

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“AGRUPAMIENTO DE 16 ACCESIONES PERUANAS DE QUINUA
(*CHENOPODIUM QUINOA* WILLD.) EN RELACIÓN AL ORIGEN
UTILIZANDO MARCADORES SSR.”**

PRESENTADO POR:

JONATHAN ORMEÑO ZEVALLOS

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE BIOLOGO

Lima – Perú

2015

Dedicatoria

A mi madre y hermana, por la enorme
paciencia que tuvieron y toda la fuerza
que me brindaron. Nunca se rindan.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Norma, por cuidarme y apoyarme en todos los momentos que pase para la elaboración de esta tesis, gracias por todo el esfuerzo, paciencia y buen humor, gracias por tu labor de madre incondicional y como amiga también, mucho de lo que soy te lo debo a ti. A mi hermana Gissel, que forma una parte importante de mi vida. A mis abuelos Jesús, Lucrecia, Dante y Bertha, cuyos ejemplos de vida siempre han sido un ejemplo a seguir.

A mis asesores Dr. Jorge Jiménez Dávalos y Dr. César López Bonilla por la amistad brindada y sabios consejos para la elaboración de este trabajo.

A la Blga. Eliana Iglesias por sus enseñanzas, consejos y ayuda desde el inicio hasta el final. Gracias por la enorme amistad y fe depositada.

A todo el personal del Programa de Cereales y Granos Nativos, por haberme tratado como un colega más y hacer mi estancia muy grata.

A mi amiga incondicional Sandra Chiri, quien me apoyo en la realización de la tesis. Gracias por ser quien eres jamás pierdas esa chispa y genialidad que te ha caracterizado siempre, no olvidare los días de laboratorio que compartimos y las experiencias que vivimos.

A mis amigos de la universidad, Analiz Rueda, Jessica Tolentino, Mitsuyo García, Karen Rojas y Miguel Llapasca, por los gratos momentos que pasamos en nuestra etapa de pre grado y por la buena amistad que seguimos conservando.

Y por último pero no al final a Dios, solo nosotros sabemos por lo que hemos pasado y por ello te lo agradezco.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	ii
RESUMEN	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Origen e historia del cultivo de la quinua	3
2.2. Distribución del cultivo	5
2.3. Producción y usos económicos del cultivo	7
2.4. Descripción botánica	9
2.4.1. Hojas	10
2.4.2. Tallo	10
2.4.3. Raíz	11
2.4.4. Flores	11
2.4.5. Inflorescencia	11
2.4.6. Semilla	12
2.5. Tipo de reproducción	13
2.6. Clasificación taxonómica	14
2.7. Genoma y Citotaxonomía	15
2.8. Diversidad genética silvestre y variedades comerciales de la quinua	17
2.9. Conservación de la diversidad genética de la quinua	21
2.10. Genética de la quinua	23
2.11. Mejoramiento y herencia de caracteres de la quinua	24
2.12. Definición de Marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética ...	26
2.13. Ventajas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos.....	28
2.14. Antecedentes de aplicaciones de marcadores moleculares en quinua	29
2.15. Marcadores moleculares: SSR (simple sequence repeats).....	30
2.16. Origen de los SSRs	31
2.17. Ventajas y desventajas de los SSRs.....	32
2.18. Usos y aplicaciones de los SSR	34
2.19. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39

3.1.	Lugar de ejecución	39
3.2.	Material Vegetal	39
3.3.	Instrumentos de colecta de datos	40
3.3.1.	Enzimas	40
3.3.2.	Reactivos	40
3.3.3.	Equipos	41
3.3.4.	Materiales de Vidrio y otros	42
3.4.	Metodología	42
3.4.1.	Germinación de las semillas	42
3.4.2.	Colección de material vegetal	42
3.4.3.	Molienda de las muestras secas	42
3.4.4.	Extracción del ADN	42
3.5.	Evaluación de la calidad y cantidad de ADN	43
3.6.	Dilución del ADN	44
3.7.	Elaboración de los Bulks	45
3.8.	Amplificación por PCR	45
3.9.	Iniciadores SSR utilizados	45
3.10.	Preparación del mix de amplificación	45
3.11.	Programa de PCR	46
3.12.	Preparación de geles de poliacrilamida	46
3.13.	Revelado de geles de poliacrilamida	47
3.14.	Evaluación de bandas	48
3.15.	Análisis de datos	48
3.15.1.	Índice de contenido polimórfico (PIC)	48
3.15.2.	Construcción de una matriz básica de datos (MBD)	49
3.15.3.	Estimación de la similitud taxonómica	49
3.15.4.	Coeficiente de asociación	49
3.15.5.	Matriz de similitud	49
3.15.6.	Análisis de grupos	52
V.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	53
4.1.	Análisis del índice de contenido polimórfico (PIC)	53
4.2.	Análisis de agrupamiento	55
VI.	CONCLUSIONES	61
VII.	RECOMENDACIONES	63
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	64
IX.	ANEXOS	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las semillas de quinua.....	12
Tabla 2. Principales variedades comerciales de Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia y Chile.....	20
Tabla 3. Genes y herencia de algunos caracteres de la quinua.....	25
Tabla 4. Ejemplos aplicativos de los SSR en algunas especies vegetales.....	35
Tabla 5. Datos pasaporte de las 16 accesiones de quinua.	39
Tabla 6. Índice de contenido polimórfico (PIC), según Mason <i>et al.</i> 2005.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patrones de bandas obtenidos por los primers QAAT76 y QATG86.....	54
Figura 2. Dendrograma de las 16 accesiones de quinua analizadas, mostrando los grupos formados.....	56

ÍNDICE DE ANEXOS

7.1. Reactivos para la extracción de ADN.....	74
7.2. Reactivos para la preparación de geles de Agarosa	74
7.3. Reactivos para la preparación de geles de Poliacrilamida	75
7.4. Datos pasaporte de las 16 accesiones de quinua.	76
7.5. Descripción de los microsatélites en quinua.....	77
7.6. Número total de alelos presentes para los 9 locus analizados y número total de alelos por zona de colecta.	78

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados)
CIP	Centro internacional de la Papa
c.s.p.	Cantidad suficiente para
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
dNTP	Desoxirribonucleotido
DICE	Dissimilarity coefficients (Coeficiente de Disimilaridad- Nei-Li)
EDTA	Etilen diamine tetra-acetic acid (ácido etilén-diamino-tetra acético)
INIEA	Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria
mg	microgramo
ml	mililitro
μl	microlitro
μM	micromolar
mM	milimolar
ng	nanogramos
NTSYS	Numerical taxonomic system (Sistema de taxonomía numérica)
pb	pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PVP	Poli vinil pirrolidona
RAPD	Random amplified polymorphism DNA (polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
SSR	Simple sequence repeats (secuencias simples repetidas)
TE	Tris-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N. N. N'. NT-Tetra-metil etilen di-amina

UPGMA Unweighted pair-group method using arithmetic averages (método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas)

RESUMEN

El valor nutricional de la quinua en comparación con otros cereales hace de este antiguo cultivo andino uno de los más importantes especímenes para la seguridad alimenticia. Actualmente, muchos países como, Bolivia, Chile, Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Francia, Rusia, Namibia, entre otros, han empezado a tomar mayor interés en este cultivo usándolo tanto para consumo humano o como forraje animal.

La quinua posee una amplia diversidad, especialmente en la zona alto andina siendo Perú y Bolivia quienes presentan mayor diversidad de variedades en los alrededores del Lago Titicaca, llegándose a encontrar diferencias en hojas, altura de la planta, contenido de saponinas, calidad de grano, colores y tipos de panoja. Así mismo, la quinua presenta una amplia adaptación a diferentes zonas agroecológicas, reportándose la existencia de genotipos tolerantes a las sequías, heladas y salinidad, sin disminuir en mucho su calidad nutricional o rendimiento. Estas importantes características de la quinua han impulsado la investigación y caracterización genética que contribuirá al desarrollo de variedades mejoradas.

Los SSR son marcadores moleculares altamente polimórficos útiles para la identificación de variaciones intragenotípica e intergenotípica. Sin embargo, este tipo de marcadores son específicos para una determinada especie y su elaboración es muy laboriosa y costosa, debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas.

Para la presente investigación se emplearon 16 accesiones formándose bulks con 5 individuos para cada accesión para el análisis de agrupamiento en relación a su origen, para lo cual se emplearon 10 primers generándose 34 bandas polimórficas con un peso molecular promedio de 140 a 300pb, todos los bulks fueron evaluados y se les asignaron valores numéricos de 1 para identificar la presencia de bandas y 0 para la ausencia de las mismas. La matriz básica de datos (MBD) generada fue procesada en el programa NTSYS versión 2.1 usando el coeficiente de similitud Jaccard, llegándose a construir el dendrograma usando el método de ligamiento no ponderado UPGMA.

Los datos moleculares agruparon las accesiones en seis grupos a un coeficiente de similitud de 0.70, el grupo 1 estuvo conformado por 4 accesiones (Arequipa 2, Puno 1, Puno 2 y Puno 3); el grupo 2 conformado por 7 accesiones (Cajamarca 1, Cajamarca 2, Cuzco 2, Cuzco 3, Puno 4, Puno 5, Puno 6); el grupo 3 formado por 2 accesiones (Ancash 1 y Ancash 2); el grupo 4, 5 y 6 lo representan las accesiones Cuzco 4, Cajamarca 3 y Arequipa 1 respectivamente. El árbol dendrológico mostro accesiones con gran grado de similitud como las accesiones Puno 1 y 2, mientras que las accesiones Cajamarca 3 y Arequipa 1 mostraron un grado de similitud de 0.54 siendo el más bajo registrado.

I. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa*) pertenece a la familia Amaranaceae. Es alotetraploide, con número cromosómico $2n=36$ y la mayoría de sus marcadores, tanto morfológicos como moleculares segregan de manera disómica. Se cultiva principalmente en los Andes de Sudamérica, siendo una de las pocas especies que está adaptada a condiciones extremas de temperatura y aridez (Kole, 2007). Su valor nutricional es mayor en comparación con los cereales, su grano contiene aproximadamente 48% de almidón, 18% de proteínas, con un balance ideal de los 20 aminoácidos esenciales, 4-9% de grasas insaturadas y una buena cantidad de calcio, fósforo y hierro (Gandarillas, 1974).

Estudios previos muestran que el Perú posee, junto con Bolivia, la mayor diversidad genética en variedades nativas de quinua (Gandarillas, 1974). A pesar de que su cultivo ha ido menguando desde su apogeo en el imperio Incaico, actualmente se están haciendo trabajos para prevenir la erosión genética de esta especie en ambos países. Esto gracias al surgimiento de un nuevo y creciente mercado internacional y a un renovado interés por incrementar la producción de ésta especie importante para la seguridad alimentaria de la Región Andina (Kole, 2007).

Sin embargo, para llevar a cabo programas de seguridad alimenticia con esta especie es necesario realizar más estudios, para incrementar el conocimiento de su enorme potencial productivo y nutritivo; pero no solo centrado en las propiedades de su composición química, nutricional y funcional. La biotecnología, permite acrecentar la eficiencia en el conocimiento de las especies. El uso de los marcadores moleculares da la posibilidad de conocer genéticamente las poblaciones que permitan mejorar la eficiencia en los programas de mejoramiento. Los microsatélites son marcadores moleculares eficientes por las ventajas que ofrece para la identificación y determinación de los genotipos.

II. OBJETIVOS

General

- . Determinar si las accesiones en estudio se agrupan de acuerdo a su origen geográfico.

Específicos

- . Analizar la variabilidad alélica entre 16 accesiones de quinua en estudio.
- . Identificar las accesiones similares.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen e historia del cultivo de la quinua

La zona andina comprende uno de los ocho mayores centros de domesticación de plantas cultivadas del mundo, dando origen a uno de los sistemas agrícolas más sostenibles y con mayor diversidad genética en el mundo. La quinua, una planta andina, muestra la mayor distribución de formas, diversidad de genotipos y de progenitores silvestres, en los alrededores del lago Titicaca de Perú y Bolivia, encontrándose la mayor diversidad entre Potosí - Bolivia y Sicuani (Cusco) – Perú. Existen pocas evidencias arqueológicas, lingüísticas, etnográficas e históricas sobre la quinua. Sin embargo, existen evidencias claras de la distribución de los parientes silvestres, botánicas y citogenéticas, lo que posiblemente demuestra que su domesticación tomó mucho tiempo, hasta conseguir la planta domesticada y cultivada a partir de la silvestre, proceso que probablemente se inició como planta usada principalmente por sus hojas en la alimentación y luego por las semillas. Actualmente, las especies y parientes silvestres se utilizan localmente como jataco o llipcha (verdura de hoja) en muchas comunidades del área andina. Posteriormente, la especie fue adaptada a diferentes condiciones agroclimáticas, edáficas y culturales, haciendo que la planta presente una amplia adaptación desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm y usos diversos en las diferentes comunidades étnicas de acuerdo a sus necesidades alimentarias.

La quinua fue cultivada y utilizada por las civilizaciones prehispánicas, y reemplazada por los cereales a la llegada de los españoles, a pesar de constituir un alimento básico de la población de ese entonces.

En el pasado ha tenido una amplia distribución geográfica, que abarcó en Sudamérica, desde Nariño en Colombia hasta Tucumán en la Argentina y las Islas de Chiloé en Chile, también fue cultivada por las culturas precolombinas, Aztecas y Mayas en los valles de México, denominándola Huauzontle, pero usándola únicamente como verdura de inflorescencia. Este caso puede explicarse como una migración antigua de quinua, por tener caracteres similares

de grano, ser conespecíficos, además por haberse obtenido descendencia al realizarse cruzamiento entre ellos (Heiser y Nelson; 1974). La quinua en la actualidad tiene distribución mundial: en América, desde Norteamérica y Canadá, hasta Chiloé en Chile; en Europa, Asia y el Africa, obteniendo resultados aceptables en cuanto a producción y adaptación.

Wilson (1976), considera que la quinua se habría originado en el hemisferio norte (México y Estados Unidos), en base a estudios de los *Chenopodium* cultivados, concluyendo que *Ch. nuttalliae* y *Ch. quinoa*, son conespecíficos distintos, pero conespecíficos con sus formas silvestres acompañantes, sugiriendo cambios en la nomenclatura existente, como son incluir dentro de *Ch. quinoa* ssp. *milleanum* las diferentes subespecies de *Ch. hircinum* y a la especie mexicana cultivada reducirla como una subespecie de *Ch. berlandierii*, del mismo modo sugiere que la quinua se habría derivado directamente de algún tipo silvestre en los Andes.

También, Wilson y Heiser (1979), manifiestan que *Ch. quinoa* habría evolucionado independientemente en sudamérica sin influencia de las especie del Norte, siendo los posibles progenitores *Ch. hircinum* de tierras bajas o una especie silvestre extinguida de los Andes, que pudo haber sido desplazada o asimilada por el acompañante silvestre.

El origen de *Ch. quinoa* aún es complejo, especialmente por que están involucradas muchas posibilidades. Se sugiere la participación de dos especies diploides en el origen de *Ch. quinoa*, por lo que la quinua sería un anfidiplóide con herencia disómica, siendo el pariente silvestre más cercano de *Ch. quinoa*, *Ch. hircinum* y de *Ch. nuttalliae* el silvestre *Ch. berlandieri* respectivamente.

Desde el punto de vista de su variabilidad genética puede considerarse como una especie oligocéntrica, con centro de origen de amplia distribución y diversificación múltiple, siendo la región andina y dentro de ella, las orillas del Lago Titicaca, las que muestran mayor diversidad y variación genética.

La historia tiene pocas evidencias arqueológicas, lingüísticas y etnográficas, sobre la quinua, pues no se conocen muchos ritos religiosos asociados al uso del grano. Las evidencias arqueológicas del norte chileno, señalan que la quinua fue utilizada 3000 años antes de Cristo (Tapia, 1982), mientras que hallazgos en la zona de Ayacucho indicarían que la

domesticación de la quinua ocurrió hace 5000 años antes de Cristo (Uhle, 1919). Existen también hallazgos arqueológicos de quinua en tumbas de Tarapacá, Calama, Arica y diferentes regiones del Perú, consistentes en semillas e inflorescencias, encontrándose abundante cantidad de semillas en sepulturas indígenas de los Tiltil y Quillagua (Chile).

Una evidencia del uso de la quinua se encuentra en la cerámica de la cultura Tiahuanaco, que representa a la planta de quinua, con varias panojas distribuidas a lo largo del tallo, lo que mostraría a una de las razas más primitivas.

A la llegada de los españoles, la quinua tenía un desarrollo tecnológico apropiado y una amplia distribución en el territorio Inca y fuera de él. El primer español que reporta el cultivo de quinua fue Pedro de Valdívía quien al observar los cultivos alrededor de Concepción, menciona que los indios para su alimentación siembran también la quinua entre otras plantas. Posteriormente, Bernabé Cobo, confunde la quinua con la Kiwicha e indica que la quinua es una planta muy parecida al bleo de Europa. Garcilaso de la Vega, en sus comentarios reales describe que la planta de quinua es uno de los segundos granos que se cultivan sobre la faz de la tierra denominada quinua y que se asemeja algo al mijo o arroz pequeño, y hace referencia al primer envío de semillas hacia Europa, las que desafortunadamente llegaron muertas y sin poder germinar, posiblemente debido a la alta humedad reinante durante la travesía por mar.

Posteriormente, Cieza de León (1560), indica que la quinua se cultivaba en las tierras altas de Pasto y Quito, mencionando que en esas tierras frías se siembra poco maíz y abundante quinua. También Patiño (1964), menciona que en sus revisiones sobre La Paz, se habla de la quinua como una planta que servía de alimento a los indígenas (Jimenes de la Espada, 1885, II, 68) y finalmente Humboldt, al visitar Colombia indica que la quinua siempre ha acompañado y seguido a los habitantes de Cundinamarca.

2.2. Distribución del cultivo

La distribución del cultivo, se inicia con las culturas preincas y su expansión se consolida con el imperio incaico, extendiéndose desde Pasto-Colombia hasta el río Maule en Chile y Catamarca en Argentina, aunque su uso como verdura, estuvo extendido en toda la zona andina muy anteriormente; en Colombia, es cultivada, usada y difundida por los Chibchas,

denominandola Suba o Pasca y extendiendo su cultivo a toda la sabana Bogotense; en el Ecuador, su cultivo es generalizado en toda la sierra ecuatoriana, principalmente en los departamentos y provincias de Carchi, Imbabura (Pablo del Lago, Otavalo), Pichincha, Cotopaxi (Saquisilí), Tungurahua, Chinborazo (Calpi), Guamote (Laguna de Colta) y el Cañar; en el Perú se ha generalizado su cultivo, en las diferentes zonas agroclimáticas, pudiendo distinguirse seis tipos de quinuas de acuerdo a su forma de cultivo, ubicación geográfica y destino de la producción: altiplano, valles interandinos abrigados, zonas altas y frías por encima de los 4000 msnm, zonas de las salinas, costa y en la ceja de selva, estas últimas áreas no tradicionales para este cultivo. En el pasado no se podía observar cultivos en costa ni en ceja de selva, su cultivo ahora está distribuido desde Piura (Huancabamba) hasta Tacna (Torata).

En Bolivia, está distribuido tanto en el altiplano (norte, central y sur), valles interandinos y en los salares existentes al sur, con características propias y peculiares de cultivo, uso y transformación. En Chile su cultivo se ubica mayormente en la zona colindante con el altiplano boliviano, zonas de Tarapacá, Antofagasta, Calama, San Pedro de Atacama y al sur en Concepción y Valdivia, siendo en el pasado cultivado por las comunidades indígenas de Araucanos y Mapuches, que distribuyeron su cultivo hasta las islas de Chiloé (Latitud sur 47°). En la Argentina su cultivo en el pasado llegó hasta Catamarca pero luego por razones de mayor competitividad de los cereales se ha replegado a Córdoba y San Juan de Jujuy, sin embargo aun su cultivo se mantiene en la zona de Tucumán, en forma aislada en pequeños campos y asociada al maíz.

El cultivo de la quinua del área andina, se ha difundido a los demás países de sudamérica a través de los programas de investigación y transferencia de tecnología cooperativa como PROCISUR, PROCIANDINO, JUNAC, y la FAO y de ahí a Centro América, México, Guatemala (inicialmente con fines de investigación y luego para la producción). Posteriormente ha sido difundida a los Estados Unidos y Canadá, principalmente bajo forma de cultivares del sur de Bolivia y Chile. Más recientemente, material genético del área andina ha sido intercambiado y difundido entre investigadores del área andina, y luego fuera de ella a través de los programas cooperativos entre países e instituciones de investigación.

Desde principios de los noventa la quinua es conocida y cultivada en Europa, Asia y África, inicialmente por los programas de investigación en diversificación de cultivos de diferentes

universidades donde numerosos estudiantes sudamericanos han efectuado estudios de posgrado, cuyos resultados han sido acogidos por investigadores europeos, empresas interesadas en la distribución de productos vegetarianos y naturales (Jacobsen, 2000). Las pruebas de los Estados Unidos y Europa en la producción de quinua han tenido buenos resultados y han demostrado que la quinua tiene un buen potencial como grano y cultivo alimenticio (Mujica *et al.*, 2001; Casini, 2002; Jacobsen, 2003). Actualmente está difundida en Inglaterra, Alemania, Dinamarca, España, Italia, Francia, Rusia, Portugal, Los Himalayas, Sur Este de Asia, y Namibia (Bhargava *et al.*, 2005).

En un esfuerzo para introducir la quinua al mercado global por su alto valor proteico, balance adecuado de aminoácidos esenciales, alto contenido de lisina, minerales, vitaminas, facilidad de producción sin uso de fertilizantes y de pesticidas, así como por la gran adaptación a diferentes condiciones agroclimáticas, el Centro Internacional de la Papa (CIP) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO de sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations) unieron fuerzas para la elaboración de un banco de germoplasma y caracterizar la diversidad genética de esta especie (Shawn, 2005).

2.3. Producción y usos económicos del cultivo

Los principales productores de este grano a nivel internacional son: Bolivia, Perú, Ecuador, y Colombia. Bolivia con más de 47.534 ha cultivadas y alrededor de 30.412 ton cosechadas, de las cuales un 49% es consumida por las familias productoras, 35% se venden en los mercados locales y el resto para mercados externos, constituyéndose así como el primer productor y exportador de quinua en el mundo, siendo productores exclusivos tanto el altiplano central como el sur de Bolivia (Viñas, 2000).

Le sigue el Perú que viene incrementando su producción habiendo sembrado y cosechado cerca de 27.000 ha, producidas especialmente en Puno, Cuzco y Junín de las cuales gran proporción se dedica al autoconsumo y mercado interno, y mínimamente al mercado externo. Ecuador tiene aproximadamente 1000 ha en producción, en los Estados Unidos en el estado de Colorado se ha reportado una producción de unas 200 ha, 800 ha en Canadá, 100 ha en Dinamarca y 20 ha en Alemania, entre otros.

La producción fuera de los principales productores de quinua sudamericanos tuvo partida en los primeros años de la década del 80, donde se iniciaron algunas investigaciones en quinua, en varios condados del estado de Colorado, EE.UU. con la finalidad de evaluar el comportamiento orgánico, seleccionando variedades de alto rendimiento, grano grande, bajo contenido de saponina e identificar algunos problemas relativos a plagas con colecciones procedentes del Perú, Bolivia, y Chile.

La Universidad Estatal de Colorado (CSU) ha tramitado la patente de una variedad de quinua, denominada como Apellawua, resultado de un híbrido, por una serie de procesos genéticos; que posee esterilidad masculina citoplasmática y que al final no tiene ninguna similitud con la misma variedad que se produce en América Latina (Ward & Johnson, 1993).

En el caso de Europa la quinua se considera como un cultivo potencial en la agricultura de ese continente y también como alimento humano es sustituto del arroz y por su calidad potencial como forraje.

Se han realizado investigaciones esperando como resultado un genotipo modelo para producción de semilla, que sea precoz, uniforme en madurez sin ramificación que facilite una cosecha mecanizada que sea corto, con alto rendimiento de granos, bajo contenido de saponina, con panoja grande y abierta, y para uso de forraje que sea con muchas hojas, tardío, altos, con rendimientos superiores de materia seca y bajo contenido de saponinas (Jacobsen, 1998).

En cuanto a los usos económicos de la quinua, ésta al ser altamente nutritiva, es utilizada para hacer harina, sopa, hojuelas para el desayuno y alcohol. Se comercializa, ya sea como grano entero que se cocina como el arroz o en platos combinados. Puede ser fermentada para hacer cerveza, o utilizase para alimentar al ganado (Galwey, 1989). Toda la planta también se utiliza como forraje verde para alimentar ganado vacuno, porcino y aves de corral. En Perú y Bolivia, hojuelas de quinua, tortillas, crepes y granos inflados se producen comercialmente (Popenoe *et al.*, 1989). El uso de la quinua con fines medicinales se ha reportado raramente (Mujica, 1994). Sin embargo esta especie se emplearía contra inflamaciones, como analgésico y como un desinfectante de las vías urinarias. También puede ser utilizada en las fracturas y hemorragias internas y como repelente de insectos (Mujica, 1994). Estos informes se pueden abrir nuevas vías para su uso como un cultivo

medicinal.

La quinua está siendo considerada como un cultivo potencial por la NASA como control del sistema ecológico de soporte de vida (CELSS de sus siglas en inglés Controlled Ecological Life Support System), cuyo objetivo es utilizar las plantas para eliminar el dióxido de carbono de la atmósfera y generar alimentos, oxígeno y agua para la tripulación de las misiones espaciales de larga duración (Schlick y Bubenlieim, 1996).

La harina de quinua, en combinación con la harina de trigo o harina de maíz, se utiliza en la fabricación de bizcochos, pan y alimentos procesados. La harina de semilla tiene buena propiedad de gelificación, capacidad de absorción del agua, capacidad de emulsión y la estabilidad (Oshodi *et al.*, 1999). El análisis cuantitativo de la harina de quinua y su comparación con otros cereales ha demostrado que la harina de quinua proporciona azúcares como la glucosa (4,55%), fructosa (2,41%) y sacarosa (2,39%) (González *et al.*, 1989). Ogungbenle (2003) evaluó el contenido de azúcar y la composición química de la harina de semilla de quinua, y declaró que tiene alta proporción de D-xilosa (120mg/100 g), y la maltosa (101 mg/100 g), y un bajo contenido de glucosa (19 mg/100 g) y fructosa (19,6 mg/100 g). Así, la quinua podría utilizarse eficazmente en la industria de las bebidas malteadas. Otro estudio mostró aumento en el nivel del factor de insulina del crecimiento-1 (IGF-1) en el plasma de los niños que consumieron una porción adicional de harina de quinua (Ruales *et al.*, 2002). La harina de quinua altamente nutritiva podría ser utilizada como complemento proteico en la harina de trigo deficiente, comúnmente utilizados para el consumo humano en diferentes partes del mundo.

2.4. Descripción botánica

La quinua, es una planta herbácea anual, dicotiledónea que usualmente alcanza una altura de 1 a 3 m. Tiene una amplia dispersión geográfica, presenta características peculiares en su morfología, coloración y comportamiento en diferentes zonas agroecológicas donde se la cultiva, fue utilizada como alimento desde tiempos inmemoriales, se calcula que su domesticación ocurrió hace más de 7000 años antes de Cristo, presenta enorme variación y plasticidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, se cultiva desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm, aunque su mayor productividad se da entre los 2500 y 3800 msnm. (Mujica y Jacobsen, 2006). Puede encontrarse desde zonas áridas, hasta zonas húmedas y

tropicales, desde zonas frías hasta templadas y cálidas; muy tolerante a los factores abióticos adversos como son sequía, helada, salinidad de suelos y otros que afectan a las plantas cultivadas (Kole, 2007).

Su período vegetativo varía desde los 90 hasta los 240 días, crece con precipitaciones desde 200 a 2600 mm anuales y temperatura media entre 5 y 14°C (Mujica y Jacobsen, 2006). Se adapta a suelos ácidos de pH 4.5 hasta alcalinos con pH de 9.0, sus semillas germinan hasta con 56 mmhos/cm de concentración salina, se adapta a diferentes tipos de suelos desde los arenosos hasta los arcillosos, la coloración de la planta es también variable con los genotipos y etapas fenológicas, desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillento, anaranjado, granate y demás gamas que se pueden diferenciar (Mujica, 1988).

2.4.1. Hojas

Son simples, enteras, esparcidas, glabras, pecioladas, sin estipulas, pinnatinervadas, presentan oxalatos de calcio o vesículas granulosas en el envés a veces en el haz; las cuales evitan la transpiración excesiva en caso de que se presentaran sequías. En la quinua, podemos notar que la hoja esta formada por una lamina y un pecíolo, los pecíolos son largos acanalados y finos, las hojas son polimorfas, las hojas inferiores son de forma romboidal o de forma triangular y las hojas superiores son lanceoladas que se ubican cerca de las panojas. Pueden tomar diferentes coloraciones, va del verde al rojo o púrpura (dependiendo de la variedad). Según Gallardo, *et al.* 1996, el color de las hojas es variable dependiendo de los genotipos, se han observado pigmentos rojos, púrpuras, amarillos, que están constituidos por betalainas, tanto del tipo, betacianinas (rojo- violeta) y betaxantinas (amarillas).

La inserción de las hojas en el tallo es alterna, en cada nudo se observan de 5 a 12 hojas de acuerdo a cada variedad y la distancia entre nudos es de 0.8 a 4 cm. La hoja es por excelencia el órgano clorofiliano esencial de la respiración y la asimilación CO₂ (anhídrido carbónico). El número de dientes por hoja varía de 2 a 14 dependiendo de la variedad.

2.4.2. Tallo

Es cilíndrico y herbáceo anual a la altura del cuello cerca a la raíz y de una forma angulosa a la altura donde se insertan las ramas y hojas, estando dispuestas en las cuatro caras del tallo, la altura es variable de acuerdo a las variedades y siempre terminan en una inflorescencia; cuando la planta es joven tiene una médula blanca y cuando va madurando

se vuelve esponjosa, hueca sin fibra, sin embargo la corteza se lignifica, el color del tallo es variable, puede ser púrpura como la Pasankalla, blanco cremoso (Blanca de Juli) y con las axilas coloreadas como la blanca de Juli, en toda su longitud; colorada como la kancolla y otros colores según el ecotipo de cada zona (el color varía de acuerdo a las fases fenológicas, se pueden diferenciar bien los colores en la floración).

Cuando se tiene plantas monopodicas (de un solo tallo), se puede inducir cortando la yema apical para tener plantas simpodicas (de varios tallos); esta técnica se debe realizar antes del inicio de panojamiento.

2.4.3. Raíz

El tipo de raíz varía de acuerdo a las fases fenológicas. Empieza con raíz pivotante terminando en raíz ramificado con una longitud de 25 a 30 cm., según el ecotipo, profundidad del suelo y altura de la planta; la raíz se caracteriza por tener numerosas raíces secundarias y terciarias.

2.4.4. Flores

En una misma inflorescencia pueden presentar flores hermafroditas (perfectas), femeninas y androésteriles (imperfectas).

Generalmente se encuentra 50 glomérulos en una planta y cada glomérulo esta conformado por 18 a 20 granos aproximadamente.

Las flores son pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro como en todas las Quenopodiáceas, son flores incompletas porque carecen de pétalos (Tapia *et al*, 1979). Hay un grupo intermedio como la blanca de Juli, originaria de Puno, en el cual el grado de cruzamiento depende del porcentaje de flores pistiladas.

2.4.5. Inflorescencia

Es de tipo racimosa con frutos tipo Aquino que pueden ser de color rojo, púrpura o verde (Tapia *et al*, 1979). Por la disposición de las flores en el racimo se le denomina como una panoja, por el habito de crecimiento algunas inflorescencias se difieren por que pueden ser axilares y terminales.

En algunas variedades no se tiene una diferencia clara y pueden ser ramificadas teniendo una forma cónica, el eje principal de la inflorescencia es de forma angulosa o piramidal y tiene dos surcos, donde se ubican las flores. De acuerdo a la forma de panoja; se le considera amarantiforme, cuando sus glomérulos están insertados en el eje secundario y glomérulada, cuando los glomérulos están insertos en el eje primario o principal y toda la panoja tiene la forma, de un solo glomérulo. De acuerdo a la densidad de panoja que se presentan estas son considerados: compactas, semicompactas o semilaxas y laxas.

2.4.6. Semilla

Constituye el fruto maduro sin el perigonio, es de forma lenticular, elipsoidal, cónica o esferoidal, presenta tres partes bien definidas que son: Episperma, embrión y perisperma. La episperma, está constituida por cuatro capas: una externa de superficie rugosa, quebradiza, la cual se desprende fácilmente al frotarla, en ella se ubica la saponina y cuya adherencia a la semilla es variable con los genotipos. La segunda capa es muy delgada y lisa, se observa sólo cuando la capa externa es translúcida; la tercera capa es de coloración amarillenta, delgada y opaca y la cuarta capa, translúcida, está constituida por un solo estrato de células.

El embrión, está formado por dos cotiledones y la radícula, y constituye el 30% del volumen total de la semilla el cual envuelve al perisperma como un anillo. En ella se encuentra la mayor cantidad de proteína que alcanza del 35-40%, mientras que en el perisperma solo del 6.3 al 8.3 % de la proteína total del grano.

El perisperma es el principal tejido de almacenamiento y está constituido mayormente por granos de almidón, es de color blanquecino y representa prácticamente el 60% de la superficie de la semilla, sus células son grandes de mayor tamaño que las del endosperma, de forma poligonal con paredes delgadas, rectas y con grandes agregados de almidón, estos agregados están compuestos por miles de gránulos de almidón individuales, de forma exagonal en la mayoría de los casos.

Tabla 1. Características de las semillas de quinua.

Variedades	Color grano	Forma	Tamaño (mm)
Sajama	Blanco	Cónica	2.0 - 2.5
Real	Blanco	Cónica	2.2 - 2.8
Kcancolla	Blanco	Cónica	1.2 - 1.9

Tabla 1. Características de las semillas de quinua. (Continuación)

Variedades	Color grano	Forma	Tamaño (mm)
Blanca de July	Blanco	Cónica	1.2 - 1.6
Koitu	Marrón ceniciento	Esféroidal	1.8 - 2.0
Misa Jupa	Blanco- Rojo	Cónica	1.4 - 1.8
Amarilla Maranganí	Amarillo anaranjado	Cónica	2.0 - 2.8
Tunkahuan	Blanco	Redondo aplanado	1.7 - 2.1
Ingapirca	Blanco opaco	Esférico	1.7 - 1.9
Imbaya	Blanco opaco	Esférico	1.8 - 2.0
Cochasqui	Blanco opaco	Esférico	1.8 - 1.9
Witulla	Morado	Lenticular	1.7 - 1.9
Negra de Oruro	Negro	Redonda	2.1 - 2.8
Katamari	Plomo	Esféroidal	1.8 - 2.0
Roja Coporaque	Púrpura	Cónica	1.9 - 2.1
Toledo	Blanco	Cónica	2.2 - 2.8
Pandela	Blanco	Cónica	2.2 - 2.8
Chullpi	Cristalino	Esférica aplanada	1.2 - 1.8

2.5. Tipo de reproducción

La quinua se reproduce por la vía sexual, es decir, mediante semilla botánica, aunque en condiciones experimentales la propagación asexual no está descartada. En la reproducción sexual los procesos de meiosis y la fecundación implicados conducen a la generación de la variabilidad genética. Esta variabilidad es mayor en especies alógamas y menor en autógamias, de todos modos la reproducción sexual constituye una fuente importante de variación, la misma que es aprovechada en el mejoramiento genético de los cultivos.

Con respecto a la forma de fecundación en la quinua, Simmonds (1971), menciona que la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.), la kañahua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) y Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Safford) son especies autógamias, afirmación similar ha sido reportada por Wilson (1988). Los ensayos conducidos por Gandarillas (1979), ha reportado porcentajes variables de cruzamiento natural que varían desde 1.5% para una distancia de separación de 20 m hasta 9.9% a 1 m de separación de plantas. Lescano ha reportado 5.78% de alogamia y 94.22% de autogamia. Según los resultados encontrados sobre la fecundación de la quinua, el porcentaje de alogamia no sobrepasa el 10% de cruzamiento natural. Los resultados anteriores muestran que la quinua tiene al menos un 90% de autogamia. Sobre la base de estos resultados, la quinua ha sido considerada como especie

autógama con fecundación cruzada frecuente (Gandarillas, 1979); por tanto, en el mejoramiento genético de la quinua se han aplicado preferentemente los métodos recomendados para autógamas y especialmente aquellos aplicados en el sorgo y arroz.

El grado de alogamia de las plantas depende de varios factores inherentes a la planta y al medio ambiente. En el caso de la quinua, el grado de alogamia depende de las características en la morfología floral, aspectos genéticos y la influencia del medio ambiente. Risi y Galwey (1984), sostienen que el cruzamiento puede estar influenciado por la velocidad del viento, la proporción de flores femeninas y flores androestériles y la autoincompatibilidad. A esto se debe agregar la presencia de flores pistiladas y flores protóginas en una misma planta o en distintas plantas de la misma variedad. A mayor frecuencia de estos tipos de flores o mayor frecuencia de plantas con estos caracteres, mayor será el grado de polinización y fecundación cruzadas. Otros factores que influyen son la temperatura y la presencia insectos. Las temperaturas mayores a 30°C afectan negativamente sobre la factibilidad de la anthesis retardando o impidiendo este proceso como también reduciendo la viabilidad del polen; por otra parte, temperaturas frías inducen a la androesterilidad temporal en algunos ecotipos y variedades. En cambio, la intensidad y frecuencia de vientos actúan como agentes de transporte del polen. Finalmente, la presencia de insectos del grupo de los trips que son muy frecuentes en la fase de floración probablemente actúa como vectores de transporte de polen. Lescano (1994), admite la posibilidad de que los pulgones verde (*Aphis* sp.) sean agentes polinizadores. La influencia del viento y los insectos sobre la polinización cruzada depende de la distancia de separación de las plantas o variedades.

El grado de alogamia en la quinua constituye uno de los factores importantes de mezcla genética de las variedades y ecotipos comerciales, por lo que es una característica desfavorable para la conservación de la pureza varietal. El grado de alogamia se puede reducir con algunas prácticas como selección negativa o purificación de plantas androestériles y plantas con flores pistiladas y protóginas, como también mediante prácticas de aislamiento en espacio, tiempo y ciclo del cultivo.

2.6. Clasificación taxonómica

La quinua es una planta de la familia *Amarantaceae*, de la que forma parte junto con la cañihua (*Chenopodium pallidicaule*), la espinaca (*Spinacea oleracea*) y la remolacha (*Beta vulgaris*) (Mujica y Jacobsen, 2006). El género *Chenopodium* es el principal dentro de la

familia Amaranthaceae y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 especies (Giusti, 1970).

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

Este género también incluye especies silvestres de amplia distribución mundial: *Ch. album*, *Ch. hircinum*, *Ch. murale*, *Ch. graveolens*, *Ch. petiolare* entre otros.

Aún existen diferentes formas de clasificación taxonómica, según el Código Internacional de Nomenclatura Botánica (conocido por sus siglas en inglés, ICBN, en español CINB) que es el compendio de reglas que rigen la nomenclatura taxonómica de los organismos vegetales, a efectos de determinar, para cada taxón vegetal, un único nombre válido internacionalmente. Según este la clasificación taxonómica sería la siguiente:

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Caryophyllales
Familia	: Amaranthaceae
Sub familia	: Chenopodioideae
Género	: <i>Chenopodium</i>
Sección	: Chenopodia
Subsección	: Cellulata
Especie	: <i>Chenopodium quinoa</i> Willdenow.

2.7. Genoma y Citotaxonomía

La quinua al parecer es una especie alotetraploide con número cromosómico $2n=36$, por lo que la herencia de la mayoría de sus características cualitativas es disómica. Está constituido por 4 genomios, con un número básico de 9 cromosomas ($4n = 4 \times 9 = 36$). Su genoma

haploide consta de aproximadamente 967 millones de pares de bases siendo relativamente pequeño en comparación con otras especies vegetales (Kole, 2007).

Según Wilson (1990), las especies domesticadas de *Chenopodium* se dividen en dos subsecciones sobre la base morfológica del pericarpio y perianto, y las relaciones de cruce. Sin embargo, el género *Chenopodium*, ha sido dividido en 10 secciones entre las cuales se encuentra la sección Chenopodia y Ambrina, dentro de la primera tenemos cuatro subsecciones:

- Cellulata: morfológicamente contiene granos con la superficie del pericarpio alveolados y genéticamente son básicamente alotetrapolides diploides ($2n = 4x = 36$). En esta subsección podemos encontrar a especies como *Ch. quinoa*, *Ch. berlandieri* subsp. *nuttalliae* y *Ch. hircinum* sinónimo de *Ch. quinoa* ssp. *Milleaenum* todos con $2n = 4x = 36$ cromosomas (Wilson, 1990).
- Leiosperma: morfológicamente contiene granos lisos no alveolados y genéticamente pueden tener diferente carga, pudiendo tener doble, cuádruple o séxtuple juego cromosómico ($2n = 18, 36, 54$). En esta subsección podemos encontrar a especies como *Ch. pallidicaule* con $2n = 18$ cromosomas y *Ch. album* de los Himalayas, con $2n = 18, 36, 54$ cromosomas, *Ch. carnosolum*, con $2n = 2x = 18$ cromosomas; *Ch. petiolare*, con $2n = 2x = 18$ cromosomas; *Ch. papulosum* y *Ch. zobelli* (Gangopadhyay *et al.*, 2002).
- Undata, en la cual podemos encontrar a *Ch. murale* con $2n = 2x = 18$ cromosomas, especie introducida en algunas regiones de la zona sur de Canadá (FNA Ed. Comm., 2003).
- Grossefoveata, en la cual podemos encontrar a *Ch. Simplex* nativa de la zona sur de Canadá (FNA Ed. Comm., 2003).

Dentro de la sección Ambrina se ubica a *Ch. ambrosioides* con $2n = 2x = 16$ cromosomas; sin embargo Wilson (1980) determina que sólo es posible la hibridación entre especies pertenecientes a la misma subsección, esto nos indicaría que los posibles parientes cercanos, estarían en la misma subsección, y que la quinua se habría originado a partir de *Ch. hircinum*

que también es tetraploide y éste a partir de especies diploides que podrían ser *Ch. carnosolum*, *Ch. pallidicaule* o *Ch. petiolare*, ampliamente distribuidos en la zona andina, en base a las características morfológicas, de adaptación y tolerancia a factores abióticos adversos, podríamos indicar que en el proceso de formación de *Ch. quinoa* hayan participado activamente grupos de genes de *Ch. carnosolum* por ello la quinua tiene una alta tolerancia al exceso de sales, puesto que *Ch. carnosolum* crece en zonas de amplia concentración salina y humedad, la resistencia al frío lo habría obtenido de *Ch. pallidicaule* que crece en las grandes altitudes del altiplano peruano-boliviano, soportando bajas temperaturas durante su ciclo de vida y que la morfología de la quinua vendría de *Ch. petiolare* por su gran parecido y porque cruzamientos efectuados entre *Ch. petiolare* y *Ch. hircinum* producen descendencia fértil, obteniendo de este modo un alotetraploide, incluso con producción de semillas de tamaños grandes y de color blanco (Gandarillas, 1984).

Por ello el pariente más cercano de la quinua cultivada sería *Ch. hircinum* (tetraploide), el escape del cultivo sería *Ch. quinoa* var. *melanospermum* (tetraploide), llamado comunmente aspha quinua y que los progenitores ancestrales serían *Ch. carnosolum*, *Ch. pallidicaule* y *Ch. petiolare* todos ellos diploides.

En los últimos años detallados estudios cariotípicos se han realizado en muchos taxones silvestres y cultivadas de *Chenopodium spp.* (Bhargava *et al.*, 2003). El índice de simetría (TF%) de la quinua varía desde 43,9 hasta 47,4%. y sólo un simple par satélite se ha observado en todas las accesiones de quinua estudiadas, lo cual ha sido corroborado por estudios de hibridación fluorescentes in situ (Kolano *et al.*, 2001). Según los estudios realizados por Bhargava *et al.* en el 2006, se muestran una gran similitud cariotípica entre *Ch. quinoa* y *Ch. berlandieri* subsp. *Nuttaltiae*; que es evidente a partir de las fórmulas cariotípica, índice de simetría y un par de satélite de morfología similar (Bhargava *et al.*, 2003).

2.8. Diversidad genética silvestre y variedades comerciales de la quinua

El centro de mayor diversidad de las Chenopodiaceae es el Altiplano peruano-boliviano. En donde la mayor parte de los parientes silvestres de quinua se encuentra en las aynokas, que son sistemas ancestrales de organización campesina con múltiples y diferentes finalidades: seguridad alimentaria, manejo racional de suelos y plagas, conservación de la diversidad

genética *in situ*, manejo altitudinal y uso racional de la diversidad (Ichuta y Artiaga, 1986). También podemos encontrar a los parientes silvestres en forma aislada, ya sea en los bordes de las chacras o lugares considerados sagrados, como los Gentil Wasi o Phiru. Sin embargo, debido al avance tecnológico e introducción de nuevas variedades, las aynokas están en proceso de erosión y pérdida, porque el desarrollo actual es avasallador y drástico, provocando su desintegración y resquebrajamiento en la organización, aunada a la pérdida de la cultura e identidad andina.

A continuación se presenta un listado de la diversidad genética silvestre (Mujica y Jacobsen, 2006) y una tabla con las principales variedades comerciales de Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia y Chile

- *Chenopodium carnosulum* Moq. Es una especie diploide con diez genotipos diferentes en las características estudiadas. Se ha encontrado en algunos casos creciendo dentro de los totorales, sumergida en el agua, con gran tolerancia al exceso de humedad y a la salinidad (Mujica *et al.* 2000). Las hojas son utilizadas en la alimentación humana como verdura, denominándose en el idioma nativo choq'a chiwa (verdura de los patos del lago). Se nota una alta concentración salina en las hojas, incluso al ser probado en forma cruda, debido a que acumula sales.
- *Chenopodium petiolare* Kunth, con siete genotipos diferentes y es también una especie diploide. Fue observada desde 3.830 hasta 3.900 m, mostrando gran variación fenotípica y confundiéndose con la quinua cultivada, no solo por su apariencia y coloración de planta, sino también por su forma muy erecta y con pocas ramificaciones. La planta tierna se emplea para la alimentación del ganado y sus hojas tiernas como verdura para alimentación humana. Los granos se usan en la alimentación para elaborar el quispiño (panecillo de color oscuro elaborado de dicha harina) y también tiene uso medicinal, principalmente para fracturas de huesos.
- *Chenopodium pallidicaule* Aellen, con 50 genotipos diferentes y es diploide. Esta especie se ubica mayormente en las partes más altas de la aynoka, debido a su resistencia al frío y a granizadas. Dentro de esta especie, se encuentran genotipos ancestrales como mama cañihua y machu cañihua, que crecen en lugares donde hubo asentamientos humanos abandonados, junto a corrales y cercos. Sus semillas se utilizan con fines

medicinales sobre todo para curar la anemia y postparto de mujeres; la harina se utiliza para evitar el mal de altura y como energizante poderoso en personas que han efectuado viajes prolongados y/o se encuentran convalescientes.

- *Chenopodium hircinum* Schrad., Es una especie tetraploide con $2n=4x=36$ cromosomas y vendría a ser el ancestro cercano de la quinua cultivada por su similitud cromosómica y fenotípica (Jacobsen & Mujica 2002). Presenta gran resistencia a la sequía, incluso en casos extremos de falta de precipitación pluvial, llegando a eliminar gran parte de las hojas inferiores para reducir la transpiración. Se utiliza principalmente para elaborar quispiño, que es de color oscuro y sabor diferente a los demás, así mismo tiene fines medicinales para el control de males hepáticos y mal de viento.
- *Chenopodium quinoa* ssp. *Melanospermum* Hunz., es una especie tetraploide. En sequías severas es la que mejor desarrollo tiene. Se han encontrado 40 genotipos diferentes, cuya coloración de semilla oscura varía desde el negro hasta el beige. Los agricultores generalmente la cosechan junto a la cultivada por ser similares. Las hojas se usan como verdura, la plántula como ingrediente de sopas, la inflorescencia como arrebozada, las semillas para elaborar quispiño y para alimentación de animales rumiantes (vacuno y ovino).
- *Chenopodium ambrosioides* L., aunque el número cromosómico es diferente al de la quinua, ya que es una especie diploide con $2n=2x=16$ cromosomas, pertenece a sección Ambrina. Se la encuentra en los bordes de los lugares de cultivo, siendo también utilizadas sus hojas en la alimentación humana y por su alto contenido de aceites esenciales en la medicina tradicional para la eliminación de parásitos intestinales, como amebas en las zonas tropicales.
- *Chenopodium incisum* Poir., es una especie diploide y se encuentra en bordes de chacras de los valles interandinos. Es utilizada como condimento en la alimentación humana, tanto en la preparación de sopas de maíz como de chuño. Así mismo se la usa en la medicina para eliminar parásitos gastrointestinales del hombre y animales, recibiendo el nombre de asna paicco.

En cuanto a las variedades comerciales la tabla 2 presenta las variedades más representativas de diferentes países andinos.

Tabla 2. Principales variedades comerciales de Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia y Chile.

País	Nombre	Tipo	Color de grano	Sabor
En Perú	Yanamarca	Valle	Blanco	Semidulce
	Blanca de Junín	Valle	Blanco	Semidulce
	Rosada de Junín	Valle	Rojo	Semidulce
	Amarillo maranganí	Valle	Amarillo	Amargo
	Rosada de Huancayo	Valle/cruce	Blanco	Semidulce
	Blanca de Hualhuas	Valle/cruce	Blanco	Semidulce
	Mantaro	Valle/cruce	Blanco	Semidulce
	Blanca de Juli	Altiplano	Blanco	Semidulce
	Tahuaco I	Altiplano	Blanco	Semidulce
	Kcancolla	Altiplano	Blanco	Semidulce
	Cheweca	Altiplano	Rosado	Amargo
	Witulla	Altiplano	Púrpura	Amargo
En Bolivia	Chucapaca	Cruce (RealxSajama)	Blanco	Semidulce
	Kamiri	Cruce (RealxSajama)	Blanco	Semidulce
	Waranga	Cruce (RealxSajama)	Blanco	Semidulce
	Sajama	Cruce (DulcexAltiplano)	Blanco	Dulce
	Sajama amarantiforme	Cruce (DulcexAltiplano)	Blanco	
	Samaranti	Altiplano	Blanco	
	Sayaña	Altiplano	Amarillo-crema	
	Tupiza	Valle	Blanco	Amargo
	Chillpi	Salar	Cristalino	Amargo
	Chiara	Salar	Púrpura	Amargo
	Kellu	Salar	Amarillo	Amargo
	Chillpi pasancalla	Salar	Cristalino/rosado	Amargo
	Michka	Salar	Rojo	Amargo
	Pantela	Salar	Rosado	Amargo
Jachapuco	Salar	Blanco	Amargo	
Pasancalla	Salar	Rosado	Amargo	
Real blanca	Salar	Blanco	Amargo	
En Ecuador	Cochasqui	Valle	Blanco opaco	Semidulce
	7Imbaya	Valle	Blanco opaco	Semidulce
	Amarga de chimborazo	Valle		Amargo
	Quinoa del carchi	Valle		Semidulce
	Morada	Valle		Amargo
	Chaucha de yaruqui	Valle		Amargo
Amarga de imbabura	Valle		Amargo	

Tabla 2. Principales variedades comerciales de Perú, Bolivia, Ecuador, Colombia y Chile.
(Continuación)

País	Nombre	Tipo	Color de grano	Sabor
En Ecuador	Tunkahuan			
	Ingapirca			
En Chile	Baer	Nivel del mar	Castaño	Semiamargo
	Faro	Nivel del mar	Castaño/marrón	Semiamargo
	Litu	Nivel del mar	Castaño	Semiamargo
	Pichaman	Nivel del mar	Castaño	Semiamargo
En Colombia	Dulce de Quitopampa	Valle	Blanco	Dulce
	Nariño	Valle	Blanco	Dulce
En Argentina	Selección Jujuy	Valle	Cristalino	Semidulce

2.9. Conservación de la diversidad genética de la quinua

La conservación de la diversidad genética de quinua a través de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, ha permitido implementar los actuales programas de mejoramiento genético en la región andina. Pese a ello es importante considerar el comportamiento en campo de esta diversidad, para posteriormente determinar aquellas líneas promisorias sobresaliente en atributos de interés como el rendimiento, índice de cosecha, calidad de grano, resistencia a enfermedades, tolerancia a sequía y/o a salinidad, entre otras características productivas relevantes. Asimismo resulta importante el conocimiento del sistema reproductivo de plantas de quinua, los cuales facilitarán en mayor o menor medida los procesos de fecundación natural o artificial entre plantas, dada la amplia variación en inflorescencias y tipos florales presentes en quinua (Bhargava *et al.*, 2007). Por otra parte, el uso de herramientas biotecnológicas como los marcadores moleculares y los mapas genéticos son altamente útiles para los programas de fitomejoramiento y particularmente importantes para la conservación de bancos de germoplasma, incluyendo también el desarrollo de núcleos de colección e identificación de cultivares (Patterson *et al.*, 1991; Diwan *et al.*, 1995; Tanksley y McCouch, 1997).

Las colecciones más completas de germoplasma *ex situ* para *Chenopodium* son mantenidas por el Royal Botanic Garden en Kew (Inglaterra), el USDA-ARS (Estados Unidos), el National Bureau of Plant Genetic Resources (India), la Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos (PROINPA, colección nacional de Bolivia), la Universidad Nacional del Altiplano (UNAP, Perú), y el IPK-Gatersleben en Alemania. De

estos bancos, sólo el de USDA-ARS y el Royal Botanic Garden en Kew mantiene una gran colección de *Chenopodium* silvestres del continente americano.

El primer banco de germoplasma caracterizado en Perú fue liderado por la Universidad Nacional del Altiplano (UNAP), la cual reportó una colección de 1.029 accesiones de quinuas, las que a partir de ellas se definió la colección núcleo de 103 accesiones (Ortiz *et al.* 1998; Ortiz *et al.* 1999), sin considerar la presencia de especies silvestres. Otros grupos de investigación en el Perú también mantienen colecciones de germoplasma, por ejemplo la Universidad Nacional Agraria de la Molina (UNALM), posee una colección de aproximadamente 2.800 accesiones de quinua y 140 de accesiones de cañihua a la fecha, incluyendo colecciones del centro y norte del Perú (L. Gómez, comunicación personal).

En Bolivia, la Fundación PROINPA fue adjudicada para la custodia de la Colección Nacional Boliviana a fines de la década de los noventa. Ellos a la fecha continúan con las colectas y mantienen su germoplasma bajo la modalidad de conservación *ex situ* en sus instalaciones en Quipaquipani, 4 km al sur de Viacha, Provincia de Ingaviri, en la parte norte del altiplano. Trabajos de colecta de germoplasma siguen en curso, con aproximadamente 3.120 accesiones de quinua (282 en la colección núcleo) y 770 accesiones de cañihua en custodia en el sitio. Adicionalmente también han colectado 67 accesiones de paico (*Dysphania ambrosioides*).

Con respecto a la conservación de germoplasma de quinua *in situ*, incluyendo a mejoradores en jornadas participativas con agricultores, aparece un importante número de programas en la región Andina (Danielsen *et al.* 2000; Fuentes *et al.*, 2005; Mujica y Jacobsen 2006; McElhinny *et al.* 2007). Tapia (2000), señala un caso donde tres entidades trabajaron en conservación *in situ* en el Departamento de Cajamarca, Perú, la que involucró la participación del Centro Internacional de la Papa (CIP), la Asociación de Desarrollo Rural de Cajamarca (ASPADERUC), y el Consorcio para el Desarrollo Sustentable de la Ecoregion Andina (CONDESAN). Los seis pasos descritos de este modelo consideraron: 1) manejo de la conservación del suelo y el agua; 2) ferias comunitarias de semillas, promoviendo la biodiversidad, más que líneas mejoradas; 3) workshops participativos de agricultores; 4) asociaciones para la conservación, integradas por los mismos agricultores; 5) establecimiento de bancos de semillas en campo con la máxima conservación de diversidad; y 6) visitas periódicas de instituciones supervisoras, con el objetivo de

monitorear el progreso en la mantención de la biodiversidad. Proyectos similares han sido desarrollados en la zona centro de México desde el año 2004, para la promoción activa de la conservación *in situ* de razas nativas de *C. berlandieri* subsp. *nuttaliae*, muchas de las cuales están al borde de la extinción (Perez-Agis *et al.* 2005).

2.10. Genética de la quinua

La quinua es alotetraploide ($2n=4X=36$) y muestra una herencia disómica para la mayoría de sus rasgos cualitativos (Simmonds, 1971; Risi y Galwey, 1984; Ward, 2000). Una estimación del contenido nuclear por citometría de flujo indica que en *Ch. quinoa* “Surimi” tiene un contenido total de ADN nuclear haploide de 976 Mbp/1C (Maughan *et al.*, 2004; Kole, 2007). Este es aproximadamente 6.7 veces el tamaño de *A. thaliana* y aproximadamente dos veces el tamaño del arroz, pero ligeramente más grande que otro miembro de la familia Amaranthaceae, incluida la remolacha (714 Mbp/1C), la remolacha azucarera (758 Mbp/1C), y espinaca (989 Mbp/1C) (Arumuganathan y Carle, 1991). Se calcula que un centimorgan (cM) en el mapa genético de quinua es de aproximadamente 568 kb. Sin embargo, se debe tener cuidado cuando se relaciona la distancia genética a la distancia física, la relación es por lo general no lineal, incluso en distancias cortas dentro del mismo cromosoma (Lashermes *et al.*, 2001).

Actualmente los intentos por acrecentar la investigación sobre la genética de la quinua es limitada. Poca información se tiene sobre sus genes, de cómo estos se ubican en su genoma y como se heredan. Sin embargo, modernos programas de reproducción y mejoramiento genético, apoyados por agencias privadas y gubernamentales, se han ido estableciendo rápidamente en Bolivia y Perú, con el objeto de desarrollar marcadores moleculares para el manejo de germoplasmas y facilitar los programas de mejoramiento genético tradicional. Gracias a la tecnología de los marcadores moleculares se ha desarrollado el primer mapa de ligamiento genético para quinua empleando 230 polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados, más conocidos por su acrónimo inglés AFLP (Amplified fragment length polymorphism), 19 secuencias simples repetidas o microsatélites, SSR (Single Sequence Repeat) y seis polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). Donde se obtuvo una extensión del mapa de 1,020 cM y contiene 35 grupos de ligamiento con una densidad media del marcador de 4.0 cM por marcador (Maughan *et al.*, 2004).

2.11. Mejoramiento y herencia de caracteres de la quinua

El objetivo principal del mejoramiento de la quinua es, desarrollar variedades con un alto nivel de rendimiento y producción, alto contenido de proteína y bajo contenido de saponina. Más no se centra en el mejoramiento de sus capacidades de resistencia a factores abióticos. Esta falta de interés puede deberse a que estas características inherentes de la quinua son muy amplias y fuertemente marcadas en casi todas las variedades existentes como las describe el CIP (Jacobsen, 2000), en donde ésta puede crecer en agua de mar, en diferentes zonas de vida y alturas o incluso bajo condiciones extremas de sequía y heladas.

Actualmente los esfuerzos de mejoramiento genéticos de esta especie se han realizado bajo técnicas convencionales, es decir, mediante cruzamientos. Sin embargo, esta técnica es muy complicada debido al alto porcentaje de auto-polinización y a que el tamaño de las flores de quinua son muy pequeñas, lo que hace que la emasculación e hibridación sea un trabajo muy tedioso (Bhargava *et al.*, 2006). Pero, aun así con las existentes dificultades la selección de masa e hibridación han sido practicados en la quinua durante años (Risi y Galwey, 1984).

Gracias a estas prácticas, se han efectuado avances considerables en la biología floral de la quinua, que han permitido iniciar trabajos de mejoramiento a través de la hibridación y selecciones, estos estudios han permitido conocer los porcentajes de autopolinización, polinización cruzada, cantidades de flores de diferentes sexos, cantidad de glomérulos en las inflorescencias, número de flores en los glomérulos, tiempo de apertura de las flores, tiempo de maduración de los estambres y estigmas, presencia de aberraciones florales, agentes polinizadores y comportamiento diferencial de las variedades.

Según Silvestri y Gil (2000), la planta es primordialmente auto-polinizadora, pero posee un porcentaje de polinización cruzada de 17.36%. Este bajo porcentaje de cruzamiento ocurre frecuentemente cuando se encuentran a una distancia de un metro y ocasionalmente a distancias menores de 20 metros (Gandarillas, 1979). Otros estudios sobre porcentaje de polinización cruzada natural y autopolinización en variedades comerciales de quinua como: Kcancolla, Blanca de Juli y Sajama (Rodríguez, 1978), presentan mayormente autogamia, aunque por la existencia de un gran número de flores femeninas permiten cierto grado de alogamia. Samanez (1977), al trabajar con los genotipos Ayara y Mixtura, observó que el genotipo Ayara se comportaba como Alógama (12.2% de polinización cruzada) mientras

que a mixtura como autógena (97.6 % de autopolinización), en ambos genotipos se observó homostilia, siendo homógamas. Valdivia (1978), encontró una marcada variación sexual en dos líneas según el color de la panoja, observando flores pistiladas, hermafroditas y androestériles, la línea blanca presentó 99.13 % de autopolinización y la morada 98.66%, considerando a ambas como autógenas.

Por otra parte, es de vital importancia considerar el uso de la biotecnología como una herramienta capaz de acelerar el alcance de objetivos en los programas de mejoramiento mediante el estudio de ADN y otras técnicas. Estudios que pueden ir desde la determinación del nivel de diversidad en un proceso de selección, hasta el estudio de genes específicos que controlan importantes características, tales como la resistencia a enfermedades, control genético de la producción de saponinas en el grano, o la comprensión de características más complejas como la tolerancia a la sequía o la salinidad (Fuentes *et al.*, 2009).

En cuanto a la heredabilidad de caracteres, el contenido de saponina en quinua es heredable, siendo recesivo el carácter dulce. La saponina se ubica en la primera membrana del grano. Su contenido y adherencia en los granos es muy variable y ha sido motivo de varios estudios y técnicas para eliminarla, por el sabor amargo que confiere al grano (Gandarillas, 1979), que el carácter amargo o contenido de saponina estaría determinado por un simple gen dominante. Sin embargo, la presencia de una escala gradual de contenido de saponina indicaría más bien su carácter poligénico.

En quinua el tipo de inflorescencia puede ser amarantiforme o glomerulada, siendo esta última dominante sobre la primera. El color de las plantas de quinua es un carácter de herencia simple; en cambio el color de los granos es por la acción de agentes complementarios, siendo el color blanco un carácter recesivo.

Tabla 3. Genes y herencia de algunos caracteres de la quinua.

Carácter	No de genes	Cifra de genes	Número de alelos	Tipo de alelos	Dominancia	Heredabilidad	Fenotipo planta	Genotipo
Color planta + color panoja	1	R	3	R	Dominante sobre r^p y r^r dominante sobre r	Simple	Rojo	R
				r^p			Púrpura	$r^p r^r$
				r			Verde	rr
Tipo panoja	1	G	2	G	Dominante sobre g	Simple	Glomerulado	G
				g			Amarantiforme	gg

Tabla 3. Genes y herencia de algunos caracteres de la quinua. (Continuación)

Carácter	No de genes	Cifra de genes	Número de alelos	Tipo de alelos	Dominancia	Heredabilidad	Fenotipo planta	Genotipo
Contenido saponina	1	D	2	D	Dominante sobre d	Simple	Dulce	D
				d			Amargo	dd
Esterilidad masculina	1	M	2	M	Dominante sobre m	Simple	Fértil	M
				m			Estéril	mm
Carácter chullpi	1	S	2	S	Dominante sobre s	simple	Normal	S
				s			chullpi	ss
Color axilar	1	Ax	2	Ax	Dominante sobre ax	simple	Axilas pigmentadas	Ax
				ax			Axilas sin pigmentación	ax ax
Color grano	2	A	5	A	Dominante sobre a ^c	Interactivo + complementario	Negro	A-C
				a ^c			Café	a ^c a ^c c ^c c ^c a ^c -c ^c
				a ^{cc}	Dominante sobre a ^{cc}		Café claro	a ^{cc} a ^{cc} cc
				a ^r	Dominante sobre a ^r		Amarillo	A
				a	Recesivo			C
				C	Dominante sobre c ^c		Rojo	A ^r a ^r
				c ^c	Dominante sobre c ^{cc}		Blanco	aacc
c ^{cc}								
c	Recesivo							

2.12. Definición de Marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética

Los marcadores moleculares son una herramienta que tiene muchos campos en la biología como genética evolutiva, ecología, biomedicina, ciencias forenses y estudios de diversidad. Actualmente su importancia radica en localizar y aislar genes de interés.

Para Valadez y Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente (por ejemplo, un gen que ocasiona resistencia para algún antibiótico).

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998).

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Tanksley, 1983). El uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, estos marcadores solo es posible evaluarlos a nivel de toda la planta y cuando esta llega a su estado adulto, esto significa una espera, no deseable, de varios años. Además, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Powell, 1992; Phillips *et al.*, 1995).

En cambio los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis, permiten la identificación correcta de la variedad sin necesidad de muchos caracteres y están libres de los efectos epistáticos (Tanksley, 1983; Powell, 1992; Phillips *et al.*, 1995). Además son útiles tanto en la investigación básica como por ejemplo; análisis filogenéticos y búsqueda de genes útiles; así como en la investigación aplicada como en la selección asistida por marcadores, pruebas de paternidad y trazabilidad de alimentos.

Además, los marcadores moleculares son herramientas importantes para la gestión de los recursos genéticos en programas de mejoramiento. La evaluación de la diversidad genética entre los genotipos se puede utilizar para: (i) identificar las identidades genéticas dentro de las colecciones, (ii) desarrollar genéticamente diversas colecciones núcleo (un sub grupo genéticamente representativa de la colección de reserva), (iii) monitorear los cambios naturales y artificiales en las colecciones genéticas (por ejemplo, los contaminantes, las hibridaciones o mezclas), y (iv) identificar las relaciones filogenéticas dentro de la colección del germoplasma y las relaciona con especies de malezas (McGregor et al, 2002).

Según Ferreira y Grattapaglia (1998), las características que debe cumplir para ser un buen marcador molecular deben ser: (i) altamente polimórfico y discriminante, permitiendo diferenciar individuos aún muy cercanos genéticamente; (ii) multialélico para un solo locus;

(iii) codominante, permitiendo distinguir homocigotos de heterocigotos; (iv) no epistáticos, sin interacciones de diferentes genes para una característica; (v) no epigenéticos, sin interacción entre sus genes y el ambiente; (vi) distribución uniforme en todo el genoma, para facilitar la evaluación del polimorfismo en muchos lugares del genoma; (vii) reproducible; (viii) económico y manejable a gran escala.

2.13. Ventajas de los marcadores moleculares sobre los marcadores morfológicos

Según Ferreira y Grattapaglia (1998), los niveles de polimorfismo de los marcadores moleculares son generalmente altos para cada locus estudiado, lo que facilita la generación de mapas genéticos. A diferencia de los morfológicos, debido a que poseen un número restringido de marcadores que pueden cubrir el genoma en estudio. Además, requieren de mucho esfuerzo y planificación debido a que los investigadores deben recurrir a un gran número de cruzamientos para el estudio de ligamientos genéticos.

En general los marcadores moleculares son neutros con relación a los efectos fenotípicos, con efectos epistáticos o pleiotrópicos mínimos o nulos. Sin embargo, los morfológicos están sujetos a estos efectos por lo que puede generar errores en la generación de mapas genéticos.

La gran mayoría de los marcadores moleculares son dominantes o codominantes y contienen mayor información genética por locus que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría, son dominantes o recesivos.

Otra ventaja de los marcadores moleculares sobre los morfológicos es que estos pueden usarse en cualquier fase del desarrollo de la planta. Mientras que los morfológicos solamente pueden usarse cuando la planta ha alcanzado el nivel de planta entera o adulta. Lo que implica un tiempo de espera no deseado. Por lo que la identificación de genotipos en fases iniciales de desarrollo de la planta, abre la posibilidad de acelerar el proceso de selección y cruzamiento de los individuos para la generación de nuevas variedades. Casos de mejoramiento genético en trigo han tomado un promedio de 20 años de espera para la generación de nuevas variedades mejoradas. Es por estos que gracias a la eficiencia de los marcadores moleculares se ha reducido este tiempo a un promedio de siete a diez años de espera para la obtención de variedades mejoradas (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.14. Antecedentes de aplicaciones de marcadores moleculares en quinua

Hasta la fecha, sólo algunos investigadores han reportado el desarrollo y uso de marcadores moleculares en la quinua. Wilson (1988) empleó datos de aloenzimas para confirmar la diferencia genética entre ecotipos de quinua altiplánicas y costeras. Fairbanks *et al.* (1990) utilizaron la variación electroforética de las proteínas de semillas para la caracterización de germoplasma de quinua. Ruas *et al.* (1999) utilizaron marcadores de polimorfismo de DNA amplificado arbitrariamente (RAPD), para detectar polimorfismos entre varios cultivares de *C. quínoa* y especies de malas hierbas relacionadas a *Chenopodium* en los altiplanos bolivianos. En el estudio se caracterizó 19 accesiones de seis especies de quinua observando altos niveles de polimorfismo en la especies estudiadas y bajos niveles en de variación intraespecífica dentro de las accesiones. Además se mencionó que cuatro accesiones de la especie *C. ambrosioides* tuvieron un grado de similitud de 0.75 el cual supone que son nuevas colecciones que podrían ser introducidas al banco de germoplasma de Patacamaya (Bolivia).

En el 2000, Pratt evaluó la diversidad genética de la quinua a través de 125 accesiones de esta especie y 56 accesiones de especies emparentadas con AFLP, encontrándose una abundante cantidad de polimorfismo en las accesiones de especies emparentadas con *Chenopodium quinoa*. Stevens (2003), uso una serie de combinaciones de AFLPs para determinar la diversidad genética de 182 especies accesadas al banco de germoplasma en Bolivia.

Maughan *et al.* (2004) desarrollaron el primer mapa de ligamiento genético para quinua empleando 230 AFLP, 19 SSR y seis RFLP. Donde se obtuvo una extensión del mapa de 1,020 cM y se obtuvieron 35 grupos de ligamiento. El desarrollo de este mapa de ligamiento genético es un importante paso para la caracterización genética y la iniciación de selección asistida por marcadores (MAS) para las características agronómicas más importantes de la quinua.

Jiménez (2006), empleó AFLPs para analizar la diversidad genética de 28 variedades de quinua, utilizando 8 combinaciones de iniciadores, obteniendo un PIC calculado en el rango de 0.26 a 0.35. La combinación EcoRI-ACT + MseI-CAC mostró el valor PIC más alto, de

0.35, con el cual se pudo determinar los polimorfismos para la diferenciación de las variedades en estudio. Por lo que se concluyó que esta combinación puede ser utilizada para la creación de mapas de ligamiento debido a que es altamente informativo.

2.15. Marcadores moleculares: SSR (simple sequence repeats)

Los microsatélites, también llamados SSR (simple sequence repeats), son secuencias repetidas en tándem de ADN que pueden ir desde un mínimo de 8 nucleótidos (nt) hasta por encima de los 100 nt de longitud (Litt y Luty, 1989). Los arreglos de las secuencias repetidas contenidas en él pueden tener un tamaño de 2 a 6 nt; sin embargo, existe cierta controversia ya que algunos los clasifican como SSR de 2-8 nt versus SSR de 1-5 nt repetidos (Chambers y MacAvoy, 2000). Los tipos de repeticiones que ocurren en los SSR varían entre las especies. Las repeticiones más frecuentes en las plantas son (AA)_n y (AT)_n (Lagercrantz *et al.* 1993). Los SSR son altamente polimórficos, tanto intra como inter específicamente, esto se debe a que poseen tasas de mutación entre 10^{-3} y 10^{-6} que se generan por deslizamiento erróneo de la hebra de ADN durante la replicación (Malik *et al.*, 2009; Wiessenbach y Dib, 1992; Weber y Wong, 1993). Se encuentran dispersas a través de los genomas de hongos, plantas y animales, los cuales pueden o no estar asociadas con genes, son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios del genoma.

La elaboración de marcadores SSR es muy laboriosa y en este aspecto costoso, debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas (bordes del microsatélite), aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo. Al respecto, Cervera *et al.* (2002) mencionan que aunque los microsatélites permiten analizar sólo un locus por experimento son bastante informativos ya que dejan diferenciar las variantes alélicas de los loci analizados y por lo tanto identificar grupos de ligamiento entre diferentes mapas genéticos. Sin embargo, para su desarrollo se precisa conocer la secuencia y, por lo tanto, son menos numerosos que otros marcadores dominantes.

La tecnología para el análisis de microsatélites es similar a la utilizada para el análisis RAPD, con la adición de una evaluación y secuenciación previa para determinar los iniciadores. La detección del polimorfismo SSR se realiza mediante un PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de secuenciación. Las

variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe *et al.* 2004).

Una técnica derivada de la anterior se conoce como “PCR iniciada con microsatélites anclados (AMP-PCR)” la cual emplea iniciadores con “anclas” en sus extremos 3’ o 5’. Esta clase de iniciadores consiste de una, dos o tres bases adicionales al microsatélite, por ejemplo; C(CT)8, CA(CT)8, CAC(CT)8 o (CT)8C, (CT)8CA y (CT)8CAC, y sirven para seleccionar aquellas islas de microsatélites en el genoma que están flanqueados con el complemento de bases específicas, por lo que se incrementa su especificidad (Valadez y Kahl 2000). Generalmente esta técnica es más eficiente que las técnicas SSR o RAPDs, ya que ha demostrado detectar más variabilidad genética (Salimath *et al.* 1996).

El uso de SSR ofrece una serie de ventajas sobre otro tipo de marcadores moleculares. Su tamaño (<500pb) es adecuado para su amplificación mediante PCR y tanto su naturaleza codominante como su herencia mendeliana permiten el análisis genético de poblaciones y relaciones de parentesco. Además el uso de iniciadores (20-30pb) complementarios a secuencias específicas que flanquean al microsatélite permiten que se amplifique un solo locus y que su uso sea reproducible en diferentes laboratorios (Karp *et al.*, 1998). Finalmente una de las ventajas más atractivas es que una vez conocidas estas secuencias, se pueden utilizar en especies cercanas, para esto es necesario modificar el programa de amplificación para que esta sea menos restringida (Karp *et al.*, 1998).

2.16. Origen de los SSRs

Las secuencias o matrices de SSR se cree que tienen un "ciclo de vida" que muestra un equilibrio entre el crecimiento y la degradación que se extiende por cientos de millones de años. La génesis de los SSR bien puede comenzar en las regiones inclasificables en el ADN que no tienen tales repeticiones o tener pequeñas repeticiones simples representativas (requisito mínimo de ocho nucleótidos repetitivos puede ser esencial), seguidos por mutaciones (Morgante y Olivieri, 1993). Estos cortos "proto-SSR", entonces podrá ser extendidos por acontecimientos de deslizamiento.

El deslizamiento durante la replicación es el mecanismo predominante para la generación de la variabilidad del SSR. Los SSR también podrían haber nacido durante la reparación del

ADN en la transcripción o durante la reparación de roturas en la cadena doble. Esto puede suceder, porque en la ausencia de otras secuencias de información, secuencias repetitivas podrían ser adecuadas para rellenar los huecos. El relleno de espacios con secuencias repetidas es potencial inherente para formar conformaciones alternativas de ADN o las mutaciones pueden ser también importantes en la generación de SSRs (Trivedi, 2003).

¿Los transposones tienen ningún papel que desempeñar en la generación de extensiones proto-SSR antes de la inicialización de los SSR propiamente dichos? Posibles vínculos evolutivos de minisatélites como progenitores de la SSR se ha especulado. Una fuerte asociación de repeticiones ricas en A/G con transposones sugiere que incrementa el proceso de integración o así mismo las colas de poli (A) en la transcripción inversa del ARN. Las secuencias ricas en CpG en *Bombyx mori*, y otros elementos transponibles, sugieren que los transposones pueden contribuir en la génesis de la SSR. Es posible que la frecuencia de SSR pudiera ser mayor en organismos mayores que tienen un menor número de copias de retrotransposones. Sin embargo, en las aves y las plantas, las asociaciones de SSRs con transposones y, sus contribuciones en la generación de SSRs no son evidentes (Trivedi, 2003, Morgante y Olivieri, 1993).

2.17. Ventajas y desventajas de los SSRs

Los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, debido a que: i) tienen el más alto grado de polimorfismo, pudiendo revelar entre 2 a 25 alelos; ii) se segregan de manera mendeliana y son codominantes, lo que permite discriminar fácilmente los estados homocigotes de los heterocigotes, lo que permite identificar heterocigotes en la F1 facilitando los análisis de flujo génico, hibridación y paternidad. Además, incrementan la agudeza y eficiencia de las medidas genético-poblacionales a comparación de los AFLP y RAPD que son marcadores dominantes; iii) la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar y iv) son selectivamente neutros (Golstein y Pollock, 1994; Vendramin *et al.*, 1996).

Una ventaja muy atractiva para análisis de diversidad es que los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y/o especies medianamente relacionadas (Vendramin *et al.*, 1996), lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o

géneros de un mismo grupo. Por otra parte, se han realizado estimaciones de las tasas de mutación de estas regiones y se ha llegado a la conclusión de que los microsatélites del ADN nuclear tienen tasas de mutación de 1×10^{-3} a 1×10^{-6} (Wiessenbach *et al.*, 1992; Weber y Wong, 1993), más altas que las que se presentan en el ADN de cloroplasto las cuales según Provan *et al.* (1999) son de $3.2-7.9 \times 10^{-5}$. Conocer las tasas de mutación nos brinda una base importante para realizar análisis robustos de la genealogía de las poblaciones que nos hablen acerca de la historia evolutiva de las especies, ventaja muy importante sobre otros marcadores genéticos.

Otra ventaja que presenta el uso de microsatélites con relación al uso de secuencias, es que la mutación es homogénea, lo que posibilita identificar no solo la tasa de mutación sino también, el tipo de mutación. En la mayoría de los SSR las mutaciones son de un paso (una unidad repetitiva) siguiendo el modelo mutacional SSM de Ohta y Kimura (1973). Sin embargo, Golstein *et al.* (1995) mencionan que las mutaciones de repeticiones formadas por dinucleótidos o trinucleótidos son de dos pasos o incluso de múltiples pasos, lo que ha sido confirmado por estudios en trinucleótidos. Por ejemplo, en el humano el microsatélite formado por las repeticiones CAG –asociado con un desorden neurológico–, puede mutar de pocos a cientos de alelos (Ashley y Warren 1995). Sin embargo este comportamiento asimétrico del tamaño de las mutaciones de SSR ha sido raramente reportado.

Una de las desventajas de la variación de los SSRs en el ADN nuclear es que debe analizarse con precaución, ya que estas variaciones pueden haberse generado por duplicaciones o por la presencia de familias multigénicas (Rieseberg, 1991), que generan un alto grado de homogeneidad dentro y entre especies, proceso conocido como evolución concertada. Estos fenómenos pueden distorsionar la historia evolutiva de los organismos en estudio y confundir las relaciones filogenéticas (Rieseberg, 1991). Es decir, se pueden presentar aparentes reticulaciones o escenarios de hibridización introgresiva.

Otro problema inherente de los SSR es la redundancia esto se debe al origen informativo de para la creación del iniciador. Generalmente las librerías genómicas pueden proporcionar grandes niveles de redundancia mientras que las librerías génicas son más acertadas y evitan o reducen drásticamente las redundancias (Varshney *et al.*, 2005). En cuanto al tipo de origen informativo del SSR los genómicos son marcadores menos robustos y de baja calidad a comparación de los génicos (Varshney *et al.*, 2005). El diseño de los iniciadores SSR no es

una ciencia exacta generalmente se reporta un porcentaje de amplificación de entre 60 a 90%, esto se puede deber a: i) desplazamientos en el sitio de anclaje, ii) la presencia de intrones en la secuencia genómica, iii) el uso de información cuestionable para el desarrollo de los iniciadores y iv) que los iniciadores fueron derivados de quimeras de cADN clones. Y finalmente otra desventaja es la presencia de alelos nulos que pueden ocurrir básicamente por dos acciones i) por delección del microsatélite en un locus específico y ii) por mutaciones en el sitio de anclaje; complicando la interpretación de análisis de segregación por que se hace imposible detectar la heterocigosis (Varshney *et al.*, 2005).

2.18. Usos y aplicaciones de los SSR

El uso de los microsatélites ha tenido un gran impacto en el estudio de la genética desde su descubrimiento en 1989 (Litt y Luty, 1989). Sin embargo, a pesar de que el concepto de los microsatélites lleva años presentes en el campo de la investigación, no fue sino hasta 1993 donde Morgante y Olivieri realizaron la identificación de SSR en secuencias genómicas en diferentes especies de plantas. No obstante, la información necesaria para la identificación y creación de SSR en aquella época era limitada debido a la falta de información disponible de secuencias genómicas o génicas. Actualmente existen proyectos encargados para la búsqueda de etiquetas de secuencia expresada (EST, de sus siglas en ingles Expressed Sequence Tag) que se encargan de generar una basta cantidad de datos de secuenciamiento en plantas disponibles para la generación de SSRs (Rajeev K. *et al.*, 2005).

Gracias a estos avances, los SSR son cada vez más utilizados como marcadores genéticos de segmentos cromosómicos (Dib *et al*, 1996), para la identificación de individuos (Anon, 1996), estudios de evolución y relación ortóloga y paraloga (Rubinsztein *et al*, 1995; Azfer *et al*, 1999; Ali *et al*, 1999), conservación de la vida silvestre (Roca *et al*, 2001), seguimiento de la historia biológica de poblaciones (Bergstrom *et al*, 1999), para diferenciar categóricamente los organismos de importancia comercial como el gusano de seda (Reddy *et al*, 1999), incluso para desentrañar la dinámica del plegado y desplegado genómico durante los ciclos celulares y en la regulación génica (Dokholyan *et al*, 2000). Los polimorfismos que se pueden encontrar gracias a los SSR son de utilidad para los estudios de patrones y tasas de mutación en poblaciones al azar y en la reconstrucción de la historia evolutiva (Stallings, 1995).

En la aplicación de los SSR en el mapeo genético, los SSR desarrollados a partir de bibliotecas genómicas pueden pertenecer tanto a regiones codificantes como a no codificantes, y rara vez existe información disponible con respecto a sus funciones. Sin embargo, los SSR génicos a menudo pueden representar genes potencialmente funcionales o genes putativos. Una de las aplicaciones con mayor uso es la caracterización de la variación genética en las poblaciones naturales y entre las líneas de cultivo, esto es crucial para la conservación y la explotación de los recursos genéticos para los programas de mejoramiento de cultivos. Los marcadores moleculares han demostrado ser útiles para la evaluación de la variación genética en las colecciones de germoplasma. Sin embargo, tal vez la característica más importante para la aplicación práctica es que los marcadores SSR génicos son transferibles entre especies medianamente alejadas, mientras que los SSR genómicos no son adecuados para este propósito. La transferibilidad de los marcadores de este tipo a las especies o géneros afines se ha demostrado en varios estudios (Rajeev K. *et al.*, 2005).

Algunos ejemplos aplicativos de los marcadores SSR se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Ejemplos aplicativos de los SSR en algunas especies vegetales.

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Ashworth y Clegg (2003)	<i>Persea americana</i> L.	Análisis de las relaciones genéticas entre materiales.	SSR, RFLP	Los marcadores permitieron la separación de los materiales en tres grupos que corresponden a las razas mexicana, guatemalteca y antillana. Se encontró una considerable diversidad entre los materiales procedentes de Guatemala. El análisis de la población con marcadores SSR detectó un mayor nivel de heterocigosis respecto del resultado de los RFLP.
Billotte <i>et al.</i> (2004)	<i>Bactris gasipaes</i> Kunth.	Identificar secuencias marcadoras.	SSR	Se determinaron 18 secuencias marcadoras. Las cuales se pueden utilizar en especies del género <i>Bactris</i> así como de los géneros <i>Astrocaryum</i> y <i>Elaeis</i> .
Billotte <i>et al.</i> (2005)	<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.	Desarrollo de mapa de ligamiento.	SSR, AFLP	Desarrollo de mapa de ligamiento de alta densidad. Los 944 marcadores empleados se distribuyen en 16 grupos de ligamiento independientes entre sí. Cada grupo encaja en uno de los pares de cromosomas homólogos de la especie.
Birnbaum <i>et al.</i> (2003)	<i>Persea americana</i> L.	Evaluar herramientas que permitan medir la diversidad genética en plantaciones a través de los años.	SSR	Los resultados apoyan la factibilidad de la conservación en la plantación. No obstante, la simulación de datos sugiere que puede ocurrir un fuerte flujo de genes, que puede conllevar a una pérdida de diversidad genética.

Tabla 4. Ejemplos aplicativos de los SSR en algunas especies vegetales. (Continuación)

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Decker-Walters <i>et al.</i> (2002)	<i>Cucumis melo</i>	Definir origen y afinidad de los materiales silvestres en Norte América.	RAPD, SSR	El análisis con marcadores RAPDs y SSRs, así como el uso de caracteres morfológicos y fisiológicos permitió entender mejor las relaciones en y entre las accesiones. Los datos sugieren que las poblaciones de Norte América son distintas, y pueden ser clasificadas como una especie diferente.
Ge <i>et al.</i> (2005)	<i>Musa spp.</i>	Análisis de la estructura poblacional.	SSR, RFLP	Determinaron las relaciones genéticas entre los materiales.
Gonzalo <i>et al.</i> (2005)	<i>Cucumis melo L.</i>	Construcción de mapa.	SSR, RFLP	Construcción de mapa con una longitud de 1.021cM. Distribuido en 12 grupos de ligamiento y una densidad de 3,11 cM/marcador. Los marcadores SSR cubren aproximadamente el 80% de la longitud total del mapa.
Honsho <i>et al.</i> (2005)	<i>Mangifera indica</i>	Aislamiento y caracterización de microsatélites	SSR	Aislaron seis microsatélites marcadores de loci con sus respectivos juegos de iniciadores. Los marcadores fueron capaces de discriminar la composición genética de la mayoría de los genotipos en estudio. Los resultados sugieren el potencial de la técnica para la identificación de los cultivares de mango.
Kaemmer <i>et al.</i> (1997)	<i>Musa spp.</i>	Valorar el uso de la tecnología del Polimorfismo de Marcadores de Secuencias Específicas Vecinas a Microsatélites (STMS).	SSR, PCR	Idoneidad de los SSR para estudios de genética en Musáceas.
Mhameed <i>et al.</i> (1997)	<i>Persea americana</i> Mill.	Análisis de la diversidad genética. Minisatélites,	SSR, ADN fingerpring	Se logró identificar las relaciones filogenéticas entre los materiales en estudio. Se observó una alta variación entre los cultivares de la especie y entre diferentes especies del género <i>Persea</i> .
Oliver <i>et al.</i> (2001)	<i>Cucumis melo L.</i>	Construcción mapa de ligamiento.	RFLP, AFLP, RAPD, SSR, Isoenzimas	Desarrollo parcial del mapa. De un total de 411 loci, 391 se colocan en 12 grupos de ligamiento y 21 segregaron independientemente. Un 66% de los marcadores fueron codominantes (RFLP, SSR e isoenzimas).
Parasnis <i>et al.</i> (1999)	<i>Carica papaya</i>	Identificación del sexo en plántulas.	SSR	La prueba (GATA) ⁴ mostró ser indicativa según el sexo.
Pugh <i>et al.</i> (2004)	<i>Theobroma cacao L.</i>	Desarrollo e integración de nuevos marcadores microsatélites a mapa de ligamiento.	SSR, RFLP, Isoenzimas	Desarrollo de mapa de ligamiento, más detallado, basado en marcadores codominantes. El nuevo mapa consta de 465 marcadores; 268 SSRs, 176 RFLPs, cinco isoenzimas y 16 Rgenes-RFLP dispuestos en 10 grupos de ligamiento que corresponden al número haploide de cromosomas de la especie.
Risterucci <i>et al.</i> (2005)	<i>Psidium guajava L.</i>	Caracterización de microsatélites	SSR	Primer reporte y caracterización de 23 SSR genómicos en la especie. Se indican que son altamente polimórficas.

Tabla 4. Ejemplos aplicativos de los SSR en algunas especies vegetales. (Continuación)

Autor	Especie	Objetivo	Técnicas	Comentario/Resultado
Ruiz <i>et al.</i> (2000)	<i>Citrus</i> spp.	Desarrollar metodología alterna a las isoenzimas, para discriminar entre materiales desarrollados a partir de embriones cigóticos de los nucelares.	SSR	En la mayoría de los casos los SSR son más eficientes que las isoenzimas en la identificación del origen sexual o no de los materiales. Además, los SSR detectaron un mayor nivel de polimorfismo respecto del escaso número de enzimas polimórficas detectadas mediante la técnica de isoenzimas para algunas de las poblaciones estudiadas.
Schnell <i>et al.</i> (2003)	<i>Persea americana</i> Mill.	Determinar variación genética en y entre razas hortícolas de aguacate.	SSR	Identificación de materiales. No determinaron marcadores útiles, asociados a alelos únicos, para separar entre razas. La agrupación hortícola de las razas es congruente con la agrupación generada por los marcadores.
Sharon <i>et al.</i> (1998)	<i>Persea americana</i> Mill.	Detección de probables loci de características cuantitativas.	SSR, RAPD y ADN fingerprint	Encontraron que seis características se asocian con al menos uno de los 90 marcadores evaluados.
Staub <i>et al.</i> (2000)	<i>Cucumis melo</i> L.	Análisis de la diversidad genética.	SSR	Desarrollo de dendrograma y análisis de las relaciones filogenéticas entre los materiales.
Viruel y Hormaza (2004)	<i>Litchi chinensis</i> Sonn.	Identificación de secuencias marcadoras.	SSR	Se determinaron 12 secuencias marcadoras enriquecidas en repeticiones CT. Los microsatélites desarrollados permitieron discriminar adecuadamente los materiales en estudio.
Viruel <i>et al.</i> (2005)	<i>Mangifera indica</i> L.	Identificación de genotipos de mango.	SSR	Los resultados demuestran la utilidad de los SSR en estudios de identificación, variabilidad, conservación y manejo de germoplasma y domesticación.
Mason <i>et al.</i> (2005)	<i>Chenopodium quinoa</i> Willdenow.	Aislamiento y caracterización de microsatélites	SSR	Desarrollaron 397 iniciadores SSR en quinua, de los cuales 208 fueron polimórficos, presentando entre 2 y 13 alelos por locus. Los mismos fueron utilizados en especies relacionadas donde 67% de estos amplificaron satisfactoriamente.
Maughan <i>et al.</i> (2004)	<i>Chenopodium quinoa</i> Willdenow.	Desarrollo de mapa de ligamiento.	AFLP, RAPD, SSR	Desarrollado el primer mapa de ligamiento genético para quinua empleando 230 AFLP, 19 SSR y 6 RFLP. Donde se obtuvo una extensión del mapa de 1,020 cM y contiene 35 grupos de ligamiento

2.19. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la Polimerasa o comúnmente llamado PCR, es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos, llamados primers o iniciadores, que inician la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables que no son mayores de 6 Kb en promedio (Valadez y Kahl 2000). Según la técnica, se usa uno o dos iniciadores, generalmente de entre

10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco. Además de los iniciadores, otro elemento clave es la ADN polimerasa, enzima que en condiciones determinadas y en presencia de los iniciadores, es capaz de producir millones de copias de determinados fragmentos del ADN. Estos fragmentos se separan posteriormente por peso molecular y conformación mediante técnicas electroforéticas, obteniéndose un patrón de bandas específico que nos permite diferenciar individuos (Rallo *et al.* 2002).

El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa.

El análisis PCR, desde su invención, por Saiki *et al.* (1985), ha sufrido modificaciones y en algunos casos ha generado incluso nuevas técnicas (Phillips *et al.* 1995). Rallo *et al.* (2002) mencionan que la gran mayoría de los marcadores moleculares del ADN, de uso actual, se basan en la técnica del PCR.

El PCR ha suministrado un conjunto de marcadores como por ejemplo; los RAPDs, SSR, AFLPs, regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCARs), amplificación selectiva de loci polimórficos (SAMPLs), amplificación azarosa de las huellas del ADN “ADN Fingerprinting” (RAF) y amplificación directa con ADN microsátélites (DAMD).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de marcadores moleculares del programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

3.2. Material Vegetal

Se trabajó con 16 accesiones (cada accesión constituye una muestra) cada una de ellas representada por 5 individuos, haciendo un total de 80. Las diferentes accesiones corresponden a una colección realizada por el personal del Programa de Cereales y Granos Nativos. A continuación se detallan las características de cada una de ellas en el siguiente cuadro.

Tabla 5. Datos pasaporte de las 16 accesiones de quinua.

Accesión	No. Pasaport	Dpto.	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud msnm	Color del grano
Puno 1	PEQPC-0850	Puno	Puno	Capachica	Barrio 3	3860	Rojo Blanco (mezcla)
Puno 2	PEQPC-0769	Puno	Collao	Ilave	Santa María	3847	Amarillo
Puno 3	PEQPC-0762	Puno	Collao	Ilave	Santa María	3890	Blanco
Puno 4	PEQPC-0835	Puno	Puno	Capachica	Barrio 3	3860	Blanco
Puno 5	PEQPC-0283	Puno	Puno	-	-	3827	Blanco
Puno 6	PEQPC-0298	Puno	Puno	-	-	3827	Amarillo
Cuzco 2	PEQPC-0444	Cuzco	Canchas	Marangani	Quisine	3937	Negro
Cuzco 3	PEQPC-0326	Cuzco	Calca	Calca	Rio Vilcanota	2928	Amarillo
Cuzco 4	PEQPC-0321	Cuzco	Canchas	Marangani	Mamuera	3725	Rojo

Tabla 5. Datos pasaporte de las 16 accesiones de quinua. (Continuación)

Accesión	No. Pasaport	Departam.	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud msnm	Color del grano
Cajamarca 1	PEQPC-0705	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Huacariz	2750	Marrón
Cajamarca 2	PEQPC-0704	Cajamarca	Cajamarca	Cajabanba	Tangalbamba	2950	Morado
Cajamarca 3	PEQPC-0703	Cajamarca	Cajamarca	Cajabanba	Chimibamba	2800	Blanco
Ancash 1	PEQPC-0425	Ancash	Carhuaz	Shilla	Catay	3336	Crema
Ancash 2	PEQPC-0489	Ancash	Recuay	Ticapampa	Ticapampa	3451	Rojizo
Arequipa 1	PEQPC-1900	Arequipa	Caylloma	Cabanacon de	Cabanaconde	2956	Amarillo
Arequipa 2	PEQPC-1905	Arequipa	La Unión	Cotahuasi	Cotahuasi	2800	Amarillo anaranjado

3.3. Instrumentos de colecta de datos

3.3.1. Enzimas

- Taq Polimerasa (Fermentas)
- RNAasa (Merck)
- dNTP's (Fermentas)

3.3.2. Reactivos

- Ácido Acético (Merck)
- Ácido Bórico (Applichem)
- Alcohol Isoamílico (Merck)
- Acrilamida/bisacrilamida (19:1) (Applichem)
- Agarosa (D1-LE)
- Azul de Bromofenol (sigma)
- Bromuro de Etidio (Merck)
- Bromuro de Hexadeciltrimetil amonio - CTAB (Calbiochem)
- Cloroformo (Merck)
- Cloruro de Sodio (NaCl) (Sigma)
- Repelente (RainX)
- γ - methacryloxypropyltrimethoxysilane (Sigma)

- Ácido Etilen Diamino Tetra Acético - EDTA (Appllichem)
- Etanol Absoluto (Merck)
- Formaldehido (Merck)
- Formamida (Merck)
- Hidróxido de Sodio (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- Mercaptoetanol (Merck)
- Nitrato de Plata (Merck)
- Persulfato de Amonio – APS (Sigma)
- TEMED (N.N.N'.N'. – Tetra-metil etilen di amida) (Sigma)
- Tris[hidroximetil] amino etano – Tris (Appllichem)
- Urea (Appllichem)
- Xilene cianol (Sigma)
- Marcador Molecular de 20pb (Fermentas)

3.3.3. Equipos

- Baño María
- Cámara de electroforesis horizontal (Bio-Rad)
- Cámara de electroforesis Vertical (Handmade)
- Captador de Imagen (Bio-Rad)
- Fuente de Poder de 300V y 500V (Consort)
- Juego de Pipetas 0.5-10µl; 2-20µl; 20-200µl (Bio-Rad)
- Juego de Pipetas 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl (Eppendorf)
- Centrífuga (Eppendorf)
- Sistema de Agua Ultra pura (Barnstead)
- Termociclador (Eppendorf)
- Molino de muestras secas (Retsch – Mill 200)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Biofótometro (Eppendorf)
- Hornilla con agitador magnético (Hridolph)
- Microondas (Panasonic)

3.3.4. Materiales de Vidrio y otros

- Espátulas, tijeras, pinzas
- Gradilla de tubos para centrífuga
- Guantes (Cranberry)
- Matraces y vasos de precipitado
- Placas de policarbonato para PCR de 96 muestras (Corning Incorporated)
- Placas de vidrio para electroforesis vertical
- Probetas de 100, 500 y 1000ml
- Puntas para pipetas (Axygen)

3.4. Metodología

3.4.1. Germinación de las semillas

Las semillas se sembraron en las macetas correspondientemente identificadas, con sustrato desinfectado (50% de compost y 50% de arena). El lugar de incubación se realizó en un tinglado con mallas antiáfidos.

3.4.2. Colección de material vegetal

Una vez germinadas las semillas y emergidas las plántulas, se colectaron 3 hojas a los 30 días después de la siembra. Se tuvo la precaución de colectar las hojas utilizando tijeras desinfectadas con alcohol de 70% por cada individuo. Una vez extraído las hojas correspondientes a cada planta se procedieron a secarlas colocándolas en una bolsa zipper con sílica gel por un tiempo pertinente.

3.4.3. Molienda de las muestras secas.

Se tomaron las muestras secas, aproximadamente 120mg y se colocaron en tubos eppendorf de 2.2ml conteniendo bolitas de acero estériles, que posteriormente fueron molidas utilizando un molino Retsch – Mill 200.

3.4.4. Extracción del ADN

La extracción de ADN de las 80 muestras de Quinoa provenientes de 16 accesiones se realizó mediante el método micro CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio), que es una modificación de del método elaborado por Doyle y Doyle (1987). El método consta de los siguientes pasos que son descritos a continuación:

- Se agregó 800 µl de buffer CTAB y se mezcló suavemente por inversión, hasta homogenizar la muestra.
- Luego se colocó en un Termomixer a 60 °C durante 30 minutos, mezclando suavemente cada 10 minutos.
- Se adicionó 800 µl de cloroformo-álcool isoamílico en la proporción de 24:1, mezclando por inversión y luego centrifugando a 14,000 rpm por 10 minutos.
- El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo, se le añadió 50 µl de CTAB al 10% (en 0.7 M de NaCl), se mezcló suavemente hasta obtener una muestra uniforme y luego se agregó 800 µl de cloroformo-álcool isoamílico 24:1 mezclando nuevamente y luego centrifugando a 14,000 rpm por 10 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante con mucho cuidado y se precipitó el ADN agregando 800 µl de etanol al 96%, mezclando por inversión hasta observar un precipitado blanquecino.
- Cuando el precipitado fue visible solo se eliminó el sobrenadante y quedó listo para el siguiente paso, en algunos casos no fue posible observar el precipitado de ADN, por lo que se centrifugó la muestra por cinco minutos y luego se eliminó el sobrenadante.
- Se agregó etanol al 70% y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó a 10,000 rpm por cinco minutos, se eliminó el sobrenadante y luego se repitió el lavado y centrifugado.
- Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar toda la noche dejando los tubitos abiertos e invertidos.
- Se re-suspendió el precipitado de ADN en 50 µl de TE y luego se le agregó 2 µl de ARNasa (10mg/ml) agitando suavemente e incubando en baño maría a 37° C por una hora.

Posteriormente se crearon bulks para cada una de las 16 accesiones con una concentración final de 10 ng/ml. Cada bulk estuvo conformado por 2 µl de cada muestra (5 muestras por accesión)

3.5. Evaluación de la calidad y cantidad de ADN

La determinación de la pureza y concentración del ADN se cuantificó mediante el uso del biofotómetro. La relación de la lectura de absorbancia de A260/A280 proporcionó un

estimado de pureza. Dicha relación en una muestra pura de ADN registraría un valor de entre 1.7 a 1.9. Un valor inferior a 1.7 indica que pueden existir proteínas y/u otros elementos absorbentes de luz ultravioleta en la muestra. En cambio un valor superior a 1.9 indica que las muestras de ADN purificadas pueden estar contaminadas con fenol o cloroformo. (Clark, 1996)

En cuanto a la calidad del ADN purificado, esta determinación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa para cada una de las accesiones obtenidas. Una muestra de ADN con buena calidad presenta una excelente resolución, es decir que no presenta manchas o barridos, de presentarlo indicaría una degradación mecánica o química del ADN.

La metodología para esta determinación se detalla a continuación:

- Para la preparación del gel de agarosa al 0.8% se disolvieron 0.8 gramos de agarosa en 100 ml de 1X buffer TBE.
- Se llevó a hervor en el horno microondas, se dejó enfriar hasta que alcanzara una temperatura de 60° C y luego se agregó 2 µl de Bromuro de etidio.
- Se vertió la agarosa líquida en un molde con peines y se esperó hasta que gelifique.
- Una vez gelificado fue puesto en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X.
- En cada pocillo del gel de agarosa se colocó 2 µl de muestra con 8 µl de tampón de carga previamente mezclados, y en un pocillo aparte un marcador de peso molecular de 100pb.
- Se aplicó corriente a 80 voltios por una hora, transcurrido este tiempo se visualizó y capturó la imagen del ADN en el Gel Doc 2000.

3.6. Dilución del ADN

Como condición de amplificación las muestras de ADN se llevarán a una concentración de 10ng/µl. Una vez determinada la cantidad total aproximada de ADN se procederá a diluir las muestras con TE a un volumen de 100µl. Esto se repetirá para cada una de las muestras obtenidas de cada accesión.

3.7. Elaboración de los Bulks

Una vez diluidas cada una de las muestras y llevaron a una concentración de 10ng/μl. en un volumen de 100μl. se procedió a formar los bulks de la siguiente manera: de una accesión se tomaron 2μl. de cada una de las 5 muestras que conforma dicha accesión y se mezclaran en tubos eppendorf. Este mismo procedimiento se realizara para cada una de las 16 accesiones presentes en la investigación.

La finalidad de este procedimiento es asegurar que la cantidad de ADN que proporciona cada muestra sea constante para la formación del bulk y que la concentración final del bulk mismo sea de 10ng/μl. a un volumen final de 10μl. De esta manera no se estará dando una mayor cantidad de ADN de una muestra en la formación del bulk.

3.8. Amplificación por PCR

En la amplificación de las muestras de ADN se empleó la técnica de SSR (Single Sequence Repeat) o microsatelites diseñados específicamente para *Chenopodium quinoa* Willd., estos fueron desarrollados por Mason *et al*, en el 2005.

Para la optimización del protocolo se probaron diferentes screenings con diferentes volúmenes de ADN, taq polimerasa, MgCl₂ y dNTPs, buffer y albúmina de bovino, variando uno de los componentes de la reacción y manteniendo los otros constantes. El procedimiento de amplificación de ADN emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.9. Iniciadores SSR utilizados

Se utilizaron 10 pares de iniciadores microsatélites, mapeados para *Chenopodium quinoa* Willd.: QaaT48, QaaT52, QaaT74, QaaT76, QaaT78, Qatg18, Qatg86, Qca06, Qca38 y Qca78, éstos se obtuvieron para caracterizar molecularmente variedades de quinua y fueron desarrollados por Mason *et al*, en el 2005.

3.10. Preparación del mix de amplificación

Se realizará una mezcla de amplificación o Mix de PCR que consta de 40 ng de muestra, 1X de buffer PCR, MgCl₂ 3mM, dNTPs 0.4mM, primer Forward 0.5uM, primer reverse

0.5uM, y Taq polimerasa 0.5 U y 2.4 µl de agua esterilizada para un volumen final de 10 µl para cada reacción.

3.11. Programa de PCR

El programa de amplificación utilizado constó de 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto (en cada ciclo la temperatura de acoplamiento disminuirá 1°C); 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto; 5 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto (en cada ciclo la temperatura de acoplamiento disminuirá 1°C) y 10 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45 °C por 30 segundos y 72 °C por 1 minuto.

A cada amplificación se añadió 6 µl de tampón de carga (95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05 de azul de bromo fenol y 0,05 de xilen cianol). La muestra se desnaturalizó a 94° C por 3 minutos y cargada en un gel vertical de poliacrilamida al 6% y 7 M de urea, catalizada con Temed y APS (persulfato de amonio) en 1X tri-borato EDTA (TBE). La pre-corrída se realizó a 500V por 30 minutos y la corrída con las muestras a 500V por 6 horas. Los geles fueron revelados empleando tinción con nitrato de plata.

3.12. Preparación de geles de poliacrilamida

La preparación de geles se realizó para cada producto amplificado por PCR. Los pasos para la elaboración de los geles de poliacrilamida se describen a continuación:

- Se emplearon dos vidrios, uno de estos posee una muesca y el otro es un cuadrado normal.
- Se lavaron los vidrios con abundante agua y luego se limpiaron con etanol 95% para eliminar toda la grasa posible.
- Al vidrio con muesca se extendió uniformemente 1 ml de sigmacote que es una solución repelente y se dejó secar por media hora.
- Sobre el otro vidrio se colocó 100 µl de solución adherente (1 ml de alcohol de 95%, 3 µl de silane y 3 µl de ácido acético), y se distribuyó en forma uniforme, dejándolo secar por media hora.
- Pasada la media hora se procedió a ensamblar los vidrios, en donde se colocaron separadores a los costados y parte inferior, se fijaron unos sujetadores en los

costados donde se pusieron los separadores y luego se terminaron de sellar con un 1% de agarosa líquida.

- Para la preparación del gel de poliacrilamida se emplearon 35 ml de acrilamida al 6% y se agregó 300 μ l de APS al 10% y 30 μ l de Temed, se mezcló y vertió esta solución entre los dos vidrios procurando no formar burbujas; finalmente se colocó el peine y se dejó polimerizar por una hora.
- Luego se limpiaron los vidrios para colocarlos en el aparato de electroforesis sacando el peine con mucho cuidado de no romper los pocillos y el separador de la parte inferior de los vidrios, una vez instalado se procedió a llenar los pocillos de la parte superior con buffer TBE al 1% y la parte inferior con TBE al 0.5%.
- Haciendo uso de una jeringa con aguja delgada, se limpió cada uno de los pocillos formados por el peine, esto se hace para eliminar la urea o pequeños trozos de gel que pueden quedar atrapados en los pocillos.
- Se pre corrió el gel a 500V por media hora.
- Las muestras amplificadas por PCR fueron desnaturalizadas agregando 6 μ l de tampón de carga y llevadas a 94° C por 4 minutos.
- Antes de colocar las muestras se volvió a limpiar cada uno de los pocillos para remover residuos de urea.
- Finalmente se corrió el gel de poliacrilamida a 500V por seis horas.

3.13. Revelado de geles de poliacrilamida

Finalizado la corrida electroforética se procedió a teñir los geles con el siguiente procedimiento que se describe a continuación:

- Se separaron los vidrios con mucho cuidado, evitando romper el gel, y se colocó el que tiene el gel de poliacrilamida adherido al vidrio en una bandeja que contenía medio litro de solución de fijación por unos 10 minutos.
- Transcurrido el tiempo se pasó el gel a otra bandeja con medio litro de solución de tinción por unos 10 minutos.
- En otra bandeja se colocó agua para enjuagar el gel y retirar los excesos de nitrato de plata presente, este proceso se llevo acabo por dos minutos.
- Luego se pasó el gel a una solución reveladora, en este paso la permanencia del gel en esta solución dependerá de que tan visible sean las bandas.

- Finalmente, una vez reveladas las bandas, se volvió a poner el gel en la solución de fijación por unos cinco minutos seguido de un enjuague con agua corriente por tres minutos y se deja secar a temperatura ambiente.

3.14. Evaluación de bandas

Se buscó polimorfismo según la presencia o ausencia de bandas en toda la población evaluada. El patrón de bandas obtenidas para cada iniciador fue registrado en una matriz binaria en donde las bandas presentes se les asignó el valor de uno y a las ausentes el valor de cero.

3.15. Análisis de datos

3.15.1. Índice de contenido polimórfico (PIC)

Si dos o más alelos coexisten en la población entonces se dice que el locus es polimórfico. Si uno de los alelos tiene una frecuencia muy alta 99% o más entonces ninguno de los otros alelos será observado en una muestra a menos que el tamaño de la muestra sea muy grande. Por ello un locus se define como polimórfico si la frecuencia de los alelos más comunes es menos del 99% (Li, 1997). Diversidad genética en un locus se define por:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$$

Donde:

H: Heterocigosis, como medida de la diversidad alélica.

k : Numero de alelos

P_i : Frecuencia del i -ésimo alelo.

Debido a que la población total analizada es un grupo de diferentes especies con diferentes números de ploidía y por lo tanto con diferentes frecuencias alélicas, el índice de diversidad de Nei fue usado como índice de contenido polimórfico - PIC (Polymorphic Index Content), el cual nos indica un estimado de la eficiencia del polimorfismo de cada marcador para cada locus microsatélite analizado (Smith *et al.* 1997). Ghislain *et al.* (1999) manifiestan que el índice contenido de polimorfismo (PIC) es la capacidad de cada iniciador (primer) para detectar loci polimórfico. El valor más alto de PIC indica el primer mas informativo.

3.15.2. Construcción de una matriz básica de datos (MBD)

Los datos obtenidos se presentaron en forma de una matriz básica de datos, esta fue una matriz donde las columnas representaron el carácter binario (presencia o ausencia de bandas) y las filas representan las unidades taxonómicas operativas (OTU).

3.15.3. Estimación de la similitud taxonómica

El parecido entre dos OTUs se cuantificó aplicando el coeficiente de similitud de Jaccard, con el uso de este coeficiente en operaciones matemáticas, se pudieron calcular las similitudes respecto a cada par de OTU en una MBD.

3.15.4. Coeficiente de asociación

El coeficiente Jaccard es la proporción de caracteres presentes que comparten, respecto al total de caracteres presentes en las dos OTUs, la cual solamente cuenta las bandas presentes, las ausentes dobles se consideran como datos ausentes. Un criterio valido fue considerar que dos muestras son más parecidas cuanto más una compartan.

$$J = \frac{a}{a + b + c}$$

Donde:

a: presencia de los dos alelos.

b: presencia del alelo en el genotipo uno y ausente en el genotipo dos.

c: presencia del alelo en el genotipo dos y ausente en el genotipo uno.

3.15.5. Matriz de similitud

Los resultados obtenidos de la aplicación del coeficiente de similitud para los pares posibles de OTUs ordenados en forma tabular constituyeron la matriz de similitud. Las OTUs ocuparon tanto las filas como las columnas, logrando compara cada OTU consigo misma y con las restantes OTUs. La matriz de similitud se analizó a través del algoritmo SAHN (Sequential, Agglomerative, Hierarchical, and Nested clustering) que estuvo incluido en el programa NTSYS (Numerical Taxonomy System) versión 2.1. El método aglomerativo jerárquico o SAHN construye la jerarquía tomando elementos individuales y fusionándolos progresivamente según la medida de similitud.

El algoritmo SAHN según Valls y Gomes (2007) considera:

- Cada elemento representante de un cluster que solamente contiene dicho elementos.
- Calcular las similitudes entre todos los clusters existentes dos a dos.
- Elegir los cluster cuya similitud sea mayor.
- Mezcla los clusters elegidos en el paso anterior según la medida de similitud.

Según como se calcule la similitud de enlace entre clusters se pueden distinguir los siguientes métodos: ligamientos simple, completo y promedio. Para nuestro caso en estudio se usó el método de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA) que utiliza las medias según el número de elementos que hay en cada conglomerado siendo el más utilizado en las taxonomía numérica debido a que no produce efectos de distorsión en el espacio y es combinatorio, el UPGMA calcula el promedio entre coeficientes de semejanza de dos grupos que tienen la posibilidad de unirse.

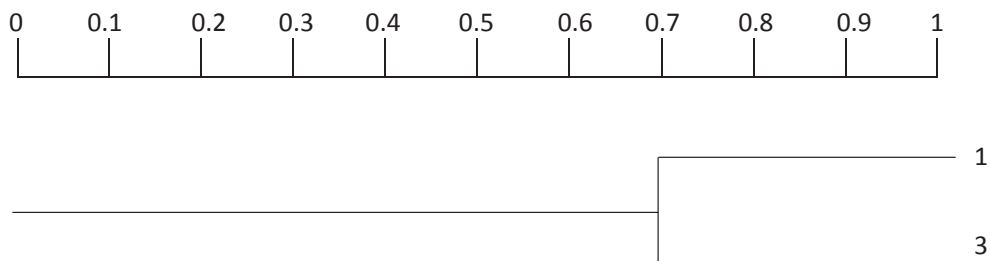
$$d(\{A, B\}, C) = \frac{d(A, C) + d(B, C)}{2}$$

Para un mejor entendimiento ejemplificaremos calculando los coeficientes de similitud entre 4 OTUs que se disponen en la llamada matriz de similitud. Para el ejemplo dado será:

OTU	1	2	3	4
1	1			
2	0.50	1		
3	0.69	0.43	1	
4	0.25	0.62	0.19	1

Puede observarse que las OTU más relacionadas son la 1 y 3 con 69% de similitud. Esto también puede representarse gráficamente de la siguiente manera:

Coefficiente de similitud



El próximo paso consiste en construir una nueva matriz en la que las OTUs 1 y 3 forman una sola OTU o cluster (1-3). A continuación pueden aplicarse tres métodos para la construcción de la nueva matriz:

- a. Ligamiento máximo.
- b. Ligamiento mínimo.
- c. Ligamiento promedio.

Si se sigue el método de ligamiento máximo, la matriz se construye teniendo en cuenta los valores de máxima similitud. En el método del ligamiento mínimo por el contrario, su matriz se construye teniendo en cuenta los valores de mínima similitud. El método de ligamiento promedio es el que se utiliza habitualmente ya que otorga la menor distorsión respecto a la matriz original de datos. En este caso la matriz se construye teniendo en cuenta el promedio entre las similitudes de las OTU involucradas. En el ejemplo dado anteriormente se representaría de la siguiente forma:

$$(1-3) 2 \rightarrow (0.5 + 0.43)/2 = 0.465$$

$$(1-3) 4 \rightarrow (0.25 + 0.19)/2 = 0.22$$

La matriz resultante tendrá una dimensión menos. En este caso será:

OTU	1-3	2	4
1-3	1		
2	0.465	1	
4	0.22	0.62	1

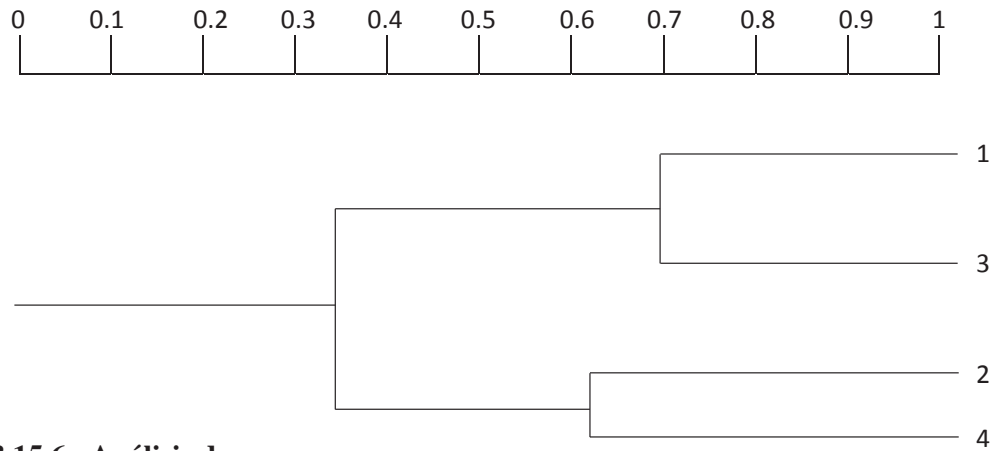
Siguiendo el mismo razonamiento, los grupos 1-3 y 2-4 se unirán en:

$$(1-3) 2 \text{ y } (1-3) 4 \rightarrow (0.465 + 0.22)/2 = 0.3425$$

La nueva matriz de similitud según el método de ligamiento promedio será:

OTU	1-3	2-4
1-3	1	
2-4	0.3425	1

Ahora puede construirse el dendrograma completo:



3.15.6. Análisis de grupos

La representación gráfica de la técnica de clustering jerárquico fue el dendrograma, la cual muestra la formación de grupos jerárquicos, así como la similitud entre los clusters. El dendrograma permitió conocer la composición de los clusters.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Análisis del índice de contenido polimórfico (PIC)

El análisis PIC en la presente tesis es poco concluyente pues la metodología usada se basa en el análisis de bulks de 16 accesiones de quinua provenientes de Banco de Germoplasma del Programa de Cereales.

La metodología del PIC se basa en evaluar la frecuencia de heterocigosidad, tomando en cuenta la presencia o ausencia de bandas presente en una población. Sin embargo, en la metodología empleada para la realización de la presente tesis, se inicia en que una porción de la población de cada accesión está contenida en un único bulk, por lo que la estimación del PIC conllevaría consigo un error estadístico, pues no nos permitirá distinguir si dentro de un bulk un individuo presenta un alelo y el otro no.

A pesar de que el valor del PIC es una herramienta importante para distinguir que marcador es más informativo, se puede realizar un comparativo sobre hechos experimentales previos con los resultados obtenidos en la presente tesis. Se tomó en cuenta la investigación de Mason *et al.* (2005) en el desarrollo y uso de microsatélites SSR en Quinua, en este sentido los valores de PIC obtenidos en la evaluación de bandas es más acertada no solo porque evalúa la presencia o ausencia de alelos de cada individuo en la población, sino también por la cantidad de accesiones evaluadas.

Tabla 6. Índice de contenido polimórfico (PIC), según Mason *et al.* 2005.

Nombre del Marcador SSR	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PIC	Alelos observados por Mason <i>et al.</i> 2005	Alelos observados en tesis
QAAT048	tcgctatagcttgaggagtgg	Aaagaacgagccaaaggttg	0.45	3	3
QAAT052	ttgtatctcgcttccatt	cgcaacaaactcgctacaaa	0.74	4	3
QAAT074	atggaacaccatccgataa	atgcctatctcatcctcca	0.85	9	7
QAAT076	gctcatgtgtataaaatgccaat	tctcgcttcccactaatttt	0.82	8	5
QAAT078	agcgaaggaaatttgaact	taacgatacgtccaaggaa	0.78	5	NA

Tabla 6. Índice de contenido polimórfico (PIC), según Mason *et al.* 2005. (Continuación)

Nombre del Marcador SSR	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	PIC	Alelos observados por Mason <i>et al.</i> 2005	Alelos observados en tesis
QATG018	ccaacaagacaataaggaacc	cgaggtgaaggagattcca	0.78	6	5
QATG086	aategcagcctaaactgagc	agttccattcgaccatatgataa	0.58	4	3
QCA006	gctctattaaggaaatgaggttaca	gccattcaattcagcaaagg	0.58	3	2
QCA038	cattcccaactgcatgaat	atgtgtgtgcgtgtgagtg	0.69	4	3
QCA048	acaatacatacataaccaatattcaa	tggaatgtcactatgattgga	0.40	3	4

NA: el marcador no amplifico.

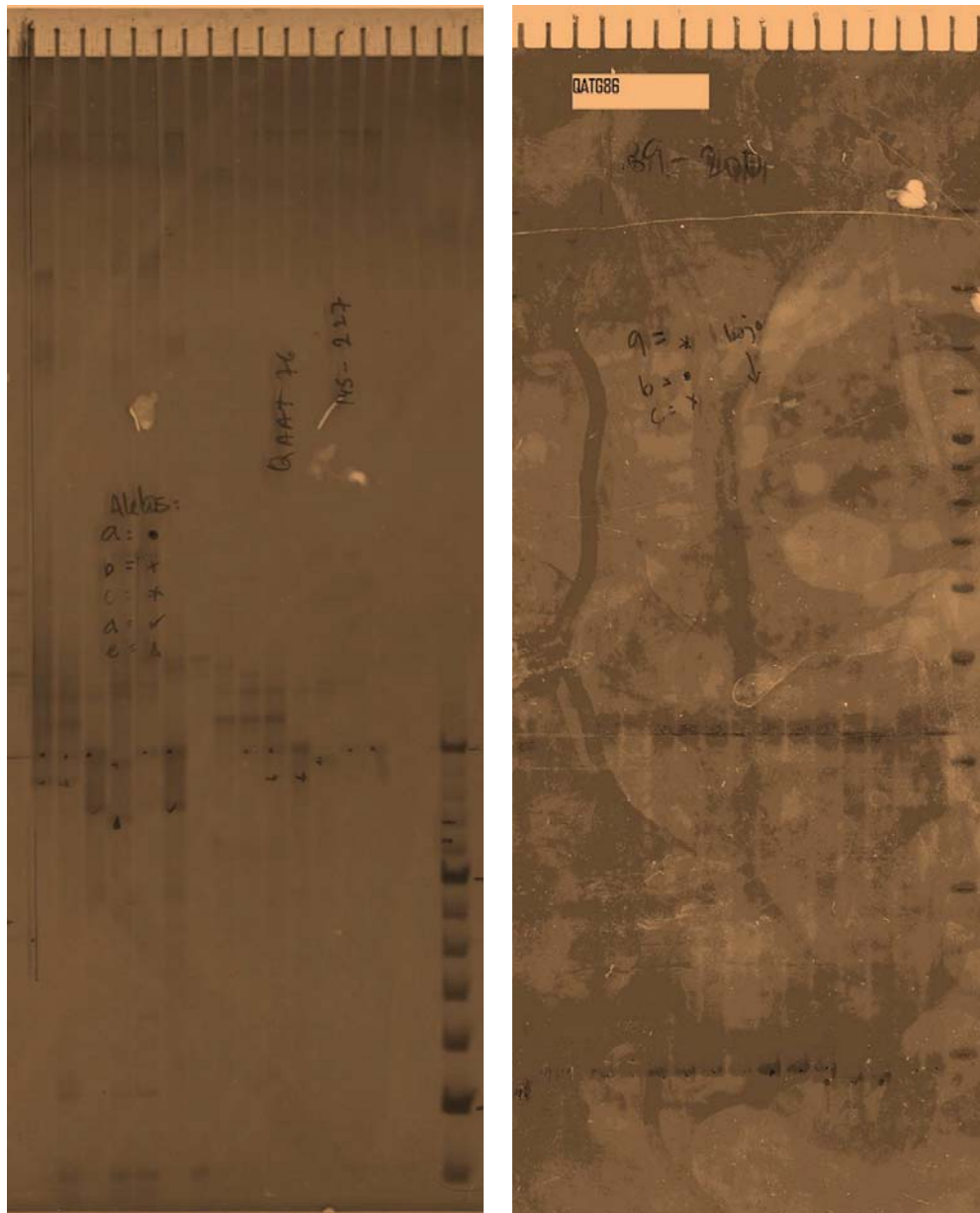


Figura 1. Patrones de bandas obtenidos por los primers QAAT76 y QATG86

Como se muestra en la tabla 6 los alelos observados por Mason et al. (2005) y los obtenidos experimentalmente son muy similares siendo los iniciadores QaaT74 y QaaT76, los que obtuvieron mayor cantidad de alelos observados y un PIC más elevado. Empíricamente el valor de PIC es de gran utilidad, dependiendo de los propósitos y recursos que se tenga para la investigación, esta herramienta nos permite seleccionar los iniciadores más adecuados.

Para dar valor a la comparación entre los alelos obtenidos por Mason et al. (2005) y los observados experimentalmente se realizó una prueba estadística chi-cuadrada, la cual consiste en identificar si hay una congruencia exacta o muy estrecha entre las frecuencias observadas y las que se esperan. Esta prueba nos dio un valor calculado de 3.1528, el cual es comparado con el valor tabular de X^2 que para un nivel de significancia de 0.001 con 8 grados de libertad representa un valor de 27.8767.

Dado que el valor calculado ($X^2 = 3.1528$) es menor que el valor tabular ($X^2 = 27.8767$) se acepta la hipótesis de que las frecuencias observadas y esperadas guardan una gran similitud entre ellas.

Adicionalmente Koskinen (2004), menciona que, cuando las posibilidades de hacer este tipo de estudios se ve limitada por los recursos, es muy importante saber poder seleccionar cuales primers pueden ser más eficientes que otros en la determinación de variabilidad genética de una población.

4.2. Análisis de agrupamiento

El análisis se realizó utilizando los datos obtenidos de 9 locus registrados para 16 accesiones de quinua. El primer paso para este análisis fue la construcción de la matriz de similitud, del cual se obtuvo un rango de similitud de 0.54 – 1.00 y una similitud media de 0.77. De los resultados obtenidos se puede tener una idea aproximada acerca de la diversidad genética de las muestras analizadas contenida en la información de los microsatélites.

De los 16 genotipos analizados se encontraron 34 bandas polimórficas mediante las corridas electroforéticas en geles de acrilamida.

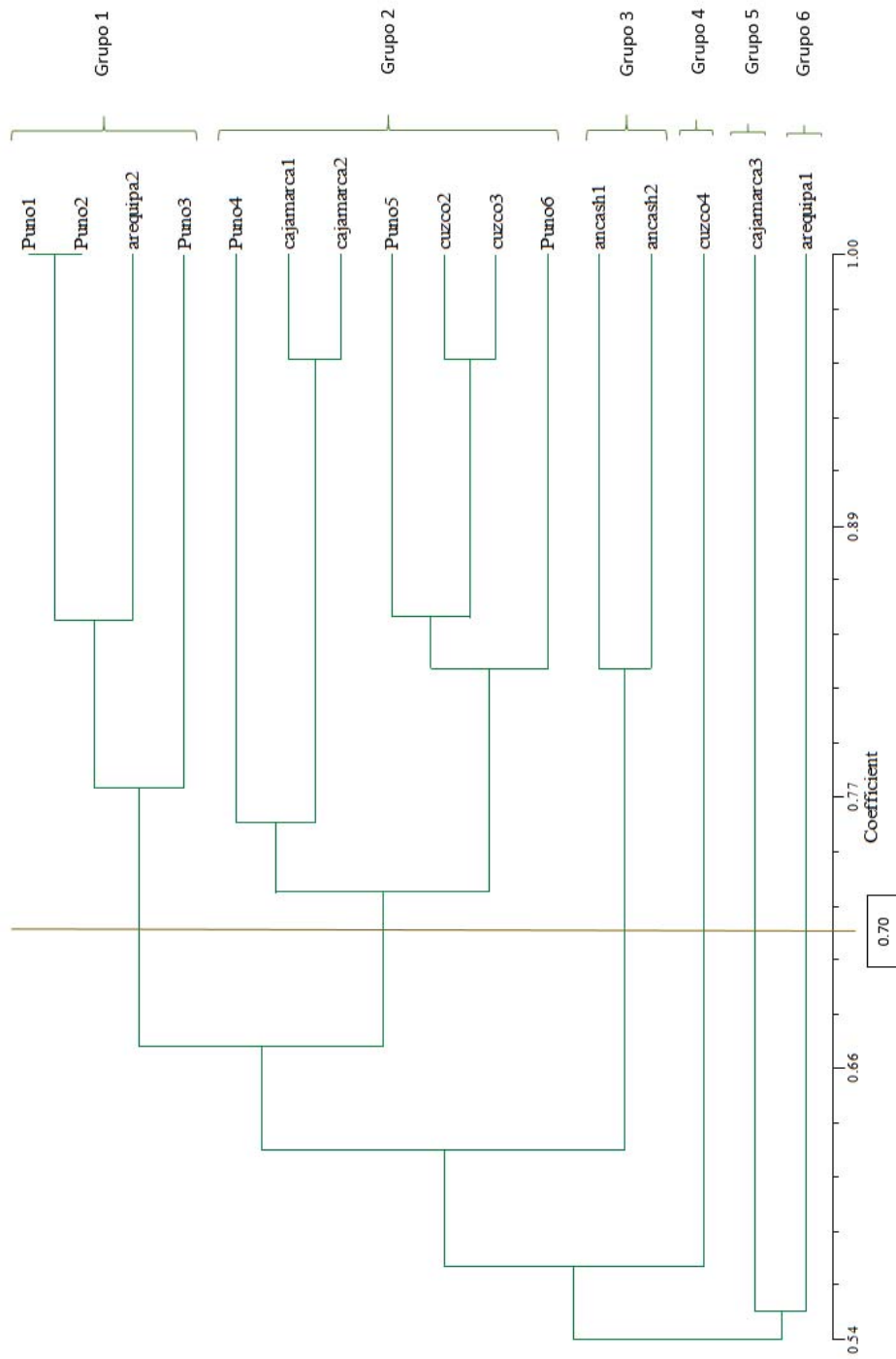


Figura 2. Dendrograma de las 16 accesiones de quinua analizadas, mostrando los grupos formados.

En la figura 1 se puede apreciar que a un coeficiente de 0.70 se forman seis grupos. El primer grupo lo conforman 4 accesiones (3 provenientes de Puno y 1 de Arequipa). En este grupo se puede apreciar que las accesiones Puno 1 y Puno 2 poseen un coeficiente de similitud de 1, lo que haría suponer que podrían pertenecer al mismo cultivar. Además al observar la matriz de similitud se puede apreciar que para los 9 locus evaluados con los respectivos SSRs, los alelos encontrados son exactamente los mismos para ambas accesiones. Aunque, podría afirmarse que se tratan de accesiones duplicadas, ya que pertenecen a la misma región, no podemos confirmar con total seguridad que ambas accesiones sean idénticas, porque para esto sería necesario emplear una gran cantidad de SSR que puedan explorar en su totalidad el genoma de estas accesiones y un secuenciamiento genético. Sin embargo, ambas accesiones al ser pertenecientes a la misma región, es posible creer que se haya efectuado algún mecanismo de intercambio de semillas, mecanismo muy común entre los agricultores de la zona, y generalmente se dan estos intercambios mediante trueques, ferias regionales y nacionales o por las administraciones de las aynokas.

En cuanto a las accesiones Arequipa 2 y Puno 3 del primer grupo, ambas presentaron menor similitud, probablemente por la existencia de un intercambio de semillas en el tiempo, migración o dispersión de semillas desde su centro de origen hacia otra región mediada por los agricultores.

El segundo grupo lo conforman 7 accesiones (3 de Puno, 2 de Cusco y 2 de Cajamarca). En este amplio grupo se puede observar que las accesiones de Cajamarca 1 y 2 se agrupan con un coeficiente de similitud de 0.94, así mismo, con las accesiones de Cusco 2 y 3. Lo que indica que están relacionadas tanto genéticamente como geográficamente en cierto grado.

El tercer grupo lo conforman 2 accesiones de Ancash con un coeficiente de similitud de 0.83, dato muy similar registrado por Tamayo (2010), quien trabajó también con las mismas accesiones de quinua empleadas en la presente tesis. Esta similitud las relaciona tanto genéticamente como geográficamente, a pesar de haber sido colectadas en diferentes provincias, Ancash 1, proveniente de la provincia de Carhuaz, distrito de Shilla y Ancash 2, proveniente de la provincia de Recuay, distrito de Ticapampa. Estas accesiones se agruparon por su origen de colecta, resultados que coinciden con otras investigaciones, según Bustinza (2004), quien empleó marcadores RAPDs pudo agrupar por origen accesiones de quinua del centro del Perú y sur de Bolivia, indicando además la existencia de niveles bajos de variación

genética en el centro del Perú. Además Christensen *et al.* (2007), realizó un análisis genético en 121 accesiones de quinua mediante marcadores SSRs, indicando una disminución en la variación genética en las regiones del norte y costa del Perú, estas reducción en la diversidad genética podrían ser debido al resultado de efectos asociativos con la dispersión del cultivo del centro de origen, pérdida de identidad cultural asociada al cultivo como desintegración de las aynokas o alternativamente como una respuesta a la adaptación selectiva de un cultivar.

El cuarto, quinto y sexto grupo los conforman las accesiones Cusco 4, Cajamarca 3 y Arequipa 1 respectivamente. Estos grupos son lo que presentan mayor disimilitud con los anteriores tres grupos mencionados. Estas accesiones pueden pertenecer a variedades silvestres en lugar de las variedades cultivadas. Según Mujica (2006), algunas especies silvestres como, *Chenopodium petiolare* Kunth., *Chenopodium quinoa* ssp. *Melanospermum* Hunz. o *Chenopodium hircinum* Schrad., se pueden confundir o cultivar a la par con las variedades comerciales. Estas variedades muestran una gran variedad fenotípica mostrando semillas que van desde el color oscuro hasta el blanco y/o diferentes niveles de saponina, que por lo general son elevados a comparación de las variedades cultivadas, lo que hace que la identificación morfológica sea difícil de conseguir; siendo los marcadores SSR ideales para realizar comparaciones entre estos tipos de variedades.

Según nuestro árbol dendrológico la accesión Cusco 4 se separa de todos los demás grupos relacionados con otras accesiones de la región Cusco, sin embargo, guardan una relación con un coeficiente de similitud de 0.56, lo que hace suponer que ésta se trate probablemente de una variedad silvestre como *Chenopodium petiolare* Kunth, la cual es observada comúnmente en los altiplanos andinos, entre los 3.830 hasta los 3.900 m.s.n.m. (Mujica, 2006).

En cuanto a las accesiones de Cajamarca 3 y Arequipa 1, estas 2 últimas accesiones se separan totalmente de todos los grupos anteriormente mencionados. Es muy difícil establecer relaciones que indique este comportamiento genético de disimilitud pero no se puede descartar la posibilidad de que sean especies silvestres, aunque se encuentren en regiones que no se consideran poseedoras de alta diversidad.

En cuanto a la comparación entre grupos formados en el árbol dendrológico los primeros tres grupos agrupan todas las accesiones de Puno, siendo las accesiones Puno 4 y 3 las que se separan más fuertemente de estos tres grupos, lo que indica que existe una fuerte relación entre estas accesiones por su ubicación geográfica, aunque guarden cierta variabilidad genética. Debemos mencionar que también que la región sur del Perú, como Puno, presenta la mayor diversidad y se representa centro de origen de este cultivo. Por su parte Gandarillas (1979) y Wilson (1988) sugirieron también que la sierra sur cercana al lago Titicaca representa el centro de diversidad basándose en los altos niveles de morfología y a la diversidad obtenida a través de estudios de isoenzimas; del mismo modo Castillo (2006) estudio la estructura genética de las diferentes poblaciones de quinua en tres regiones distintas del altiplano peruano-boliviano, en la cual dio a conocer que las poblaciones de quinua exhibieron polimorfismos generados a través de marcadores RAPDs, evidenciándose un amplia divergencia en los diferentes cultivares de quinua sembrados en los Andes. Adicionalmente, Ruas *et al.* (1999) caracterizó 19 accesiones de seis especies de quinua altiplánica con marcadores RAPDs concluyendo al igual que otros investigadores que existen altos niveles de polimorfismo entre todas las especies estudiadas y bajos niveles de variación intraespecífica dentro de las accesiones de quinua dependiendo del origen de cada accesión. Finalmente los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las accesiones de quinua provenientes de Cajamarca, Arequipa y Cusco presentaron la mayor disimilitud genética, amplia variabilidad y probablemente heterogeneidad, resultados muy similares a los obtenidos por Tamayo (2010), quien realizó una caracterización molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de quinua mediante la técnica de ISSRs.

Para la elaboración del árbol dendrológico la metodología de agrupamiento de muestras o bulk fue empleada no solo porque, al ser la quinua una especie autógama primordialmente puede asegurarse que los individuos colectados sean muy similares entre sí, por lo que reducir el número de muestras a amplificar en PCR y posterior revelado en geles de acrilamida, reducirían los costos que estos implica. Sino también porque esta metodología representa una herramienta útil y rentable para estudios a gran escala, incluyendo estudios de asociación como la presente tesis.

Según Motilal *et al.* (2009), la utilización de un número reducido de marcadores SSR y uso de bulks es una gran alternativa para solucionar el mal etiquetado o duplicación de especies vegetales en colecciones de germoplasma, esto representa un grave inconveniente debido a

que genera grandes costos innecesarios para su mantenimiento. Generalmente estas equivocaciones ocurren principalmente por la multiplicidad de introducciones y transferencias de las plantas desde el punto de recolección hasta el establecimiento en los primeros sitios de alberge, por subsiguientes recolecciones de injertos y material de propagación o por errores humanos durante la demarcación de la parcela y/o plantación también pueden haber llevado a la confusión de identidad entre y dentro de las accesiones.

La reducción del número de microsatélites requeridos para la detección de etiquetados incorrectos en colecciones de germoplasma, es una gran alternativa. Los microsatélites con muchos alelos por locus favorecerían a la identificación de una huella única para un gran número de accesiones con relativamente pocos locis. Kottapalli *et al.* en un estudio de 112 accesiones de maní con 67 marcadores de SSR encontró que un subconjunto de 12 marcadores fue suficiente para su identificación y obtuvo un patrón de agrupamiento o cluster similar. Así como Kottapalli, otros investigadores han reducido el número de marcadores SSR empleados para analizar una gran representación de accesiones obteniendo resultados similares en sus clusters, esta metodología ha sido aplicada exitosamente en sorgo, cacao y en frijol chino.

El método de bulks consiste en reducir el número total de muestras de una determinada accesión a una simple muestra común para ser analizadas. El propósito de este método es reducir la cantidad de error que se puede acumular en grandes proporciones de accesiones e individuos a identificar, inclusive genotipados con alto rendimiento pueden incurrir a este tipo de errores. Según Motilal *et al.* (2009), los errores de genotipado con microsatélites han sido reportados y varios enfoques y discusiones para reducir éstos han sido documentados, dando como conclusión que ambos métodos, reducción de SSR a emplear y los bulks, son recomendados para el correcto manejo de bancos de germoplasma y estudios de asociación.

Finalmente mediante el método de bulks, la agrupación de ADN ha resultado ser una herramienta útil para múltiples propósitos como estudios de asociación, la identificación de polimorfismo de nucleótido único, mapeo de loci de caracteres cuantitativos, identificación de marcadores de resistencia a las enfermedades y la determinación de las frecuencias de alelos de microsatélites. La agrupación de ADN también se aplicó en estudios de diversidad genética con RAPDs, AFLPs y en el cacao en la caracterización con microsatélites.

VI. CONCLUSIONES

1. Los marcadores SSR probaron ser una técnica eficiente para la asociación intergenotípica de las 16 accesiones de quinua. Pudiéndose asociar geográficamente muchas de estas accesiones.
2. La caracterización molecular permitió identificar la similitud entre las accesiones de quinua donde el más alto coeficiente fue de 1 para las accesiones de Puno 1 y Puno 2, esto demuestra que los marcadores SSR son selectivamente neutros, es decir que a pesar de presentar alelos similares, fenotípicamente pueden ser distintos debido a diversos factores ambientales, según se describe en la presente tesis (Ver anexos 7.4. Datos pasaporte de las 16 accesiones de quinua).
3. La generación del árbol dendrológico posibilitó la identificación de posibles especies silvestres dentro de las accesiones colectadas debido a su bajo coeficiente de similitud. Siendo las accesiones Cajamarca 3 y Arequipa 1, aquellas que obtuvieron el más bajo coeficiente de similitud y se agruparon separadamente de los otros grupos que guardan mayor relación.
4. La utilización de bulks resultó ser una metodología realmente útil en cuanto a los costos y tiempo empleado para la realización de la investigación. Así mismo el uso de esta metodología obtuvo resultados muy acordes a investigaciones descritas por otros autores.
5. El alto grado de autogamia en la quinua hace que su variabilidad genética sea menor con respecto de especies alogamas, básicamente la variabilidad genética que pueda manifestarse en esta especie se debe a varios factores inherentes a la morfología de la quinua misma, procesos meióticos, errores en la replicación del ADN y a factores ambientales.
6. Puede existir una alta probabilidad de encontrar especies silvestres dentro de los cultivos comerciales, esto puede deberse a que estas especies con respecto a las

cultivadas son morfológicamente similares o en algunos casos como la *Chenopodium quinoa* ssp. *Melanospermum* Hunz, los mismos agricultores la siembran conjuntamente. Para este tipo de investigación donde se desea establecer una relación de agrupamiento en relación al origen, las especies silvestres pueden generar bajos coeficientes de similitud. Sin embargo, para estudios de calidad dentro de un cultivar puede ser muy útil el uso de los marcadores SSR para establecer la homogeneidad de cultivo.

VII. RECOMENDACIONES

1. Completar el análisis molecular con el análisis morfológico para identificar, seleccionar y determinar relaciones en la variabilidad genética de la quinua.
2. Siendo los marcadores SSR muy versátiles para diferentes tipos de investigación es necesario elaborar un plan de las metodologías más útiles que nos permitan administrar adecuadamente los recursos que se dispongan.
3. Para análisis de asociaciones se debe hacer una selección previa de los marcadores SSR más informativos.
4. Para generar mayor impacto de la presente investigación, se debería ampliar las colecciones de muestra y establecer posibles relaciones de comercio según los análisis dendrológicos.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ali S., Azfer M. A., Bashamboo A., Mathur P. K., Malik P. K. *et al.* 1999. Characterization of species-specific repetitive DNA from a highly endangered wild animal *Rhinoceros unicornis* and assessment of genetic polymorphism by microsatellite associated sequence amplification (MASA), *Gene*, 228: 33-42.
2. Anon. 1996. Romanovs find closure in DNA, *Nat Genet*, 12: 339-340.
3. Ashley C.T. y Warren S.T. 1995. Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Annual Review Genetics* 29:703-728.
4. Azfer M. A., Bashamboo A., Ahmed N. & Ali S. 1999. Random amplification of polymorphic DNA with conserved sequences reveals genome-specific monomorphic amplicons: Implications in clad identification, *J Biosci*, 1: 35-41.
5. Bergstrom T. F., Engkvist H., Erlandsson R., Josefsson A., Mack S. J. *et al.* 1999. Tracing the origin of HLA-DRB1 alleles by microsatellite polymorphism, *Am J Hum Genet*, 64: 1709-1718.
6. Bhargava A., Rana T., Shukla S. & Ohri D. 2005. Seed protein electrophoresis of some cultivated and wild species of *Chenopodium*. *Biol. Plan.* 49(4), 505-511.
7. Bhargava A., Shukla S., Ohri D., 2006. *Chenopodium quinoa*—an Indian perspective. *Ind. Crops Prod.* 23, 73–87.
8. Bhargava A., Shukla, S., Ohri, D., 2003. Karyotypic studies on some cultivated and wild species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae). *Gen. Res. Crop. Evol.*
9. Bhargava, A., Shukla S. & Deepak O. 2007. Gynomonocy in *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae): variation in inflorescence and floral types in some accessions. *Biologia*, 62(1): 19-23.
10. Bustinza B. 2004. Diversidad de Marcadores RAPDs entre cultivares y variedades nativas de quinua. Universidad Nacional Federico Villareal. Lima. Libro de resúmenes Pág. 3.
11. Casini, P., 2002. Possibilita di introdurre la quinoa negli ambienti mediterranei. *Informatore Agrario* 27, 29–32.

12. Castillo C. 2006. Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa*) from Bolivia altiplano as revealed by RAPD. Universidad Mayor de San Andres Bolivia. Crop evolution. Pág. 1-22.
13. Cervera, M., Cabezas, J. & Martínez J. 2002. Análisis genético de la vid (en línea). Madrid, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.rubes.es/ace/ciencia56_1.htm
14. Chambers K. G. & MacAvoy E. S. 2000. Microsatellites: Consensus and controversy, *Comp Biochem Physiol (Part B)*, 126: 455-476.
15. Christensen D. B., Pratt C., Nelson P. T., Stevens M. R., Jellen E. N., Coleman C. E., Fairbanks D. J., Bonifacio A. & Maughan P. J. 2007. Review agronomy and horticulture. Young University, CIP. Departement of plant and animal. Crop sciences. Vol. 12:12-16.
16. Cieza de León, P. 1560. La crónica del Perú. I edición Vedia. Historiadores primitivos De las indias. Madrid Tomo II.1879.
17. Clark M. S. 1996. Plant molecular biology a laboratory manual. Springer.
18. Danielsen S., Jacobsen S. E., Echegaray, t. ames. 2000. Impact of downy mildew on the yield of quinoa. In: Scientist and farmer. Partners in research for the 21st Century. CIP Program Report 1999-2000, pp 397-401, International Potato Center (CIP), Lima.
19. Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N *et al.* 1996. A comprehensive map of the human genome based on 5264 microsatellites, *Nature (Lond)*, 380: 152-154.
20. Diwan N, McIntosh MS, Bauchan GR (1995) Methods of developing a core collection of annual Medicago species. *Theor Appl Genet* 90:775–761
21. Dokholyan N V, Buldyrev S V, Havlin S & Stanley H E. 2002. Distributions of dimeric tandem repeats in non-coding and coding DNA sequences, *J Theor Biol*, 202: 273-282.
22. Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
23. Fairbanks, D.J., K.W. Burgener, L.R. Robison, W.R. Andersen, and E. Ballon. 1990. Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins. *Plant Breeding*. 104:190 – 195.
24. Ferreira M. E., Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa-Cenargen Documento 20. Embrapa-Cenargen, Brasilia, Brasil.
25. FNA Editorial Committee. 2003. Flora of North America north of Mexico. Volume 4: Magnoliophyta: Caryophyllidae, part 1. Oxford University Press, New York.

26. Fuentes F. F., Maughan P.J. & Jellen E. R. 2009. Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Rev. geogr. Valpso. (En línea) N° 42 / 2009 ISSN 0718 – 9877. Pp. 20. – 33.
27. Fuentes F., Delatorre J., Tello V., Arenas J., Riquelme A., Oliva M., Lanino M., Carevic A. 2005. Diversidad genética intrapredial en germoplasma nativo de quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la Comunidad de Ancovinto, Altiplano de la I Región de Chile. En Anales del V SIRGEALC: 121. Montevideo, Uruguay.
28. Gallardo, M.; Prado, F. y Gonzales, J. 1996.Efecto del ClNa sobre el contenido de betalainas en *Chenopodium quinoa* Willd. En: XXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal. Actas. 20-21 marzo. Mendoza, Argentina. pp. 284-285.
29. Galwey, N.W., 1989. Exploited plants—Quinoa. Biologist 36 (5), 267–274.
30. Gandarillas, H. 1984. Obtención experimental de *Chenopodium quinoa* Willd. MACA, IBTA. La Paz, Bolivia. 21 p.
31. Gandarillas, H., 1979. Botanica. Quinoa y Kaniwa. Cultivos Andinos. In: Tapia, M.E. (Ed.), Serie Libros y Materiales Educativos, vol. 49. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Bogota, Columbia, pp. 20–44.
32. Gangopadhyay, G., Das, S., Mukherjee, K.K., 2002. Speciation in *Chenopodium* in West Bengal, India. Genet. Res. Crop Evol. 49, 503–510.
33. Ghislain, M., Zhang, D., Fajardo, D., Huaman, Z. y Hijmans, R. 1999. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. Genetic Resources and Crop evolution, 46 (6):547-555.
34. Giusti, K. 1970. El género *Chenopodium* en la Argentina. I. Numero de cromosomás. Darwiniana 16: 98-105.
35. Golstein D.B. y D.D. Pollok. 1994. Least-squares estimation of molecular distance – noise abatement in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Applied Genetics* 12:432-440.
36. Golstein D.B., L.A. Ruíz, L.L. Cavalli-Sforza y M.W. Felman. 1995. Genetics absolute dating based on microsatellites and the origin of modern human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6723-6727.
37. Gonzalez, J.A., Roldan, A., Gallardo, M., Escudero, T., Prado, F.E., 1989. Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: *Chenopodium quinoa* ('quinoa'). *Plant Foods Hum. Nutr.* 39 (4), 331–337.
38. Heiser, C. y D. Nelson. 1974. On the origen of the cultivated *Chenopods* (*Chenopodium*). *Genetics* 78: 503-505.

39. Ichuta, F. & E. Artiaga. 1986. Relación de géneros en la producción y en la organización social en comunidades de Apharuni, Totoruma, Yauricani-Ilave. Informe para optar el grado de Bachiller en Trabajo Social. Universidad Nacional del Altiplano, Puno. 86 p.
40. Jacobsen, S.-E. & A. Mujica. 2002. Genetic resources and breeding of the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Plant Genetic Resources Newsletter (130): 54-61.
41. Jacobsen, S.E. 2000. QUINOA – Research and development at the International Potato Center (CIP). Síntesis preparada para la Reunión Anual del Consejo Directivo del CONDESAN (noviembre del 2000). Reg 005/2000.
42. Jacobsen, S.E., 1998. Developmental stability of quinoa under European conditions. Ind. Crops Prod. 7, 169–174.
43. Jacobsen, S.E., 2003. The worldwide potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Food Rev. Int. 19 (1–2), 167–177.
44. Jimenez, J. 2006. Biodiversidad tradicional propagada cultivo cultivado peruano Highland. Tesis para optar el grado de PhD. Facultad de biología y protección ambiental, Universidad de Silesia Polonia.
45. Karp, A., Isaac, P. y Ingram, D. 1998. Molecular tools for screening biodiversity: Plants and animals. 1era Edición. Chapman & Hall. USA. 498 pp.
46. Kolano, B., Pando, L.G., Maluszynska, J., 2001. Molecular cytogenetic studies in *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus caudatus*. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 70, 85–90.
47. Kole, C. 2007. Genome mapping and molecular breeding in plants: Pulses, sugar and tuber crops. Vol 3. Springer. USA. 306 pp
48. Koskinen, M.T., Hirnoven, H., Landry P.A., Primmer C. 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites used in genetic population studies: an empirical perspective. Hereditas 141:61-67.
49. Kottapalli KR, Burow MD, Burow G, Burke J, Puppala N. 2007. Molecular characterization of the U.S. peanut mini core collection using microsatellite markers. Crop Sci 47:1718–1727 doi:10.2135/cropsci2006.06.0407
50. Lagercrantz, U., H. Ellegren, and L. Andersson. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates Nucleic Acids Res. 21:1111–1115.

51. Lashermes P, Combes MC, Prakash NS, Trouslot P, Lorieux M, Charrier A (2001) Genetic linkage map of *Coffea canephora*: effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. *Genome* 44:589–596.
52. Lescano, J.L. 1994. *Genética y mejoramiento de cultivos andinos*. Programa Interinstitucional de Waru waru, Puno, Perú. 459 p.
53. Li Wen H. 1997. *Molecular Evolution*. Chapter 2: Dynamics of genes in population. Sinauer associates. INC, Publishers.
54. Litt M & Luty J A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*, 44:397-401.
55. Lowe A., Harris S., Ashton P. 2004. *Ecological genetics; design, analysis, and application*. Blackwell Science. Victoria, Australia. 326 p.
56. Malik, C., Wadhvani, C. y Kaur, B. 2009. *Crop Breeding and biotechnology* . 1era Edición. Aavishkar. India. 288 pp.
57. Mason S. L., Stevens M. R., Jellen E. N., Bonifacio A., Fairbanks D. J., Coleman C. E., McCarty R. R., Rasmussen A. G., and Maughan P. J. 2005. Development and Use of Microsatellite Markers for Germplasm Characterization in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). 45:1618–1630
58. Maughan, P.J., A. Bonifacio, E.N. Jellen, M.R. Stevens, C.E. Coleman, M. Ricks, S.L. Mason, D.E. Jarvis, B.W. Gardunia B.W., and D.J. Fairbanks. 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:1188–1195.
59. McElhinny E., E. Peralta, N. Mazon, D.L. Danial, G. Thiele, P. Lindhout. 2007. Aspects of participatory plant breeding for quinoa improvement in marginal areas of Ecuador. *Euphytica* 153:373-384.
60. McGregor CE, van Treuren R, Hoekstra R, van Hintum ThJL (2002) Analysis of the wild potato germplasm of the series *Acaulia* with AFLPs: implications for ex situ conservation. *Theor Appl Genet* 104:146–156
61. Morgante, M y Olivieri, A. M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3, 175 – 182.
62. Motilal L. A., Zhang D., Umaharan P., Mischke S., Boccara M. & Pinney S. 2009. Increasing Accuracy and Throughput in Large-Scale Microsatellite Fingerprinting of Cacao Field Germplasm Collections. *Tropical Plant Biol.* (2009) 2:23–37. DOI 10.1007/s12042-008-9016-z

63. Mujica, A. 1988. Parámetros genéticos e índices de selección en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Centro de Genética. Montecillos, México. 122p.
64. Mujica, A. y Jacobsen, S. 2006. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 449-457.
65. Mujica, A., 1994. Andean grains and legumes. In: Hernando Bermujo, J.E., Leon, J. (Eds.), *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*, vol. 26. FAO, Rome, Italy, pp. 131–148.
66. Mujica, A., Jacobsen, S.E., Ezquierdo, J., Marathe, J.P., 2001a. Resultados de la Prueba Americana y Europeas de la Quinua. FAO, UNA-Puno, CIP, p. 51.
67. Mujica, A., R. Ortiz & S.-E. Jacobsen. 2000. Uso potencial de *Chenopodium carnosolum* Moq. en zonas áridas. pp.16-21 En: Resúmenes II Congreso Internacional de Zonas Áridas, Iquique.
68. Ogungbenle, H.N., 2003. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54 (2), 153–158.
69. Ortiz R., Ruiz-Tapia E.N., Mujica A. 1998. Sampling strategy for a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Theor Appl Genet* 96:475-483.
70. Ortiz R., Madsen S., Ruiz-Tapia E.N., Jacobsen S-E, Mujica A., Christiansen J.L., Stolen O.. 1999. Validating a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Genet Res Crop Evol* 46:285-290.
71. Oshodi, A.A., Ogungbenle, H.N., Oladimeji, M.O., 1999. Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamum radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) flours. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50 (5), 325–331.
72. Otha T. y M. Kimura. 1973. The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. *Genetic Research* 22: 201-204.
73. Patiño, V. 1964. Plantas cultivadas y animales domésticos en América equinoccial. Tomo II. Plantas alimenticias. Imprenta Departamental. Cali. Colombia.
74. Patterson, A.H., S.D. Tanksley, and M.E. Sorrells. 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv. Agron.* 46:39–90.
75. Perez-agis E., E. DE LA CRUZ TORRES, C. MAPES, J.M. ANDRADE GARCIA. 2005. Las comunidades campesinas: un importante reservorio de recursos para la

76. Phillips W., Rodríguez H., Fritz P. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
77. Popenoe, H., King, S.R., Leon, J., Kalinowski, L.S., 1989. Lost Crops of the Incas. In: Vietmeyer, N.D. (Ed.), Little Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. National Academy Press, Washington.
78. Powell W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. In: Moss, J. P. ed. Biotechnology and crop improvement in Asia. Patancheru, India. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. p. 297-322.
79. Pratt, C. 2000. AFLP analysis of genetic diversity in the USDA. *Chenopodium quinoa* collection. M. S. Thesis. Brigham Young University, Provo, UT, USA.
80. Provan J., N. Soranzo, N.J. Wilson, D.B. Gostein y W. Powell. 1999. A low mutation rate for chloroplast microsatellites. *Genetics* 153:943-947.
81. Rajeev, K., Andreas G., y Mark E. S. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Review. El sevier. TRENDS in biotechnology. Vol. 23 N° 1. 48 – 55.
82. Rallo P., Belaj A., De la Rosa R., Trujillo I. 2002. Marcadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm
83. Reddy K, Nagaraju J & Abraham E G. 1999. Genetic characterisation of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR, *Heredity*, 83:681-687.
84. Rieseberg L.H. y D.E. Soltis. 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evol. Trends Plants* 5: 65-84.
85. Risi, J., Galwey, N.W., 1984. The *Chenopodium* grains of the andes: inca crops for modern agriculture. *Adv. Appl. Biol.* 10, 145–216.
86. Roca A L, Georgiadis N, Pecon-Slattery J & O'Brien S J. 2001. Genetic evidence for two species of elephant in Africa, *Science*, 293: 1473-1477.
87. Rodriguez, R. 1978. Determinación del porcentaje de autopolinización y cruzamientos naturales en tres variedades comerciales de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de Ing. Agro. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 86 p.

88. Ruales, J., Grijalva, Y., Jaramillo, P.L., Nair, B.M., 2002. The nutritional quality of an infant food from quinoa and its effect on the plasma level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in undernourished children. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53 (2), 143–154.
89. Ruas, P.M., A. Bonifacio, C.F. Ruas, D. Fairbanks, and W.R. Anderson. 1999. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L. by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). *Euphytica* 105:25–32.
90. Rubinsztein C D, Amos W, Leggo J, Goodburn S, Jain S *et al.* 1995. Microsatellite evolution-evidence for directionality and variation in rate between species, *Nat Genet* , 10: 337-343.
91. Saiki R. K., Scharf S.; Faloona F.; Mullis K.B.; Horn G.T.; Erlich H.A.; Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site análisis for diagnosis of sikle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
92. Salimath S.; De Oliveira A.; Godwin I.; Bennetzen J. 1996. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38:757-763.
93. Samanez, R. 1977. Biología floral en dos líneas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis Ing. Agro. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 112 p.
94. Schlick, G., Bubenheim, D.L., 1996. Quinoa—Candidate Crop for NASA’s Controlled Ecological Life Support Systems. In: Janick, J. (Ed.), *Progress in New Crops*. ASHS Press, Arlington, VA.
95. Shawn, A. C. 2005. Assessment of *Chenopodium quinoa* Willd. Genetic diversity in the USDA and CIP-FAO collections using SSR’s and SNP’s. 85pp.
96. Silvestri, V., Gil, F., 2000. Alogamia en quinua. Tasa en Mendoza (Argentina). *Revista de la facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo* 32 (1), 71–76.
97. Simmonds, N.W., 1971. The breeding system of *Chenopodium quinoa*. I. Male sterility. *Heredity* 27, 73–82.
98. Smith, J. S. C, Chin, E. C. L, Shu, LI., Smith, O. S., Wall, S. J., Señor, M. L., Mitchell, S. E., Kresovich, S. & Ziegler, J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLP and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics.* 95:163-173.
99. Stallings R L. 1995. Conservation and evolution of (CT)_n/(GA)_n microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes, *Genomics* , 25: 107-113.

100. Stevens, M. 2003. Development and use of microsatellite and AFLP markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science*. 45.4: 1618 – 1630.
101. Tamayo H. L. 2010. Caracterización molecular Inter e Intra genotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (quinua) mediante la técnica de ISSR. Tesis para obtener el grado de Magister Scientiae. Escuela de post grado, Especialidad de Mejoramiento Genético de Plantas. UNALM. 76 p.
102. Tanksley SD, McCouch SR (1997) Seed bands and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277:1063– 1066
103. Tanksley S. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.
104. Tapia M.E. 2000. Mountain agrobiodiversity in Peru. Seed fairs, seed banks, and mountain-to-mountain exchange. *Mountain Res Dev* 20:220-225.
105. Tapia, M. 1982. El medio. Los cultivos y los sistemas agrícolas en los Andes del sur del Perú. Proyecto PISCA IICA/CIID. 79 pp.
106. Tapia, M., Gandarilla, H., Alandia, S., Cardozo, A. y Mujica, A. 1979. La quinua y la kañiwa: cultivos andinos. CIID. Colombia. 228 pp.
107. Trivedi S. 2003. Microsatellites (SSRs): Puzzles within puzzle. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol 3, pp 331-347.
108. Uhle, Max 1919 La arqueología de Arica y Tacna." *Boletín de la Sociedad Ecuatoriana de Estudios Históricos Americanos*", vol. III, nos. 7/8:1-48. Quito.
109. Valadez E. y Kahl G. 2000. Huellas en ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Ed. Mundo prensa. México. 147p.
110. Valdivia Ascona, M.C. 1978. Biología floral de dos líneas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). Universidad Nacional Técnica del Altiplano, Puno (Perú). Programa Académico de Ingeniería Agronómica. Puno (Perú). 71 p.
111. Valls A., Gómez C. 2007. El algoritmo de microagregación para anonimización de las secuencias de datos categóricos. Departamento de matemáticas. Catalonia, España. ITAKA. Pág. 1-8.
112. Varshney R. K., Graner A. & Sorrells M. E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology* Vol.23 No.1. review 48-55. doi:10.1016/j.tibtech.2004.11.005

113. Vendramin G.G., L. Lelli, P. Rossi y M. Morgante. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5:595-598.
114. Viñas, Oscar. 2000. Exportación de quinua orgánica (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la República de Bolivia. La Paz, Bolivia. 14 p.
115. Ward, S.M., 2000. Response to selection for reduced grain saponin content in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Field Crops Res.* 68 (2), 157–163.
116. Ward, S.M., Johnson, D.L., 1993. Cytoplasmic male sterility in quinoa. *Euphytica* 66, 217–223.
117. Weber, L. y Wong, C. 1993. Mutation of the human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.
118. Wiessenbach, J. y Dib, G. 1992. A second-generation link-age map of the human genome. *Nature* 359: 794-801.
119. Wilson, H. and Heiser, C.B. Jr. 1979. The origin and evolutionary relationship of huauzontle (*Chenopodium nuttalliae*) domesticated chenopod of Mexico. *Am. J. Bot.* 66: 198-206.
120. Wilson, H.D. 1976. A biosystematic study of the Chenopods and related species. Ph.D. Thesis. Indiana University. USA.
121. Wilson, H.D. 1980. Artificial hybridization among species of *Chenopodium* sect. *Chenopodium*. *Systematic Botany* 5 (3): 253-263.
122. Wilson, H.D. 1988. Quinoa biosystematics. I: Domesticated populations. *Econ. Bot.* 42:461–477.
123. Wilson, H.D. 1990. Quinoa and relatives (*Chenopodium* sect. *Chenopodium* subsect. *Cellulata*). *Econ. Bot.* 44, 92 – 110.

IX. ANEXOS.

7.1. Reactivos para la extracción de ADN.

Tampon de extraccion CTAB 2X

Stock	Final	100 ml
CTAB	2%	2g
NaCl 5M	1.4M	28 ml
EDTA 0.5M, pH 8	20 mM	4 ml
Tris HCl 1M, pH 8	100 mM	10 ml
PVP	1%	1 g
H ₂ O destilada		c.s.p. 100 ml

Tampon de extraccion CTAB al 10%

Stock	Final	100 ml
CTAB	10%	10 g
NaCl	0.7 M	4.09 g
EDTA 0.5M, pH 8	20 mM	4 ml
Tris HCl 1M, pH 8	100 mM	10 ml
H ₂ O destilada		c.s.p. 100 ml

Tampón T10E1

Stock	Final	1000 ml
10 mM	10 ml	10 g
Tris HCl 1M, pH 8	1 mM	2 ml
H ₂ O destilada		c.s.p. 1000 ml

ARNasa 10 mg/ml

Stock	Final	5 ml
ARNasa	10 mg/ml	50 mg
NaCl 5M	0.7 M	4.09 g
EDTA 0.5M, pH 8	15 mM	15 µl
Tris HCl 1M, pH 8	10 mM	50 µl
H ₂ O destilada		c.s.p. 5 ml

7.2. Reactivos para la preparación de geles de Agarosa

Preparación de geles de azarosa 1 %

Stock	Final	100ml
Agarosa	1%	1 g
TBE 1X	1X	100ml
EtBr 10 mg/ml	0.1 µg/ml	1 µl

7.3. Reactivos para la preparación de geles de Poliacrilamida

Tampón TBE 10X

Stock	Final	100 ml
Tris-Base	90 mM	108 g
Ácido Borico	5.5%	55 g
EDTA 0.5M, pH 8	20 mM	40 ml
H ₂ O destilada MilliQ		c.s.p. 100 ml

Solución stock de poliacrilamida al 40%

Stock	1000 ml
Acrilamida	380 gr
Bisacrilamida	20 gr
H ₂ O destilada MilliQ	c.s.p. 1000 ml

Solución Acrilamida al 6%, Urea/M

Stock	Final	100 ml
Stock de poliacrilamida al 40%	6%	150 ml
UREA	7 M (42%)	420 g
TBE 10X	1X	100 ml
H ₂ O destilada MilliQ		c.s.p. 1000 ml

Tampón de carga para geles de poliacrilamida

Stock	Final	10 ml
Dye		100 µl
EDTA 0.2 M	0.01 M	500 µl
Formamida		9.6 ml

7.4. Datos pasaporte de las 16 accesiones de quinua.

Accesión	Nº. Pasaporte	Departam.	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud msnm	Color del grano	Latitud	Longitud
Puno 1	PEQPC-0850	Puno	Puno	Capachica	Barrio 3	3860	Rojo Blanco (mezcla)	15° 38' 23,20" S	69° 50' 02,24" O
Puno 2	PEQPC-0769	Puno	Collao	Ilave	Santa María	3847	Amarillo	16° 04' 46,13" S	69° 37' 31,08" O
Puno 3	PEQPC-0762	Puno	Collao	Ilave	Santa María	3890	Blanco	16° 05' 42,96" S	69° 39' 28,75" O
Puno 4	PEQPC-0835	Puno	Puno	Capachica	Barrio 3	3860	Blanco	15° 38' 23,20" S	69° 50' 02,24" O
Puno 5	PEQPC-0283	Puno	Puno	-	-	3827	Blanco	16° 03' 18,08" S	69° 32' 30,32" O
Puno 6	PEQPC-0298	Puno	Puno	-	-	3827	Amarillo	16° 03' 18,08" S	69° 32' 30,32" O
Cuzco 2	PEQPC-0444	Cuzco	Canchas	Marangani	Quisine	3937	Negro	14° 22' 39,89" S	71° 11' 16,20" O
Cuzco 3	PEQPC-0326	Cuzco	Calca	Calca	Rio Vilcanota	2928	Amarillo	13° 19' 45,35" S	71° 56' 57,12" O
Cuzco 4	PEQPC-0321	Cuzco	Canchas	Marangani	Mamuera	3725	Rojo	14° 21' 36,84" S	71° 09' 54,06" O
Cajamarca 1	PEQPC-0705	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Huacariz	2750	Marrón	7° 11' 27,08" S	78° 29' 46,15" O
Cajamarca 2	PEQPC-0704	Cajamarca	Cajamarca	Cajabamba	Tangalbamba	2950	Morado	7° 37' 27,86" S	78° 01' 42,91" O
Cajamarca 3	PEQPC-0703	Cajamarca	Cajamarca	Cajabamba	Chimibamba	2800	Blanco	7° 38' 17,39" S	78° 08' 53,06" O
Ancash 1	PEQPC-0425	Ancash	Carhuaz	Shilla	Catay	3336	Crema	9° 13' 22,94" S	77° 36' 41,21" O
Ancash 2	PEQPC-0489	Ancash	Recuay	Ticapampa	Ticapampa	3451	Rojizo	9° 45' 40,14" S	77° 26' 34,36" O
Arequipa 1	PEQPC-1900	Arequipa	Caylloma	Cabanaconde	Cabanaconde	2956	Amarillo	15° 36' 25,33" S	72° 00' 58,32" O
Arequipa 2	PEQPC-1905	Arequipa	La Unión	Cotahuasi	Cotahuasi	2800	Amarillo anaranjado	15° 12' 58,28" S	72° 52' 49,58" O

7.5. Descripción de los microsatélites en quinua

Nombre del Marcador SSR	Motif primario	Complejidad	Tipo	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Tamaño esperado del producto del PCR	Numero de alelos observados	PIC
QAAT048	(ATT)12 (AAT)4TAT(AAT)3A	simple	perfect	tcgctatagcttgaggagtg	Aaagaacgagcccaagggtg	157	3	0.45
QAAT052	GT(AAT)7AAC	simple	imperfect	ttgtatctggcttccatt	cgcaacaacacgctacaaa	158	4	0.74
QAAT074	(ATT)14	simple	perfect	atggaacacccatccgataa	atgccatctctctctcca	186	9	0.85
QAAT076	(ATT)30	simple	perfect	gcttcatgtgtataaaatgccaat	tctggcttcccactaatttt	197	8	0.82
QAAT078	(AAT)22	simple	perfect	agcgaaaggaaattggaact	taacgatacgcctccaaggaa	196	5	0.78
QATG018	(ATC)12	simple	perfect	ccaaacaagaacaataaggaaacc	cgaggftgaaggagatcca	186	6	0.78
QATG086	(CAT)9 (CA)15CG(CA)4CG(CA)8	simple	perfect	aatcgcagcctaactgagc	agftccatttcgacccatgataa	186	4	0.58
QCA006	(CT)10(CA)13 CA)8	simple compound	imperfect	gctctattaaggaaatgaggttaca	gccattcaattcagcaagg	125	3	0.58
QCA038	(CT)10(CA)13	simple	perfect	catttccaaacgcatgaat	atgtgtgtgcgfgtgagtg	197	4	0.69
QCA048	(CA)13	simple	perfect	acaatacatacaataccaatattcaa	tggaaatgctactatgatggga	235	3	0.40

7.6. Número total de alelos presentes para los 9 locus analizados y número total de alelos por zona de colecta.

Primer	Total de alelos	Número de alelos																	
		Puno 1	Puno 2	Puno 3	Puno 4	Puno 5	Puno 6	Cuzco 2	Cuzco 3	Cuzco 4	Cajamarca 1	Cajamarca 2	Cajamarca 3	Ancash 1	Ancash 2	Arequipa 1	Arequipa 2		
QaaT74	7	3	3	4	3	3	3	3	3	3	4	3	3	3	2	3	3	3	
QaaT76	5	2	2	2	2	2	0	0	2	2	2	1	1	1	1	0	0	0	
QaaT52	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	
Qatg19	5	2	2	3	2	2	2	2	3	3	3	2	4	4	2	2	0	0	
Qatg86	3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	
Qca38	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Qca06	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	
QaaT48	3	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	
Qca48	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Total	35	14	14	15	14	12	14	13	12	14	15	12	17	15	12	13	9		
Promedio	3.889	1.556	1.556	1.667	1.556	1.333	1.556	1.444	1.333	1.556	1.667	1.333	1.889	1.667	1.333	1.444	1		