogen). La flecha roja indica la banda diferencial extraída de este gel que posteriormente fue secuenciada. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

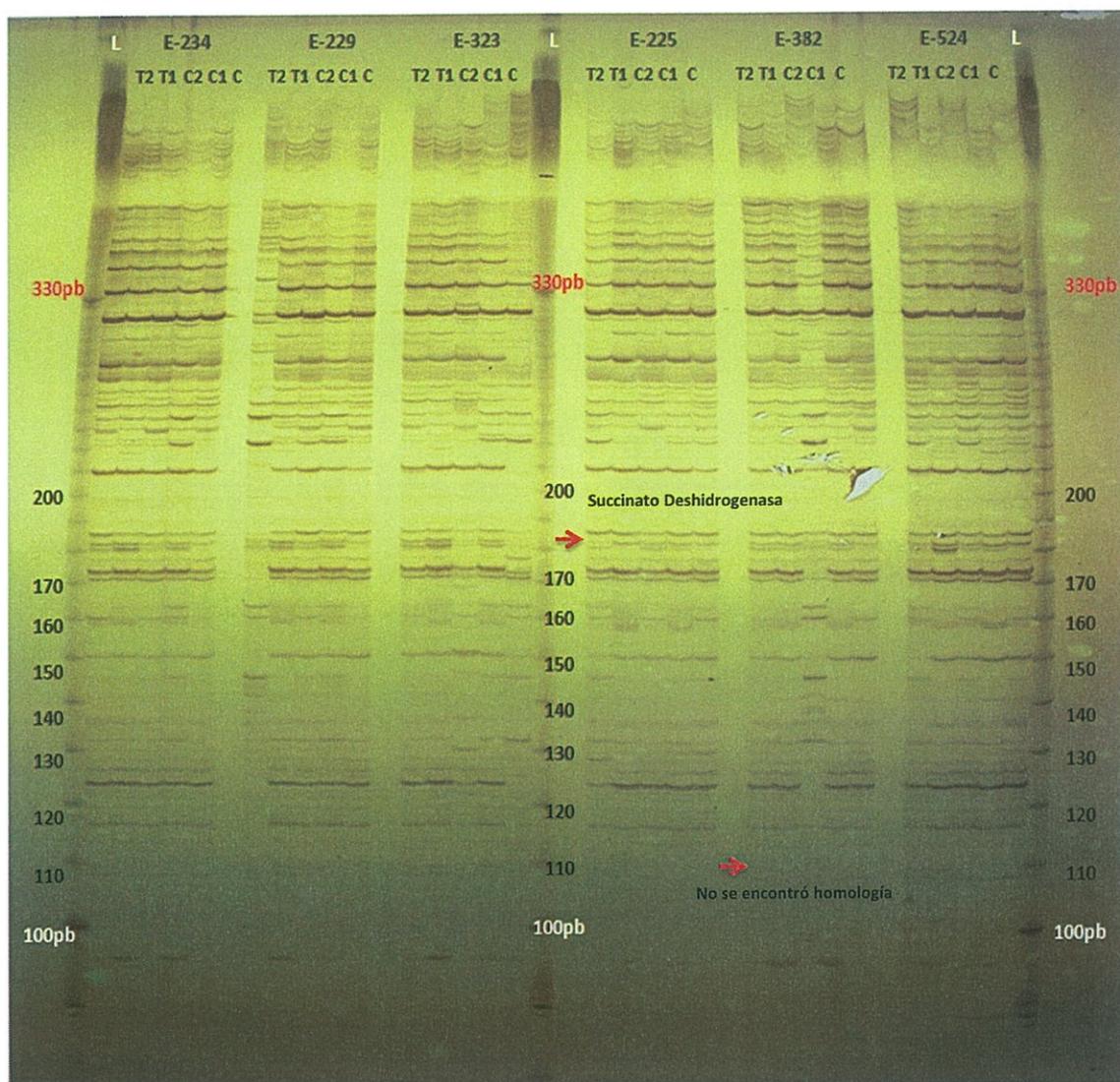


Figura 6. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 12. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

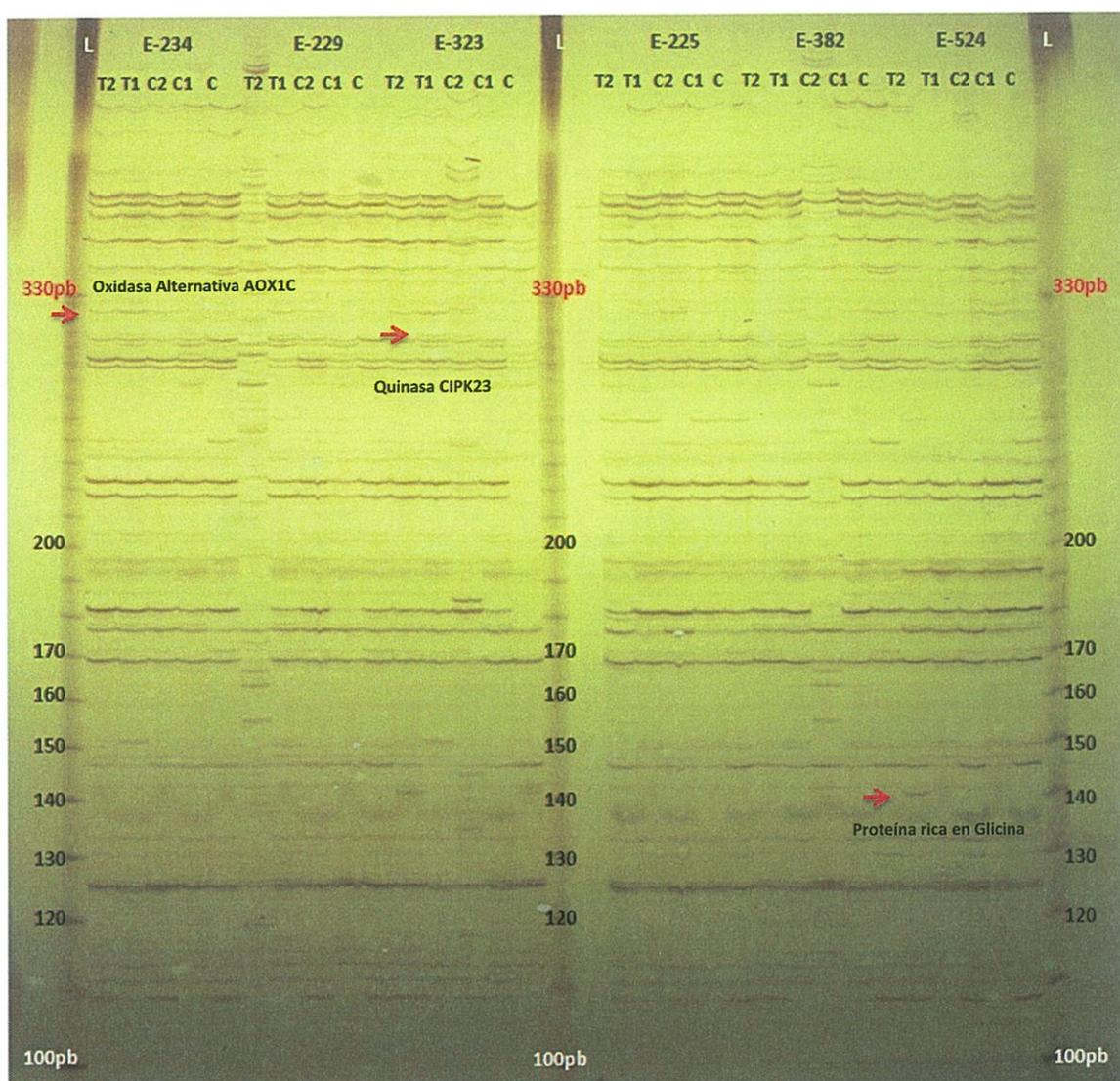


Figura 7. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 21. Ladder 10pb (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

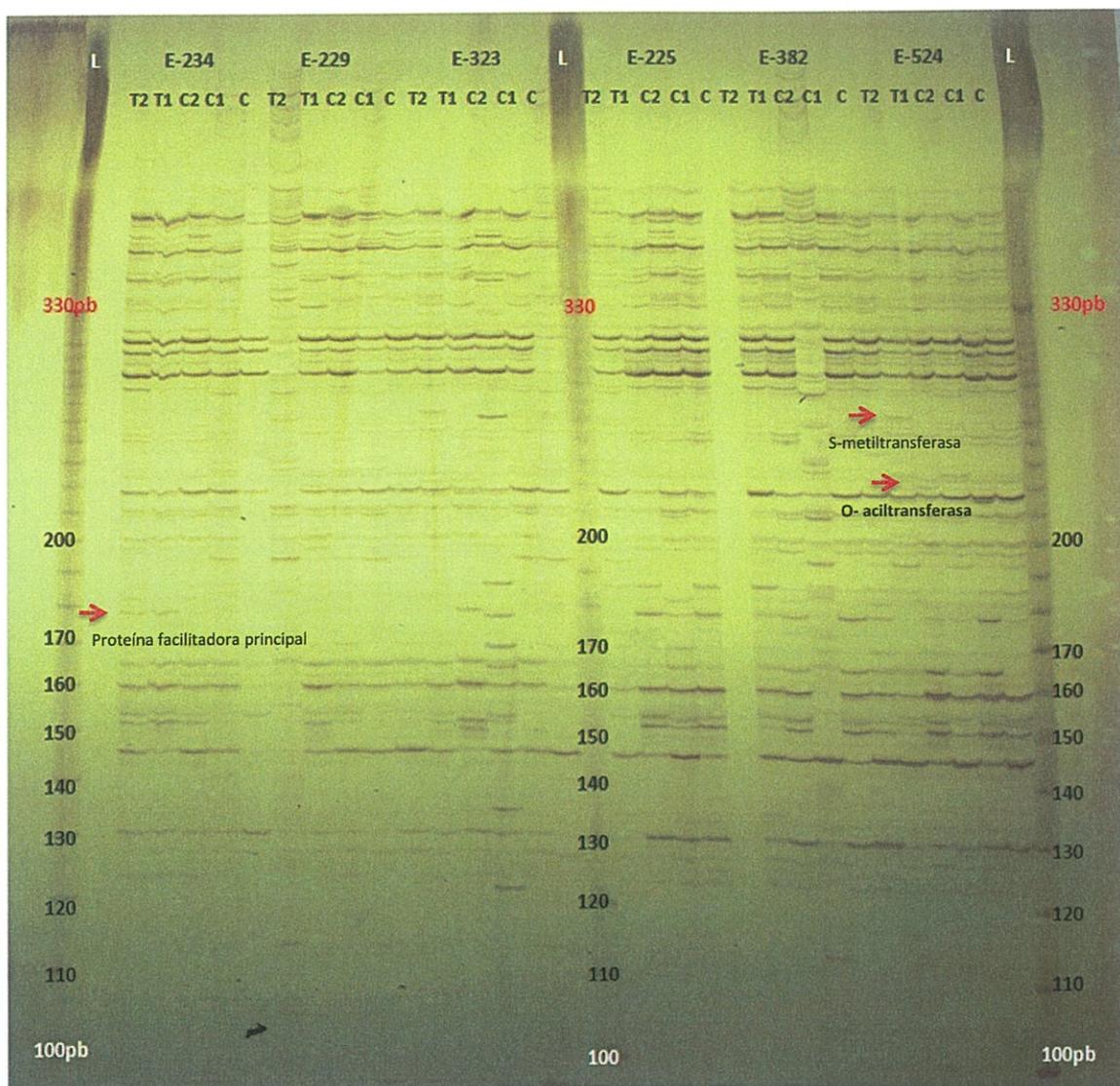


Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 22. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

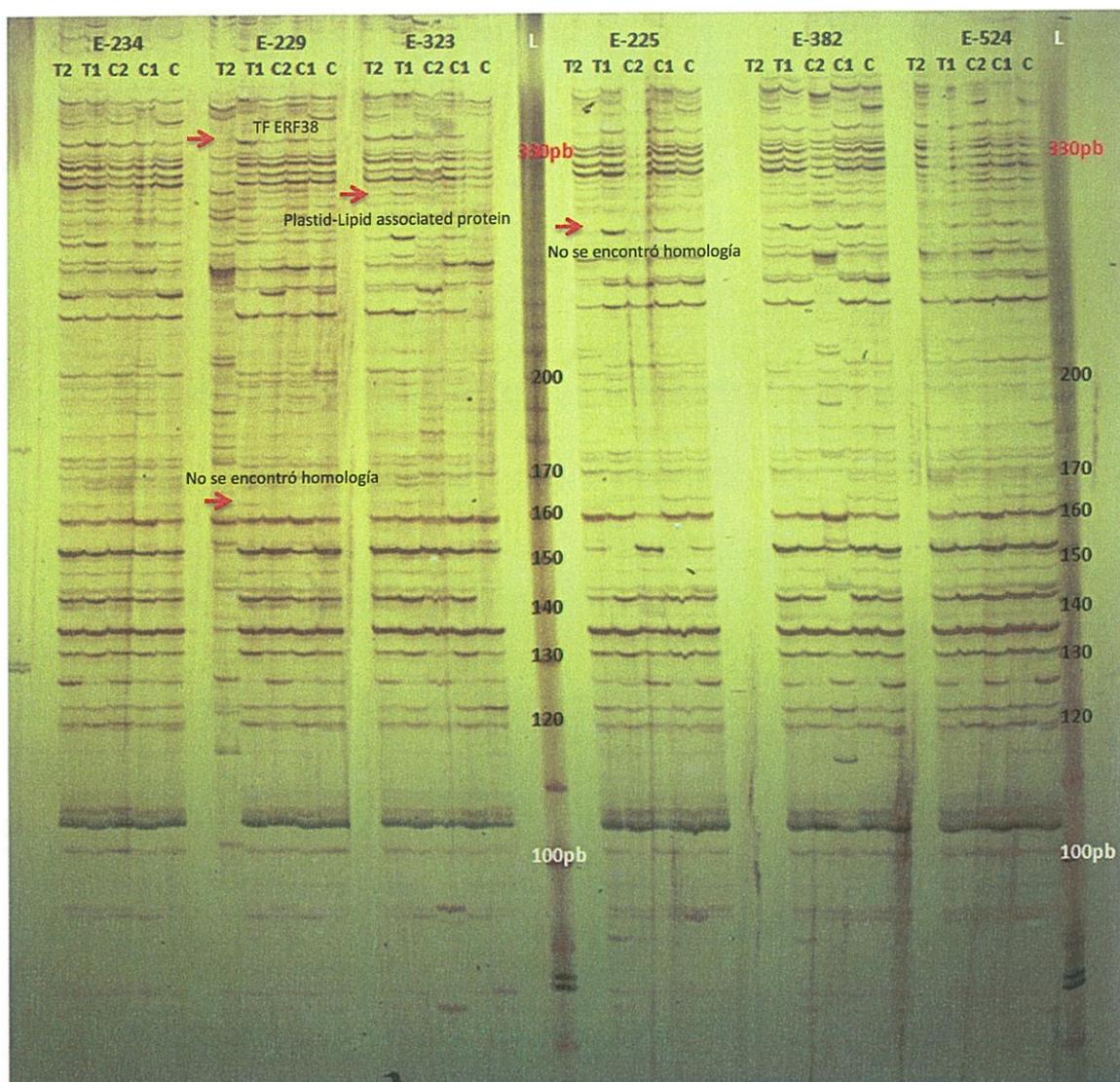


Figura 9. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 31. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

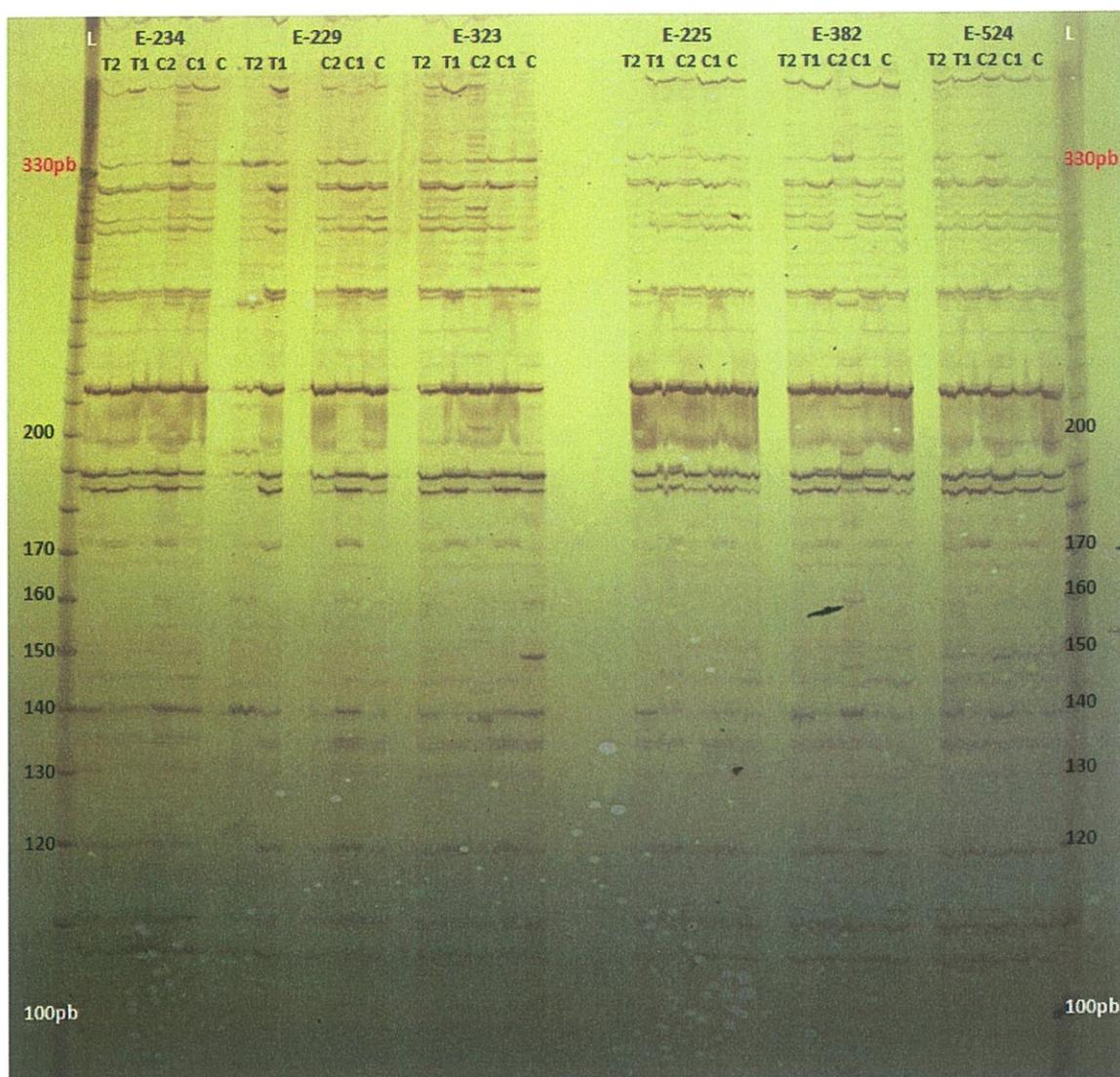


Figura 10. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 44. Ladder 10bp (Invitrogen). No se secuenció bandas extraídas de este gel. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato).



Figura 11. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 11. Ladder 10bp (Invitrogen). La flecha roja indica la banda diferencial extraída de este gel que posteriormente fue secuenciada. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

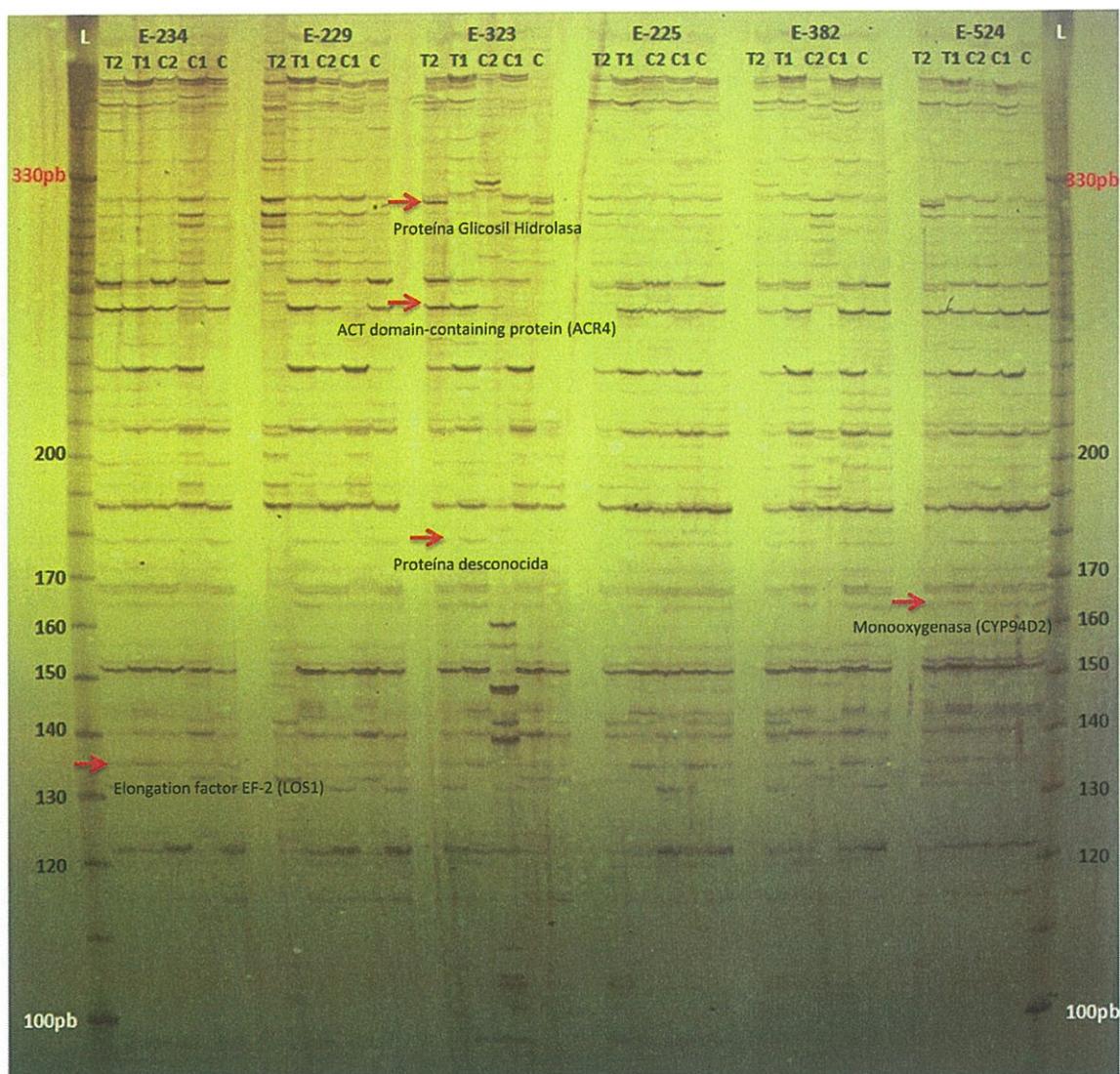


Figura 12. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 33. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

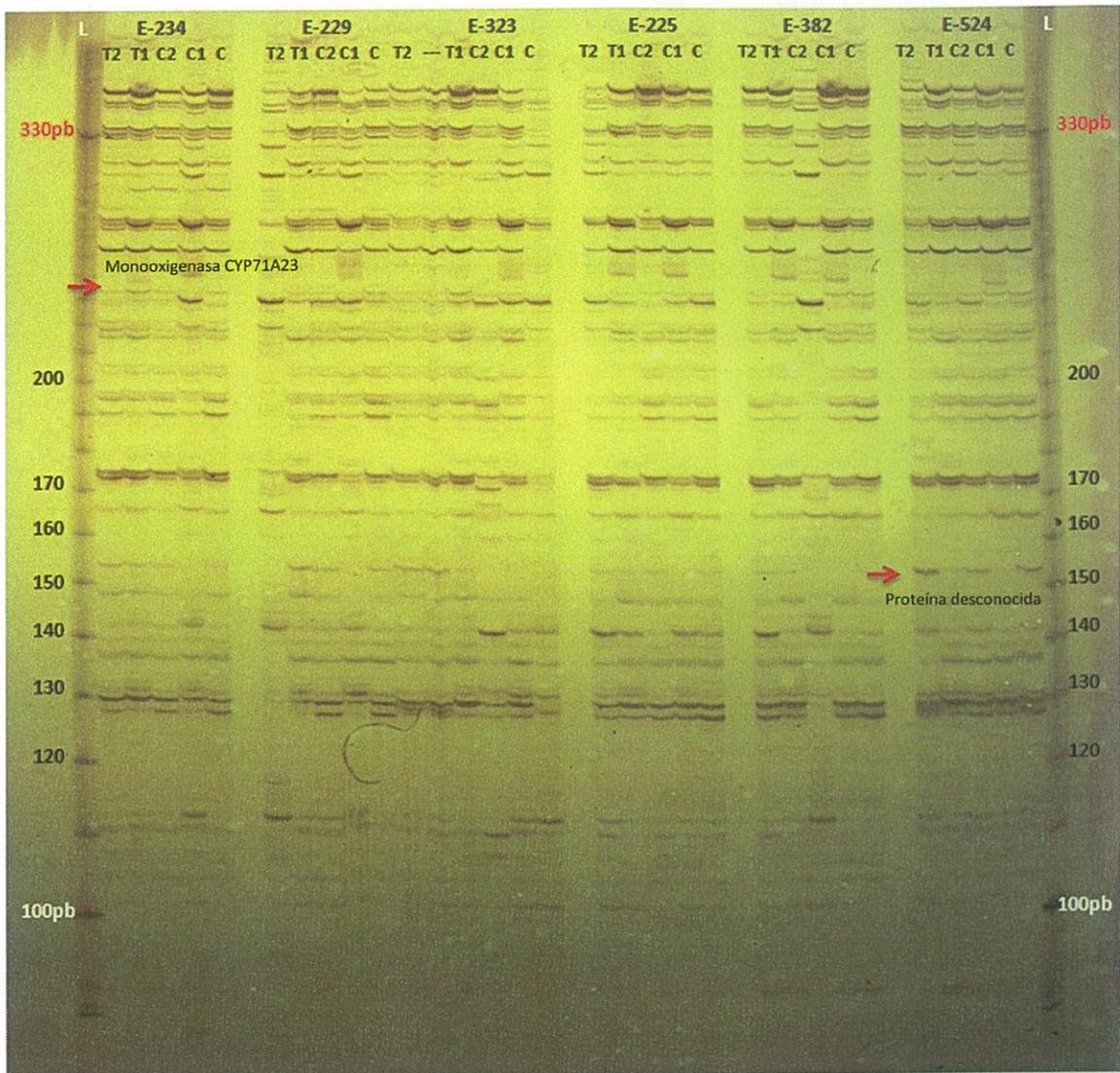


Figura 13. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 34. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

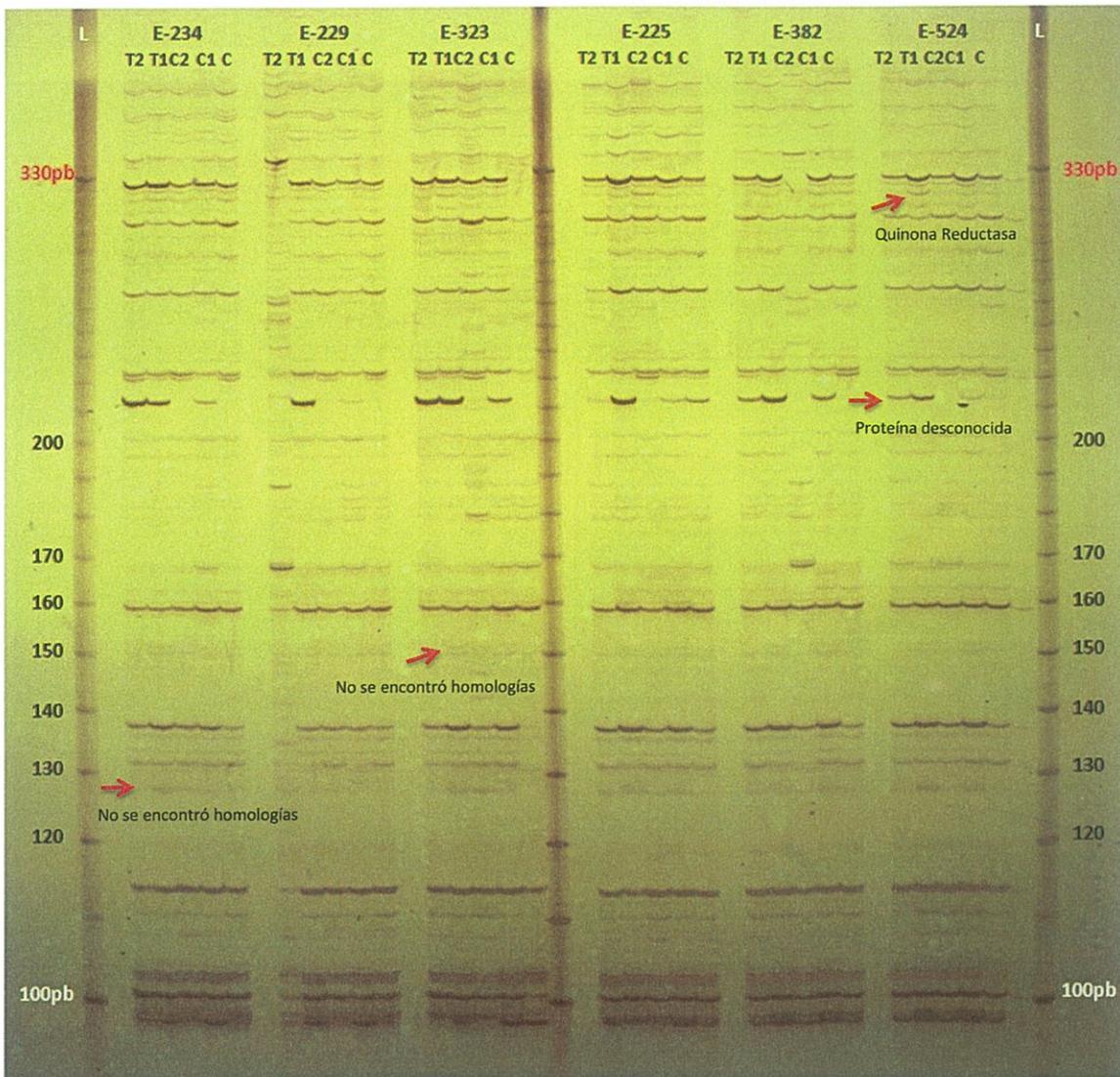


Figura 14. Electroforesis en gel de acrilamida 6% de los productos de la amplificación selectiva empleando la combinación de primers *Bst*YI + T2/*Mse*I 41. Ladder 10bp (Invitrogen). Las flechas rojas indican las bandas diferenciales extraídas de este gel que posteriormente fueron secuenciadas. Ecotipos de quinoa amarga: 234, 229 y 323. Ecotipos de quinoa dulce: 225, 382 y 524. Para cada ecotipo: T0 (sin aplicar tratamientos), T1c (8hs control), T1t (8hs tratamiento con metiljasmonato), T2c (24hs control) y T2t (24hs tratamiento con metiljasmonato). Junto a la flecha roja se indica la homología encontrada para dicha banda.

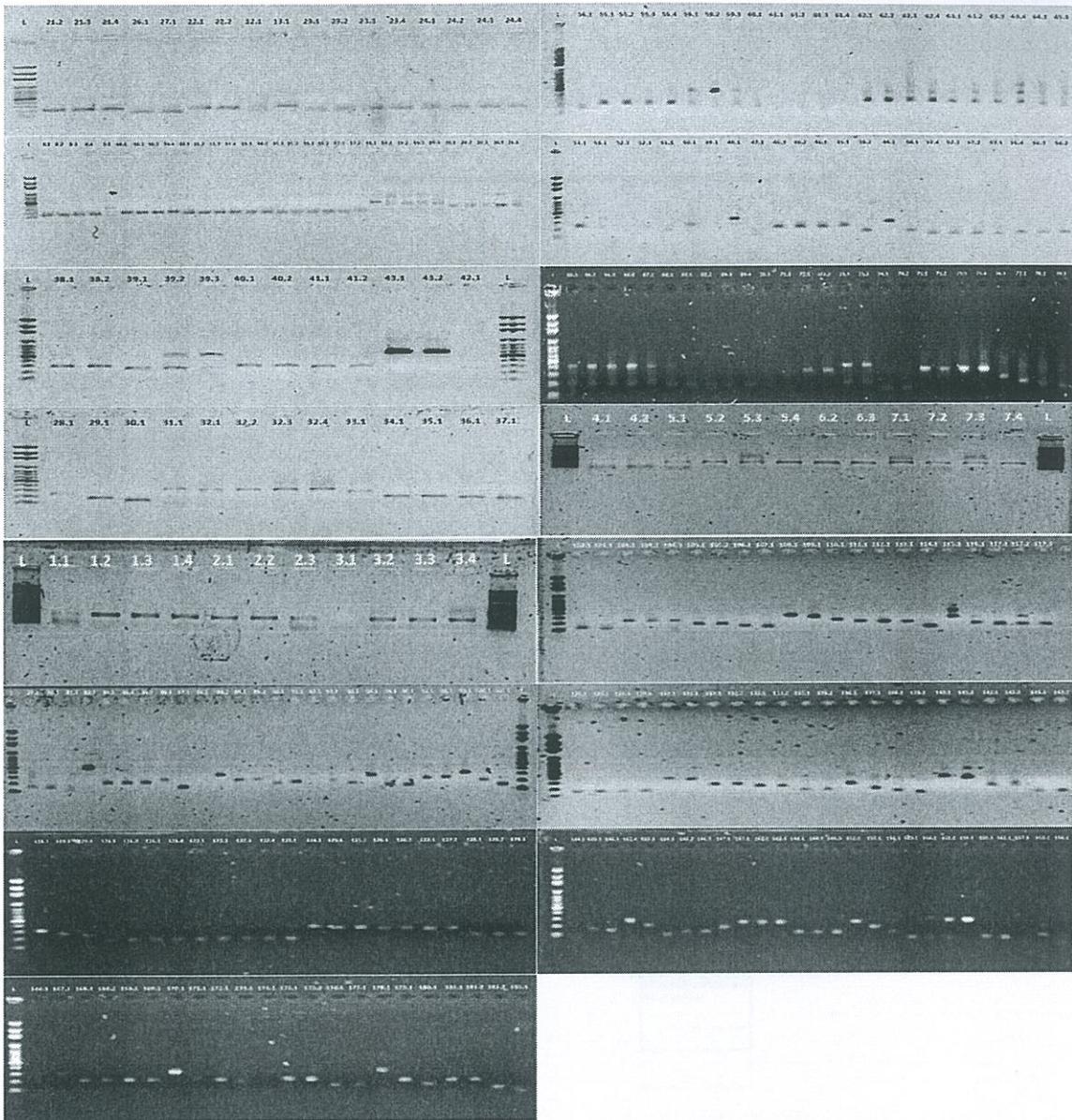
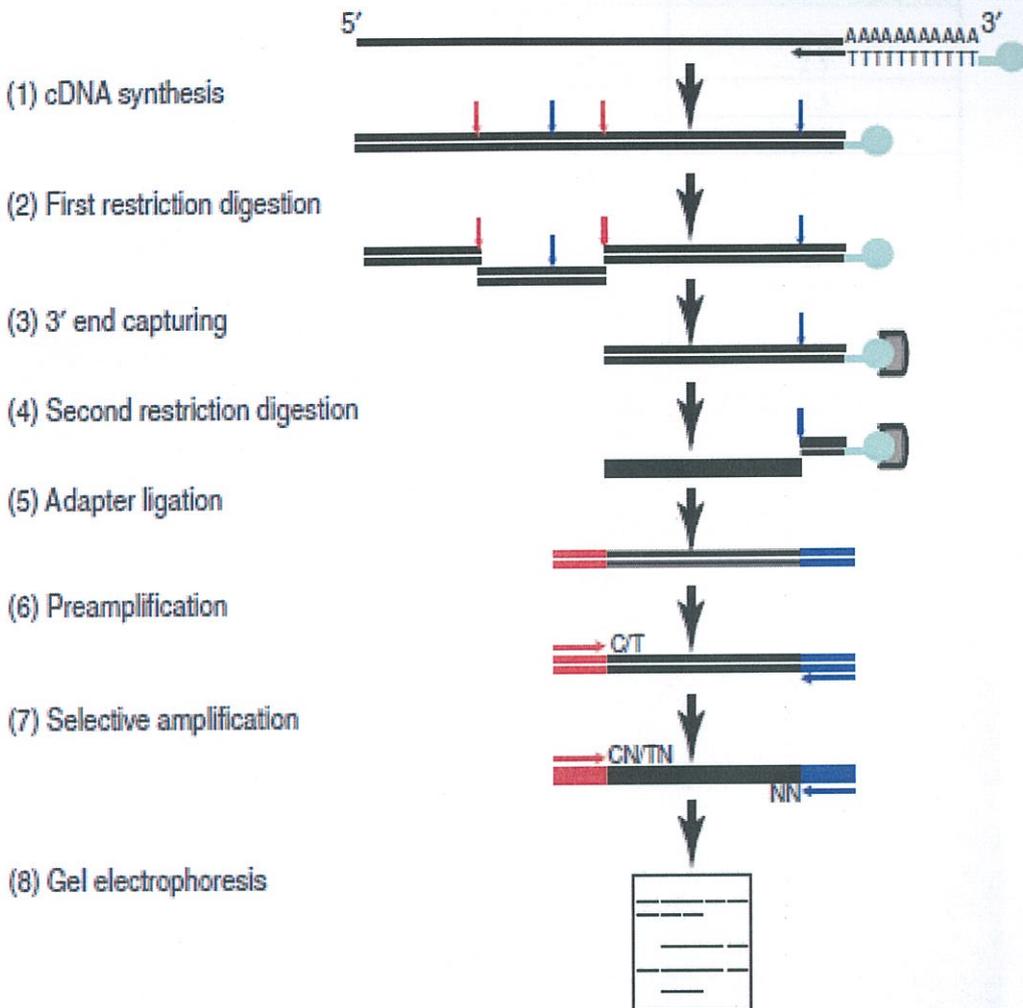


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la re-amplificación de las 180 bandas diferenciales aisladas. En la mayoría de casos se observa una sola banda, lo cual es indicativo de una re-amplificación exitosa. Los números que se observan en los gels corresponden a los códigos designados a cada banda diferencial aislada. Se observa la re-amplificación de las 180 bandas extraídas en total a partir de los 10 gels de acrilamida.

15. Anexos

Anexo 1. Diagrama de la técnica cDNA-AFLP one gene – one tag. Imagen tomada de Vuyksteke et al, 2007.



Anexo 2. Composición de la Solución Nutricional Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950)

Hoagland Solution (Hoagland y Arnon, 1950)		
Component	Solución Stock	mL de Solución Stock / 1L
Macronutrientes		
2M KNO ₃	202g/L	2.5
2M Ca(NO ₃) ₂ - 4H ₂ O	236g/0.5L	2.5
Hierro (Sprint 138 iron chelate)	15g/L	1.5
2MMgSO ₄ - 7H ₂ O	493g/L	1
1MNH ₄ NO ₃	80g/L	1
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	2.86g/L	
MnCl ₂ - 4H ₂ O	1.81g/L	
ZnSO ₄ - 7H ₂ O	0.22g/L	
CuSO ₄	0.051g/L	
H ₃ MoO ₄ - H ₂ O	0.09g/L	
1M KH ₂ PO ₄ (ph 6.0 con 3M KOH)	136g/L	0.5

Aforara 1L

Anexo 3. Aplicación de tratamiento con metiljasmonato en invernaderos caseros construidos para plantas de Quinoa (*Chenopodium quinoa* W.)



Anexo 4. Programas de PCR empleados en la reacción de pre-amplificación y amplificación selectiva

Programa PCR Pre-amplificación			
Nº de ciclos	Denaturación	Annealing	Extensión
1	94°C, 10 s		
25	94°C, 30 s	56°C, 1 min	72°C, 1 min
1			72°C, 1 min

Programa PCR Amplificación Selectiva			
Nº de ciclos	Denaturación	Annealing	Extensión
1	94°C, 10 min		
13	94°C, 30 s	65°C, 30 s (-0.7°C cada ciclo)	72°C, 1 min
23	94°C, 30 s	56°C, 30 s	72°C, 1 min
1			72°C, 2 min