



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA VARIABILIDAD
GENÉTICA Y TOLERANCIA A GLIFOSATO DE VARIEDADES
COMERCIALES DE SOYA (*Glycine max* (L.)), DEL LITORAL
ECUATORIANO.”**

AUTORA: ANDRADE CÁRDENAS, CYNTHIA ESTEFANÍA

DIRECTORA: SEGOVIA SALCEDO, MARÍA CLAUDIA PhD.

SANGOLQUÍ

2019

CERTIFICACIÓN



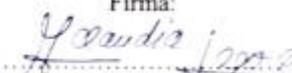
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización molecular de la variabilidad genética y tolerancia a glifosato de variedades comerciales de soya (*Glycine max* (L.)), del Litoral Ecuatoriano**” fue realizado por la señorita *Andrade Cárdenas, Cynthia Estefanía* el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 2 de julio de 2019

Firma:


.....
María Claudia Segovia Saucedo, PhD.

C. C.170.908.5998

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, *Andrade Cárdenas, Cynthia Estefanía*, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: “**Caracterización molecular de la variabilidad genética y tolerancia a glifosato de variedades comerciales de soya (*Glycine max* (L.)), del Litoral Ecuatoriano**” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 2 de julio de 2019

Firma:

Cynthia Estefanía Andrade Cárdenas

C. C. 0603616241.....

AUTORIZACIÓN



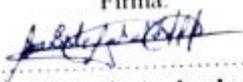
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Andrade Cárdenas, Cynthia Estefania*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el presente trabajo de titulación: **“Caracterización molecular de la variabilidad genética y tolerancia a glifosato de variedades comerciales de soya (*Glycine max* (L.)), del Litoral Ecuatoriano”** en el Repositorio Institucional a partir de septiembre de 2021 cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 19 de septiembre de 2019

Firma:


.....
Cynthia Estefania Andrade Cárdenas

C. C. 060581934.....

DEDICATORIA

Sin dudar, este trabajo es dedicado a mi querida madre Betty por ser la persona que más admiro y el pilar fundamental de mi vida. Con su apoyo incondicional nunca dejo que me rinda ella me enseñó que con esfuerzo, disciplina, responsabilidad y sobre todo constancia se logran cumplir todos nuestros sueños y anhelos.

Te amo con todo mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la vida, por permitirme disfrutar de ella y ayudarme a cumplir una más de mis metas.

A mi directora del proyecto de titulación Claudia Segovia Ph.D., quien me apoyo en la realización de esta tesis, por su orientación, seguimiento, supervisión y por brindarme su valioso tiempo.

Quiero extender un sincero agradecimiento al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), al Departamento Nacional de Biotecnología (DNB). A el Dr. Eduardo Morillo, jefe del Departamento, por sus sugerencias, ayuda y por su confianza depositada en mí para la realización de este trabajo. A la Ingeniera Johana Buitrón, el Ingeniero Santi y Doña Geo por sus enseñanzas, ayuda, paciencia y sobre todo por brindarme su linda amistad.

A mis padres, abuelitos y tíos por su amor, cariño, paciencia, apoyo y constante preocupación, muchas gracias por confiar en mí, a ustedes les debo todo lo que soy.

Gracias a todas las personas que de una u otra forma me apoyaron y colaboraron en el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
CAPÍTULO I:.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Marco Teórico.....	4
1.4.1 Soya (Glycine max (L.)).....	4
1.4.2 Mejoramiento genético e importancia del análisis de diversidad genética.....	9
1.4.3 Herbicidas y Resistencia.....	16
1.4.4 Cultivos transgénicos.....	21
1.5 Hipótesis.....	23
CAPÍTULO II: 24	
2 METODOLOGÍA 24	
2.1 Participantes.....	24
2.2 Zona de estudio.....	25
2.3 Procedimiento.....	25
2.3.1 Material vegetal.....	25
2.3.2 Extracción de ADN.....	25
2.3.3 Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro Epoch™ de BioTek.....	26
2.3.4 Validación de ADN de soya.....	26

2.3.5	Validación de Primers Microsatélites	27
2.3.6	Amplificación utilizando metodología M-13 Tailing	29
2.3.7	Corrida electroforética de productos PCR	31
2.3.8	Genotipaje de la colección de Soya en el software SAGAGT Microsatélite.....	31
2.3.9	Análisis de datos.....	32
2.3.10	Diversidad Genética	32
2.3.11	Estructura Genética	33
2.3.12	Asignación genética	36
2.3.13	Análisis molecular de Varianza.....	37
2.3.14	Análisis molecular de la región 35-S y EPSPS-NOS del gen cp4-epsps que da resistencia a Glifosato.....	37
2.3.15	Secuenciación.....	40
2.3.16	Alineamiento múltiple.....	40
CAPÍTULO III: 42		
3 RESULTADOS 42		
3.1	Extracción y cuantificación de ADN genómico	42
3.2	Validación de muestras de ADN	42
3.3	Validación de Primers	42
3.4	Pruebas de amplificación y dúplex de primers con la técnica M13- <i>Tailing</i> para el analizador LI-COR 4300.....	43
3.5	Amplificación, Corrida electroforética y Genotipaje en el LI-COR 4300	45
3.6	Análisis de Datos	46
3.6.1	Diversidad Genética	46
3.7	Estructura Genética.....	48
3.7.1	Análisis de agrupamiento	48
3.7.2	Análisis de coordenadas principales	50
3.8	Asignación Genética.....	52
3.9	Análisis de AMOVA	54
3.10	Detección molecular de soya modificada genéticamente	55
3.10.1	Alineamiento múltiple.....	60
CAPÍTULO IV:.....		62
4 DISCUSIÓN.....		62
4.1	Extracción y validación de ADN.....	62

4.2	Validación de Primers	63
4.3	Diversidad Genética	64
4.4	Estructura Genética.....	67
4.5	Asignación genética.....	69
4.6	Análisis de AMOVA	70
4.7	Detección de la proteína CP4-EPSPS en variedades de soya.....	71
CAPÍTULO V:.....		77
5 CONCLUSIONES.....		77
CAPÍTULO VI:.....		80
6 RECOMENDACIONES		80
CAPÍTULO VII:.....		81
7 BIBLIOGRAFÍA		81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Taxonomía</i>	7
Tabla 2 <i>Protocolo para PCR de validación de ADN de soya</i>	27
Tabla 3 <i>Programa de termociclado para PCR de validación de ADN de soya</i>	27
Tabla 4 <i>Marcadores microsatélites de soya</i>	28
Tabla 5 <i>Protocolo para PCR empleando la metodología M-13 tailing</i>	30
Tabla 6 <i>Programa de termociclado para PCR de validación de ADN de soya</i>	30
Tabla 7 <i>Protocolo de PCR empleado en la detección del promotor 35-S y el terminador EPSPS-NOS</i>	38
Tabla 8 <i>Programa del termociclado</i>	38
Tabla 9 <i>Protocolo de PCR empleado en la detección de la proteína CP4-EPSPS</i>	39
Tabla 10 <i>Programa del termociclado</i>	39
Tabla 11 <i>Combinaciones dúplex y monoplex para el genotipaje de soya</i>	44
Tabla 12 <i>Análisis de diversidad genética de diez primers SSR</i>	46
Tabla 13 <i>Alelos registrados en cada marcador SSR con su respectiva frecuencia alélica</i>	47
Tabla 14 <i>Valores Eigen y porcentajes individuales y acumulados de la varianza de las tres primeras coordenadas</i>	50
Tabla 15 <i>Análisis molecular de varianza de la población G1 y G2 de soya empleando 10 marcadores SSR</i>	54
Tabla 16 <i>Resultados de la detección de soya modifica genéticamente en accesiones que mostraron resistencia a Glifosato</i>	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Reactivos y pasos generales de la PCR.	15
Figura 2	Inhibición de la EPSPS mediada por Glifosato	19
Figura 3	Validación de ADN de soya	42
Figura 4	Validación de primers SSR para soya	43
Figura 5	Amplificcaión de las combinaciones dúplex	45
Figura 6	Imágenes de los Geles obtenidos en SAGA	45
Figura 7	Dendrograma UPGMA basado en la distancia de los alelos compartidos que indica la agrupación de 95 accesiones de soya. Las flechas indican los grupos identificados.....	49
Figura 8	Análisis de coordenadas principales en las dos primeras coordenadas, obtenido con el coeficiente de similitud SM, que indica la agrupación de 95 accesiones de soya. En color verde se indican las accesiones del grupo G1 y en rojo las accesiones del grupo G2.	51
Figura 9	Análisis de coordenadas principales en tres coordenadas, obtenido con el coeficiente de similitud SM, que indica la agrupación de 95 accesiones de soya. En color verde se indican las accesiones del grupo G1 y en rojo las accesiones del grupo G2.....	52
Figura 10	Distribución de valores ΔK vs K basado en el análisis de estructura poblacional de 95 accesiones de soya con 10 marcadores SSR en el programa Structure Harvester. ...	53
Figura 11	Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de 95 accesiones de soya obtenido en el programa Structure vs 2.3.4. En color verde se evidencian las accesiones identificadas en el Grupo G1 y en rojo las accesiones del grupo G2.	54
Figura 12	Porcentaje del análisis molecular de varianza de los grupos G1 y G2 de las accesiones de soya obtenido en el software GenAlex ver 6.5.....	55
Figura 13	Productos PCR de la detección de soya modificada genéticamente. A. Promotor 35-S de 317pb. B. Terminador EPSPS-NOS de 342 pb. C. CP4-EPSPS de 1050 pb. .	56
Figura 14	Alineamiento múltiple usando BioEdit de las accesiones I-308M4-65-19, I-308M4 136-1, 522, 768, 769, AG Monsanto y el gen CP4-EPSPS que amplificaron el fragmento PCR de 1050pb de la proteína CP4-EPSP.....	61

RESUMEN

La Soya (*Glycine max* (L.)) es una especie de la familia de las leguminosas y es el principal cultivo de aceite y proteína del mundo. En la actualidad es un cultivo de gran importancia nacional tanto en el ámbito comercial, agronómico y nutricional y se ha convertido en una de las materias primas más empleadas por la agroindustria en nuestro país. El objetivo de esta investigación fue realizar una caracterización molecular de la variabilidad genética en diversas variedades comerciales de Soya del Litoral Ecuatoriano, a través de 10 SSR. Los análisis de diversidad genética revelaron un total de 46 alelos en un rango de 125 pb a 304 pb, con un promedio de 4 alelos/locus y un valor promedio de PIC de 0.47. El análisis de agrupamiento y asignación genética estructuraron a la colección en dos grupos poblacionales. Adicionalmente con la finalidad de complementar la investigación se realizó pruebas de detección molecular de la proteína CP4-EPSPS, el promotor 35S-CTP y el terminador EPSPS-NOS en aquellas variedades de soya que presentaron resistencia a glifosato en campo. De 87 accesiones analizadas 77 presentaron resultados positivos a las secuencias control y mediante un alineamiento múltiple llevado a cabo en un grupo de secuencias representativas de la colección analizada se identificó que estas eran completamente homólogas con el evento sintético CP4-EPSPS obtenido de la accesión del GenBank AF464188.1 y la accesión de soya transgénica de la empresa Monsanto evidenciando la presencia de soya genéticamente modificada en territorio ecuatoriano.

Palabras claves:

- *Glycine max* (L.)

- **VARIABILIDAD GENÉTICA**
- **GLIFOSATO**

ABSTRACT

Soya (*Glycine max* (L.)) is a species in the legume family and is the world's leading oil and protein crop. At present it is a crop of great national importance both in the commercial, agronomic and nutritional field and has become one of the raw materials most used by the Agroindustry in our country. The objective of this research was to carry out a molecular characterization of the genetic variability in diverse commercial varieties of Soya of the Ecuadorian Coast through 10 SSR. The genetic diversity analyses revealed a total of 46 alleles in a range of 125 bp to 304 bp, with an average of 4 alleles/locus and an average ICP value of 0.47. The analysis of genetic diversity revealed a total of 46 alleles in a range of 125pb to 304 bp, with an average of 4 alleles/locus and an average ICP value of 0.47. The analysis of clustering and genetic assignment structured the collection in two population groups. Additionally, in order to complement the research, molecular detection tests of the CP4-EPSPS protein, the 35S-CTP promoter and the EPSPS-NOS terminator were performed in those soybean varieties that presented resistance to glyphosate in the field. Out of 87 accessions analyzed, 77 presented positive results to the control sequences and through a multiple alignment carried out in a group of representative sequences of the analyzed collection, it was identified that these were completely homologous with the synthetic event CP4-EPS obtained from the accession of GenBank AF464188.1 and the accession of transgenic soy from Monsanto, evidencing the presence of genetically modified soya in Ecuadorian territory.

Keywords:

- *Glycine max* (L.)
- GENETIC VARIABILITY

- **GLYPHOSATE**

CAPÍTULO I:

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema.

La seguridad alimentaria es uno de los más grandes desafíos al cual se enfrenta la Agricultura moderna (Cano, Vélez, & Morgado, 2017). Según la FAO, (2017) se espera que para el año 2050 la población mundial aumente en 2 300 millones de personas y casi todo este crecimiento tendrá lugar en los países en desarrollo. En este sentido, la biotecnología agrícola se ha enfocado en el desarrollo de una amplia gama de tecnologías utilizadas en la caracterización y conservación de recursos (Kumar & Poulouse, 2016), diagnóstico y control de enfermedades (Cano et al. 2017), así como la transformación genética con la finalidad de mejorar los cultivos (Sudaric, Vrataric, MLadenovic Drinic, & Matosa, 2010). En la soya, la biotecnología ha permitido comprender la domesticación del cultivo brindando una comprensión más completa de su evolución y su historia. Además ha proporcionado información muy valiosa sobre su variabilidad genética, permitiendo a los fitomejoradores seleccionar rasgos que mejoren el rendimiento y la calidad del cultivo (Guo et al. 2010).

En el 2017, el Ecuador presentó importaciones de soya de 107,875 TM (SIPA, 2017), por lo cual, el Gobierno nacional a través de centros de investigación, como, el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) trabajan en el mejoramiento y certificación de semilla de soya de calidad brindado aportes fundamentales al sector sojero y así contribuir al cambio de la matriz productiva. En la actualidad se han logrado obtener variedades con mayor

calidad y resistencia como: “Americana”, “Manabí”, “INIAP Júpiter”, “INIAP 301”, “INIAP 302”, “INIAP 303”, “INIAP 304”, “INIAP 305”, “INIAP 306”, “INIAP 307” e “INIAP 308” siendo las 2 últimas variedades las semillas comerciales que se ofertan al público, gracias a su alto rendimiento y baja susceptibilidad a enfermedades (SIPA, 2017).

La nueva constitución del Ecuador aprobada en 2008, “declara al territorio ecuatoriano libre de semillas y cultivos transgénicos, lo que implica la inexistencia de organismos genéticamente modificados en el país” (Mejía, 2011). Desde el 2011, con la finalidad de precautelar la condición de país libre de OGMs se ha llevado a cabo monitoreos de control en cultivos como el maíz, la canola y la soya; hasta ese año no se había registrado una contaminación genética en esos cultivos., sin embargo, en el 2014 ya se registraron resultados de soya transgénica. (Intriago, Pérez, & Bravo, 2014).

1.2 Justificación del problema

Los agricultores se basan en características fenotípicas para seleccionar aquellas variedades que satisfacen sus necesidades. Actualmente, gracias a los avances en biología molecular se han desarrollado marcadores moleculares con una mayor sensibilidad a los cambios en el genotipo de los individuos. Los marcadores moleculares representan una herramienta de gran importancia para la evaluación de la diversidad genética y la determinación de la identidad de variedades, especialmente en cultivos cuya base genética es estrecha como el caso de soya.

En la actualidad, el cultivo de soya es de gran importancia nacional especialmente en la agroindustria, razón por la cual el Gobierno Nacional mediante el apoyo de centros de investigación como el INIAP ha fomentado y desarrollado programas de investigación que permiten liberar nuevas variedades de soya con un alto potencial de rendimiento y que se adapten

a las necesidades del mercado. Por tales motivos, “esta investigación tiene por objeto realizar una caracterización molecular de la variabilidad genética de diversas variedades de Soya del Litoral Ecuatoriano mediante el uso de Secuencias Simples Repetidas SSR”, misma que permitirá establecer las posibles diferencias y/o similitudes genéticas que se encuentran en las diferentes variedades que se ofertan en el país. Esto brindará un mayor conocimiento genético sobre la variabilidad de este cultivo en nuestro país a fin de aprovechar mejor estos recursos en los diferentes programas como investigación, mejoramiento y conservación del germoplasma.

Desde que se inició la siembra comercial de semillas transgénicas a nivel mundial, en el país se crearon movimientos de oposición al ingreso de cultivos genéticamente modificados al Ecuador, esto conllevó a establecer normas jurídicas, la más importante es la Constitución de la República del Ecuador en la cual “se declara al Ecuador libre de cultivos y semillas transgénicas”. Sin embargo estudios realizados por organizaciones académicas con la finalidad de monitorear la presencia de soya transgénica en el país han arrojado los primeros resultados positivos para soya modificada genéticamente. Esto se entiende, pues a pesar de los múltiples esfuerzos por mejorar el cultivo de soya en el país aún la producción nacional no logra suplir la demanda del producto conllevando a la importación de semilla de soya desde países en los cuales el uso de cultivos transgénicos está legalizado como EEUU, Brasil y Argentina. A partir de estos antecedentes y con el fin de complementar esta investigación se evaluarán las diferentes variedades de soya que presentan resistencia a glifosato en campo aplicando una prueba PCR que permitirá establecer la presencia o ausencia de soya transgénica en las variedades comerciales del Litoral Ecuatoriano.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar molecularmente la variabilidad genética y tolerancia a Glifosato de variedades comerciales de soya (*Glycine max* (L.)), provenientes del litoral Ecuatoriano que se encuentran en el del Departamento Nacional de Biotecnología-INIAP.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la variabilidad genética de variedades comerciales de soya del Litoral Ecuatoriano con miras a procesos de mejoramiento.
- Evaluar el promotor 35-S y el terminador NOS de CP4 EPSPS en variedades comerciales de soya mediante PCR para detectar la presencia de genes externos introducidos que confieren la resistencia a herbicidas.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Soya (*Glycine max* (L.))

1.4.1.1 Origen e Introducción en el Ecuador

La Soya (*Glycine max* (L.)) es una especie de la familia de las leguminosas y se ha convertido en el principal cultivo de aceite y proteína del mundo (Sudaric et al. 2007). El origen y la historia de la planta de soya no se conoce claramente, sin embargo, la literatura China señala que el cultivo se sembró por primera vez en la dinastía Shang en la mitad oriental del norte de China, por lo cual se cree que este es su centro de origen (Smith & Waterman, 1970). China fue el mayor productor y exportador de soya durante la primera mitad del Siglo XX. A partir de la década del 50 la producción de soya tuvo un gran auge en los Estados Unidos convirtiéndose hoy en día en el productor más grande del mundo (Singh, 2010).

El cultivo se inició en nuestro país en la década del 70, constituyéndose en una de las materias primas más empleadas en la Agroindustria. Sirve en la elaboración de productos tales como: aceite, carnes, leche, harina, pastas, balanceados, entre otros (Infoagro, 2011). Ecuador, en los últimos años ha mostrado variabilidad en la superficie de siembra, en el año 2017 se sembraron 28,021 ha, con una producción de 35,006 toneladas, encontrándose el mayor porcentaje de producción en la provincia de los Ríos (92,95 %), Guayas (6,83%) y Santa Elena (0,10%) (SIPA, 2017).

El informe de rendimientos de soya en el Ecuador 2017 reportado por el MAG, (2018) declara que “el rendimiento a nivel nacional fue de 1.87 t/ha y la provincia de mayor rendimiento fue Guayas con una producción de 2.22 t/ha, mientras que, la provincia de los Ríos presentó un rendimiento de 1.73 t/ha. Guayas que fue la provincia de mayor rendimiento posee características sobresalientes y superiores al nivel nacional en factores como: uso de semilla certificada, densidad promedio por hectárea y utilización de una variedad de alto rendimiento (INIAP-307)”. Este informe también reportó que la mayor parte de agricultores del país utilizan material de siembra reciclado pues el 73% de productores declararon reciclar sus semillas de soya; mientras que, el 27% de productores aplicó semilla certificada en la siembra del cultivo (MAGAP, 2017).

1.4.1.2 Taxonomía y Descripción Botánica

La soya es un tetraploide diploide ($2n=40$). Es una planta anual, herbácea de primavera-verano, cuyo ciclo vegetativo oscila entre tres a siete meses. Adquiere alturas variables de 0,4 a 1,5 metros (Kanchana, Lakshmi, & Dilip, 2005). El cultivo de soya como cualquier otro responde al ambiente en donde se siembra, sin embargo, para su normal desarrollo y producción se

recomienda que los agentes ecológicos se encuentre en un rango aceptable según sus requerimientos (Guamán et al. 1996).

El cultivo se desarrolla bien en climas calurosos con temperaturas medias de 20 a 30 °C (Kanchana, Lakshmi, & Dilip, 2005). Según Rosas & Young, (1993) requiere de suelos de textura pesada (arena fina, franco-arenoso) en general estos suelos presentan reducida capacidad de retención de agua por lo tanto se aconseja riegos frecuentes y ligeros. En la etapa de germinación se requiere un contenido de humedad cercano al 50% de su peso. Si bien es considerada como una planta de días cortos, hay una considerable variación genética de acuerdo a la sensibilidad al fotoperiodo (Guamán et al, 1996).

En el Ecuador, la soya es un cultivo transitorio que se cultiva en verano, en altitudes que van desde 0 a 1200 msnm, con temperatura promedios de 26 a 30 °C (Guamán et al, 1996). Con el fin de aprovechar la humedad residual que queda en el suelo después de la época lluviosa se recomienda su siembra después de la cosecha de arroz o maíz (Guamán & Andrade, 2009)

Taxonomía

La clasificación taxonomía de la soya se encuentra detallado en la **Tabla 1** (Kanchana et al. 2016).

Tabla 1*Taxonomía*

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Faboideae
Género	<i>Glycine</i>
Especie	<i>G. max</i>

Fuente: Kanchana et al., 2016

Descripción Botánica

Según Rosas & Young (1993), la soya posee un sistema radical predominantemente axial, fasciculado, constituido de una raíz principal que puede alcanzar hasta un metro de profundidad de donde emergen raíces secundarias y en las cuales se forman varias raíces laterales. El tallo es de tipo rígido y erecto, suele ser ramificado y se encuentra cubierto por finos pelos o pubescencia de color pardo grisáceo con alturas variables, de 0,4 a 1,5 metros. Presenta tres tipos de hojas: cotiledonales, unifoliadas y trifoliadas (Guamán et al. 1996). Posee una flor perfecta o completa, es decir, tanto los órganos sexuales femeninos como masculinos se encuentran en la misma flor. Se encuentran en inflorescencias racimosas axilares en números variables de forma amariposadas de color blanco o lila. (Olivieri et al. 2016). El fruto es una vaina achatada de 3-7 cm de longitud, con pubescencia de color amarillo, gris y/o negro. Una inflorescencia puede desarrollar de 2 a 20 o más vainas y el número de semillas por vaina varían de 1 a 4 (Guamán et al. 1996). La forma de la semilla es variable, desde subesférica, subesférica aplanada, alargada o alargada plana (Olivieri et al. 2016, las variedades cultivadas para la obtención de aceite son casi esféricas, mientras que

las variedades alargadas son las que se utilizan como vegetales. Según el genotipo la testa puede ser de distintos colores: amarilla, verde, negra o café (Rosas & Young, 1993).

1.4.1.3 La soya como ingrediente alimentario

La soya contiene un alto valor nutricional debido a la alta concentración de aceite (18-25%) y proteína (38-50%) por lo que es un alimento popular en todo el mundo (Shashank, Ramakrishna, Kiran, Kosturkova, & Ravishankar, 2015). En los países asiáticos, la soya se utiliza como alimento fermentado y no fermentado, como la salsa de soya, miso, natto, yogur, kinako, proteína crujiente, postres, alimentos para bebés y leche de soya que se procesa aún más en tofu, aburage y yuba, mientras que en los países occidentales el consumo de alimentos a base de soya se ha hecho popular recientemente en parte debido a los informes publicados sobre los beneficios para la salud humana siendo consumido popularmente a manera de leche de soya, brotes, edamame y productos de soya texturizados que se usan en hamburguesas, tofu, salchichas, Nuggets, helado, yogurt, etc (Hammond & Jez, 2011).

La soya presenta aminoácidos esenciales recomendados en un ingesta diaria de un dieta equilibrada como la histidina, isoleucina, leucina, lisina, entre otros, asimismo presenta metabolitos secundarios como isoflavonas, saponinas, proteínas y péptidos que son los encargados de impartir los beneficios en la salud humana como la reducción del colesterol plasmático, prevención de enfermedades cardiovasculares, prevención del cáncer, la mejora de la densidad mineral ósea, además proporciona protección contra enfermedades intestinales y renales (Shashank et al. 2015).

1.4.2 Mejoramiento genético e importancia del análisis de diversidad genética

El mejoramiento genético es un proceso largo que permite obtener nuevos cultivares mediante investigación, desarrollo y tecnología con la finalidad de producir una agricultura más sustentable. Generalmente los programas de mejoramiento genético han utilizado características morfológicas como bioquímicas para la selección de variedades y si bien estas características son importantes presentan limitaciones particularmente cuando se utilizan variedades emparentadas ya que se incrementa el grado de endogamia. El cruce entre individuos en base a la observación de las características fenotípicas expresadas puede generar genotipos con rasgos diferentes a sus padres y producen con menor frecuencia líneas deseables en comparación aquellas desarrolladas a partir del cruzamiento entre progenitores élites adaptadas (Gill, Pecina, Maldonado, Hernández, & Mayek, 2006).

La información sobre la diversidad genética del germoplasma es esencial para la identificación de los genotipos mejor adaptados a las condiciones agroclimáticas de una región y permiten una mejor selección de progenitores. Además los datos moleculares tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética, en ese enfoque la variabilidad genética es imprescindible en cualquier programa de mejoramiento ya que la información generada permite el desarrollo de nuevas líneas, planificación de cruce para la obtención de híbridos, protección vegetal entre otros (Rimieri, 2017). A partir de los años sesenta, el desarrollo de técnicas como los marcadores moleculares abrió las puertas para el estudio de la variación a nivel molecular posibilitando estudiar caracteres con un control genético sencillo (Ismail & Essawi, 2012)

1.4.2.1 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología como evolución, ecología, bio-medicina, ciencias forenses y estudios de diversidad, además se utilizan para localizar y aislar genes de interés. En la actualidad existen varias técnicas moleculares que nos permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en *loci* únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante. Se entiende por polimorfismo una diferencia en la secuencia de ADN entre individuos, grupos o poblaciones ocasionados por una inserción, delección o recombinación del material genético la cual se presentan en una frecuencia mayor al 1% (Ismail & Essawi, 2012).

Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN presentan una serie de ventajas frente a los proteicos: no se ven afectados por variaciones ambientales ni de desarrollo, muestran la base misma de la variación de los individuos, permiten seleccionar regiones concretas dentro de la molécula de ADN para estudios determinados, el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado, permiten analizar tanto la información que se expresa como la que no y en la actualidad se han desarrollado un gran número de técnicas adecuadas a diferentes situaciones (Jiménez & Collada, 2000).

Gracias a los rápidos avances de los últimos años en biología molecular hoy en día existe un conjunto de marcadores ya disponibles para detectar polimorfismos del ADN nuclear como:

RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) en donde el ADN obtenido es digerido mediante enzimas de restricción “endonucleasas” que cortan solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el ADN, siempre que estas no están metiladas; RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) estos son marcadores arbitrarios que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN.

SSRs (Simple Sequence Repeats) también conocidos como microsatélites son repeticiones de secuencias simples que aparecen dentro del genoma, esta técnica detecta polimorfismos que corresponden a diferencias de longitud provocadas por un número distinto de repeticiones denominados motifs; AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphis) combina la digestión con enzimas de restricción del ADN génico con una pre-amplificación y una amplificación selectiva de los fragmentos de restricción (Jiménez & Collada, 2000).

Marcadores empleados en Soya

Los marcadores más utilizados para la caracterización molecular de la soya son los microsatélites debido a que ofrecen las siguientes ventajas: alto polimorfismo, enorme número de loci, alta reproducibilidad, abundancia e interpretación sencilla de resultados (Kumawat et al. 2015). Además los niveles de polimorfismo revelados por marcadores SSR en soya han sido altos en comparación a otros marcadores moleculares tales como RFLPs, RAPDs y AFLPs (Arnao, Perdomo, & Graterol, 2010).

Microsatélites nucleares (SSR)

Los microsatélites son repeticiones de secuencias simples en *tandem* con “motifs” de dos, tres o más nucleótidos que aparecen dentro del genoma. Los polimorfismos observados

corresponden a diferencias de longitud provocadas por un número distinto de repeticiones (Jiménez & Collada, 2000). También denominados como SSR se tratan de secuencias altamente variables, entre y dentro de individuos. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada caso. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre 10^2 y 10^5 por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Picó & Esteras, 2012).

Los SSR se pueden hallar en gran abundancia en las regiones no codificantes del genoma como los intrones, las regiones no traducidas (UTR), los espacios intergénicos y también en las secuencias exónicas codificantes (Carneiro, Santini, Lima, & De Freitas, 2016). Los microsatélites también se ubican dentro de transposones y otros elementos repetitivos dispersos (Abdurakmonov, 2016). Presentan una amplia importancia como marcador genético pues facilita el desarrollo de estudios filogenéticos, diagnóstico e identificación de enfermedades, estudios forenses, análisis de parentesco, mejoramiento asistido, código de barras de ADN para variedades de plantas y germoplasma, filogeografía, conservación y restauración de la biodiversidad entre otros (Jiménez & Collada, 2000). Su detección se basa en la amplificación por PCR de la región que los contiene, empleando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes, y la posterior visualización de la diferencia de tamaño de estos amplicones (Picó & Esteras, 2012).

Los SSR se han convertido en los marcadores más empleados en la genotipificación vegetal durante los últimos 20 años gracias a sus altos niveles de polimorfismo, amplia distribución en la mayoría de genomas de plantas y facilidad de uso (Mason, 2015)., siendo particularmente útiles en estudios de diversidad medidos sobre la base de la distancia génica, estimación del flujo de genes, estudios evolutivos, estimación de parentesco y construcción de mapas de enlace (Carneiro et al. 2016).

1.4.2.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR se considera como una de las técnicas más sensibles y específicas de las pruebas moleculares; esta técnica permite la síntesis “in vitro” de secuencias específicas del ADN y es una metodología encaminada a obtener grandes cantidades de ADN presente en diferentes muestras biológicas de forma simple y muy rápida.

Fue descubierta por el Dr. Kary Mullis, quien en 1986 desarrolló un método simple para la obtención de un número ilimitado de copias de una secuencia específica de ADN en un tubo de ensayo, motivo que le permitió ganar el Premio Nobel de Química en 1993. Uno de los primeros investigadores en acoger la nueva técnica fue Saiki y colaboradores quienes decidieron aplicar el ensayo, con la finalidad de descubrir la mutación en el gen de la hemoglobina responsable de la anemia falciforme. Por sus excelentes resultados confirmaron la bondad de la técnica, así como su versatilidad como técnica de análisis (Villegas, Sánchez, & Chuaire, 2009).

La Reacción en cadena de la polimerasa es un sistema que permite obtener varios millones de copias de una secuencia blanco de ADN. La PCR estándar requiere de 4 componentes la molécula de plantilla de ADN que se usa como molde, dos cebadores sintéticos

denominados cebadores directos e inversos que flanquean la región de ADN que se amplifica, ADN polimerasa termoestable, desoxinucleótidos sintéticos (dNTPs) que se usan como sustrato para copiar las cadenas nuevas y la Enzima ADN polimerasa (Mas et al. 2001).

La reacción se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas

Desnaturalización.- Consiste en separar las dos cadenas de la molécula de ADN. Para ello se realiza una incubación de la muestra a una temperatura entre 94 y 96 ° C (Mas et al. 2001).

Hibridación.- Aquí los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Los cebadores son oligonucleótidos sintéticos que delimitan el sitio que se busca amplificar y se hibridan a temperaturas que oscilan entre 50 y 65 ° C (Mas et al. 2001).

Extensión.- En esta etapa se produce la síntesis de las nuevas hebras de ADN en la dirección 5'→3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos presentes en el medio siguiendo la cadena molde. Este ciclo toma entre uno y varios minutos a 72 ° C. Generalmente, 20 a 30 ciclos de PCR estándar logran amplificar el segmento deseado unas 10^7 veces (Mas et al. 2001).

Los reactivos necesarios y los pasos generales de la PCR se pueden apreciar en la **Figura1.**

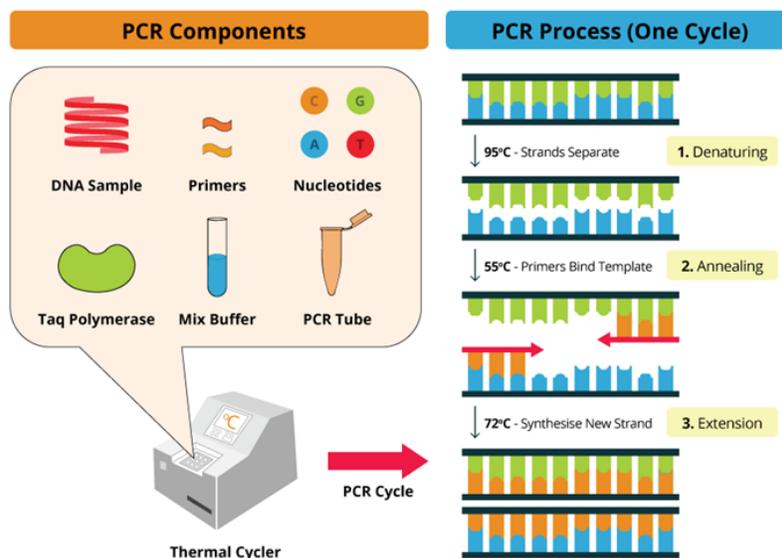


Figura 1 Reactivos y pasos generales de la PCR.

Fuente: Boster. (1993).

Una aplicación de la PCR en el análisis de polimorfismos mediante el uso de SSR es a través de la técnica *M13 Tailing*, que consiste en añadir una secuencia de nucleótidos (5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3') al extremo 5' del cebador forward SSR el cual se une al IRDye-labeled M13 (secuencia complementaria marcada con fluorescencia infrarroja a 700 u 800 nm). Los productos de la PCR son detectados y visualizados por electroforesis en gel de poliacrilamida mediante el equipo LI-COR 4300S (Bonilla, 2010)

El LI-COR 4300S es una herramienta de detección semi-automática que permite detectar el ADN mediante fluorescencia infrarroja. Posee un sistema de láser dual que detecta IRDye 700 e IRDye 800 y crea al mismo tiempo dos archivos de imagen independientes los cuales son analizados posteriormente mediante el software *SAGA^{GT}*, el cual permite una lectura clara y reproducible de los datos reportados (Biosciences, 2004).

1.4.2.3 Electroforesis

Una gran cantidad de técnicas que se realizan comúnmente en biología molecular requieren del uso de la electroforesis. Como menciona Salazar, Sandoval & Armendáriz, (2013) “esta técnica se fundamenta en que la mayoría de las biomoléculas poseen una carga eléctrica cuya magnitud depende del pH del medio en el que se encuentran; como consecuencia”, pueden desplazarse cuando se ven sometidas a un campo eléctrico hacia el polo de carga opuesta al de la molécula. Según Salazar et al. (2013) el principio de la electroforesis consiste en la migración proporcional de las moléculas a través de un gel u otro tipo de matriz porosa, según su peso molecular o tamaño, movimiento que es generado por el campo eléctrico.

Los geles pueden ser de agarosa o poliacrilamida. En general para la separación de ácidos nucleicos se usan geles de agarosa o acrilamida y para las proteínas, solo de acrilamida.

1.4.2.4 Electroforesis de ácidos nucleicos

Geles de agarosa.- La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas. El método más común para la electroforesis de ADN es elaborar un gel horizontal de agarosa, con una concentración de 0.5 a 2% (Salazar et al. 2013).

Geles de acrilamida.- La acrilamida es un polímero sintético, termoestable, incoloro y químicamente inerte, El gel de poliacrilamida es el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bisacrilamida (Salazar et al. 2013).

1.4.3 Herbicidas y Resistencia

Los herbicidas constituyen un grupo muy importante de plaguicidas de uso agrícola que año tras año aumentan su volumen de uso. Como menciona De Prado & Cruz-Hipolito, (2008) en

la agricultura moderna se han convertido en la principal herramienta gracias a las múltiples características presentadas y que son llamativas para los agricultores; pues son altamente fiables, eficaces, fáciles de manejar, económicamente rentables y agronómicamente versátiles.

La resistencia a los herbicidas es la capacidad que han desarrollado las poblaciones de malezas previamente susceptibles a un cierto herbicida para resistir a ese compuesto y completar su ciclo biológico (Valverde, 2004).

La resistencia es un ejemplo de evolución adaptativa resultante del uso repetitivo de un herbicida. Este proceso selecciona ciertos individuos “biotipos” dentro de una población con la capacidad natural y heredable de sobrevivir y reproducirse después de ser expuestos a un tratamiento herbicida. Si bien los biotipos resistentes resultan de mutaciones espontáneas que se dan al azar en las poblaciones de malezas, en la actualidad los científicos han logrado obtener plantas resistentes mediante el uso de técnicas tales como ingeniería genética, selección de tipos variantes en los cultivos o mutagénesis (Ríos, 2013).

1.4.3.1 Glifosato

El glifosato, es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo amino. Es una sal isopropilamina de N-(fosfonometil) glicina. Constituye uno de los descubrimientos agroquímicos más importantes del siglo pasado, convirtiéndose en el herbicida más utilizado del mundo por su efectividad, bajo costo y facilidad de aplicación (Pedemonte, 2017).

En la década de los 70, Monsanto patentó el ingrediente activo glifosato y entro en el mercado en 1974 como un herbicida no selectivo con el nombre de Roundup. En 1985 la misma

empresa, lanzó al mercado semilla transgénica resistente a glifosato incrementando notablemente las ventas del herbicida (Cressey, 2015).

Mecanismo de acción

El glifosato es un herbicida post-emergente de amplio espectro, no selectivo y seguro desde el punto de vista ambiental. Inhibe la síntesis de aminoácidos esenciales en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos apicomplejos, a través de la inhibición de la enzima EPSPS (5-enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintetasa) en la ruta metabólica del ácido shikimico). La enzima EPSPS se codifica en el núcleo y desempeña su acción catalítica en el cloroplasto. Ya en el cloroplasto, la EPSPS enlaza primero una molécula de shikimato-3-fosfato (S3P) e inmediatamente después una molécula de fosfoenol piruvato (PEP) se enlaza al sitio activo de la enzima. La EPSPS cataliza entonces una reacción de condensación para producir 5-enolpiruvil shikimato-3 fosfato. La EPSPS está asociada a la síntesis de tres aminoácidos aromáticos esenciales: fenilalanina, tirosina y triptófano. Además, este trayecto está relacionado a la síntesis de compuestos aromáticos como ligninas, alcaloides, flavonoides, ácidos benzoicos y hormonas vegetales (Villalba, 2009).

El glifosato es un herbicida soluble en agua, de amplio espectro y no selectivo lo que favorece su absorción por las hojas y su transporte a todas las partes de la planta, incluyendo las raíces. Una vez que la planta ha absorbido el glifosato este se une a la enzima EPSPS gracias a la similitud estructural de este compuesto con el PEP. El glifosato actúa como inhibidor competitivo y se une fuertemente al complejo formado por el shikimato y la EPSPS, resultando en una acumulación de shikimato en concentraciones tóxicas e impidiendo la biosíntesis de los tres

aminoácidos aromáticos esenciales, lo que eventualmente provoca la muerte de la planta a causa de desnutrición (Villalba, 2009). Debido a que la EPSPS no se encuentra en animales, se asume que el glifosato es relativamente inocuo para mamíferos, insectos, peces y aves. En la **Figura 2** se puede observar una representación esquemática sobre la acción del glifosato en la inhibición de la EPSPS

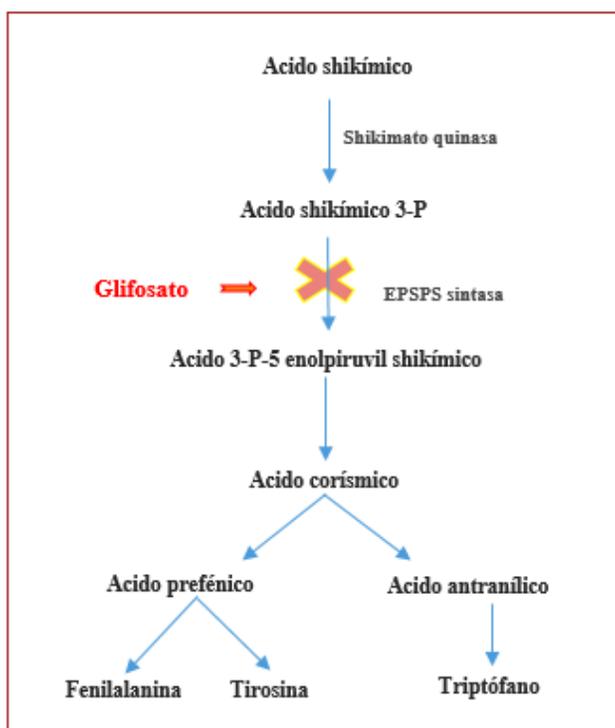


Figura 2 Inhibición de la EPSPS mediada por Glifosato

El glifosato fue introducido al Ecuador a finales de la década de los 80 como alternativa a otros herbicidas de extrema toxicidad convirtiéndose en el herbicida de mayor uso en el país. Debido a las características de baja selectividad y amplio espectro, su uso está orientado al manejo de malezas en cultivos de grandes distancias de siembra, perennes en etapa de establecimiento, manejo de muros y en cultivos anuales (Peñaherrera, 2013).

1.4.3.2 Mecanismos de Resistencia a Glifosato

Mutaciones en el gen EPSPS

La resistencia de sitio activo a glifosato resulta de mutaciones puntuales en el gen EPSPS que torna a la enzima insensible al herbicida. La enzima producida por el gen mutado es catalíticamente activa en presencia del glifosato y posee menor afinidad por el mismo (Villalba, 2009). En varias especies se ha confirmado que las variaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos que codifican la EPSPS son las que confieren esta resistencia, como el estudio reportado por Pérez, Kee, Polge, Colquhoun & Mallory (2007) en donde se recolecto poblaciones de *Lolium multiflorum* y se identificó mediante una análisis de la secuencia de ADNc que la población resistente al glifosato tiene una prolina 106 para la sustitución de aminoácidos con serina siendo la sustitución de este aminoácido la que genera resistencia al glifosato.

Organismos genéticamente modificados (OGMs)

Durante los últimos años, se han desarrollado cultivos genéticamente mejorados con resistencia a un amplio espectro de herbicidas de post-emergencia por medio de la ingeniería genética, al permitir incorporar genes externos de interés.

Es así que para obtener cultivos resistentes a glifosato se ha modificado el gen que codifica la enzima EPSPS de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* (cp4-epsps) y se clonó el gen GOX, que codifica la enzima glifosato oxidoreductasa (responsable del proceso de degradación del glifosato por la ruta del ácido aminometilfosfónico). La expresión de este gen, introducido en copia única, está regulado por el promotor 35 S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), contiene además el CTP4 (chloroplast transit peptide) codificado en *Petunia hybrida*

que destina la enzima al cloroplasto, y el elemento transcripcional de terminación NOS 3' (Nopaline Synthase) de *Agrobacterium tumefaciens* (Mejía, 2011). El gen (cp4-epsps) codifica la enzima C4-EPSPS tolerante al herbicida (Villalba, 2009).

1.4.4 Cultivos transgénicos

Se conocen como cultivos transgénicos a todas aquellas plantas que a través de las tecnologías de ingeniería genética han incorporado nuevos genes (transgenes) en su genoma confiriéndole nuevas características. La aceptación de estos cultivos todavía es muy limitada ya que existen varias preocupaciones respecto a las consecuencias del desarrollo de los cultivos transgénicos resistentes a los herbicidas (Holst, 2001). Las principales objeciones al uso de cultivos transgénicos están relacionadas con los posibles riesgos asociados a la salud humana y el medio ambiente. Sin embargo, a la fecha no se han encontrado pruebas con respaldo científico que evidencien posibles efectos adversos ni para el ambiente, ni para la salud humana, ni animal que deriven directamente del cultivo o consumo de transgénicos (Key, Ma, & Drake, 2008). Además debido a la gran polémica que genera los transgénico estos deben pasar por un proceso de análisis de riesgo y de esta manera poder garantizar su inocuidad antes de ser liberado. Se debe evaluar las medidas y lineamientos de prevención y control, así como de mitigación y remediación de los posibles impactos adversos a la salud humana y al ambiente que pudieran ocasionar estos cultivos (Mejía, 2011).

1.4.4.1 Métodos de detección

Los organismos genéticamente modificados pueden ser identificados mediante la detección de una molécula de ADN, ARN o proteína que estén asociados con la modificación genética de interés. La mayoría de los métodos desarrollados hasta ahora para la detección de

OGMs y derivados se centran en la detección de ADN, mientras que solo unos pocos métodos se han desarrollado para detectar proteínas o ARN. Esto tiene varias razones: el ADN se puede purificar y multiplicar en miles de millones de copias en solo unas pocas horas mediante PCR mientras que la multiplicación de ARN y proteínas es un proceso más complicado y lento. El ADN es una molécula muy estable, mientras que el ARN es inestable (Holst, 2001).

Los métodos basados en el ADN se basan principalmente en multiplicar un ADN específico con la técnica de PCR. Se necesitan dos fragmentos cortos de ADN sintético (cebadores) cada uno complementario a un extremo del ADN para ser multiplicado. Para propósitos rutinarios de detección se usan cebadores que permiten detectar el promotor 35-S del virus del mosaico de la coliflor (P-35S) y el terminador nos de *Agrobacterium tumefaciens* (nos 3') que son los elementos de control genético. Los métodos basados en proteínas se basan en técnicas inmunológicas que utilizan anticuerpos producidos en el suero de animales en respuesta a sustancias extrañas (antígenos). En el caso de la detección de OGMs el antígeno puede ser la proteína recién sintetizada. Los métodos basados en ARN se basan en la unión específica entre la molécula de ARN y una molécula de ARN o ADN sintética (denominada cebador). El cebador debe ser complementario a la secuencia de nucleótidos al inicio de la molécula de ARN. El resultado es una molécula de doble cadena similar al ADN. Por lo general, la unión entre la molécula de ARN y el cebador es seguida por la conversión del ARN en una molécula de ADN a través de un proceso llamado transcripción inversa. Finalmente, el ADN se puede multiplicar con la PCR o se puede traducir en hasta 100 copias de la molécula de ARN original y se puede repetir el procedimiento utilizando cada copia como plantilla en una técnica llamada NASBA

(amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico) (Bonfini, Heinze, Kay, & Van den, 2001).

En la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas de análisis de OGMs, como espectrometría de masa, cromatografía, chips de ADN, entre otros. Aquellas basadas en la amplificación del material genético insertado mediante PCR ha sido el método generalmente aceptado para propósitos regulatorios (Holst, 2001).

1.5 Hipótesis

- Las variedades comerciales de soya del Litoral Ecuatoriano que se encuentran presentes en el Departamento Nacional de Biotecnología-INIAP presentan un nivel de variabilidad genético bajo.
- Las accesiones de soya comercial provenientes del Litoral Ecuatoriano expresan la proteína CP4-EPSPS resistente a Glifosato

CAPÍTULO II:

2 METODOLOGÍA

2.1 Participantes

Institución

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP): Estación Experimental Santa Catalina (EESC)-Departamento Nacional de Biotecnología (DNB)-Laboratorio de Biología Molecular (LBM).

La presente investigación fue realizada en las instalaciones del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) en la Estación Experimental Santa Catalina bajo la dirección del Dr. Eduardo Morillo, jefe del departamento

Responsable del proyecto

Cynthia Estefanía Andrade Cárdenas

Colaboradores científicos

Directora del proyecto: Claudia Segovia, Ph.D

Codirector del proyecto: Valeria Ochoa, Ph.D

Responsable del Departamento Nacional de Biotecnología: Eduardo Morillo, Ph.D

Técnica del Laboratorio de Biología Molecular: Ing. Johanna Buitrón

2.2 Zona de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicada en el Sector Cutuglagua, Cantón Mejía, Pichincha, Ecuador.

2.3 Procedimiento

2.3.1 Material vegetal

El Departamento Nacional de Biotecnología proporcionó una colección de material genético de Stock y semillas de variedades comerciales de soya provenientes del Litoral Ecuatoriano (Anexo A). Este material biológico fue el que se utilizó para realizar los estudios de la caracterización molecular de la variabilidad genética y tolerancia a Glifosato.

2.3.2 Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia, (1998) en la extracción de ADN de 12 accesiones de soya de las cuales solo se disponía de semilla. Primero se tomó el embrión en un tubo *ependorf* de 2mL, se añadió 700 μ L de *buffer* y se maceró el material con un pistilo designado para cada muestra. Posteriormente, la muestra se incubó por 1 hora a 65°C agitando cada 30 minutos. Con ayuda de la centrífuga (Eppendorf AG, Centrifuge 5415D) se separó la fase líquida de la mezcla a 13000 rpm por 15 minutos. Se añadió 600 μ L de una solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) para precipitar las proteínas y se separó las fases mediante centrifugación por 5 minutos a 13000 rpm. Para la precipitación del ADN se adicionó 400 μ L de isopropanol y se dejó reposar a -20°C durante 30 minutos. Después de centrifugar por 4 minutos a 1300 rpm se obtuvo el pellet de ADN en un tubo *ependorf*, se

eliminó el isopropanol y la pastilla de ADN se lavó dos veces con 1ml de etanol al 70%. Finalmente el ADN se secó en el CentriVap (LABCONCO, DNA) por 30 minutos y se eluyó en 100 μ L de *buffer* Tris-EDTA 0.1M para su posterior cuantificación.

2.3.3 Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro Epoch™ de BioTek

Se colocó 2 μ L de ADN de cada muestra a cuantificar en la placa Take3 del espectrofotómetro *Epoch™* (BioTek, Epoch), la cual consta de 16 pocillos, en los 2 primeros pocillos se colocó el blanco (Agua ultra pura) y en los 14 pocillos restantes las muestras a cuantificar. La lectura se realizó a través del Software Gen5 y los datos obtenidos se importaron a una tabla en Excel.

2.3.4 Validación de ADN de soya

Las muestras de ADN se validaron mediante PCR, empleando el marcador molecular SaTT 530. La reacción de PCR se la hizo como menciona Morillo & Miño (2011) **Tabla 2**.

Tabla 2
Protocolo para PCR de validación de ADN de soya

Reactivo	CI	CF	Rx (µl)
Agua UP			2.18
Buffer PCR	5	1	1.5
MgCl ₂ (mM)	25	2	0,60
dNTP's (mM)	5	0.25	0.38
Primer (µM)	10	0.50	0.38
Primer (µM)	10	0.50	0.38
Taq polimerasa (U/ µL)	5	0.06	0.10
Muestra (ng/ µL)	5	1.33	2
Volumen total (µL)			7.5

Fuente: (Morillo & Miño, 2011).

El termociclado se realizó bajo las condiciones presentadas en la **Tabla 3**

Tabla 3
Programa de termociclado para PCR de validación de ADN de soya

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5 min	1 ciclo
94	45 seg	
51	1 min	30 ciclos
72	2 min	
72	7 min	1 ciclo
10	5 min	1ciclo

Fuente: (Morillo & Miño, 2011).

2.3.5 Validación de Primers Microsatélites

Se realizó pruebas preliminares con 25 marcadores microsatélites SSR reportados por Akkaya, Bhagwat and Cregan (1992) y Cregan, Jarvik, Bush, Shoemaker and Lark (1999), para

esto se utilizó el coctél de PCR y el programa del termociclador descritos en la **Tabla 2** y **Tabla 3** respectivamente. Finalmente se seleccionaron 10 primers en base a su polimorfismo y calidad de producto amplificado, sus características se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4
Marcadores microsatélites de soya

Marcador	Primer	Secuencia 5'-3'	Fragmento PCR	Motif	T°C
SaTT 22	Forward	GCCTTTTCTGACTGTAA	NR	TAA ₂₂	51
	Reverse	CAGTGACTAAAACCTACTAT			
SaTT 45	Forward	TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT	135-160	AAT ₁₈	51
	Reverse	ATGCCTCTCCCTCCT			
SATT 173	Forward	TGCGCCATTTATTCTTCA	185-264	TAT ₁₈	51
	Reverse	AAGCGAAATCACCTCCTCT			
SaTT 197	Forward	CACTGCTTTTTTCCCCTCTCT	130-207	ATT ₂₀	51
	Reverse	AAGATACCCCAACATTATTTGTAA			
SaTT 215	Forward	GCGCCTTCTTCTGCTAAATCA	132	ATT ₁₁	51
	Reverse	CCCATTCAATTGAGATCCAAAATTAC			
SaTT 460	Forward	GCGCGATGGGCTGTTGGTTTTTAT	156	ATT ₂₆	51
	Reverse	GCGCATACGATTTGGCATTTTTTCTATTG			
SaTT 38	Forward	GGGAATCTTTTTTCTTTCTATTAAGTT	211-251	ATT ₁₂	51
	Reverse	GGGCATTGAAATGGTTTTAGTCA			
SaTT 530	Forward	CATGCATATTGACTTCATTATT	152-184	AT ₂₀	51
	Reverse	CCAAGCGGGTGAAGAGGTTTTT			
SaT 186	Forward	GCGACGCGCTAGTCTTATTT	220-260	ATT ₁₉	51
	Reverse	GCGGATGGCTTTTACTTT			
SaT 69	Forward	CGACCAGCTGAAGAAA	156	AT ₂₁	51
	Reverse	CTGAATACCCATCATTACTTAA			

Fuente: Akkaya et al. (1992) y Cregan et al. (1999)

2.3.6 Amplificación utilizando metodología M-13 Tailing

Con los 10 primers SSR escogidos para el estudio se realizó un screening con la finalidad de verificar su polimorfismo y determinar a qué longitud de onda (700 u 800 nm) amplifican mejor. Además se realizó pruebas de dúplex PCR. Estas pruebas consistieron en amplificar dos primers en una misma reacción PCR. Los primers seleccionados para cada combinación debían tener misma temperatura de *annealing*, al menos 30 pb de diferencia entre los fragmentos amplificados y una misma marcación de fluorescencia M13-*tailing*.

Para estas pruebas se utilizó siete muestras de ADN y un control negativo para cada SSR, siguiendo la metodología M-13 *tailing* descrita por Morillo & Miño (2011). El coctél de amplificación además de los reactivos usuales de una PCR convencional se le adiciona el reactivo Primer M-13 Fwd IRDye 700 y 800 para darle fluorescencia infrarroja y puedan ser detectados por los canales del genotipador. Tanto el mix de la PCR así como el programa aplicado en el termociclador se detallan en la **Tabla 5** y **Tabla 6**.

Tabla 5
Protocolo para PCR empleando la metodología M-13 tailing

Reactivo	CI	CF	Rx (µl)
Agua UP			0.32
Buffer PCR	5	1	1
MgCl ₂ (mM)	25	2.5	0,50
dNTP's (mM)	5	0.20	0.20
M13-100/800 (µM)	1	0.16	0.80
Primer F-M13 (µM)	1	0.01	0.05
Primer R (µM)	10	0.16	0.08
Taq polimerasa (U/ µL)	5	0.05	0.05
Muestra (ng/ µL)	5	2	2
Volumen total (µL)			5

Fuente: (Morillo & Miño, 2011).

Tabla 6
Programa de termociclado para PCR de validación de ADN de soya

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	2 min	1 ciclo
95	4 min	1 ciclo
95	1 min	
51	2 min	25 ciclos
72	2 min	
72	10 min	1 ciclo
4	10 min	1 ciclo

Fuente: (Morillo & Miño, 2011).

2.3.7 Corrida electroforética de productos PCR

Para cargar, los productos de PCR amplificados se diluyeron en una solución de carga (Blue Stop), en proporción 1:3. Luego se denaturaron las muestras a 95°C por 5 minutos y enseguida se colocaron en hielo.

Se cargó 1µl del producto PCR en un gel de poliacrilamida al 6,5%, el cual se preparó empleando 20 ml de Gel Matrix KB Plus, 150 µl de Persulfato de Amonio (APS) al 10% y 15 µl de TEMED, esta mezcla se colocó entre dos placas de vidrio, previamente lavadas con detergente y limpiadas con isopropanol, luego se colocó el peine para formar la línea base y se dejó polimerizar por 1 hora. Posteriormente se ensambló la placa de poliacrilamida en el equipo LICOR 4300. Finalmente se realizó una pre-corrída de 25 minutos antes de efectuarse la corrida electroforética. La corrida se realizó por una hora y media a 1500 voltios.

2.3.8 Genotipaje de la colección de Soya en el software *SAGA^{GT}* Microsatélite

El genotipaje se realizó en el analizador de ADN LI-COR 4300 junto con el Software de análisis *SAGA^{GT}* Microsatélite.

Se creó un proyecto llamado Soya en el cual se ingresó la diferente información para establecer las condiciones de genotipaje como: tallas del marcador de peso molecular IRDye (50-350) pb según el caso (700 u 800 nm), rango de tamaño de amplificación de cada marcador SSR, marcaje, combinaciones de los *loci* SSR y el nombre de las muestras.

Para el análisis de la imagen del gel en *SAGA^{GT}* se abrió el proyecto Soya, se escogió el gel requerido y se abrió la imagen. Después se identificó la posición de las bandas (alelos) con

una “x” y al confirmar el genotipaje se generó un reporte que indica los pesos de los alelos de cada *locus* en pares de bases y sus frecuencias alélicas.

2.3.9 Análisis de datos

Los datos obtenidos en el software *SAGA^{GT}* se exportaron al programa Microsoft Excel y fueron convertidos en una matriz que muestra las accesiones con sus tamaños alélicos. Se disminuyó en 19 pb las tallas alélicas debido a la técnica *M13-tailing*.y se depuró la matriz genotípica en base a los motifs de cada *locus*. La matriz alélica extraída se analizó con los programas Power Marker V3.2 (Liu & Muse, 2005), NTSYS V 2.1 (Rohlf, 2002).

2.3.10 Diversidad Genética

Para el análisis de diversidad genética se utilizó los siguientes parámetros

- ❖ **Tamaño de la muestra:** Es el número de materiales analizados
- ❖ **Número de observaciones:** Es el número de alelos o genotipos observados en la muestra. Si existen datos perdidos, disminuye el número de observaciones.
- ❖ **Frecuencias alélicas:** Se refiere al número de veces que un alelo, se encuentra presente en la relación con el número total de alelos de la población en estudio para cada *locus*. Se expresa sólo en proporción.

$$Frecuencia\ alélica = \frac{Frecuencia\ absoluta\ de\ un\ alelo\ determinado}{N^{\circ}\ total\ de\ alelos\ de\ la\ población\ para\ un\ locus}$$

- ❖ **Genotipos:** Número de genotipos generados
- ❖ **Número de alelos:** Cantidad de alelos generados.

- ❖ **Heterocigosidad total u observada:** Es la frecuencia de individuos heterocigotos en la población. Si la frecuencia de un alelo es muy alta, existe poca heterocigosidad. La heterocigosidad está dada por la ecuación a continuación.

$$H_o = \frac{N^\circ \text{ de genotipos heterocigóticos}}{N^\circ \text{ total de genotipos}}$$

- ❖ **Heterocigosidad esperada:** Es la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos escogidos al azar de la población sean diferentes entre sí. Está dada por la siguiente ecuación:

$$H_{exp} = 1 - \sum q_i^2 = 1 - (q_a^2 + q_b^2 + q_c^2 + \dots + q_k^2)$$

Donde:

q= frecuencia alélica de cada alelo en un *loci*.

- ❖ **Índice de contenido polimórfico (PIC):** Es la medida de la información de un marcador genético. El PIC estima el poder de discriminación de un *locus*, no solo por el número de alelos que se expresan, sino por la frecuencia relativa de aparición de los alelos. El rango de los valores del PIC son entre 0 (monomórfico) a 1 (altamente discriminativo)

2.3.11 Estructura Genética

2.3.11.1 Análisis de Agrupamiento

Este análisis se utiliza para representar gráficamente, las relaciones individuales y grupales entre los materiales evaluados. Se basa en una matriz de distancias genéticas individuales que refleja la similitud en base a las frecuencias alélicas. Para ello se utilizó el software PowerMarker V3.2 (Liu & Muse, 2005), el análisis comprende los siguientes pasos:

Cálculos de frecuencia

Para calcular las distancias genéticas, la matriz genotípica se convirtió en una matriz de frecuencia con datos binarios de 0 (ninguna similitud) y 1 (máxima similitud). Luego se calculó la matriz de distancias con opción de alelos compartidos (Shared Allele Distance, DAS), que calcula las distancias entre individuos de una población.

Construcción de dendrogramas

Al obtener la matriz de similitud se construyó un dendrograma donde la longitud de las ramas que conectan a los individuos indica la relación entre ellos. El árbol genético se construyó en Power Marker V3.2 (Liu & Muse, 2005) empleando el método UPGMA.

El UPGMA (Unweighed Pair Group Method using Arithmetics Averages) es una técnica de conglomerado jerárquico. La construcción de los árboles o dendrogramas se basan en 4 criterios, estos deben ser: secuenciales, aglomerativos, jerárquicos y sin superposiciones (Vicario, 2002).

Bootstrap

Con el fin de robustecer los resultados de la agrupación jerárquica se elaboró un dendrograma más robusto empleando el método de bootstrapping en el software PHYLIP 3.67 (Felsenstein, 1993). Ossandón, (2006) indica que en este método la matriz de similaridad es recreada muchas veces mediante reemplazos al azar de un dato por otro manteniendo el tamaño de la matriz original y crea un dendrograma para cada matriz modificada los cuales se comparan con el dendrograma original para obtener un árbol consenso final robusto (Ossandón, 2006).

En este estudio se generó una lista de 100 árboles que fueron usados para construir un árbol consenso con la opción “Consensos” del software PHYLIP 3.67 (Felsenstein, 1993). El dendrograma concenso se visualizó en el software TREEVIEW 1.6.6 (Page, 1996)

2.3.11.2 Métodos multivariados

Es el conjunto de técnicas estadísticas destinadas al análisis simultáneo de un conjunto de datos multivariante permitiendo la medición de varias variables para cada individuo u objeto estudiado (Figueras, 2000) y tienen como objetivo medir el grado de discrepancia entre los individuos (Lancheros & González, 2011).

Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas principales (PCA) se utiliza para reducir la dimensionalidad de un dato perdiendo la menor cantidad de información posible. Los métodos factoriales como el análisis de coordenadas principales detectan estructuras fuertes en una población sin tomar en cuenta los efectos individuales. Este análisis se utiliza para determinar la contribución de un individuo a la variabilidad y determinar fácilmente el carácter que puede representar un genotipo (Syafi & Ruswandi, 2015).

El PCA es una técnica de análisis multivariado que permite detectar los ejes mayores de variación (y no solo uno como los métodos de agrupamiento UPGMA y NJ). Este método se basa en una matriz de similitud de los datos observados entre los individuos analizados. Para este análisis se usó el software NTSYS V 2.1 (Rohlf, 2002). Primero se abrió “NTedit” para importar la matriz binaria calculada en Power Marker V3.2 (Liu & Muse, 2005) y arreglada de Excel (los datos perdidos se asignaron con 9) y se guardó en formato “nts” para que pueda ser usada por el

software; luego se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente SM de la opción “Simqual”, la matriz obtenida se guardó para ser utilizada en la opción “Dcenter”, y después mediante la opción “EIGEN” se obtuvo la dispersión de las muestras en dos y tres dimensiones y los porcentajes de varianza de cada coordenada.

2.3.12 Asignación genética

La asignación de genotipos a poblaciones predeterminadas, se realizó con el software Structure vs. 2. 3.4 desarrollado (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000). Este programa implementa un método de agrupamiento bayesiano que permite reconocer poblaciones genéticas distintas, asignando los individuos a una población además identifica individuos mezclados. Structure asume un modelo en el que hay K poblaciones (donde K puede ser desconocido), cada una de las cuales se caracteriza por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus (Pritchard et al. 2000). En el estudio se utilizó un modelo con mezcla que muestra la fracción de genoma de cada individuo que pertenece a cada población. El periodo de Burning y el número de repeticiones MCMC fue de 10. 0000 y 100.000 en cada parámetro. EL número de simulaciones que se ejecutó fue de 10 veces.

Determinación del número de subpoblaciones

Para determinar el número de poblaciones (K) se utilizó el programa Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2012) que calcula el ΔK en base al método descrito por Evanno, Regnaut & Goudet (2005) quienes mencionan que “el número de poblaciones se estima basándose en la tasa de cambio de segundo orden de la función de probabilidad para cada uno de los valores de k. El programa Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2012) genera un grafica que representa Delta K

frente al número de poblaciones K y el valor de K que genere un pico en ΔK será el valor de K óptimo.

2.3.13 Análisis molecular de Varianza

El análisis molecular de varianza (AMOVA) (Excoffier, Smouse, & Quattro, 1992) determina la diferenciación dentro y entre los componentes de una población. El AMOVA se calculó utilizando el software GenAlex ver 6.5 (Peakall & Smouse, 2006).

2.3.14 Análisis molecular de la región 35-S y EPSPS-NOS del gen cp4-epsps que da resistencia a Glifosato

Con la finalidad de confirmar la presencia de la proteína CP4-EPSPS en aquellas accesiones de soya que presentaron resistencia a Glifosato en campo se efectuó pruebas de detección molecular.

El sistema de detección consistió en tres partes.

Primero se confirmó la calidad del ADN. Para ello se tomó en cuenta la validación del ADN con el marcador SaTT 530 que se llevó a cabo en el estudio de variabilidad genética.

La segunda parte consistió en la detección del promotor 35-S y el terminador EPSPS-NOS. Se empleó una PCR con los Primers empleados por Zhang et al. (2007) en su estudio de detección de soya modificada en productos altamente procesados. El protocolo que se empleó en la PCR se describe en la **Tabla 7**.

Tabla 7

Protocolo de PCR empleado en la detección del promotor 35-S y el terminador EPSPS-NOS

Reactivo	CI	CF	Rx (μl)
Agua UP			3.3
Buffer PCR	5	2	5
MgCl ₂ (mM)	25	2	1
dNTP's (mM)	5	0.2	0.5
Primer (μM)	10	0.50	0.6
Primer (μM)	10	0.50	0.6
Taq polimerasa (U/ μL)	5	0.08	0.2
Muestra (ng/ μL)	20	2	1.3
Volumen total (μL)			12.5

Fuente: (Zhang et al. 2007).

El programa del termociclado se describe en la **Tabla 8**.

Tabla 8

Programa del termociclado

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	10 min	1 ciclo
95	40 seg	
54	45 seg	30 ciclos
65	1 min	
65	10 min	1 ciclo
4	10 min	1 ciclo

Fuente: (Zhang et al. 2007).

La tercera parte se basó en la detección de la proteína CP4-EPSPS con los primers empleados por Watrud et al. (2004). El protocolo empleado en la PCR se detalla en la **Tabla 9**

Tabla 9

Protocolo de PCR empleado en la detección de la proteína CP4-EPSPS

Reactivo	CI	CF	Rx (µl)
Agua UP			14.75
Buffer PCR	5	1	5
MgCl ₂ (mM)	25	1.2	1.2
dNTP's (mM)	5	0.2	1
Primer (µM)	10	0.32	0.8
Primer (µM)	10	0.32	0.8
Taq polimerasa (U/ µL)	5	0.04	0.2
Muestra (ng/ µL)	20	1	1.25
Volumen total (µL)			25

Fuente: (Watrud et al. 2004).

El programa del termociclado se describe en la tabla 9.

Tabla 10

Programa del termociclado

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
95	5 min	1 ciclo
94	30 seg	
64	30 seg	40 ciclos
72	90 seg	
72	10 min	1 ciclo
4	10 min	1 ciclo

Fuente: (Watrud et al. 2004).

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando el marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder, a 100 voltios durante 60 minutos.

La tinción de los geles se realizó con 300 ml de TAE 1X y 30 μ L SYBRTM Gold por 30 minutos. Los geles se observaron en el fotodocumentador Dolphin View Wealtec.

2.3.15 Secuenciación

Se envió a secuenciar el producto PCR de 6 accesiones de soya que mostraron la presencia del evento cp4-epsps. Primero se realizó 2 réplicas de los productos amplificados y se validó el amplicon. Posteriormente se concentró el ADN a 20 μ L en tubos de 0,2 ml respectivamente etiquetados. El servicio de secuenciación lo brindó la empresa Universidad de las Américas UDLA (Quito, Ecuador), donde se purificó y secuenció a través de la técnica simple Sanger automatizada.

2.3.16 Alineamiento múltiple

Una vez secuenciadas las muestras de ADN se obtuvieron dos secuencias (*forward* y *reverse*) guardadas cada una en un documento con formato “txt”. Se usó el editor de secuencias de alineamiento BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999) con el fin de realizar tres pasos importantes: reverso complementario, algoritmo *Smith-Waterman* y algoritmo *Needleman-Wunsch*.

El reverso complementario convierte una secuencia de ADN en su reversa y luego aplica el complemento esto se aplica a cada secuencia *reverse*. Los pasos que se siguieron fueron: Sequence→Nucleic Acid→Reverse Complement.

El algoritmo *Smith-Waterman* es un algoritmo de alineamiento de secuencias local encuentra y alinea las regiones similares entre dos hileras con el fin de asegurar una secuencia óptima y coincidencia de un cien por ciento. (Smith & Waterman, 1970). Para la ejecución de

este algoritmo primero se importó las secuencias *forward* correspondientes y se siguió las instrucciones Alignment→Local Alignment.

El algoritmo *Needleman-Wunsch* es un algoritmo de alineamiento global, se basa en alinear y mostrar donde calza en forma perfecta o casi perfecta las secuencias (Needleman & Wunsch, 1970). Con el fin de verificar si las secuencias analizadas presentaban el evento de la soya modificada genéticamente se obtuvo la secuencia del constructo sintético de cp4-epsps (n ° de acc. GenBank AF464188.1). Además como control positivo se trabajó con la secuencia de la accesión de soya transgénica de la empresa Monsanto. Una vez alineada cada muestra con su *forward* y *reverse*. Se ejecutó las instrucciones: Accessory Application → ClustalW Multiple Alignment para obtener un alineamiento múltiple de todas las secuencias. Posteriormente se analizaron las secuencias para determinar su similitud.

CAPÍTULO III:

3 RESULTADOS

3.1 Extracción y cuantificación de ADN genómico

La extracción de ADN de las accesiones de soya que no estaban presentes en la colección de ADN Stock mediante el uso del protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia (1998) permitió obtener una buena concentración de ADN. La cuantificación de todas las muestras de ADN indicaron un rendimiento promedio de ADN genómico de 719 ng/ul.

3.2 Validación de muestras de ADN

Se validó la colección total de muestras de ADN de soya utilizando el primer (SaTT 530).que fue previamente probado. Los productos amplificados evidenciaron una buena calidad de ADN. En la **Figura 3**, se observa la validación de la colección de ADN de soya

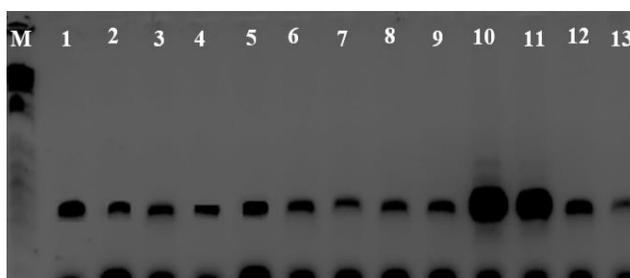


Figura 3 Validación de ADN de soya

Nota: carril M:marcador de peso ; carril 1 al 13 : accesiones I-308 M4.

3.3 Validación de Primers

Se verificó la validación de 10 marcadores SSR utilizando la temperatura de *annealing* reportada. En la **Figura 4** se observa algunos de los primers amplificados.

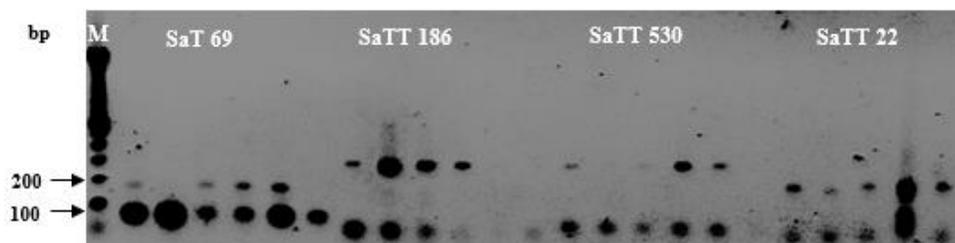


Figura 4 Validación de primers SSR para soya

3.4 Pruebas de amplificación y dúplex de primers con la técnica *M13-Tailing* para el analizador LI-COR 4300

Con los 10 primers SSR seleccionados se realizó pruebas de amplificación usando la metodología *M13-tailing* y se confirmó que todos los primers amplificaron los fragmentos de tamaño esperado. Posteriormente se probaron en combinaciones dúplex.

Como resultado de las pruebas dúplex, se obtuvieron 4 combinaciones dúplex por la temperatura similar de sus primers y su diferencia respecto al tamaño en pares de bases. Se decidió genotipar individualmente a 2 *loci* SSR por tener tamaños muy cercanos que podrían confundirse al momento de asignar las tallas de sus alelos. En **Tabla 11** se detallan las combinaciones seleccionadas.

Tabla 11
Combinaciones dúplex y monoplex para el genotipaje de soya

Combinaciones	Primers	Rango de tamaño (pb)	Marcaje M13(nm)
DÚPLEX 1	SaTT 215	175-200	700
	SaTT 38	120-145	
DÚPLEX 2	SaTT 197	180-210-	700
	SaTT 460	145-160	
DÚPLEX 3	SaTT 530	225-260	700
	SaTT 45	145-175	
DÚPLEX 4	SaTT 173	200-260	800
	SaT 186	325-350	
MONOPLEX 1	SaTT 22	180-220	800
MONOPLEX 2	SaT 69	150-180	700

En la **Figura 5** se puede apreciar un gel con los productos de amplificación de las combinaciones dúplex junto al marcador de peso molecular (50-350) pb IRDye, indicando una diferencia de por lo menos 30 pb entre los *loci* SSR seleccionados para que no se sobrepongan.

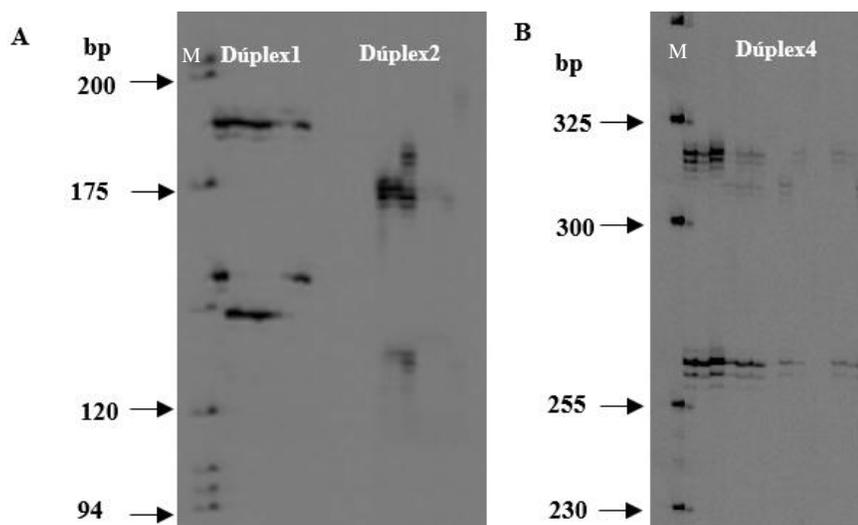


Figura 5 Amplificación de las combinaciones dúplex

Nota: carril M: marcador de peso (50-350) pb IRDye

3.5 Amplificación, Corrida electroforética y Genotipaje en el LI-COR 4300

Se analizó la imagen generada por el LI-COR 4300, en el programa *SAGA^{GT}*. Se señaló cada banda que representa un alelo con una “x”, los datos generados fueron registrados y compilados en una base de datos para realizar los análisis de diversidad genética (Anexo B). En la **Figura 6** se observan las imágenes de los geles analizados en el LI-COR 4300.

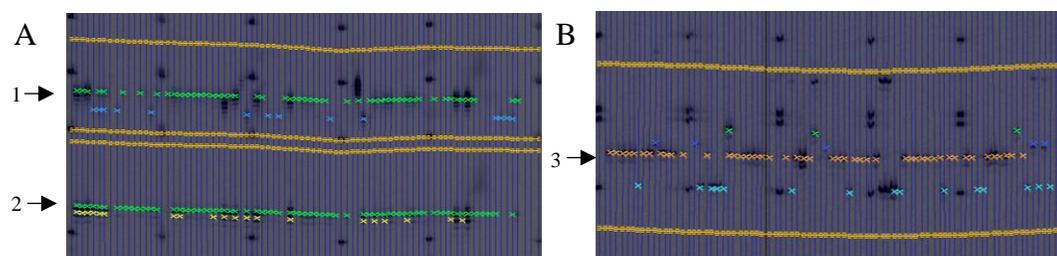


Figura 6 Imágenes de los Geles obtenidos en SAGA

Nota: A. Dúplex 4, 1: SaT 186, 2: SaTT 173. B Monoplex 1, 3: SaTT 22.

3.6 Análisis de Datos

3.6.1 Diversidad Genética

Se analizaron 95 muestras de Soya pertenecientes a la colección del INIAP con diez microsatélites, las cuales presentaron 46 alelos en un rango de longitud de 125 pb a 304 pb, con un promedio de 4 alelos/locus. El marcador SaTT 38 fue el menos polimórfico con 2 alelos y el marcador SaTT 197 el más polimórfico con 7 alelos y con un índice de PIC de 0.37 para SaTT 38 y 0.66 para SaTT 197 (**Tabla.12**).

Tabla 12
Análisis de diversidad genética de diez primers SSR

Marcador	Frecuencia Alélica	Número de Alelos	Diversidad	Heterocigosidad	PIC
SaTT 38	0.59	2	0.48	0.10	0.37
SaTT 215	0.62	4	0.55	0.04	0.50
SaTT 45	0.80	3	0.34	0.02	0.32
SaTT 530	0.41	5	0.70	0.03	0.65
SaTT 197	0.44	7	0.70	0.10	0.66
SaTT 460	0.83	4	0.29	0.02	0.27
SaTT 173	0.70	5	0.47	0.41	0.42
SaT 186	0.61	5	0.55	0.05	0.50
SaTT 22	0.72	5	0.44	0.01	0.40
SaT 69	0.35	6	0.70	0.02	0.63
Promedio	0.60	4	0.52	0.08	0.47

El alelo más frecuente fue el SaTT 45-133 pb con un valor de 0.80, en tanto que, los alelos de menor frecuencia fueron SaTT 197-179 pb; SaTT 173-204 pb; SaT 186-295 pb; SaT 69-170 pb con un valor de 0.01 cada uno (**Tabla 13**)

Tabla 13*Alelos registrados en cada marcador SSR con su respectiva frecuencia alélica*

Locus	Número de alelos	Alelos (pb)	Frecuencia alélica
SaTT 38	2	125	0.60
		134	0.40
SaTT 215	4	157	0.13
		169	0.62
		172	0.22
		175	0.03
SaTT 45	3	127	0.11
		133	0.80
		139	0.09
SaTT 530	5	214	0.09
		217	0.29
		220	0.02
		223	0.19
		244	0.41
SaTT 197	7	173	0.11
		179	0.01
		182	0.28
		185	0.44
		188	0.08
		191	0.02
		200	0.06
SaTT 460	4	114	0.11
		135	0.02
		141	0.83
		156	0.03
SaTT 173	5	198	0.06

CONTINÚA



		204	0.01
		207	0.02
		246	0.20
		249	0.70
		273	0.08
		289	0.25
SaT 186	5	295	0.01
		298	0.61
		304	0.03
		156	0.17
		159	0.02
SaTT 22	5	168	0.72
		174	0.05
		177	0.02
		152	0.35
		154	0.29
		156	0.31
SaT 69	6	166	0.02
		170	0.01
		176	0.02

Nota: En azul se muestran los alelos menos frecuentes y en rojo los alelos más frecuentes

3.7 Estructura Genética

3.7.1 Análisis de agrupamiento

Para visualizar si las 95 accesiones analizadas tienden a agruparse. Se realizó un árbol “Consenso” de 100 repeticiones. El árbol generado muestra la formación de dos subgrupos como se observa en la **Figura 7**.

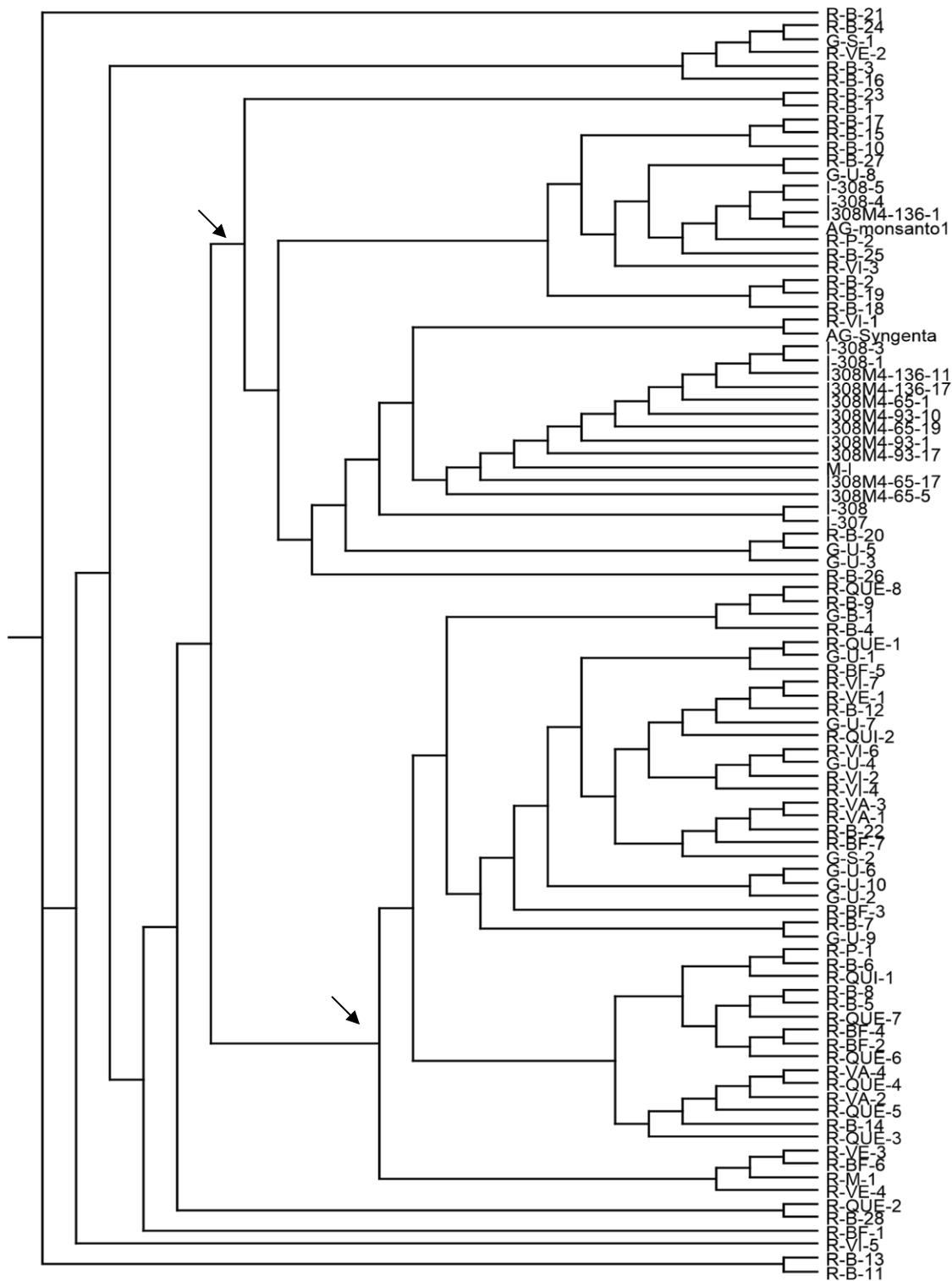


Figura 7 Dendrograma UPGMA basado en la distancia de los alelos compartidos que indica la agrupación de 95 accesiones de soya. Las flechas indican los grupos identificados.

3.7.2 Análisis de coordenadas principales

En el Análisis de Coordenadas Principales, se detectaron los mayores ejes de varianza, para lo cual se calculó los valores Eigen (**Tabla 14**), que indican el porcentaje individual y acumulado de la variabilidad que se encuentra en cada una de las coordenadas. De esto se obtuvo que, la primera coordenada muestra un 26.01% de la variabilidad de las accesiones de soya, la segunda coordenada muestra un 13.21%, y juntas presentan el 29.22% de la variabilidad total.

Tabla 14

Valores Eigen y porcentajes individuales y acumulados de la varianza de las tres primeras coordenadas

Coordenada	Valor Eigen	Porcentaje Individual (%)	Porcentaje Acumulado (%)
1	5.79	26.01	26.01
2	2.94	13.21	39.22
3	2.12	9.51	48.73

En la **Figura 8** se puede observar que mediante el análisis de coordenadas principales aplicado en las 95 accesiones de soya separa a los individuos en dos grupos genéticos respecto a la primera coordenada. En color verde se observan las accesiones del grupo G1 y rojo las accesiones del grupo G2. Las accesiones correspondientes a las accesiones de las provincias de los Ríos y Guayas se agrupan en el grupo G2 mientras que en el grupo G1 se evidencian las accesiones pertenecientes de la Estación Experimental Litoral Sur “EELS” del INIAP.

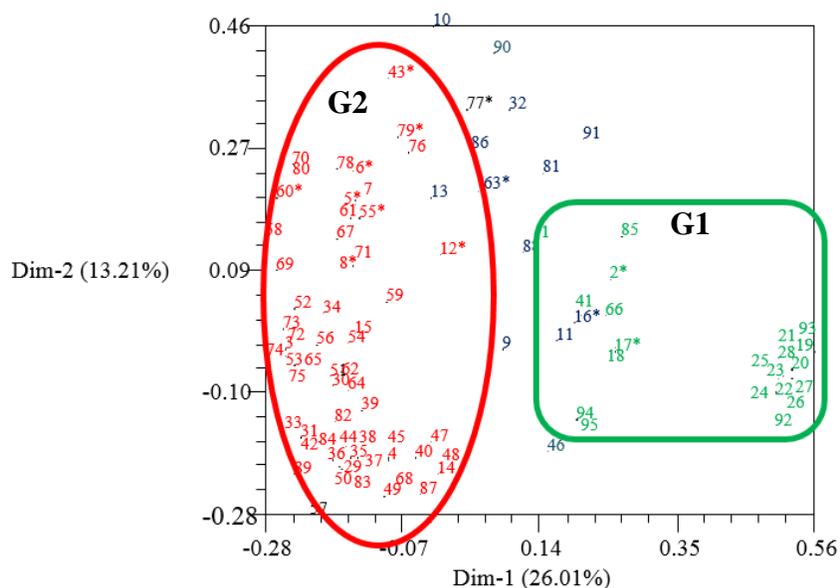


Figura 8 Análisis de coordenadas principales en las dos primeras coordenadas, obtenido con el coeficiente de similitud SM, que indica la agrupación de 95 accesiones de soya. En color verde se indican las accesiones del grupo G1 y en rojo las accesiones del grupo G2.

En la **Figura 9** se observa una tercera coordenadas que muestra un 9.51% de variabilidad adicional (**Tabla 14**), lo que suma un acumulado de 48.73% de la variabilidad total observada para las accesiones de Soya analizadas. En la gráfica se aprecia mejor la distribución espacial de las 95 accesiones en los dos Grupos G1 y G2 permitiendo apreciar las relaciones de cada accesión con todas las demás.

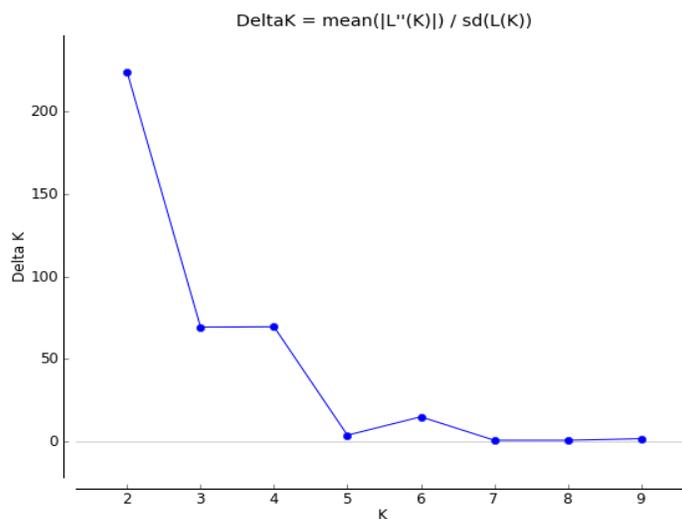


Figura 10 Distribución de valores ΔK vs K basado en el análisis de estructura poblacional de 95 accesiones de soya con 10 marcadores SSR en el programa Structure Harvester.

En la **Figura 11** se observa el gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia generado en el programa Structure vs 2.3.4 para las 95 accesiones de soya en base a una población $k=2$. En el gráfico se aprecia mejor las muestras que conforman los grupos G1 y G2. El grupo G1 se encuentra conformado por 57 muestras todas ellas pertenecientes a los diferentes cantones en las que se realizó la recolección del material, el grupo G2 por su parte agrupó a 24 accesiones en su mayoría pertenecientes a las variedades liberadas por el INIAP. Además se observa la discriminación de 14 accesiones intermedias muestras 10 (522), 12 (687), 13 (681), 14(697), 16 (I-307), 32 (654), 46 (593), 48 (670), 63 (642), 81(752), 86 (672), 88(602), 90 (675) lo cual nos da a entender que estos individuos comparten caracteres genéticos de ambos grupos.

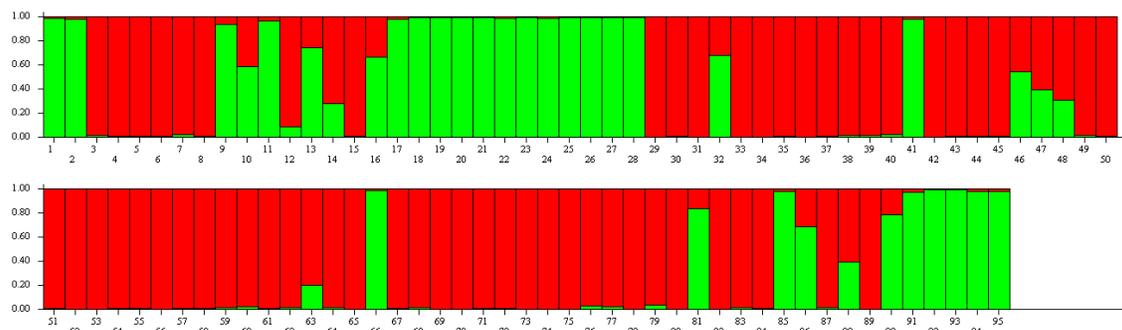


Figura 11 Gráfico de barras de los coeficientes de pertenencia de 95 accesiones de soja obtenido en el programa Structure vs 2.3.4. En color verde se evidencian las accesiones identificadas en el Grupo G1 y en rojo las accesiones del grupo G2.

Nota: eje de las x: individuos, eje y: coeficiente de pertenencia.

3.9 Análisis de AMOVA

El análisis molecular de varianza (AMOVA) realizado para examinar las diferencias genéticas que existe entre la población G1 y la población G2 determinó que el 41% de la diversidad genética se debe a la diferenciación entre las poblaciones, mientras que el 59% de la diversidad se debe a la diferenciación presente dentro de cada población (**Tabla 15**). El AMOVA también mostró un valor F_{st} de 0.40.

Tabla 15

Análisis molecular de varianza de la población G1 y G2 de soja empleando 10 marcadores SSR

Origen de la variación	g.l	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Componente de Varianza	%variación genética
Entre poblaciones	1	193.64	193.64	5.34	41
Dentro de las poblaciones	80	626.037	7.82	7.82	59
Total	81	819.68		13.17	100

En la **Figura 12** se observa gráficamente los resultados del AMOVA generado en Gen Alex. 6.5 (Peakall & Smouse, 2006) efectuado sobre los grupos G1 y G2 que se identificaron en el análisis de asignación genética.

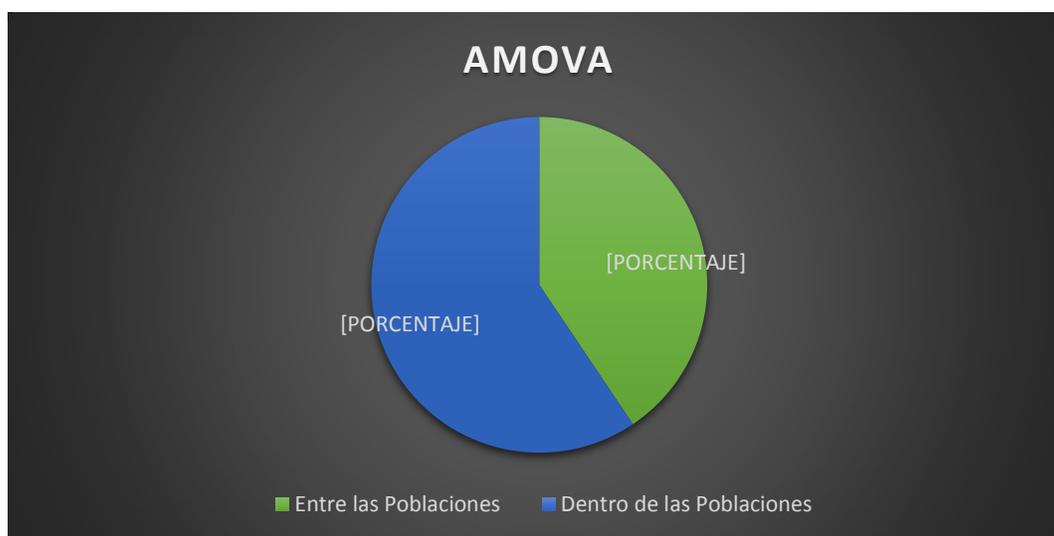


Figura 12 Porcentaje del análisis molecular de varianza de los grupos G1 y G2 de las accesiones de soya obtenido en el software GenAlex ver 6.5.

3.10 Detección molecular de soya modificada genéticamente

Se realizó pruebas de detección molecular de soya transgénica en 87 accesiones de soya provenientes del Litoral Ecuatoriano que mostraron resistencia a Glifosato en campo (Anexo A). Mediante la técnica de PCR se confirmó la presencia del promotor 35-S, el terminador EPSPS-NOS y la proteína CP4-EPSPS. En la **Figura 13** se observan algunos de los productos PCR efectuados en la identificación de cada secuencia control. Las bandas amplificadas evidencian el tamaño correcto del fragmento PCR.

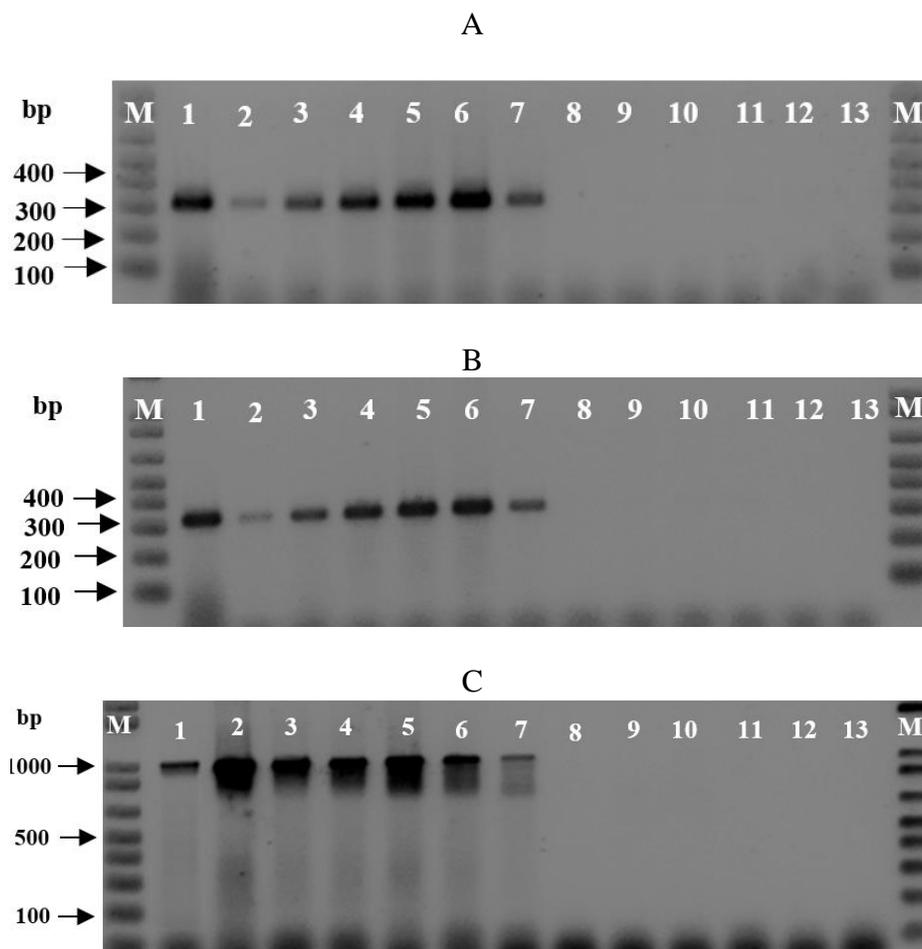


Figura 13 Productos PCR de la detección de soya modificada genéticamente. **A.** Promotor 35-S de 317pb. **B.** Terminador EPSPS-NOS de 342 pb. **C.** CP4-EPSPS de 1050 pb.

Nota: Carril M: marcador de peso 1Kb DNA Ladder, carriles 1, 2 y 3: Ag Monsanto; carril 4: 522; carril 5: 729; carril 6: Mutante Irradiada; carril 7: I-308 M4 65-1; carril 8: Ag Syngenta; carril 9: 636; carril 10: 776; carril 11: I-308; carril 12: I-307; carril 13: blanco.

En la **Tabla 16** se indica los resultados presencia/ausencia de soya modificada genéticamente de cada accesión analizada. De las 87 accesiones analizadas, 77 fueron positivas y solo 10 fueron negativos.

Tabla 16

Resultados de la detección de soya modificada genéticamente en accesiones que mostraron resistencia a Glifosato

Provincia	Cantón	Código	Presencia	Ausencia
Guayas	Urbina Jado	490		x
		625		x
		605	X	
		522	X	
		525	X	
		687	X	
		681	X	
		697	X	
		683	X	
		686	X	
	Baquerizo Moreno	533	x	
	Simón Bolívar	621	x	
		543		x
Los Ríos	Babahoyo	509	x	
		510	x	
		512	x	
		513	x	
		721	x	
		722	x	
		725	x	
		647		x
		651	x	
		559	x	
		653	x	
		654	x	

CONTINÚA



		739	x	
		729	x	
		742	x	
		503	x	
		744	x	
		567	x	
		569	x	
		663	x	
		573	x	
		574		x
		591	x	
		592	x	
		593	x	
		669	x	
		670	x	
		757	x	
	Buena Fe	768	x	
		769	x	
		771	x	
		636		x
		772	x	
		641	x	
		642		x
	Montalvo	656	x	
	Pueblo Viejo	762	x	
		596	x	
	Quevedo	576	x	
		577	x	

CONTINÚA



		578	x	
		579	x	
		580	x	
		581	x	
		582	x	
		555	x	
	Quisaloma	749	x	
		751	x	
	Valencia	776		x
		777	x	
		778		x
		781	x	
	Ventanas	752	x	
		756	x	
		583	x	
		584	x	
	Vinces	598	x	
		672	x	
		601	x	
		602	x	
		766	x	
		675	x	
		676	x	
BRASIL (T+)	AG SyngentaO	-		x
	AG Monsanto	-	x	
EELS (T-)	INIAP-308	-		x
	Mutante Irradiado	-	x	
	I308M4-93-1	-	x	

CONTINÚA



	I308M4-93-10	-	x	
	I308M4-93-17	-	x	
	I308M4-65-5	-	x	
	I308M4-65-10	-	x	
	I308M4-65-19	-	x	
	I308M4-65-17	-	x	
	I308M4-136-1	-	x	
	I308M4-136-11	-	x	
	I308M4-136-17	-	x	

Nota: Para confirmar una muestra como presente para soya modificada genéticamente esta tenía que ser positiva al promotor 35-S, el terminador EPSPS-NOS y la proteína CP4-EPSPS.

3.10.1 Alineamiento múltiple.

Con la finalidad de comparar si las accesiones de soya con resultados positivos para soya genéticamente modificada mediante la detección de la proteína CP4-EPSPS de 1050 pb. Se envió a secuenciar 5 accesiones de soya, 3 de ellas formaban parte de las variedades provenientes de las provincias de los Ríos y Guayas muestras 522, 769 y 768 y 2 muestras pertenecientes a la EELS accesiones I308M4-136-1, I308M4-65-19. El alineamiento múltiple de estas secuencias se efectuó con dos controles positivos: la secuencia de soya transgénica de la empresa Monsanto y la accesión del GenBank AF464188.1 que es un constructo sintético de CP4-EPSPS. Como se observa en la **Figura 14** el análisis de alineamiento múltiple realizado en el software BioEdit identificó que las secuencias estudiadas eran completamente homólogas.

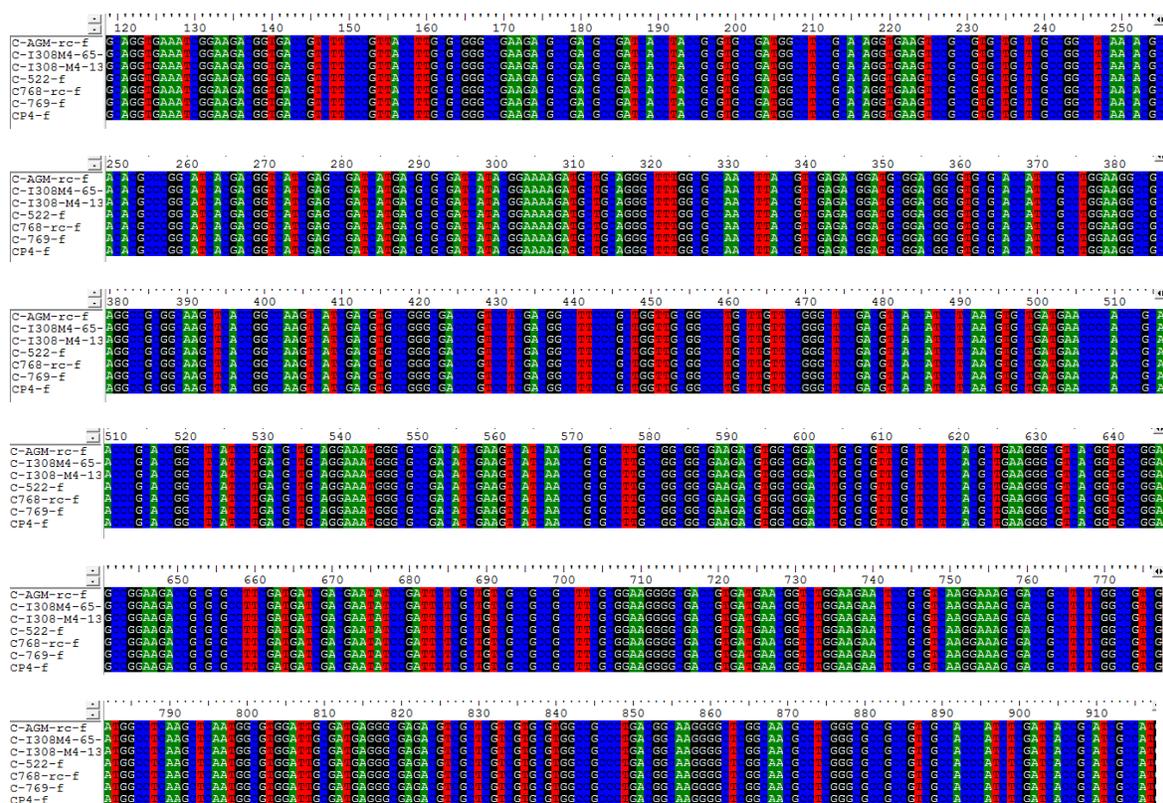


Figura 14 Alineamiento múltiple usando BioEdit de las accesiones I-308M4-65-19, I-308M4-136-1, 522, 768, 769, AG Monsanto y el gen CP4-EPSPS que amplificaron el fragmento PCR de 1050pb de la proteína CP4-EPSP.

CAPÍTULO IV:

4 DISCUSIÓN

4.1 Extracción y validación de ADN

La extracción de ADN genómico de calidad es el paso inicial en diversas técnicas moleculares (Cerdeira & Díaz, 2013). Si bien en este estudio ya se contaba con una colección de ADN Stock fue necesario realizar un proceso de extracción de ADN en 12 accesiones de soya de las cuales solo se contaba con muestras de semilla. Se trabajó con el protocolo de extracción de ADN vegetal mediante el agente químico CTAB (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Para la extracción del ADN se usó el embrión de las semillas. Por ello se homogenizó la muestra junto con el buffer de extracción mediante el uso de un pistilo, pues como sugiere Velázquez, Aragón & Cornejo (2015) es recomendable homogenizar el material vegetal cuando se trabaja con poca muestra y así garantiza el rompimiento de las células y su interacción con la solución de lisis.

El protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia, (1998) emplea como reactivos el CTAB, CIA e isopropanol. Los solventes como el cloroformo y el alcohol isoamílico en el protocolo de extracción van a permitir separar el ADN de las proteínas y lípidos (Velázquez et al. 2015). Mientras que el isopropanol y el etanol va a permitir el pliegue del ADN y su precipitación (Cerdeira & Díaz, 2013). Por otra parte el *buffer* de extracción CTAB es altamente eficiente en la extracción de ADN vegetal a partir de pequeña muestra de tejido (Ferreira & Grattapaglia, 1998) como es el caso del embrión de la soya, lo cual lo convierte en uno de los mejores *buffers* para la extracción de ADN a partir de esta clase de tejido.

La cuantificación del ADN reportó una cantidad promedio de ADN de 719 ng/ul. Mientras que la validación del ADN empleando el primer SaTT 530 evidenció el fragmento amplificado pues se observó una banda clara y bien formada. Estos resultados indican que el protocolo descrito por Ferreira & Grattapaglia, (1998) permite obtener una buena cantidad y calidad de ADN a partir del embrión de semillas de soya, por lo cual, el material genético es idóneo para los análisis de diversidad genética así como para las pruebas de detección de soya transgénica resistente al herbicida glifosato.

4.2 Validación de Primers

De los 25 marcadores SSR analizados, 10 de ellos amplificaron el fragmento PCR demostrando que las condiciones de PCR estándar descritas por Morillo & Miño (2011) fueron óptimas en la amplificación de estos primers. Con los 15 primers restantes que no evidenciaron la amplificación del fragmento PCR se realizaron pruebas con gradientes de $MgCl_2$ y temperatura de *annealing*.

Primero se llevó a cabo pruebas con gradientes de $MgCl_2$. Espinoza (2003) sugiere que al disminuir la concentración de Mg^{2+} se mejora la especificidad de la ADN polimerasa además debe ser lo primero que se debe ajustar en una reacción de PCR. Sin embargo, no se observó la amplificación del fragmento PCR. Posteriormente se estandarizó la reacción con variaciones en la temperatura de anillamiento. Espinoza (2003) menciona que si la temperatura de anillamiento es muy baja obtendremos una PCR menos específica mientras que al aumentar la temperatura la especificidad será mayor, por tanto se probó con diferentes temperaturas (49, 51, 54 °C) no obstante la PCR no mostró ninguna banda.

Posiblemente los oligonucleótidos estuvieron mal diseñados, defectuosos o degradados (Espinoza, 2003) por lo cual no se pudo evidenciar su amplificación. Finalmente se decidió descartar los 15 primers del estudio por la ausencia de producto PCR.

4.3 Diversidad Genética

La diversidad genética es muy importante para salvaguardar la alimentación humana, un ejemplo de ello fue la hambruna que asoló Europa a finales de 1830 que casi acabo con el cultivo de papa y el único modo de controlar la enfermedad fue buscando ejemplares resistentes en América Latina que es su lugar de origen (INIAP, 2008). La evaluación de la diversidad genética tiene implicaciones significativas en la mejora de cultivos, permitiendo a los genetistas entender la estructura del germoplasma y seleccionar a los individuos que producirán las progenies más variables (Vinu et al. 2013). También ayuda a la protección de la variabilidad genética disponible (Bisen, Khare, Nair & Tripathi, 2015) y se la puede determinar entre individuos o poblaciones utilizando morfo-enfoques lógicos, bioquímicos y moleculares (Vinu et al. 2013).

El último informe nacional sobre el estado de los recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la alimentación en el Ecuador, no evidencian estudios sobre caracterización o evaluación de germoplasma para el cultivo de soya (INIAP, 2008). Por lo cual el objetivo de este estudio fue caracterizar molecularmente la variabilidad genética de variedades comerciales de soya provenientes del Litoral ecuatoriano y con la ayuda de análisis estadísticos determinar el nivel de diversidad genética del cultivo con el fin de que los resultados obtenidos puedan ser utilizados por los programas de mejoramiento o conservación de recursos presentes en el territorio nacional.

Los marcadores moleculares como los RAPD, SSR y otros representan una herramienta de precisión y eficacia en la evaluación de la diversidad genética (Morgante & Olivieri, 1993). Las repeticiones de secuencias simples denominadas microsatélites “SSR” han resultado ser un instrumento útil en los estudios genéticos de soya, principalmente por ser considerada como una técnica simple, rápida y muy confiable (Akkaya et al. 1992). Varios investigadores como Creggan et al. 1999; Rongwen et al. 1995; Hudcovicová, & Kraic, 2003; Hwang et al. 2008; Arnaog et al. 2010; Tantasawat et al. 2011; Kumawat et al. 2015, también han reportado el gran éxito de los SSR en los estudios de diversidad genética en soya al evidenciar un mayor polimorfismo que otros marcadores moleculares usados con el mismo fin.

Los motifs (AT)_n, (TAT)_n (Morgante & Olivieri, 1993) y (ATT)_n (Akkaya et al. 1992) son los que se encuentran más ampliamente distribuidos en el genoma de la soya, revelando que estos SSR son altamente polimórficos, estables y pueden ser usados con gran éxito en estudios poblacionales, mapeo físico e identificación de variedades. El Departamento Nacional de Biotecnología del INIAP cuenta con un grupo de primers tipo SSR que poseen motifs TAA, TAT, ATT, AT reportados por Akkaya et al. (1992) y Creggan et al. (1999) mismos que fueron escogidos en el estudio de variabilidad genética.

La riqueza alélica es uno de los índices de diversidad genética más importantes. En el presente estudio, de un total 10 SSR analizados en 95 accesiones de soya se obtuvieron 46 alelos en un rango de longitud de 125 a 304 pb, con un promedio de 4 alelos/locus, un valor moderado en comparación a los reportados en estudios previos como el de Akkaya et al. (1992) que al evaluar un grupo de 43 genotipos de soya detectó un promedio de 7 alelos por locus o el de

Rongwen et al. (1995) que observó un promedio de 18 alelos en siete loci SSR al analizar 96 genotipos de soya.

El índice de contenido polimórfico “PIC” es una medida de la diversidad genética y provee una estimación del poder discriminatorio de cada locus, teniendo en cuenta el número de alelos y sus frecuencias relativas en cada población (Lima, 2009). En este estudio se encontró un valor promedio de PIC de 0.47. Cabe resaltar que si bien el valor PIC obtenido en este estudio es menor a los señalados por Akkaya et al., 1992; Rongwen et al., 1995; Hudcovicová & Kraic, 2003; Kumawat et al., 2015 aún es mayor a la diversidad registrada para RAPD y RFLP que evidencian una índice de diversidad de 0.35 (Brown-Guedira, Thompson, Nelson, & Warburton, 2000) demostrando la hipervariabilidad y la producción de mayor información de los *loci* SSR en comparación con otros sistemas moleculares.

Los primers SaTT 197 y el primer SaT 69 fueron los microsatélites que mayor número de alelos evidenciaron con 7 y 6 alelos respectivamente e índices de contenido polimórfico entre 0.66 y 0.63. Morgante & Olivieri, (1993) detectaron entre 7 y 8 bandas para los motifs AT_n y TAT_n indicando un alto nivel de discriminación y su utilidad en los estudios de diversidad genética. El primer SaTT 197 presenta un motivo ATT_{20} y el primer SaT 69 un motivo AT_{21} por lo tanto a ser motifs que se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma de la soya son primers con un alto poder discriminatorio tal como lo evidencian en esta investigación.

En los estudios de Akkaya et al. (1992) y Rongwen et al. (1995) en su mayoría los individuos analizados son genotipos locales observando una riqueza alélica más alta. En el mismo estudio de Rongwen et al. (1995) al evaluar por separado solo los genotipos introducidos

se observó una reducción casi a la mitad de los alelos identificados (entre 5 y 9 alelos/locus) lo que indica que el tipo de accesión analizada juega un papel fundamental en los análisis de diversidad genética.

Según Guamán et al. (1996) cuando se inició el cultivo de soya en el país por el año de 1970 se sembraron variedades introducidas principalmente de Estados Unidos y Colombia. Posteriormente el INIAP a través del programa de oleaginosas ha ido liberando distintas variedades de acuerdo a las necesidades del país como INIAP: “Júpiter, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307 y 308” (González M. , 2015). Sin embargo de acuerdo al informe de Rendimientos de soya en el Ecuador 2017 las variedades más empleadas por los agricultores son INIAP -307, P-34 y transgénica por lo cual se presume que estas son las variedades que más se comercializan en el país (MAG, 2018).

Se considera que la estrecha diversidad genética observada en el análisis de caracterización molecular de 95 muestras de soya se debe al tipo de accesiones analizadas. Si bien, se desconoce con certeza la genealogía de los individuos evaluados, éstas al provenir de casas comerciales de las principales provincias de producción como Guayas y los Ríos son empleadas con fines de producción por lo por lo cual se presume que pueden pertenecer a las variedades que son más empleadas por los agricultores como INIAP-307, P-34 y transgénica.

4.4 Estructura Genética

Después de realizar el análisis UPGMA, se encontró que las accesiones de la colección de soya del INIAP se estructuran genéticamente en dos grupos G1 y G2 con varios subgrupos que no se logran identificar claramente. La reducida diferenciación observada entre las accesiones

analizadas muestran la estrecha relación genética entre el germoplasma de soya evaluado en este trabajo por lo tanto es importante realizar un muestreo más extenso y que cubra otras zonas soyeras del territorio nacional, esto brindara un panorama más claro sobre la diversidad genética de este cultivo en el Ecuador.

El análisis de coordenadas principales represento a la colección de soya en dos grupos G1 y G2 pero en comparación al análisis UPGMA esta estaba mejor estructurada. El PCA evidencia que tanto el grupo G1 como G2 poseen muestras que se solapan unas con otras indicando una base genética estrecha. El grupo G1 contiene en su mayoría a las accesiones del INIAP mientras que el grupo G2 a las accesiones provenientes de las provincias de los Ríos y Guayas. La diferenciación de estos grupos puede deberse a que los genotipos del INIAP (INIAP-308; INIAP-308 M4) son variedades de alto rendimiento mejoradas por selección de un grupo de cultivares que fue introducido desde Bolivia en el año 2000 (Guamán & Andrade , 2009) mientras que las accesiones recolectadas en las diferentes provincias provienen de distintas casas comerciales.

Algo singular que muestra el PCA es que las réplicas del genotipo INIAP-308 muestras (17, 92, 93, 94, 95) no se solapan. Al visualizar la matriz genotípica (Anexo B) se observa que los alelos encontrados en las accesiones del genotipo INIAP-308 varían entre sí. Por una parte la muestra 17 (INIAP-308) es más similar a la muestra 16 (INIAP-307) difiriendo únicamente en un alelo reportado por el SSR SaTT 530, en tanto, las accesiones 92 (INIAP-308 replica 1) y 93 (INIAP-308 replica 2) se solapan con el genotipo INIAP-308-M4 que son accesiones identificadas como mutantes irradiadas de INIAP-308.y las muestras 94 (INIAP-308 replica 4) y 95(INIAP-308 replica 5) son similares a la muestra 46 (593) difiriendo únicamente en un alelo reportado por el primer SaTT 530.

Según los resultados observados por el PCA en el genotipo INIAP-308 se podría pensar que se produjo una mezcla de las semillas o una mala identificación. Como menciona Guamán & Andrade, (2009) la variedad INIAP-308 fue evaluada en campo en 24 ensayos que se llevaron a cabo por parte del Programa Nacional de Oleaginosas de Ciclo Corto con el apoyo de la gestión de gremios sojeros en las zonas de Buena Fe, San Carlos, Pichilingue, Ventanas, San Juan, Montalvo, Pueblo Nuevo y en la Estación Experimental Litoral Sur. Como nos menciona Redolfi, González, Pucheta, & Canali, (2016), el análisis de semillas es una actividad muy importante en la producción de granos y su identificación es realizada por personal capacitado usando inspección visual, lo cual de cierta forma genera un grado de subjetividad y puede conllevar a errores en su clasificación, que pueden generar los resultados obtenidos en esta investigación. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que los ensayos del genotipo INIAP-308 al realizarse en diferentes localidades se pudieron mezclar con cultivares de las zonas ocasionado una mezcla de material vegetal en la base del INIAP.

4.5 Asignación genética

La delimitación de la estructura de una población, usualmente solo es posible usando datos genéticos (Vía & Fernández, 2015). Con la finalidad de determinar mejor la estructura de la colección de soya del INIAP y ratificar los resultados del agrupamiento UPGMA y el PCA, se realizó un análisis de asignación con base en la matriz genética reportada por los 10 SSR utilizando el programa Structure (Pritchard et al. 2000).

Structure estima el número de poblaciones de acuerdo al genotipo y la frecuencia de los alelos que presentan los individuos. Cuando no se conoce una estructura genética definida Structure evalúa el número más probable de poblaciones (K) al representar gráficamente Delta K

vs K. El valor de K más probable será aquel que haga claramente máximo a Delta K (González A. , 2016). El análisis realizado asignó la colección de soya en dos poblaciones. Al contrastar estos resultados con el PCA se puede observar que ambos concuerdan en la asignación de grupos.

La asignación genética idéntico que el grupo G1 está conformado por 57 muestras todas ellas pertenecientes a los diferentes cantones de recolección. El grupo G2 por su parte agrupó a 24 accesiones en su mayoría muestras del INIAP. En ambas poblaciones se puede apreciar la homogeneidad de sus accesiones así como su estrecha relación genética. También se observa la discriminación de 14 accesiones intermedias muestras 10 (522), 12 (687), 13 (681), 14(697), 16 (I-307), 32 (654), 46 (593), 48 (670), 63 (642), 81(752), 86 (672), 88(602), 90 (675) lo cual nos da a entender que estos individuos comparten caracteres genéticos de ambos grupos. Estos resultados corroboran la información obtenida en el análisis de PCA en donde también se evidencia la discriminación de especies intermedias entre ambos grupos.

4.6 Análisis de AMOVA

El análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para examinar las diferencias existentes en las poblaciones G1 y G2 identificados mediante el estudio de asignación genética y descartando a las accesiones intermedias indicó que la mayor diversidad genética se debe a la variabilidad existente dentro de las poblaciones con un 59% y un 41% corresponden a la variabilidad entre las poblaciones. Resultado que concuerda con el estudio de Li et al, (2010) sobre análisis de diversidad genética en soya mediante repeticiones de secuencias simples e indico que el mayor componente de variación (73.9%) se da entre los individuos dentro de las poblaciones. Estos resultados indican que la mayor varianza molecular se da dentro de los individuos de las poblaciones lo cual implica que el flujo génico entre poblaciones es bajo.

Además todas las pruebas realizadas evidencian la baja diversidad genética del cultivo de soya en el territorio Ecuatoriano

4.7 Detección de la proteína CP4-EPSPS en variedades de soya

En el año de 2008, se aprobó la nueva constitución del Ecuador en la que se declaran un país libre de semillas y cultivos transgénicos. Sin embargo, como menciona Bravo & León, (2013) existen dudas si realmente en el país los cultivos no están contaminados con transgénicos. Con la finalidad de hacer una vigilancia de los cultivos que podrían ser potencialmente transgénicos se conformó la Red de Guardianes del Ecuador Libre de Transgénicos conformada por la FECAOL (Federación de Centros Agrícolas y Organizaciones Campesinas del Litoral), Acción Ecológica y el Colectivo Agroecológico (Barreno & Bravo, 2015).

Uno de los cultivos monitoreados por estas organizaciones fue el maíz, misma que se realizó entre los años de 2012 y 2013 en 15 provincias del Ecuador, más no se observó material transgénico en este cultivo. Otro cultivo analizado fue la soya estudio realizado por Intriago, Pérez & Bravo, (2014), en donde se llevó a cabo un proceso de monitoreo entre los meses de junio y agosto de 2013 en los mercados, tiendas de abastos y supermercados del Ecuador para detectar la proteína transgénica CP4 EPSPS presente en los granos de soya Roundup Ready, los resultados evidenciaron la presencia de soya transgénica.

En el presente estudio se decidió monitorear el promotor 35-S, el terminados ESPS-NOS y la proteína CP4-EPSPS en 87 accesiones de soya que mostraron resistencia a glifosato en campo puesto que estudios previos evidencian la presencia de soya transgénica en el país. Si bien, en la actualidad se cuenta con muchos métodos que permiten la detección de OGMs, uno de

los más sensibles en su detección es la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Magaña, Islas, Yepiz, & Calderón, 2003). La PCR permite amplificar y detectar secuencias reguladoras que se usan en la construcción de transgénicos como promotores y terminadores (Windels, Taverniers, Depicker, Van Bockstaele, & De Loose, 2001).

La mayoría de evaluaciones de soja RR amplifican el promotor 35-S, el gen epsps y el terminador NOS que se emplean en el constructo sintético de CP4-EPSPS (Wu et al. 2012) por lo tanto en este estudio se analizaron las 87 accesiones de soja que mostraron resistencia a Glifosato en campo empleando el método de PCR con los pares de cebadores usados en los estudios de Watrud et al. (2004) y Zhang et al. (2007) que permiten la detección de la proteína CP4-EPSPS, el promotor 35S-CTP, el terminador EPSPS-NOS ya que estos mostraron ser reproducibles, rápidos y sensibles.

Algo muy importante al emplear la técnica de PCR en la detección de OGMs es comprobar la calidad y amplificación del ADN. En un inicio se pensaba emplear el par de primers Lec EF/Lec ER usado por Zhang et al. (2007), como un control de soja al amplificar lectina (gen doméstico de la soja), pero después de una serie de pruebas de PCR los resultados obtenidos no mostraron amplificación, entonces se tomó en cuenta la validación del ADN con el marcador SaTT 530 que se llevó a cabo en el estudio de variabilidad genética a manera de control de calidad y eficacia del ADN a investigar.

En los primeros ensayos se observó que la reacción de PCR es muy sensible y puede ocasionar falsos positivos. Ya que durante la preparación puede darse algún tipo de contaminación (Mejía, 2011), por ello se decidió tomar medidas preventivas en las pruebas. Se

trabajó en una área completamente estéril y aislada evitando el uso de la cámara de flujo laminar en la preparación de la reacción de PCR debido a la formación de aerosoles que contaminaban las muestras, se trabajó siempre con alícuotas nuevas de los reactivos y un juego de pipetas único. Tomando en cuenta estos tips la PCR es un método confiable, sensible, específico y rápido en la detección de soya GM (Zhang et al. 2007) como lo demuestran nuestros resultados.

De las 87 accesiones analizadas se detectó que 77 muestras amplifican el promotor 35S-CTP, el terminador EPSPS-NOS y la región CP4-EPSPS, lo cual sugiere que se trata de accesiones transgénicas. De cierta manera ya se sospechaba de la obtención de estos resultados, pues anteriores estudios ya evidencian la presencia de soya genéticamente modificada en el país, como el de Intriago, Pérez & Bravo, (2014); Intriago & Bravo, (2016) o la evaluación de OGMs desarrollada por Mejía, (2011) en granos de soya colectados en diferentes centros de Acopio.

Las accesiones de soya que obtuvieron resultados positivos se encontraban presentes en todos los cantones en que se realizó la recolección, en Urbina Jado (7), Baquerizo Moreno (1), Simón Bolívar (1), Babahoyo (26), Buena Fe (5), Montalvo (1), Pueblo Viejo (2), Quevedo (8), Quisaloma (2), Valencia (2), Ventanas (4) y Vinces (5). En un segundo estudio realizado por Intriago & Bravo, (2016) sobre un monitoreo participativo en campo se reportó los primeros indicios de la presencia de cultivos de soya transgénicos, en las zonas productoras de las provincias de los Ríos y Guayas. Estos resultados coinciden con los encontrados en esta investigación, pues también se observa una alta incidencia de soya genéticamente modificada en las provincias de los Ríos y Guayas.

Por otra parte las accesiones de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP identificadas como Mutante Irradiado, I308M4-93-1, I308M4-93-10, I308M4-93-17, I308M4-65-5, I308M4-65-10, I308M4-65-19, I308M4-65-17, I308M4-136-1, I308M4-136-11, I308M4-136-17 de las cuales se pensaba que habían obtenido la resistencia al herbicida Glifosato por alguna mutación obtuvieron resultados positivos a soya GM. En la investigación de Intriago, Pérez & Bravo, (2014) también se analizaron 6 semillas del INIAP aunque no se especifica el genotipo se observó que una de ellas obtuvo resultados positivos. En consecuencia se pensaría que el genotipo INIAP-308M4 no adquirió la resistencia al herbicida glifosato como consecuencia de la irradiación llevada a cabo sobre estas muestras.

Con la finalidad de comprobar que las accesiones analizadas comparten el mismo evento que la soya modificada genéticamente se realizó un alineamiento múltiple en el programa BioEdit. Se analizaron 3 secuencias provenientes de las accesiones comerciales 522, 769,768 y 2 de las secuencias de las muestras I308M4-136-1, I308M4-65-19. Como secuencia control, se empleó AG-Monsanto y la secuencia de GenBank AF464188.1 que es un constructo sintético de CP4-EPSPS empleado por Watrud et al. (2004) en la síntesis de los primers P217F/P218R que amplifican un segmento de 1050 pb de la región de codificación de la CP4-EPSPS. El análisis de alineamiento identificó que las secuencias estudiadas eran completamente homólogas. Esto permite evidenciar la sensibilidad y especificidad del método de PCR en la detección de OGMs.

El alineamiento múltiple evidencia la presencia del constructo sintético en las accesiones provenientes de las casas comerciales. Estos resultados indican que en el país se distribuye semilla transgénica tal como se menciona en el informe de rendimientos de soya en el Ecuador 2017 (MAGAP, 2017). El genotipo INIAP-308M4 también evidencia la presencia del constructo

sintético por lo cual se descarta la posibilidad que este genotipo adquirió la resistencia al herbicida glifosato producto de la irradiación.

Como se observó en el estudio de caracterización molecular existe una posible mezcla de semillas del genotipo INIAP-308 o una mala identificación lo cual puede ser la causa de la presencia de soya transgénica en el genotipo INIAP-308M4. Si bien, las pruebas de PCR para detectar el promotor 35-S, el terminador EPSPS-NOS y la proteína CP4-EPSPS no evidencian la amplificación de estos fragmentos en el genotipo INIAP-308, no se descarta la posibilidad de que al irradiar estas muestras para obtener el genotipo INIAP-308M4 se tomaron muestras que ya eran transgénicas.

Desde el inicio de la transformación genética de ciertos cultivares de importancia mundial como la soya, maíz, algodón y canola se ha planteado la pregunta de si estos organismos liberados de manera masiva en los agro-ecosistemas pueden causar efectos ambientales negativos en el mediano plazo, o efectos evolutivos desastrosos en el largo plazos resultado del flujo de genes desde cultivos modificados genéticamente hacía sus parientes salvajes (Giraldo, 2009). Se han desarrollado investigaciones que nos dan una respuesta a esta interrogante como la investigación de Blanco (2012) quien monitoreo el flujo de genes de cultivos transgénicos de maíz a razas locales y variedades comerciales de maíz en el Valle de San Juan en Tolima y al emplear las técnicas de *ImmunostripTM*, PCR y ELISA indican la existencia de flujo de genes vía semilla y vía polen.

La transferencia de genes desde los OGMs hacia poblaciones silvestres depende de varios factores: las plantas cultivadas y las especies silvestres deben ser sexualmente compatibles, deben

crecer juntas en el mismo lugar y florecer al mismo tiempo, además de existir un medio de transporte del polen de una hacia otra (Giraldo, 2009). Esta podría ser una posible explicación a la manera en que los genotipos del INIAP obtuvieron el evento que le brindó la resistencia al glifosato, si bien se desconoce la forma en cómo se cultivaron estas accesiones en las pruebas de resistencia al herbicida se pudo haber generado los medios para que exista un flujo de genes. Yoshimura, Matsuo, & Yasuda, (2006) tras un estudio de cuatro años en Japón sobre soya tolerante a glifosato genéticamente cultivada junto a soya convencional reportó una tasa máxima de flujo de genes de 0.19% a 0.7m y una tasa mínima de 0.052% a una distancia de 2.1m aunque la incidencia es baja posiblemente porque la soya es prevalentemente autógama no se descarta el flujo de genes entre genotipos.

Debido a la alta incidencia detectada de soya GM tanto en este estudio como los reportados por Mejía, (2011); Intriago Pérez & Bravo, (2014); Intriago & Bravo, (2016) nos lleva a pensar que el territorio ecuatoriano tiene una necesidad urgente de realizar monitoreos constantes en el cultivo de soya y en especies que sean importantes para el país donde cultivos genéticamente modificados han sido aprobados.

Puesto que la plataforma del INIAP oferta para las siembras comerciales de soya la variedad INIAP-307 y INIAP-308 mismas que son distribuidas como semilla certificada y de alto rendimiento. Se considera de suma importancia realizar nuevas evaluaciones moleculares sobre los genotipos INIAP-308 e INIAP-308M4 con el fin de identificar las posibles causas que conllevaron a la mala identificación del genotipo o la mezcla del cultivo además de la presencia de soya transgénica y de esta manera garantizar la calidad de la semilla.

Los resultados obtenidos evidencian la importancia de realizar análisis moleculares continuos en los bancos de germoplasma cuyo fin sea precautelar la seguridad alimentaria. Al conocer el tipo de material genético almacenado estos podrán ser mejor seleccionados por los programas de conservación de recursos o por los programas de mejoramiento cuyo objetivo principal es buscar genotipos con mejor rendimiento, buena calidad y que se adapten a las necesidades de los productores nacionales.

CAPÍTULO V:

5 CONCLUSIONES

Esta investigación identifico mediante una caracterización molecular la variabilidad existente en 95 variedades comerciales de soya provenientes de diferentes catones de las provincias de los Ríos, Guayas y la Estación Experimental del Litoral Sur del INIAP empleando marcadores microsatélites.

La caracterización molecular de las 95 muestras de soya se llevó a cabo con 10 marcadores SSR y reveló una riqueza alélica de 46 alelos, con un promedio de 4 alelos/locus y un valor promedio de PIC de 0.47 evidenciando poco polimorfismo y baja diversidad genética.

El análisis UPGMA y el análisis de Conglomerados, permitió distinguir que las accesiones de soya, se estructuran en dos grupos genéticos. Por otra parte el análisis de asignación genética corroboró la formación de estos dos grupos poblacionales e identificó accesiones intermedias.

El análisis molecular de varianza determinó que la contribución a la mayor diversidad genética se debió a las diferencias dentro de los individuos de cada grupo poblacional.

La detección molecular del constructo transgénico CP4-EPSPS mediante la técnica de PCR llevado a cabo en las 87 accesiones de soya provenientes de los diferentes catones de las provincias de los Ríos, Guayas y la Estación Experimental del Litoral Sur del INIAP que presentaron resistencia a Glifosato evidenció 77 muestras transgénicas.

Para identificar una muestra como soya transgénica esta debía amplificar el fragmento de PCR tanto de la proteína 35-S con una banda de 317pb, el terminador EPSPS-NOS con una banda de 342 pb y la proteína CP4-EPSP con una banda de 1050pb.

El alineamiento múltiple de las accesiones 522, 769, 768, I308M4-136-1, I308M4-65-19 identificó que estas eran completamente homólogas con el constructo sintético de CP4-EPSPS obtenido de la accesión del GenBank AF464188.1 y la accesión de soya transgénica de la empresa Monsanto corroborando la presencia de soya transgénica en las accesiones analizadas.

CAPÍTULO VI:

6 RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un estudio de variabilidad genética en soya (*Glycine max* (L.)) con un mayor número de muestras y utilizando más marcadores SSR para determinar un mayor diversidad genética.

En futuros análisis de diversidad genética en soya se recomienda emplear la técnica de microsatélites por su facilidad de uso e interpretación de resultados.

El estudio de caracterización molecular de la variabilidad genética y tolerancia a glifosato evidencian un mal manejo del genotipo INIAP-308 por lo que se recomienda realizar un nuevo análisis que permita identificar las posibles causas que conllevaron a la mala identificación del genotipo o la mezcla del cultivo.

Se recomienda realizar monitoreos constantes en la detección de OGMs por parte de la academia, la sociedad y del Estado para asegurar el cumplimiento de las normas ecuatorianas que declaran un país libre de transgénicos.

Se recomienda realizar monitoreos de OGMs principalmente en los cultivos de gran impacto para el país y de los cuales se conoce que son importados desde país donde los cultivos transgénicos son legales.

CAPÍTULO VII:

7 BIBLIOGRAFÍA

Abdurakmonov, I. (2016). Introduction to Microsatellites: Basics, Trends and Highlights.

IntechOpen.

Akkaya, M., Bhagwat, A., & Cregan, P. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean . *Genetics*, 1131-1139.

Alcántara, M. (2002). Breve Revisión de los Marcadores Moleculares.

Arnao, E., Perdomo, R., & Graterol, E. (2010). Diversidad genética en cultivares de soya utilizando marcadores microsatélites en Venezuela. *Redalyc*, 534-538.

Barreno, R., & Bravo, E. (2015). Situación actual del Ecuador como territorio libre de transgénicos. *Letras Verdes. Revista Latinoamericana de Estudios Socioambientales.*, 264-275.

Biosciences, L.-C. (2004). Obtenido de <https://www.licor.com/documents/aj4klfk97yfri0ksyflg>

Bisen, A., Khare, D., Nair, P., & Tripathi, N. (2015). SSR analysis of 38 genotypes of soybean (Glycine Max (L.) Merr.) genetic diversity in India. *Physiol Mol Biol Plants*, 21(1): 109–115.

- Blanco, J. (2012). Monitoreo del flujo de genes de cultivos transgénicos de maíz a razas locales y variedades comerciales de maíz en el Valle de San Juan, Tolima . *Universidad Nacional de Colombia*.
- Bonfini, L., Heinze, P., Kay, S., & Van den, E. (2001). Review GMO detection and quantification techniques. *Institute for health and consumer protection*.
- Bonilla, V. (2010). *Caracterización molecular de la colección lojana de frejol arbustivo (Phaseolus vulgaris L.) conservada en el banco nacional de germplasma del INIAP-Ecuador*. Sangolqui-Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas-Espe.
- BOSTER. (1993). Obtenido de www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-principle-pcr
- Bravo, E., & León, X. (2013). Monitoreo participativo del maíz ecuatoriano para detectar la presencia de proteínas transgénicas. . *La Graja. Revista Ciencias de la Vida*, 17 (1): 16-24.
- Brown-Guedira, G., Thompson, J., Nelson, R., & Warburton, M. (2000). Evaluation of Genetic Diversity of Soybean Introductions and North American Ancestors Using RAPD and SSR Markers. *Crop Sci*, 40: 815–823.
- Cano, A., Vélez, D., & Morgado, C. (2017). The role of biotechnology in agricultural production and food supply. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(1):1-11.
- Carneiro, M., Santini, L., Lima, A., & De Freitas, C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics*, 39(3): 312-328.

- Cerda, D., & Díaz, V. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus Tecunumii*. *ResearchGate*, 82-92.
- Cressey, D. (2015). Widely used herbicide linked to cancer. *Nature*.
- De Prado, R., & Cruz-Hipolito, H. (2008). Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas. *INIA*.
- Earl, D., & Vonholdt, B. (2012). STRUCTURE HARVESTER a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 359-361.
- Espinoza, L. (2003). *Guía práctica sobre la técnica de PCR*. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf>
- Excoffier, L., Smouse, P., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-491.
- FAO. (2017). *El futuro de la alimentación y la agricultura: Tendencias y desafíos*. Obtenido de <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/es/c/471474/>
- Ferreira, M., & Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético*. Brasilia: Embrapa-Cenargen.
- Gill, H., Pecina, V., Maldonado, N., Hernández, S., & Mayek, N. (2006). Caracterización Morfoagronómica y Genética de Germoplasma mejorado de Soya. *Agriculturaa técnica en México*, 22 (3).

- Giraldo, A. (2009). La selección natural y los cultivos transgénicos: ¿Un hiato Darwinista ? *Acta biol. Colomb*, 14 (4): 365-382.
- González, A. (2016). Guía rápida del programa Structure Version 2.3. *UACH*.
- González, M. (2015). Origen y desarrollo de la variedad de soya (Glycine max (L) Merrill.) INIAP 310 de alto rendimiento y calidad de grano. *Universidad Católica de Santiago de Guayaquil*.
- Guamán, R., & Andrade, C. (2009). *Nueva variedad de soya de alto rendimiento y buena calidad de semilla para el Litoral*. Guayaquil: INIAP, Estación Experimental Litoral Sur. Programa nacional de Oleaginosas.
- Guamán, R., Andrade, C., Peralta, L., Triviño, C., Espinoza, A., Arias, M., . . . Monzano, B. (1996). Manual del cultivo de soya. Guayas: EC. INIAP. Manual N. 32.
- Guo, J., Wang, Y., Canción, C., Zhou, J., Qiu, L., Huang, H., & Wang, Y. (2010). A single origin and moderate bottleneck during domestication of soybean (Glycine max): implications from microsatellites and nucleotide sequences. *Annals of Botany*, 505-514.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hammond, B., & Jez, J. (2011). Impact of food processing on the safety assessment for proteins introduced into biotechnology-derived soybean and corn crops. *Food and Chemical Toxicology*, 49 (4): 711-721.
- Holst, J. (2001). GMO detection methods and validation.

- Hudcovicová, M., & Kraic, J. (2003). Utilisation of SSRs for Characterisation of the Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genetic resources. *Czech.Genet.Plant Breed*, 39 (4): 120-126.
- Infoagro. (2011). *Agro información del cultivo de soya: Importancia del cultivo*.
- INIAP. (2008). *Informe Nacional sobre el Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación en Ecuador*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/i1500e/Ecuador.pdf>
- Intriago, R., & Bravo, E. (2016). Primera Detección de Soya Transgénica (*Glycine max*) Cultivada en la Costa Ecuatoriana usando Métodos de Monitoreo Participativo. *Cienciamérica*, 75-82.
- Intriago, R., Pérez, B., & Bravo, E. (2014). Monitoreo sobre la presencia de soya que se expende en los mercados de Ecuador. *En la Inocencia de la Ciencia*, 241-256.
- Ismail, S., & Essawi, M. (2012). Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics*, 1(2): 57-63.
- Jiménez, P., & Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Universidad Politécnica de Madrid*.
- Kanchana, P., Lakshmi, M., & Dilip, K. (2005). A review on *Glycine max* (L.) merr. (Soybean). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1):356-371.
- Key, S., Ma, J., & Drake, P. (2008). Genetically modified plants and human health. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 101(6): 290-298.

- Kumar, V., & Poulouse, L. (2016). Agricultural Biotechnology: current status and future prospects. *Biodiversity, Conservation and Sustainable Development*.
- Kumawat, G., Singh, G., Gireesh, C., Shivakumar, M., Arya, M., & Masroor, S. (2015). Molecular characterization and genetic diversity analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Mer.) germplasm accessions in India. *Springer*, 101-107.
- Li, Y., Li, W., Zhang, C., Yang, L., Chang, R.-Z., Gaut, B., & Qiu, L.-J. (2010). Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci. *New Phytologist Trust*, 188 (1).
- Lima, L. (2009). Diseño de marcadores moleculares funcionales para un sistema de identificación genética de cultivares de soja (*Glycine max*) en Uruguay. *Universidad de la República*.
- Liu, K., & Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*.
- MAG. (2018). Informe de Rendimiento de soya en el Ecuador 2017 (junio-octubre).
- Magaña, J., Islas, M., Yepiz, G., & Calderón, A. (2003). Detección por PCR de un trasgen en productos de soya utilizados para formular alimentos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 26(4): 263-269.
- MAGAP. (2017). *Rendimientos de soya en el Ecuador 2017. Periodo de junio-octubre*.
- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C. (2001). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *AQUATIC*.

- Mason, A. (2015). SSR genotyping. *Methods Mol Biol*, 1245: 77-89.
- Mejía, M. (2011). Estandarización de un Protocolo para Detección de OGMs: Evaluación de la Presencia de OGMs en Granos de Soya Colectados en Diferentes Centros de Acopio de Ecuador. *Universidad San Francisco de Quito*.
- Morgante, M., & Olivieri, A. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3(1): 175-82.
- Morillo, E., & Miño, G. (2011). Marcadores moleculares en biotecnología agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP . Quito: INIAP.
- Needleman, & Wunsch. (1970). General Method Applicable to the Search for Similarities in the Amino Acid Sequence of Two Proteins. *J. Mol. Biol*, 48, 443-453.
- Olivieri, V., Camps, G., Boschi, F., Cassou, S., Moure, S., Rebollo, A., & Tarán, C. (2016). Descripción de cultivares de soja. Serie de divulgación Técnica N° 23. Uruguay: INASE.
- Ossandón, F. (2006). Uso de bioinformática como herramienta de análisis de datos en cáncer gástrico. Universidad de Chile.
- Page, R. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GenAlex6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.

- Pedemonte, F. (2017). Problemática del uso de Glifosato. *Universidad Nacional Agraria la Molina*.
- Peñaherrera, L. (2013). Situación actual sobre el uso del Glifosato en Ecuador. *INIA*, 145-148.
- Perez, A., Kee, P., Polge, N., Colquhoun, J., & Mallory, C. (2007). Investigating the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Springer*, 395-404.
- Picó, M., & Esteras, C. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR. *Universidad Politécnica de València*.
- Pritchard, J., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- Redolfi, J., González, D., Pucheta, J., & Canali, L. (2016). Clasificación de Variedades de Semillas de Trigo usando Visión por Computadora. *Repositorio Institucional de la UNLP*.
- Rimieri, P. (2017). La Diversidad Genética y la Variabilidad Genética: Dos Conceptos Diferentes Asociados al Germoplasma y al Mejoramiento Genético Vegetal. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 38(2): 7-13.
- Ríos, A. (2013). Viabilidad del glifosato en sistemas productivos sustentables. *INIA*.
- Rohlf, J. (2002). Numerical taxonomy and Multivariate analysis system version 2.1. . *Department of ecology and evolution state Universiti of New York*.
- Rongwen, J., Akkaya, M., Bhagwat, A., Lavi, U., & Cregan, P. (1995). The use of microsatellite DNA markers for soybean identification. *Theor Appl Genet*, 90(1): 43-48.

- Rosas, J., & Young, R. (1993). *El cultivo de la soya*. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana.
- Salazar, A., Sandoval, A., & Armendáriz, J. (2013). *Biología Molecular: Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. México, McGrawHill.
- Shashank, A., Ramakrishna, D., Kiran, S., Kosturkova, G., & Ravishankar, G. (2015). Nutraceutical Potential of Soybean: Review. *Asian Journal of Clinical Nutrition*, 7:22-32.
- Singh, G. (2010). *The soybean: Botany, production and uses*. CABI.
- SIPA. (2017). *Ficha del Cultivo de Soya*. Obtenido de <http://sipa.agricultura.gob.ec/INDEX.PHP/SOYA>
- Smith, T., & Waterman, M. (1970). Identification of common molecular subsequence. *J. Mol. Biol*, 147, 195-197.
- Sudaric, A., Vrataric, M., MLadenovic Drinic, S., & Matosa, M. (2010). Biotechnology in soybean breeding. *Genetika*, 91-102.
- Syafi, M., & Ruswandi, D. (2015). Multivariate Analysis of Genetic Diversity among some Maize Genotypes under Maize-Albizia Cropping System in Indonesia. *ResearchGate*, 244-255.
- Valverde, B. (2004). *Manejo de la resistencia a los herbicidas en los países en desarrollo*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/y5031s/y5031s0h.htm>
- Velázquez, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2015). *Extracción y purificación de ADN*. México: Ebook.

- Vía, R., & Fernández, R. (2015). Determinación de la Diversidad Genética de 172 accesiones de la colección nacional de *Chenopodium quinoa* Willd. “QUINUA” mediante marcadores microsatélites. *Universidad Ricardo Palma*.
- Vicario, A. (2002). Estudio comparativo de la diversidad genética de germoplasma comercial de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) y variedades tradicionales. *Facultad de Ciencias Exactas. Universidad de Buenos Aires*.
- Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas. Glifosato.
- Villegas, V., Sánchez, M., & Chuaire, L. (2009). Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Scielo*, 40(3): 347-352.
- Vinu, V., Naveen, S., Sujata, V., Devendra, Y., Sushil, K., Sugandh, N., & Shripad, B. (2013). Assessment of genetic diversity in *Brassica juncea* (Brassicaceae) genotypes using phenotypic differences and SSR markers. *Revista de biologia tropical*, 61(4): 1919-34.
- Watrud, L., Lee, H., Fairbrother, A., Burdick, C., Reichman, J., Bollman, M., . . . Van de Water, P. (2004). Evidence for landscape-level, pollen-mediated gene flow from genetically modified creeping bentgrass with CP4 EPSPS as a marker. *PNAS*, (40), 14533-14538.
- Windels, P., Taverniers, I., Depicker, A., Van Bockstaele, E., & De Loose, M. (2001). Characterisation of the Roundup Ready soybean insert. *Eur Food Res Technol*, 213:107–112.

- Wu, H., Zhang, Y., Zhu, C., Xiao, X., Zhou, X., Xu, S., . . . Huang, M. (2012). Presence of CP4-EPSPS Component in Roundup Ready Soybean-Derived Food Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(2): 1919-1932.
- Yoshimura, Y., Matsuo, K., & Yasuda, K. (2006). Gene flow from GM glyphosate-tolerant to conventional soybeans under field conditions in Japan. *Environ. Biosafety Res*, 5:169-173
- Zhang, M., Gao, X., Yu, Y., Ao, J., Qin, J., Yao, Y., & Li, Q. (2007). Detection of Round Ready soy in Highly processed products by triplex nested PCR. *Elsevier*, 18: 1277-1281.

