



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POST GRADO**

DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DE DISTANCIAS
GENÉTICAS EN VARIETADES NATIVAS Y PARIENTES SILVESTRES DE
QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) MEDIANTE EL MARCADOR
MOLECULAR AFLP.**

TESIS

PRESENTADA POR:

ERNESTO JAVIER CHURA YUPANQUI

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORIS SCIENTIAE EN:
CIENCIA TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**



PUNO - PERÚ

2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO • PUNO	
BIBLIOTECA CENTRAL AREA DE TESIS	
Fecha Ingreso:	16 OCT 2014
Nº	100710

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
ESCUELA DE POST GRADO
DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y DETERMINACIÓN DE DISTANCIAS
GENÉTICAS EN VARIETADES NATIVAS Y PARIENTES SILVESTRES DE
QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) MEDIANTE EL MARCADOR
MOLECULAR AFLP.

PRESENTADA POR:

ERNESTO JAVIER CHURA YUPANQUI

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORIS SCIENTIAE EN:
CIENCIA, TECNOLOGIA Y MEDIO AMBIENTE

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO

PRESIDENTE

:


Dr. Eduardo Flores Condori

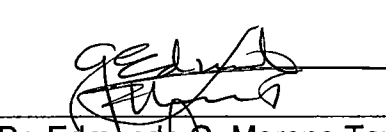
PRIMER MIEMBRO

:


Dr. Sabino Atencio Limachi

SEGUNDO MIEMBRO

:


Dr. Edmundo G. Moreno Terrazas

TERCER MIEMBRO

:


Dr. Angel M. Mujica Sanchez

PUNO – PERU
2013

DEDICATORIA

Con amor eterno dedico este trabajo a los que me han dado la oportunidad de existir; Constantino (QDDG) y Andrea (QDDG); y con mucho amor a los motores de mi vida, motivo de inspiración mis hijos: Luz Corali y Ernesto Zhildeer y a mi amiga, compañera Ada Luz, madre de mis hijos; por su valioso apoyo y motivaciones, para ustedes con el mayor respeto y amor.

Ernesto Javier

AGRADECIMIENTOS

A Dios por las grandes maravillas que ha hecho conmigo, por darme la oportunidad de vivir en esta vida, por darme sabiduría para entender mis lecciones, por prepararme para esta vida y la eternidad; por haberme dado; una sabia esposa Ada Luz mi gran amor, a mis hijos Luz Corali y Ernesto Zhildeer, por alentarme en los momentos mas difíciles de mis estudios, a mi madre política Febe Loida y a José Elmer, quienes siempre estuvieron conmigo.

A la Escuela de Postgrado, Programa de Doctorado en Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de la Universidad Nacional del Altiplano y a los profesores que hacen de este centro superior de estudios lo mejor por los conocimientos impartidos.

A los señores jurados: Dr. Eduardo Flores Condori (Presidente), Dr. Sabino Atencio Limachi (Miembro), Dr. Edmundo Moreno Terrazas (Miembro), por la orientación del presente trabajo.

Al Dr. Ángel Mujica Sánchez, por la Asesoría de este trabajo, y por constante apoyo moral, técnico y científico, que hoy es parte del mundo científico.

Al Ing. Joel Flores, especialista en caracterización molecular del Laboratorio del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria de la Molina- Lima

INDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
INDICE.....	iv
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE GRÁFICOS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	xii

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Justificación	2
1.3. Objetivos	4

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes	5
2.2. Marco referencial	8
2.2.1. Generalidades del cultivo de quinua	8
2.2.1.1. Origen	8
2.2.1.2. Domesticación	11
2.2.1.3. Clasificación taxonómica.....	12
2.2.1.4. Parientes silvestres	14

2.2.1.5. Características reproductivas de la quinua; Autogamia y Alogamia	15
2.2.1.6. Genética de poblaciones	32
2.2.1.7. Flujo genético.....	34
2.2.1.8. Flujo genético por hibridación de las plantas	36
2.2.1.9. Flujo genético neutro.....	37
2.2.1.10. Flujo Genético desde plantas domésticas sus parientes silvestres	37
2.2.1.11. Herramientas moleculares	40
2.2.1.12. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)	41
2.2.1.13. Importancia de marcadores moleculares	43
2.2.1.14. Marcadores moleculares.....	46
2.2.1.15. Marcadores moleculares como herramienta para la selección	47
2.2.1.16. Estudios moleculares en quinua	49
2.2.1.17. Marcadores genéticos.....	49
2.2.1.18. Tipos de marcadores genéticos	50
2.2.1.19. Análisis de información	61
2.2.1.20. Elección de Unidades Taxonomicas Operativas OTU	62
2.2.1.21. Elección de caracteres.....	62
2.2.1.22. Datos de tipo doble, estado y su codificación	63
2.2.1.23. Matriz básica de datos	63
2.2.1.24. Obtención de coeficiente de similitud.....	63
2.2.1.25. Matriz de similitud	64
2.2.1.26. Análisis de agrupamiento.....	65
2.3. Métodos estadísticos multivariados aplicados a la biología molecular .	66

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Diseño metodológico.....	69
3.1.1. Ambito de estudio	69
3.1.1.1. Fase de campo	69
3.1.1.2. Fase de laboratorio	71
3.2. Metodología	74
3.2.1. Germinación de las semillas	74
3.2.2. Extracción de ADN.....	74
3.2.3. Determinación de la calidad y concentración de ADN	74
3.2.4. Técnicas de AFLP.....	75
3.2.5. Digestión de ADN genómico	75
3.2.6. Ligación de adaptadores.....	76
3.2.7. Reacción de Pre-amplificación (+1/+1)	76
3.2.8. Amplificación selectiva (+3/+3)	77
3.2.9. Selección de combinaciones de iniciadores	79
3.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	80
3.2.11. Tinción y revelado de geles de poliacrilamida.....	80
3.2.12. Escaneado y lectura (scoreo) de bandas.....	80
3.2.13. Análisis estadístico.....	81
3.2.13.1. Registro de datos	81
3.2.13.2. Determinación del índice de contenido polimorfo.....	81
3.2.13.3. Análisis de similitud.....	82
3.2.13.4. Análisis de agrupamiento.....	82

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Caracterización mediante métodos moleculares de las variedades nativas y sus parientes silvestres de quinua utilizando el sistema AFLP	83
4.2. Determinación de parentesco y las distancias genéticas entre las variedades nativas y parientes silvestres de quinua	99
4.3. Identificación de parientes silvestres de la quinua en base a la caracterización molecular	103
CONCLUSIONES	112
RECOMENDACIONES	114
BIBLIOGRAFÍA	115
ANEXOS	137

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de plinización cruzada a diferentes distancias de Siembra 1965.....	17
Cuadro 2. Características generales de marcadores genéticos 1995	61
Cuadro 3. Comparación entre OTU (Unidades Taxonomicas Operativas) ..	64
Cuadro 4. Lugares de colección de las accesiones de quinua para banco de germoplasma 2009-2012	70
Cuadro 5. Programa de pre-amplificación 2012	77
Cuadro 6. Programa de amplificación selectiva - AFLP 2012.....	78
Cuadro 7. Secuencia de los iniciadores de muestra 2009 - 2012	80
Cuadro 8. Variedades nativas de quinua en Puno 2009-2011	84
Cuadro 9. Parientes silvestres de quinua colectadas en Puno 2010-2011	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dendograma que agrupa a 13 variedades nativas de quinua según marcadores AFPL 2012	85
Figura 2. Dendograma que agrupa los parientes silvestres de quinua según los marcadores AFLP 2012.....	94
Figura 3. Dendograma que agrupa las quinuas nativas y sus parientes silvestres según los marcadores AFLP 2012.....	100
Figura 4. Dendograma que agrupa a toda las quinuas según marcadores AFLP 2012	105

RESUMEN

El estudio se centro en la caracterización molecular y de distancias genéticas en variedades nativas y sus parientes silvestres de quinua. Los objetivos fueron: a) Caracterizar por métodos moleculares las variedades nativas y sus parientes silvestres de quinua, utilizando el sistema AFLP, b) Determinar el parentesco y las distancias genéticas de las variedades nativas y parientes silvestres de quinua, c) Identificar los parientes silvestres de la quinua en base a la caracterización molecular. El estudio se dividió en dos fases a). de recolección de muestras en el campo y b) de laboratorio, realizada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria la Molina – Lima. Los resultados de la investigación señalan que el dendograma obtenido del análisis de las 13 muestras de variedades nativas con un coeficiente de similitud de 0,65 forman dos clúster. El primer clúster estuvo conformado por: las variedades: Chullpi, Choclito, Wariponcho, Toledo, Rosa Frutilla, Huallata, Negra Collona, Antahuara, Airampo y Pucakello y el segundo clúster fue constituido por Pasankalla, Salcedo INIA y Kancolla. Mientras que con un coeficiente de similitud de 0,77 se llegan a formar 5 clúster, el primero está formado por 5 variedades nativas, el segundo clúster está formado por tres variedades, el tercer clúster por una variedad, el cuarto clúster por solo una variedad, y el quinto clúster está constituido por 5 variedades nativas. Esto indica que existe similitud genéticas entre ellas. Analizado los parientes silvestres con un coeficiente de similitud de 0,78 se forman 5 grupos: el primero integrado por un solo pariente silvestre, el segundo grupo está formado por 4 parientes, el tercer grupo está conformado por un pariente silvestre, el cuarto grupo está formado por tres y el quinto grupo está formado por un solo pariente silvestre. Por otro lado el análisis combinado de 13 variedades nativas y 10 parientes silvestres, muestra un dendograma a un coeficiente de similitud de 0,64 en el que se forman tres clúster, el clúster (a) formado por 10 cultivares, el clúster (b) constituido por 7 cultivares y el clúster (c) constituido por 6 cultivares. Por lo que podemos asumir que muchas variedades nativas, poseen características genéticas similares en los tres clúster (a, b y c). Es así que el pariente silvestre HAY1 (Ayara – Huataraqui) se encuentra dentro del clúster (a), indicando que posee características genéticas coincidentes con las variedades nativas: Chullpi, Choclito, Wariponcho, Toledo, Rosa Frutilla, Huallata, Negra Collona, Antahuara y Airampo, por tanto se deduce que es el ancestro de estas variedades nativas.

Palabras claves: Quinua, AFLP, sistema, genética molecular, variedad, silvestres.

ABSTRACT

The study focused on the molecular characterization and genetic distances in native varieties and their quinoa's wild relatives. The objectives were: a) characterize by molecular methods native varieties and their quinoa's wild relatives, using the AFLP system, b) to determine the kinship and genetic distances of native varieties and the wild relatives of quinoa, c) to identify quinoa's wild relatives based on molecular characterization. The study was divided into two phases. First, a sample collection out in the field and second, a laboratory work developed in the Biotechnology Institute of the Agrarian National Universidad La Molina in Lima. The research results indicate that the dendrogram obtained from the analysis of 13 samples of native varieties with 0.65 similarity coefficient forms two clusters. The first cluster consisted of varieties: Chullpi, Choclito, Wariponcho, Toledo, Rosa Frutilla, Huallata, Negra Collona, Antahuara, Airampo and Pucakello and the second cluster was formed by Pasankalla, Salcedo INIA and Kancolla. While a similarity coefficient of 0.77 is reaching form 5 clusters, the first is formed by five native varieties, the second cluster of three varieties, the third cluster for one variety, the fourth cluster for only one variety, and the fifth cluster consists of five native varieties. This indicates that exist genetic similarity among them.. Analyzing quinoa's wild relatives with 0.78 similarity coefficient it form 5 groups: the first consisting of a single wild relative, the second group consists of four relatives, the third group consists of one wild relative, the fourth group formed by three and the fifth is formed by a single wild relative. Furthermore, the combined analysis of 13 native varieties and 10 wild relatives shows a dendrogram with similarity coefficient of 0.64 which form three clusters, the cluster (a) consisted of 10 cultivars, the cluster (b) consisting of 7 cultivars and the cluster (c) consists of six cultivars. Therefore, we can assume that many native varieties have similar genetic characteristics in the three clusters (a, b and c). Thus, the wild relative HAY1 (Ayara - Huataraqui) is located within the cluster (a), indicating that possess genetic characteristics consistent with native varieties: Chullpi, Choclito, Wariponcho, Toledo, Rosa Frutilla, Huallata, Black Collona, Antahuara and Airampo therefore follows that the ancestor of these native varieties.

Keywords: Quinoa, AFLP system, molecular genetic, wild varieties of quinoa.

INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) es un cultivo originario de Los Andes y en su domesticación y desarrollo han participado grandes culturas como la Tiahuanacota y la Incaica. La diversidad genética de esta especie es el resultado de la variación genética, la participación de factores ambientales y la intervención del hombre. El hombre ha orientado en alguna forma la evolución de la especie favoreciendo las variantes más convenientes para la utilización por el hombre, precisamente, es en este momento que empezó el mejoramiento de la quinua.

En general, el mejoramiento genético de plantas tiene por finalidad la obtención de variedades con características de mayor rendimiento, mayor calidad comercial y nutritiva, mayor resistencia a factores abióticos y bióticos adversos al cultivo. En otras palabras, el mejoramiento genético de la quinua tiene por finalidad la generación de variedades más eficientes producir productos aprovechables por el hombre como alimento, como materias primas para la industria, como forraje para los animales domésticos, etc.

La quinua es un recurso fitogenético de valor estratégico para las condiciones áridas del altiplano, destacándose su resistencia a heladas, salinidad y sequía predominantes que son factores adversos de tipo abiótico en las zonas altas de Los Andes. La quinua tiene roles múltiples en el sistema de producción del altiplano y valles interandinos donde juega papel importante en la seguridad alimentaria de la población rural, en la generación de ingresos económicos y en la producción de subproductos para la alimentación de animales domésticos de la zona. Finalmente, la quinua tiene una significación

cultural y religiosa para los habitantes del altiplano y valles. Estos roles han convertido a la quinua en un cultivo importante y multipropósito para las condiciones agroecológicas y socioeconómicas de las zonas altas.

Los trabajos de investigación en la quinua conducida en la zona andina y últimamente también fuera de esta zona, han estado orientados a la obtención de mayor rendimiento del grano. El incremento del rendimiento es posible mediante el mejoramiento genético, el mejoramiento de las condiciones de manejo agronómico y conjunción de ambos. En las últimas décadas, la quinua ha sido objeto de investigación en el campo de la genética y fitomejoramiento. Esta sección trata de los métodos de mejoramiento de la quinua, sin que esto sea un tratado completo de la disciplina, al contrario, se pretende presentar los métodos aplicados y aplicables al mejoramiento de la quinua basados en la experiencia de investigadores de la zona andina

Por la importancia que tiene este cultivo, esta investigación se ha planteado los siguientes objetivos a). Caracterizar por métodos moleculares las variedades nativas y sus parientes silvestres de quinua, utilizando marcadores moleculares AFLP. b). Determinar el parentesco y las distancias genéticas de las variedades nativas y parientes silvestres de quinua. c). Identificar los parientes silvestres de la quinua en base a la caracterización molecular.

CAPITULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Problema

La diversidad y variabilidad genética de la quinua se ha visto reducida (*Ex situ* e *In situ*), disminuyendo notablemente las variedades nativas locales y sus parientes silvestres a consecuencia de la introducción de nuevas variedades, mercados, continua presencia de factores adversos bióticos y abióticos durante las campañas agrícolas, la pérdida de tecnologías de conservación en comunidades y la falta de motivación a los conservacionistas *In situ*.

Con las colectas de variedades nativas y parientes silvestres, y su conservación *Ex situ* (banco de germoplasma) e *In situ* (conducción de Bancos de Germoplasma Comunales, conducidos por los propios agricultores) se podrá recuperar y conocer la diversidad y variabilidad, de Chenopodiáceas, de alto valor genético y nutraceutico, que pueden ser aprovechados como fuente de mejoramiento principalmente.

En la actualidad no se tiene identificada las variedades nativas y sus parientes silvestres de la quinua, de génesis resistentes a factores bióticos y abióticos, muchos de ellos están en constante erosión en sus nichos

ecológicos, no se tiene medios de conservación (*In situ* y *Ex situ*), de continuar este problema, traerá consigo la pérdida de variedades nativas y sus parientes silvestres de alto valor nutraceutico.

Pérdida del conocimiento ancestral y tecnologías tradicionales de cultivo, la desaparición total de las organizaciones comunales encargadas de cuidar (proteger) las chacras, pérdida de conocimientos de atributos curativos (medicinales) de los parientes silvestres de la quinua y por último, desaparecerían variedades que podrían ser fundamentales en el futuro no muy lejano y que podrían ser utilizadas en la agroindustria (tintes naturales, fuentes de proteínas y aminoácidos, etc.) material en el mejoramiento y usos genéticos.

Así mismo no existe una caracterización molecular y morfológica actualizada de la información genética de la diversidad y variabilidad de la quinua y sus parientes silvestres, siendo la única base las colectas realizadas hace 50 años, donde incluso no se tienen ni los datos de pasaporte de cada accesión, mucho menos su ubicación georeferenciada exacta (GPS) que hoy día es útil para trabajos de mapeos espaciales y análisis de distribución de la variabilidad.

1.2. Justificación

La quinua es una planta alimenticia de desarrollo anual, dicotiledónea que usualmente alcanza una altura de 1 a 3 m. Las hojas son anchas y poliformes (diferentes formas en la misma planta), El tallo central comprende hojas lobuladas y quebradizas. El tallo puede tener o no ramas, dependiendo de la variedad o densidad del sembrado. Las flores son pequeñas y carecen de

pétalos. Generalmente son bisexuales y se autofertilizan. El fruto es seco y mide aproximadamente 2 mm de diámetro (de 250 a 500 semillas por gramo), circundando al cáliz, el cual es del mismo color que el de la planta. La quinua es una planta de gran resistencia que se adapta a diversas condiciones de latitud y altitud hasta unos 4,000 msnm, y puede crecer en zonas áridas y semiáridas

La quinua o quinoa es evocada con frecuencia como el alimento sagrado de antiguas culturas andinas, parte de las dietas del pasado. Pero sus cualidades han convertido a esta planta sudamericana en un producto cargado de futuro. "La quinua es uno de los pocos alimentos de origen vegetal que es nutricionalmente completo, es decir que presenta un adecuado balance de proteínas, carbohidratos y minerales, necesarios para la vida humana", dice un documento albergado en el servidor de FAO.

En las investigaciones realizadas al momento no existe trabajos de caracterización molecular y distancias genéticas de las variedades nativas y parientes silvestres de quinua de génesis resistentes a factores bióticos y abióticos, muchos de ellos están en constante erosión en sus nichos ecológicos, no se tiene medios de conservación (*Ex situ*, *In situ*), de continuar este problema, traerá consigo la pérdida de variedades nativas y sus parientes silvestres de alto valor nutraceutico y de gran diversidad y variabilidad genética de las Chenopodiáceas en el altiplano de Puno.

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Determinar las características moleculares y las distancias genéticas de las variedades nativas y parientes silvestres de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.).

1.3.2 Específicos

1.3.2.1. Caracterización por métodos moleculares las variedades nativas y sus parientes silvestres de quinua, mediante el sistema AFLP.

1.3.2.2. Determinación del parentesco y las distancias genéticas de las variedades nativas y parientes silvestres de quinua.

1.3.2.3. Identificación de los parientes silvestres de la quinua en base a la caracterización molecular.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

Medina (2004), estudio 8 combinaciones de cebadores, en el análisis de AFLP, entre variedades y generaron 419 productos, 154 de los cuales fueron polimórficos, con lo que demuestra la eficacia de esta técnica, en el estudio de variedad intra, detecto una cantidad total de bandas por 3 combinaciones de cebadores de 129 para la variedad AMM con un promedio de 7.3 bandas polimórficas por combinación de cebadores (17,1% de polimorfismo), 138 bandas totales para ECU con un promedio de 12 bandas polimórficas por combinación de cebadores (25,4% de polimorfismo) y 127 bandas totales para NAR con un promedio de 10 banda polimórfica por combinación de cebadores (23,6% de polimorfismo). Asi mismo señala que los resultados para el nivel de polimorfismo tras el análisis inter variedad AFLP fue del 3,6% para EDK y NL6 al 22,7% para NL6 y RAT.

Varias fuentes informaron de que la técnica de AFLP es adecuado para el análisis de germoplasma. (Russel *et. al* 1997) demostró que la AFLP, en comparación con otros sistemas de marcadores tales como RFLP, SSR o RAPD, es la técnica más eficiente para este propósito, debido a su capacidad

de revelar muchas bandas polimórficas en una sola reacción de 57 accesiones de arroz sugirieron, que los marcadores obtiene a partir de sólo una de las combinaciones de cebadores que se generan más de 30 bandas polimórficas podrían ser suficientes para la clasificación de los principales grupos de análisis de genotipos de arroz.

Ruas *et. al* (1999) trabajó en el establecimiento del nivel de polimorfismo entre varias especies del género *Chenopodium*, 10 accesiones de *C. quinoa* entre ellos, utilizando técnicas de RAPD. En otros trabajos con especies del género *Chenopodium* fue obra de Chan y Sun (1997), que estudió la diversidad genética y las relaciones de 23 especies de *Amaranthus* cultivadas y silvestres fueron examinadas usando ambas isoenzimas y los marcadores RAPD. (Sun *et. al* 1999), que examinó la diversidad genética y las relaciones entre los 24 cultivadas y silvestres adhesiones *Amaranthus* utilizando el ADN de baja cuna total y cinco individuos secuencias repetitivas como sondas.

Obras similares en otros cultivos, pero usando polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) ha sido desarrollado para cultivos tales como arroz (Federici *et. al* 2001), los cultivares de semilla de colza (Lombard *et. al* 1999), remolacha azucarera (De Riek *et. al* 2001), la especie *Oryza* (Aggarwal *et. al* 1999), yuca y otras especies. (Roa *et. al* 1997), tribus Solanáceas (Mace *et. al* 1999), el melón (García -Mas *et. al* 2000), y también para *Arabidopsis thaliana*, (Erschadi *et. al* 2000) y (Breyne *et. al* 1999). No hay datos disponibles sobre la evaluación del polimorfismo AFLP en *Chenopodium quinoa* Willd.

El polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) técnica se basa en la detección de fragmentos de restricción genómicos por Reacción en

Cadena de la Polimerasa (PCR), y se puede utilizar para los ADN de cualquier origen o la complejidad. Las huellas digitales se producen sin secuencias conocimiento previo con un límite conjunto de cebadores genéricos. El número de fragmentos detectados en una sola reacción se puede ajustar mediante la selección del conjunto de cebadores específico. La técnica AFLP es un robusto y fiable debido a condiciones de reacción severas se utilizan para la hibridación del cebador: la fiabilidad de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) se combina entonces con el poder de la técnica de PCR (Vos *et al* 1995).

En comparación intra variedad análisis de AFLP, el nivel de polimorfismo entre dos muestras elegidas al azar en cada variedad era 3,3% para AMM variedad, 6,5% para el NAR y 7,6% para el ECU. Los niveles de polimorfismo están a menos de 10%, lo que es similar a la información de coeficiente de similitud de Jaccard (más de 90%). Los valores más bajos de polimorfismo en la AMM y la NAR, se pueden explicar por el método de selección genética utilizada en su producción. Ambos quinuas fue resultado de los métodos de selección individuales, que producen plantas con características homogéneas y homocigotos (Jacobsen y Mujica 2000).

Vos *et al* (1995), señala que la técnica AFLP es una poderosa técnica de marcadores de ADN. Se concibió originalmente para permitir la construcción de mapas de marcadores de ADN de muy alta densidad para su aplicación en la investigación del genoma y la clonación posicional de genes. Es adecuado para aplicaciones en el análisis genético que requieren más modestos

densidades marcadores de ADN. AFLP se basa en la detección de fragmentos de restricción de ADN mediante amplificación por PCR.

La amplificación de fragmentos de restricción se lleva a cabo mediante la ligación de doble cadena (ds) secuencias de adaptador a los extremos de los sitios de restricción que pueden posteriormente servir como sitios de "universales" de unión para hibridación de los cebadores en la PCR. De esta manera, los fragmentos de restricción de un ADN particular, pueden ser amplificadas con cebadores AFLP "universales" correspondientes a el sitio de restricción y la secuencia del adaptador. Sin embargo, para la mayoría de las AND el número de fragmentos que se detecta al mismo tiempo de esta manera será demasiado alta para ser resuelto en cualquier sistema de análisis de fragmentos, por ejemplo, geles. Por lo tanto, los cebadores AFLP tienen en su extremo 3 'de un número de bases selectivas que se extienden en fragmentos de restricción. Esto resulta en la amplificación selectiva de los fragmentos en los que la extensión del cebador coinciden con los nucleótidos que flanquean el sitio de restricción (Vos y Kuiper 1999).

2.2. Marco referencial

2.2.1. Generalidades del cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)

2.2.1.1. Origen,

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 (Mujica *et al* 2006).

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 (Mujica *et al* 2006). 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.

La quinua en el pasado ha tenido 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 con específicos, 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 África, 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 con específicos distintos, pero con específicos 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 (Mujica *et al* 2006).

2.2.1.2. Domesticación.

Durante la domesticación de la quinua y como producto de la actividad humana, ha ocurrido un amplio rango de modificaciones morfológicas. Entre ellas, condensación de la inflorescencia en el extremo terminal de la planta, incremento del tamaño de la planta y la semilla, reducción de la testa, pérdida de la dormancia para la germinación, pérdida de los mecanismos de dispersión de la semilla, y altos niveles de pigmentación, consiguiéndose la actual planta de quinua de alta producción de semillas de colores claros, lo que demuestra el enorme tiempo utilizado por el hombre en la selección y cultivo de esta especie. Los parientes más cercanos y también los posibles progenitores, muestran aun estas características silvestres y no así el escape de cultivo *Ch. quinoa* var. *melanospermum*, que sólo tiene la semilla de color oscuro (Mujica *et al* 2006).

Seguramente, durante la domesticación el hombre andino selecciono los genotipos por el tipo de uso y por la tolerancia a factores adversos tanto bióticos como abióticos, llegando a obtener las actuales plantas y ecotipos con características diferenciales, tales como las quinuas Chullpi para sopas, las

quinuas Pasankalla para tostado, las Coytos para harina, las Reales para la pissara o graneado, la Utusaya para resistir a la salinidad, las Witullas y Achachínos para resistir el frío, las Kcancollas para resistir la sequía, las Quellus o amarillas para alto rendimiento, las Chewecas para resistir el exceso de humedad, las Ayaras por valor nutritivo (alto balance de aminoácidos esenciales y proteína), y las Ratuquis por precocidad (Mujica *et al* 2006). Aún hoy en día, el poblador andino sigue manteniendo los parientes silvestres para su uso como ataco o Llipcha, como plantas medicinales y en casos extremos para el uso del grano en la alimentación, cuando se presenten desastres naturales.

2.2.1.3. Clasificación taxonómica

La quinua es una planta de la familia *Chenopodiáceas*, género *Chenopodium*, sección *Chenopodia* y subsección *Cellulata*. El género *Chenopodium* es el principal dentro de la familia *Chenopodiáceas* con una amplia distribución mundial, cerca de 250 especies (Giusti 1970). La subsección *Cellulata*, tiene sus granos con la superficie del pericarpio alveolados, ubicando dentro de ella a: *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium berlandieri* sp. *nuttalliae* ($2n=4x=36$ cromosomas) y *Chenopodium hircinum* (Mujica *et al* 2006). *Chenopodium quinoa* Willd, es la quinua cultivada, con 185 genotipos, caracterizados por tener semillas menos adheridas al perigonio y con menor dehiscencia, panojas compactas y colores de grano blanco y claros, es tetraploide ($2n= 4x= 36$ cromosomas), siendo un allotetraploide

Chenopodium hircinum Schrad., tiene semillas oscuras y granos fuertemente adheridos al perigonio con dehiscencia que permite su fácil

dispersión, con características peculiares de planta y semillas, encontrando 18 genotipos cuyas diferencias están en el color de grano y planta, aunque con menor número de hojas y semillas, es tetraploide ($2n= 4x =36$ cromosomas) siendo el ancestro cercano de la quinua, por su similitud cromosómica y fenotípica (Mujica *et al* 2006). Mientras que en la subsección leiosperma también perteneciente a la sección *Chenopodia*, posee granos lisos no alveolados, se ubicando dentro de esta a: *Chenopodium pallidicaule*, *Chenopodium carnosolum*, *Ch. petiolare* y *Chenopodium quinoa* Subsp. *Melanospermum* Hunz. *Chenopodium pallidicaule* Aellen, con 50 genotipos, entre erectas (Sayhuas), semierectas (Lastas) y postradas (Pampa lastas), con variación en coloración de planta, ramificación y tamaño, la especie es diploide ($2n= 2x=18$ cromosomas).

Chenopodium carnosolum Moq. con diez genotipos diferentes, diploide ($2n= 2x= 18$ cromosomas), caracterizada por su crecimiento postrado, con muchas ramificaciones y creciendo dentro del agua, con enorme tolerancia a salinidad y soportando gran parte del tiempo el exceso de humedad y elevada concentración salina. *Chenopodium petiolare* Kunth, con siete genotipos diferentes, diploide ($2n = 2x=18$ cromosomas), caracterizada por su crecimiento erecto, poco ramificado y variación en ubicación de los glomérulos dentro de la inflorescencia, está presente en los campos cultivados de quinua y acompañando a los lugares de distribución de la quinua, se encuentra de 3830 a 3900 msnm, mostrando gran variación fenotípica y confundándose con la quinua cultivada. *Chenopodium quinoa* Subsp. *Melanospermum* Hunz, es una especie silvestre, posee 40 genotipos, ($2n= 4x=36$ cromosomas), tiene semillas

obscuras, granos grandes, poca dehiscencia y similar en morfología y fenología a la quinua (Mujica *et al* 2006).

2.2.1.4. Parientes silvestres

Gandarillas (1984), menciona que 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:

- a) **Cellulata**, (Granos con la superficie del pericarpio olveolados), ubicando dentro de ella a *Ch. quinoa* con $2n=4x=36$ cromosomas, *Ch. berlandieri* ssp. *nuttalliae* con $2n=4x=36$ cromosomas y *Ch. hircinum* con $2n= 4x = 36$ cromosomas, sinónimo de *Ch. quinoa* ssp. *milleanum*.
- b) **Leiosperma** (granos lisos no alveolados), ubicando dentro de ella a *Ch. pallidicaule* con $2n = 2x 018$ cromosomás y *Ch. album* de los Himalayas, con $2n = 6x = 54$ cromosomas, *Ch. carnosolum*, con $2n = 2x = 18$ cromosomas; *Ch. petiolare*, con $2n = 2x 0 18$ cromosomas; *Ch. papulosum* y *Ch. zobelli*.
- c) **Undata**, ubicando a *Ch. murale* con $2n = 2x = 18$ cromosomas y
- d) **Grossefoveata**. 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 adversos abióticos, 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 por que 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 (Gandarillas 1984).

2.2.1.5. Características reproductivas de la quinua, Autogamia y Alogamia

La quinua normalmente se reproduce por la vía sexual, es decir, mediante semilla botánica, aunque la propagación asexual no esta descartada al menos en condiciones experimentales. La reproducción sexual es un proceso biológico que implica la formación de gametos masculinos y femeninos, la posterior fusión de éstos permite la formación del cigote el que

mediante divisiones celulares consecutivas y la diferenciación forma el embrión de cuya estructura nace una nueva planta. Los procesos de meiosis y la fecundación implicados en la reproducción sexual conducen a la generación de la variabilidad genética. Esta variabilidad es mayor en especies alógamas y menor en autógamas, de todos modos la reproducción sexual constituye una fuente importante de variación, la misma que es aprovechada en el mejoramiento genético de los cultivos (Mujica *et al* 2006).

Las investigaciones en la biología floral han mostrado una diversidad en las estructuras florales. Simmonds (1965) al estudiar las chenopodiáceas del altiplano ha descrito plantas con flores ginomonoicas y ginodioicas. (Rea, 1969), ha encontrado flores femeninas y hermafroditas en una misma inflorescencia. Por su parte Gandarillas (1979), menciona que la quinua presenta flores con gineceo y androceo (flor perfecta), flores pistiladas (flor imperfecta) y flores andrestériles. Los tres tipos de flores se encuentran distribuidos en diferentes plantas de una misma variedad o en diferentes partes de una misma inflorescencia Lescano (1994), reporta resultados similares sobre la biología reproductiva y una posible protandria.

Con respecto a la forma de fecundación en la quinua Simmonds (1965), menciona que la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) la kañahua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) y Huauzontle (*Chenopodium nuttalliae* Safford) son especies autógamas, afirmación similar ha sido reportada por Wilson (1988). Los ensayos conducidos por Gandarillas (1976), para determinar la forma de fecundación de la quinua en el altiplano, zona de origen y de mayor producción de la quinua, ha reportado porcentajes variables de

cruzamiento natural que varía desde 1.5% para una distancia de separación de 20 m hasta 9.9% a 1 m de separación de plantas. Lescano (1994), 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, siendo más o menos similar al grado de autogamia presente en el arroz y sorgo (House 1982 y Jennings *et al* 1981). Sobre la base de estos resultados, la quinua ha sido considerada como especie autógena con fecundación cruzada frecuente (Gandarillas 1979); por tanto, en el mejoramiento genético de la quinua se han aplicado preferentemente los métodos recomendados para autógenas y especialmente aquellas aplicados en el sorgo y arroz.

CUADRO 1
PORCENTAJE DE POLINIZACION CRUZADA A DIFERENTES DISTANCIAS
DE SIEMBRA

Distancia m	Color planta polinizadora	Numero de plantas en la progenie		Porcentaje de cruzamiento
		Verdes	Púrpuras	
1	Planta púrpura, grano rojo	614	68	9.9
5	Planta púrpura, grano rojo	648	19	2.8
10	Planta púrpura, grano rojo	656	18	2.6
20	Planta púrpura, grano rojo	743	4	0.5
1	Planta púrpura, grano amarillo	330	15	4.3
5	Planta púrpura, grano amarillo	459	6	1.3
10	Planta púrpura, grano amarillo	287	6	2.0
20	Planta púrpura, grano amarillo	393	6	1.5

Fuente. Simmonds (1965),

Erquinigo (1970), ha propuesto un método para determinar la autopolinización y polinización cruzada, describiendo una serie de características morfológicas del gineceo y androceo en plantas marcadas. Las numerosas categorías propuestas aparentemente no superan la eficiencia del método empleado por Gandarillas y recientemente por Silvestre y Gil (2000).

Por otra parte, recientes trabajos de investigación de Silvestre y Gil (2000), conducidos en Mendoza, Argentina, han encontrado un 17.36% de alogamia trabajando con las variedades Sajama (verde) y Paca (rojo), este resultado duplica lo reportado por Gandarillas, sin embargo, los resultados de Silvestre y Gil (2000) provienen de estudios conducidos en condiciones ambientales distintos a las condiciones naturales de adaptación de la especie.

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 Galvey (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.

a). POLIPLOIDIA.

Las investigaciones sobre el número de cromosomas de la quinua cultivada (*Chenopodium quinoa* Willd) han demostrado que la especie $2n = 36$ cromosomas (Cárdenas y Hawkes 1948, Gandarillas y Luizaga 1967 y Gandarillas 1986). En base a los resultados obtenidos Gandarillas (1979), sostiene que se debe aceptar que la quinua tiene 36 cromosomas somáticos constituidos por cuatro genomios de $x = 9$ cromosomas que son número básico para el género *Chenopodium*, lo que significa que la quinua es un

alotetraploide. Los estudios de Simmonds (1971) y Gandarillas, (1986), muestran evidencias sobre la condición alotetraploide de la quinua donde participarían dos genomas de especies diploides y una posterior duplicación del número de cromosomas daría origen a un alotetraploide autofértil.

Con respecto a la herencia genética (cromosómica), la quinua tiene un comportamiento hereditario del tipo disómico (Simmonds 1971). Esta forma de herencia esta implícita, al menos para caracteres cualitativos, en varios trabajos de Gandarillas, (1968, 1971 y 1979), Saravia (1990), Bonifacio (1990 y 1991) y Silvestre y Gil (2000), quienes han observado la segregación de caracteres en F2 concordantes con las proporciones clásicas de 3:1 y 9:3:3:1 correspondientes a uno y dos pares de genes respectivamente.

b). ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS Y GENÉTICAS.

Gandarillas y Luizaga (1976), en recuentos cromosómicos empleando puntas de raíz han encontrado endopoliploidización en algunas células. Posteriormente, Gandarillas (1979), trabajando con puntas de radículas de quinua en proceso de germinación, ha encontrado anomalías en el número de cromosomas, entre ellos una reducción y poliploidía en el número de cromosomas. Lo anterior significa que las células en los puntos de crecimiento (radícula) durante la división celular primeramente ocurren una reducción en el número de cromosomas y después una endopoliploidía (endomitosis).

Otras anomalías genéticas observadas en la quinua constituyen la segregación espontánea que se presenta en condiciones naturales (Bonifacio 1995 y 1996). Las variaciones más notorias se refieren a la segregación hacia el color oscuro del grano a partir de materiales de grano blanco, esto es el caso

de algunas variedades y ecotipos comerciales en las que aparecen espontáneamente los colores oscuros del grano. Inicialmente esta forma de segregación se atribuyó a los cruzamientos naturales con quinua silvestres y entonces la práctica de purificación varietal era recomendada para mantener la pureza varietal. Sin embargo, autofecundaciones controladas en el ecotipo Real Pandela y Sayaña han mostrado segregación en color de planta y también en color de grano, lo cual es un indicio de una segregación espontánea. La segregación espontánea observada en la quinua puede ser atribuido no solo al cruzamiento natural con especies silvestres sino también a la acción de elementos genéticos de transposición (Bonifacio 1996).

La transposición genética fue estudiada primero en maíz y posteriormente en *Drosophyla*. Los elementos genéticos de transposición o elementos genéticos móviles son segmentos de DNA que se mueven de un locus a otro, cuando un elemento de transposición se inserta dentro de un gene interrumpe el gene causando una mutación y usualmente el gene pierde su función (Fairbanks y Andersen 1999). Este aspecto requiere ser estudiado con mayor detalle en la quinua, puesto que la segregación espontánea considerada negativo para la conservación de la pureza varietal, puede ser favorable para la selección por constituir una fuente de variación. Precisamente, Bonifacio y Vargas (2000), han iniciado la selección en materiales con segregación espontánea en variedades y ecotipos de quinua con resultados iniciales alentadores.

c). AUTOFECUNDACION Y CRUZAMIENTO ARTIFICIAL

La autofecundación y cruzamiento dirigido son procedimientos rutinariamente aplicados en los trabajos de investigación en genética y mejoramiento. Las técnicas de autofecundación y cruzamiento para la quinua han sido desarrolladas gradualmente y aún no existe una técnica perfecta para la especie. Sin embargo, las técnicas que se presentan en esta sección son consideradas como las más apropiadas porque han sido aplicadas satisfactoriamente en el programa de mejoramiento genético de la quinua.

Tanto la autofecundación como la hibridación son procedimientos técnicos que requieren del conocimiento de la biología reproductiva y de las técnicas más apropiadas. Tanto para la autofecundación como para el cruzamiento de la quinua se requieren de una serie materiales e instrumentos que no son muy costosos y en la mayoría de los casos se pueden adaptar a partir de materiales utilizados en trabajos similares. Los materiales comúnmente utilizados son los sobres de papel glassine de 10 por 15 cm y 15 x 25 cm, marbetes de 4 x 6 cm y 6 x 10 cm, tijera pequeña de punta fina, clips de 32 mm, agujas histológicas o de disección, pinzas punta fina, lente de aumentos tipo frontal, vidrio de reloj, bollos de algodón, pincel pelo de camello números 4 y 6, alcohol 70%, libro y libreta de registros, caja de fitotecnia y otros (Bonifacio 1996).

d). LA AUTOFECUNDACIÓN

La autofecundación artificial consiste en la autopolinización controlada para propósitos específicos. La autofecundación es el procedimiento imprescindible aplicado en la primera generación filial después del cruzamiento (F1) para

obtener la población segregante F2. Por otra parte, la autofecundación es un procedimiento apropiado para la obtención de líneas puras a partir de variedades y/o accesiones mezcladas y poblaciones segregantes (Mujica *et al* 2006). Las líneas puras obtenidas por autofecundaciones sucesivas son útiles para la hibridación, puesto que los progenitores empleados en la cruce deben ser líneas puras o al menos altamente homocigóticas, lo cual permite la obtención de progenies heterocigóticas en F1, las mismas que a su vez facilitarán la recombinación de genes para generar mayor variabilidad en la F2. Por otra parte, las líneas provenientes de autofecundación son apropiadas para aplicar los métodos de selección recomendados para la quinua.

La técnica de autofecundación en quinua consiste en el aislamiento previo a la anthesis con el propósito de evitar la polinización cruzada. La autofecundación es un proceso sencillo, pero se deben tomar algunas consideraciones al respecto. La autofecundación se realiza en toda la panoja o en algunos glomérulos dependiendo del propósito y de la cantidad de semilla que se desea obtener a partir de plantas autofecundadas. Cuando se requiere obtener mayor cantidad de semilla, la autofecundación se realiza en toda la panoja o en la mayor parte de la ella, en caso de que la cantidad de semilla requerida no sea mayor, la autofecundación se realiza solo en pocos glomérulos (entre 8 a 10 glomérulos). En ambos casos, la identificación y el registro de las plantas autofecundadas es importante, los datos deben estar registrados en el libro de campo adoptando un sistema de registros adecuado y como también en campo mediante marbetes con anotaciones y símbolos pertinentes que permitan identificar la planta y el procedimiento del aislamiento

(el símbolo de una x encerrada en un círculo representa la autofecundación)
(Bonifacio 1996).

La autofecundación en toda la panoja requiere de un proceso de eliminación de algunas hojas y glomérulos axilares en la base de la panoja, posteriormente se aísla con una bolsa grande compatible con el tamaño de la panoja (15 x 25 cm). En este caso, es necesario colocar un tutor consistente en una varilla de madera o caña de bambú como soporte de la planta para evitar el tumbado de plantas como consecuencia de la mayor superficie de exposición al viento y la humedad del sobre (Mujica 2006). La autofecundación en un escaso número de glomérulos requiere de la eliminación de la mayor parte de la panoja hasta quedar con solo entre 8 y 10 glomérulos ubicadas en la base de la panoja, luego se procede al aislamiento cubriendo con un sobre de 10 x 15 cm. Se sugiere incluir en el sobre unas tres hojas para que proporcione humedad en el interior del sobre y evitar el desecamiento de las flores.

Las plantas aisladas durante el proceso de autofecundación, deben ser revisadas periódicamente por el ataque de enfermedades o presencia de insectos, frecuentemente los glomérulos aislados son preferidos por las larvas que consumen el grano en formación.

e). CRUZAMIENTO.

El cruzamiento es una instancia muy importante en los trabajos orientados al estudio de la herencia y en el mejoramiento genético. El cruzamiento es la vía más rápida para combinar los caracteres favorables presentes en progenitores diferentes y generar la variabilidad. El cruzamiento de la quinua

se puede realizar en invernadero o en campo. El cruzamiento en invernadero se realiza en plantas en maceta y en campo se realiza en el bloque de cruzamientos (crossing block) que es un sitio especialmente acondicionado para efectuar esta labor. El método de cruzamiento para la quinua ha sido desarrollado gradualmente con la participación de investigadores que ha dedicado sus esfuerzos para promover la investigación en los campos de la genética y mejoramiento de la quinua. Los trabajos relacionados con el desarrollo de la técnica de cruzamiento se encuentran reportados por reportes de investigadores en los que han participado Rea (1948), Gandarillas (1967 y 1979), Lescano y Palomino (1976), Bonifacio (1990 y 1995). En la presente sección se presenta la técnica de emásculación y polinización artificial consecutiva que incluye los procedimientos descritos por los autores citados y la experiencia lograda en los años de trabajo en el mejoramiento genético de la quinua.

El cruzamiento de la quinua es un procedimiento muy sencillo, pero por las características de la inflorescencia y el tamaño reducido de la flor, el trabajo se convierte en laborioso y a veces aburridor. El procedimiento consiste en varios pasos que son similares a los aplicados en arroz y sorgo, entre ellos la elección de los progenitores del cruce, preparación de la planta madre, emásculación, recolección de polen, polinización y aislamiento.

La selección de los progenitores se realiza en función a los objetivos del cruzamiento. El cruzamiento se realiza para estudios de la forma de herencia de caracteres y para el mejoramiento genético. El cruzamiento puede ser simple (A x B) o recíproco (A x B y B x A), requiriéndose en todos los casos de

uno o más marcadores morfológicos presentes en los progenitores. Los marcadores morfológicos son aquellos caracteres de herencia simple, siendo condición requerida para la planta madre llevar el carácter atribuible a alelos recesivo y para el progenitor paterno el carácter expresado por alelos dominantes. Los marcadores morfológicos útiles son los caracteres cualitativos expresados en la planta y también en el grano, siendo los más favorables los de la planta porque se pueden distinguir antes de la floración (Bonifacio 1988). Para la elección de las plantas, también es necesario considerar el vigor de los progenitores. El vigor de la planta madre debe ser adecuado para soportar la manipulación durante la emásculación y polinización consecutiva (10 a 14 días) y el vigor del progenitor paterno debe ser apropiado para soportar el manipuleo durante las colectas consecutivas de polen y proporcionar polen suficiente durante el período de cruzamiento. El vigor de las plantas progenitoras se puede determinar fácilmente mediante el grosor del tallo y la conformación robusta de la planta (Bonifacio 1990 y 1995).

El acondicionamiento de la planta madre consiste en la remoción o decapitación de la mayor parte de la inflorescencia y dejar solamente dos a tres glomérulos simétricamente localizados en la base de la panoja. En este proceso, se deben eliminar las hojas interglomerulares dejando solamente tres hojas distribuidas equidistantemente en la base de los dos o tres glomérulos elegidos. Una vez acondicionada la planta madre y antes de la emásculación, remover o eliminar las flores que han ingresado a la antesis o en proceso de apertura de las flores para reducir al mínimo la autofecundación o polinización cruzada no deseada. El acondicionamiento de la planta madre tiene la finalidad de proporcionar las condiciones apropiadas para las operaciones de

emásculación, polinización y el aislamiento de la planta involucrada en el cruzamiento. Cada planta preparada de esta forma debe llevar prendida el marbete con las anotaciones que identifiquen el cruzamiento, se debe especificar el orden cronológico del cruzamiento, los progenitores paterno y materno (registro, genotipo, ubicación en el bloque de cruzamiento, propósito de la cruce, la fecha y las iniciales del operador) (Bonifacio 1990 y 1995).

La emásculación es el proceso de remoción de las anteras que son los órganos masculinos de quinua, la remoción de anteras, no debe causar lesiones en el gineceo ni roturas en los sacos polínicos. Esto se consigue presionando con la punta de la aguja en la base de las tecas y removiendo las mismas de uno en uno y siguiendo la dirección en sentido circular, es decir en una dirección periférica al ovario. La emásculación consiste de varias sesiones, una por día y durante 10 a 14 días. En cada sesión se castran solamente las flores muy próximas a la antesis, lo cual deriva en la emásculación consecutiva mientras dure el período de floración de los glomérulos elegidos para el proceso. Las estructuras del gineceo y androceo si bien son pequeñas, estas son visibles a la vista y la emásculación puede ser efectuada sin mayores dificultades. La utilización de lentes de aumento frontales facilitan la emásculación sin causar mayores daños al estigma, al ovario y a la flor (Mujica *et al* 2006).

La recolección de polen se realiza en la planta padre elegida previamente y que necesariamente debe presentar algunas flores en antesis. La antesis en la quinua ocurre a partir de las 10 a 11 de la mañana y cuando la temperatura alcanza más o menos los 24° C. En condiciones de alta humedad relativa, días

nublados temperaturas próximas a 15° C, la antesis es mínima o nula. Cuando la planta se encuentre en estado adecuado, se procede a recolectar el polen inclinando la panoja sobre el vidrio de reloj y haciendo golpes suaves con los dedos, de esa forma se logra liberación de abundante polen sobre el vidrio de reloj. Posteriormente, el vidrio de reloj es llevado hasta la planta madre tomando precauciones para no perder el polen por efecto del viento. En este proceso, tanto el vidrio de reloj como las manos del operador deben estar desinfectados con algodón empapado en alcohol.

La polinización se realiza pasando varias veces el pincel impregnado con polen sobre las flores emásculadas y receptoras de la planta elegida como madre. La polinización se repite mientras dure la viabilidad de estigmas en los glomérulos en proceso de cruzamiento, esto puede ser cada día como dice Gandarillas (1979) o cada dos o tres en el período de receptividad de estigmas que es aproximadamente de 10 a 14 días para los tres glomérulos. Las flores femeninas receptoras se distinguen por los filamentos estigmáticos lozanos y ligeramente encrespadas, en cambio las prematuras tienen los filamentos poco elongados y gruesos en la base, las que presentan la receptividad pasada muestran filamentos delgados, muy encrespados y de apariencia marchitada. Por otra parte, la viabilidad del polen se distingue por la apariencia de polvo fino de color amarillento y que no presenta aglutinación, al contrario, el polen viejo se reconoce por la aglutinación del polen y la caída de los sacos polínicos junto con el polen, estos indicios muestran que los granos de polen han perdido la viabilidad (Mujica 2006).

El aislamiento se realiza utilizando sobre de papel delgado preferiblemente el tipo glassine que tiene una buena resistencia al manipuleo y a prueba de agua. A falta de sobres de este tipo se pueden utilizar bolsas de papel bond con pegamento insoluble en agua. El sobre de aislamiento se fija doblando la abertura de la bolsa circundante al tallo o eje de la inflorescencia y fijándolo con un clip para papel. Las plantas emásculadas deben permanecer aisladas durante todo el periodo que dure el trabajo de emásculación y los sobres deben llevar anotado los números de registro de la cruz

Considerando la dedicación de mayor tiempo a esta labor Bonifacio (1988) ha probado diferentes materiales de aislamiento orientados a evitar o reducir al mínimo la antesis, encontrando que las bolsas de papel color oscuro aceleran la floración acortando el período de cruzamiento y las bolsas impermeables (polietileno) retardan o inhiben la antesis. Particularmente el empleo de bolsas de polietileno resulta más ventajoso porque la alta humedad y mayor temperatura en el interior de la bolsa evitan la antesis y la elongación de los filamentos, lo cual facilita la emásculación que consiste en sacudir vigorosamente los glomérulos y luego polinizarlas, el proceso se repite día por medio mientras dure la floración de los glomérulos.

Finalmente, el cruzamiento aprovechando la androesterilidad genético o genético citoplásmico constituye una opción más sencilla. Sin embargo, este método requiere previamente el desarrollo de líneas androestériles y sus mantenedores, como también la incorporación del carácter a progenitores potenciales. En la medida en que sea posible encontrar material androestéril con características favorables para el mejoramiento, este carácter puede ser

aprovechado en el cruzamiento. El cruzamiento de la quinua con empleo de la androesterilidad consiste más o menos de los mismos pasos descritos anteriormente con excepción de la emásculación que no es necesario en este tipo de plantas. El proceso se inicia con la identificación de plantas androestériles, lo que es distinguible por las flores pequeñas y elongación de los filamentos estigmáticos; una vez identificada la planta, se procede a la preparación que consiste en remover las partes apicales de la inflorescencia que supuestamente ya están polinizadas por polen extraño, luego se aísla por un período de una semana, se revisa el estado de las flores y se retira las flores que están iniciando la formación de grano y finalmente se poliniza con polen recolectado del progenitor masculino. La polinización puede ser repetida por una segunda vez para asegurar la obtención de mayor cantidad de semilla. Ward y Johnson (1993), realizaron cruzamientos aprovechando la androesterilidad, el método consistió en ponerlas juntas la planta androestéril y la planta elegida como padre. Este método que es sencillo puede ser aplicable para trabajos en invernadero y para una o pocas cruces donde la contaminación de polen extraño puede ser controlado fácilmente.

f). LA ANDROESTERILIDAD:

La androesterilidad es un carácter presente en varias especies y su utilidad en el mejoramiento genético tiene varios propósitos. En las Quenopodiáceas del altiplano, el carácter de la androesterilidad se encuentra en la quinua (*Ghenopodium quinoa* Willd.) y en el kauchi (*Swaeda foliosa* Moq.). La androesterilidad en la quinua se presenta en forma natural, numerosas accesiones del germoplasma de quinua proveniente del altiplano Central y

Norte de Bolivia como también de la zona circunlacustre del Perú presentan este carácter. La herencia de la androesterilidad ha sido estudiada por varios autores, quienes han determinado que la androesterilidad está controlada por genes nucleares y factores del citoplasma. (Gandarillas 1969, Saravia 1991) y otros autores han estudiado la androesterilidad conocida como genético citoplásmico y su forma de herencia. Este mismo carácter ha sido estudiado por investigadores de otros países tales como Wilson (1971) Ward y Johnson (1991) y Ward (1993), quienes han confirmado la existencia natural del carácter y también la forma de herencia. Los factores del citoplasma son el N y S y los genes nucleares son el MsMs para la fertilidad y msms para la esterilidad.

Gandarillas (1969) y Ward (1993), han encontrado un grado considerable de vigor híbrido en las progenies de cruzas entre plantas androestériles y las fértiles; lo cual ha conducido a sugerir que puede ser un potencial para la producción de semilla híbrida como en el caso del sorgo. Por su parte, (Bonifacio 1995) ha reportado sobre el carácter mencionando que es muy útil para los cruzamientos intervarietales; interespecíficos e intergenéricos. Precisamente el citado autor ha obtenido híbridos intergenéricos empleando plantas androestériles.

La androesterilidad como un carácter de interés práctico en la producción de semilla híbrida es evidente, lo cual está reflejado inicialmente por Gandarillas (1969 y 1979) y Saravia (1991) y posteriormente, más patético con la patente otorgada a dos investigadores norteamericanos (Ward y Johnson) de la Universidad Estatal de Colorado; sin embargo, la patente ha sido

cuestionada por parte de productores e investigadores bolivianos como también por organizaciones protectoras de los derechos de indígenas. Actualmente, la patente ha sido abandonada y se encuentra sin vigencia.

2.2.1.6. Genética de Poblaciones

La genética de poblaciones estudia los procesos y mecanismos por medio de los cuales ocurre la evolución en las poblaciones naturales, entendido como el cambio en sus frecuencias alélicas a través del tiempo. Para esto, se determina cuánta variación genética existe en dichas poblaciones, cuál es el origen de dicha variación, cómo se mantiene y distribuye y cuál es su importancia evolutiva (Hartl y Clark 1989):

Los genetistas han elaborado modelos en donde los estudios evolutivos se enfocan a un locus con dos alelos, es así como nace la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), la cual no es más que un modelo que describe la relación que hay entre las frecuencias alélicas y genotípicas en un estado de equilibrio de un sólo locus, en una población diploide que se entrecruza aleatoriamente (Gillespie 1998).

De los supuestos anteriores se espera que las frecuencias alélicas (y por lo tanto, la composición genotípica) de la próxima generación sean exactamente iguales a las de una anterior es decir, que no exista evolución (Hartl y Clark 1997). Éste fenómeno es la implicación más importante del principio del EHW y se da gracias a la ausencia de las fuerzas evolutivas:

Existen cinco fuerzas evolutivas que intervienen en la genética de las poblaciones, las cuales son:

- a). Mutación:** son aquellas que dan origen a un nuevo alelo o a una nueva secuencia nucleotídica, generando una variación genética. Sin embargo, la magnitud de las tasas de mutación en la naturaleza es muy baja, haciendo a la mutación un mecanismo muy lento; se requieren miles de generaciones para obtener un pequeño cambio en las frecuencias alélicas (Eguiarte *et al* 2000).

- b). Deriva génica:** se da cuando las poblaciones naturales tiene un número reducido de individuos, ya que se presentan los llamados errores de muestreo: algunos individuos producen mayor número de hijos que otros, sin que la selección intervenga. Entre más pequeña es la población los errores de muestreo son más relevantes y con mayor rapidez cambian las frecuencias alélicas. Es por esto que la deriva génica promueve cambios en las frecuencias alélicas al azar y eventualmente promoverá la fijación de alguno de los alelos (Eguiarte *et al* 2000).

- c). Endogamia:** se presenta cuando los apareamientos no son al azar; sino que se cruzan con más frecuencia individuos con un grado de consanguinidad mayor al de dos individuos que se tomaran al azar en la población. En este proceso no cambian las frecuencias de los alelos, aunque sí cambia la de los genotipos; y por lo tanto aumenta la frecuencia de los homocigotos y se reduce la de los heterocigotos (Hartl y Clark 1989; Eguiarte *et al* 2000; Aguirre 2004).

d). Selección natural: es la supervivencia y reproducción de organismos diferentes es decir, se da gracias a que los diferentes genotipos no son igual de eficientes para dejar hijos. Esta eficiencia se interpreta en términos de adecuación, la cual es una medida que indica la eficiencia de un genotipo dado y señala cuántos hijos en promedio deja un portador de ese genotipo. Se considera que la selección natural actúa sobre un "locus" o potencialmente en otros que se encuentren en una región cercana (Eguiarte *et al* 2000; Aguirre 2004).

e). Migración o flujo génico: el flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra (Eguiarte *et al* 2000; Aguirre 2004).

2.2.1.7. Flujo genético

El flujo de genes (también conocido como la migración de genes) como ya se mencionó, es la transferencia de alelos de genes de una población a otra. La migración dentro o fuera de una población puede ser responsable de un marcado cambio en frecuencias de los alelos (la proporción de los miembros con una particular variante de un gen). También puede dar lugar a la adición de nuevas variantes al establecido genético de una especie o población (Eguiarte *et al* 2000).

Este proceso tiene fuertes efectos homogeneizadores entre distintas poblaciones; si continúa mucho tiempo, eventualmente las dos poblaciones serán idénticas. Asimismo; puede aumentar la variabilidad genética existente de una población en un momento dado, variación sobre la cual puede operar la selección natural y conducir a la adaptación. Por otro lado, pueden migrar

individuos con genes adaptados a otras condiciones y, en consecuencia, disminuir la adecuación promedio (adaptación) de la población a la cual llegan dichos genes (Eguiarte *et al* 2000).

Este flujo genético puede conducir de hecho a la pérdida de identidad genética de las poblaciones silvestres, a su extinción, o bien a la conversión o exacerbación en malas hierbas; especialmente los derivados de la hibridación de plantas cultivadas con sus parientes silvestres y la introgresión de alelos domésticos en las plantas salvajes (Ellstrand *et al* 2003). La hibridación es la formación de una población a partir del cruzamiento de dos taxa distintos; por ejemplo cebada y su progenitor silvestre *Hordeum vulgare* subsp. *Spontaneum*. Además la hibridación, puede llegar a ocasionar la extinción de los cultivos familiares o generar nuevas razas de malezas que son más agresivos y mejor adaptados a factores abióticos y bióticos (Ellstrand *et al* 1999).

La introgresión en cambio, es el movimiento de genes de una especie a otra mediante repetidos retrocruzamientos de los híbridos hacia una de sus especies progenitoras (Heiser, 1973). Igualmente ha demostrado ser un fenómeno generalizado en la mayoría de las especies, tanto especies alógamas como autógamias (Papa 2005).

El flujo de genes según Crawley *et al* (2001); puede tener dos consecuencias negativas: evolución de mayor capacidad de convertirse en malas hierbas o mayor probabilidad de extinción de los parientes silvestres. Estos procesos de migración, se pueden agrupar en dos categorías: 1) modelos simétrico; el cual asume el mismo tamaño en todas las subpoblaciones y rangos de simetría de migración por ejemplo, modelo isla

(Wright 1931). En general, estos modelos suponen que por cada subpoblación el número de individuos que migran dentro de las sub-poblaciones es igual al número de personas que emigran fuera de la subpoblación; 2) modelos asimétricos (por ejemplo, modelo continente-isla, Harrison 1991), donde ambos subpoblación tamaño y tasa de migración puede variar. Afecta drásticamente tanto a la diversidad genética total y a las frecuencias de los genes de toda la población, y puede llevar a la extinción de algunas subpoblaciones (Papa 2005).

Existen tres tipos de flujo genético; el primero es flujo genético por hibridación en las plantas, el segundo es flujo génico neutro y por último flujo genético desde plantas domesticadas a sus parientes silvestres (Ellstrand *et al* 1999).

2.2.1.8: Flujo genético por hibridación en las plantas

La hibridación es un mecanismo común, pero no ubicuo de evolución vegetal, de modo que quizá más del 70% de las especies de plantas pueden descender de híbridos. Para que se produzca hibridación se necesita la acción de varios factores: a) la polinización cruzada, para lo cual se requiere que ambas plantas estén en flor al mismo tiempo y lo suficientemente cercanas (como para permitir la acción del vector que transporta el polen); b) ser compatibles entre sí, para que el polen pueda germinar y lograr la fertilización. Frecuentemente los híbridos F1 (resultantes del eventual desarrollo de los embriones hasta que producen semillas y germinan) son fértiles, aunque no tanto como los parentales (Ellstrand *et al* 1999).

Muchos híbridos naturales no adolecen de menor capacidad biológica, llegando incluso a presentar mayor capacidad que los parentales. Ello significa que existen grandes probabilidades de introgresión, es decir, la incorporación de alelos de una especie o taxón en otro diferente (Ellstrand *et al* 1999).

2.2.1.9. Flujo génico neutro

En ausencia de flujo génico, la evolución de alelos neutros depende de procesos aleatorios (deriva génica), pero cuando hay flujo, se da un cruce entre poblaciones de cada generación, generando una diferenciación de alelos entre las poblaciones que se cruzan. Está interrelación es independiente del tamaño de las poblaciones receptoras involucradas (Ellstrand 1999).

Los cultivares de plantas domésticas normalmente contienen menos variación que las poblaciones de sus parientes silvestres, lo que puede indicar que los niveles de variación neutra en una población silvestre, bajo flujo génico; a menudo descenderán a los niveles de variación de su pariente domesticado (Ellstrand 1999).

2.2.1.10. Flujo genético desde plantas domesticadas a sus parientes Silvestres

La dispersión de los genes entre plantas cultivadas y plantas silvestres se da a través del polen, para lo cual requiere de la presencia de parientes sexualmente compatibles en las regiones donde las plantas son cultivadas (Simmonds 1995). A gran escala espacial, la probabilidad de flujo de genes en los cultivos depende de la distribución geográfica y de sus parientes silvestres;

tales simpatías son generalmente más frecuentes en el cultivo de los centros de origen y / o centros de diversidad (Simmonds 1995).

El flujo de genes espontáneo en los cultivos silvestres se determina por el período de floración y el grado de dispersión de polen. A pesar de ser escasos los datos experimentales sobre la comparación fenológica entre plantas domesticadas y silvestres esto sugiere que las poblaciones silvestres suelen mostrar un mayor rango en el tiempo de floración que los cultivados (Renno y Winkel 1996).

Algunos estudios disponibles Wilson y Kirkpatrick (19889; Klinger *et al* (1992); Arriola *et al* (1996), indican que el flujo de genes es la norma, más que la excepción. Por ejemplo, en el Reino Unido, una tercera parte de las 31 especies domesticadas evaluadas se hibridan espontáneamente con miembros de la flora local. En Holanda, la proporción es de un cuarto. Estas proporciones son muy altas, teniendo en cuenta de que estamos hablando de países relativamente pequeños en los que la mayoría de especies domésticas son de origen exótico (Ellstrand 1999).

A continuación, se muestra los casos significativos de plantas domesticadas que se hibridan “naturalmente” con ejemplares silvestres (Ellstrand 1999):

a). Trigo: las plantas de trigo domesticadas como el *Triticum aestivum* (trigo de panadería) y el *T. turgidum* ssp *turgidum* (trigo duro). Se forman intermediarios espontáneos entre *T. aestivum* cultivado y *T. aestivum* silvestre o *Aegilops* (Zemettra *et al* 1998). Se ha informado de híbridos en Cercano Oriente, África, Europa, Asia y Norteamérica, tanto con trigo de

panadería como con trigo duro; aunque son estériles (Zemettra *et al* 1998).

- b). Arroz:** los híbridos se forman con la subespecie silvestre *O. sativa spontanea*, así como con *O. nivara* y *O. rufipogon*. Las plantas intermedias normalmente aparecen como invasores híbridos (Langevin *et al* 1990). En el caso de *O. glaberrima*, se forman híbridos en África Occidental con parientes silvestres simpátricos, que son malas hierbas pertenecientes a la misma especie, así como con *O. barthii* y *O. longistamina*. Las tasas espontáneas de hibridación son altas: desde el 1 al 52% (Langevin *et al* 1990).

La hibridación natural con arroz cultivado parece haber sido la causa de la casi extinción del arroz taiwanés *Oryza rufipogon formosana*, cuyos cultivares han ido adquiriendo con el tiempo caracteres propios de la especie silvestre, al tiempo que han ido disminuyendo su fertilidad. Esto parece estar afectando igualmente otras subespecies a lo largo de toda Asia (Langevin *et al* 1990).

- c). Maíz:** las plantas de maíz (*Zea mays mays*) forma híbridos con sus parientes silvestres teosinte (*Z. mays mexicana*) dentro y cerca de los maizales de Centroamérica, aunque parece que la introgresión a los teosintes (incluyendo *Z. luxurians*; *Z. diploperennis*) no es muy alta. De hecho, existen poderosas barreras reproductivas entre el maíz y algunos taxones silvestres (Doebley 1990).

- d). Soja:** en China y Corea se dan plantas intermedias entre la soja cultivada (*Glycine max*) y *G. soja*. La especie *G. gracilis* parece un híbrido estabilizado, interfértil con los dos anteriores.
- e): Cebada:** en el cercano Oriente, la cebada (*Hordeum vulgare*) forma intermedios con su pariente silvestre *H. spontaneum*. Estos datos indican que las cosechas son generalmente cruces con sus progenitores directos.
- f): Quinoa:** se detectó en quinoa *Chenopodium* (Wilson y Manhart 1993); que cerca del 30% de la progenie de la especie *Chenopodium berlandieri* que crecía en contacto espacial con *Chenopodium quinoa* en el estado de Washington, US (región donde la quinoa fue introducida), generaban genotipos híbridos ocurriendo en forma espontánea. Estos autores explican que esta tasa de flujo genético es alta considerando que se traten de especies alógamas facultativas, y predicen con una alta probabilidad el hecho de que estas poblaciones híbridas, parcialmente fértiles, puedan introgresar genes en las poblaciones naturales. También señalan que una dinámica similar podría estar ocurriendo en la región andina, ya que es frecuente observar, la presencia de quinuas silvestres en los campos de quinoa cultivada.

2.2.1.11. Herramientas Moleculares

En la actualidad la tecnología molecular se ha convertido en la herramienta ideal para estudios muy diversos en varios ámbitos de la biodiversidad, de la conservación y de la genética poblacional y evolutiva de todo tipo de organismos. Los avances en esta área se dan a una gran velocidad, tanto en

las técnicas de obtención de los datos de ADN, como en su análisis. Las diferentes herramientas moleculares disponibles como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); marcadores moleculares y secuenciación de ADN, generan información muy valiosa para el análisis poblacional y evolutivo (Becerra *et al* 1999).

Estas técnicas varían de acuerdo al tipo de datos que ellas generan, a los niveles taxonómicos a los cuales estas pueden ser aplicadas, y a sus requerimientos técnicos y financieros (Karp *et al* 1997).

2.2.1.12: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en Cadena de la Polimerasa, es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza secuencias de uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos); cada uno de los cuales involucra: desnaturalización, hibridación y extensión. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Morganre *et al* 1993).

La ADN polimerasa es una enzima que cataliza la síntesis de ADN a partir de desoxirribonucleotidos y de una molécula de ADN plantilla o molde. Tras la acción de la ADN polimerasa, y una vez que se han eliminado y añadido alrededor de unas 10 bases; interviene la enzima ADN ligasa que une los extremos libres del fragmento recién formados con el resto de la cadena,

recuperando así el ADN su estructura normal. Los protocolos básicos de PCR constan de los siguientes pasos fundamentales (Narváez 2008):

- a). Desnaturalización:** Se realiza a temperaturas elevadas (usualmente 94°C), con el objetivo de separar las dos cadenas o fibras del DNA y de esta manera proveer del molde de simple cadena a ser replicado por la polimerasa. Durante el primer ciclo se prolonga más (2-5 minutos aproximadamente para garantizar que DNAs complejos se desnaturalicen completamente) y en los ciclos siguientes tiene una duración menor, pudiendo ser desde 15 segundos a 2 minutos (Narváez 2008):

- b). Hibridación (annealing):** Garantiza el alineamiento de los cebadores con las cadenas de ADN que se desean amplificar. La temperatura del ciclo inicial se disminuye de 15 a 25 grados. Usualmente las temperaturas que se emplean están entre 40 y 60°C; desde 15 seg. a 1 min., aproximadamente (Narváez 2008) .

- c). Polimerización, síntesis o extensión:** Se realiza por la acción de la polimerasa y la temperatura variará con la enzima empleada. La más usada es los métodos de rutina es la *Taq* polimerasa; que trabaja mejor alrededor de los 75 °C (por ser esa la temperatura del hábitat donde la bacteria que la produce fue descubierta), por lo que este paso se desarrolla en el rango de los 72–75°C durante 1-3 minutos y 5-10 minutos durante el último ciclo. La cantidad de ciclos que se realiza es variable, encontrándose generalmente entre 20 y 40. Los productos de amplificación pueden después ser analizados por su talla; cantidad; secuencia; etc.; o ser empleados en experimentos posteriores (Narváez 2008).

2.2.1.13. Importancia de Marcadores Moleculares

La definición de la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) por parte de Watson y Crick en los años '50, abrió todo un mundo de nuevas posibilidades científicas para el conocimiento y mejor aprovechamiento de plantas, animales y microorganismos, contribuyendo en gran parte a lo que se ha dado en llamar, la revolución biotecnológica (Phillips - Mora, 1998). Cada molécula de ácido desoxirribonucleico consiste en una doble hélice formada a partir de dos hebras complementarias de nucleótidos; emparejadas mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases G-C y A-T (Alberts *et al* 1996).

Ahora es posible conocer el contenido genético del ADN mediante el uso de marcadores moleculares los cuales se han convertido en herramientas para identificar características que están relacionadas con resistencia a enfermedades, producción, calidad, etc. Su uso frecuente en la agricultura ha sido útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de cultivos de importancia económica así también como para la caracterización e identificación de genotipos (Phillips - Mora 1998). A mediados de la década de los 60's los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual como enanismo, deficiencia clorofílica, color de pétalos o morfología foliar. Los marcadores morfológicos contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Sin embargo, el pequeño número de marcadores morfológicos distintos en un mismo linaje reducía la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre estos marcadores y caracteres de importancia económica a través del estudio de poblaciones segregantes. La revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos los cuales se definen como un grupo de múltiples formas moleculares de una misma enzima presentes en una especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificado para cada una de las enzimas (Montaldo 1991).

Con la llegada de las técnicas modernas de biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. Inicialmente la utilización de enzimas de restricción permitió el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de ADN o técnica mejor conocida como RFLP. Luego se desarrolló el proceso de amplificación en cadena utilizando una ADN polimerasa o técnica de PCR (Reacción de cadena de la polimerasa). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la amplificación de ADN al azar (RAPD's), fragmentos polimórficos de ADN amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otros (Becerra y Paredes 2000):

Uno de los aspectos fundamentales de la revolución causada por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue la posibilidad de generar grandes cantidades de ADN de segmentos específicos del genoma, los cuales pueden ser detectados fácilmente a simple vista por medio de una electroforesis utilizando para ello primers o secuencias cortas arbitrarias de

oligonucleótidos para dirigir la reacción de amplificación (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Los marcadores moleculares se han utilizado o se pueden utilizar en los siguientes aspectos de la mejora de plantas: estimación de la distancia genética entre poblaciones; variedades; líneas puras e híbridos; identificación y distinción de variedades e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el registro de variedades protegidas de cada país; establecimiento de relaciones de parentesco entre líneas de variedades para realizar estudios genéticos; localización e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños que afectan caracteres cuantitativos (los así llamados QTLs) (Ferreira y Grattapaglia 1998).

En el área de los recursos genéticos los marcadores moleculares han provisto de información relevante en áreas claves de la conservación y caracterización de germoplasma (Otero *et al* 1997).

Las ventajas de los marcadores moleculares es que son fenotípicamente neutros, pues no son afectados por el medio ambiente, se pueden evaluar un número indeterminado de ellos, se puede analizar toda la planta o parte de ella, pueden ser evaluados desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo y aparentemente no muestran epistasis (Phillips-Mora *et al* 1995).

De acuerdo con Otero *et al* (1997), la rápida identificación de la extensión de la variación genética dentro y entre poblaciones usando marcadores moleculares, es de valor para las actividades de conservación genética y para el desarrollo de poblaciones mejoradas. La desventaja que hoy en día tiene el

uso de los marcadores moleculares en estudios de germoplasma y diversidad genética es el alto costo de los reactivos y los equipos que se utilizan para llevar a cabo las reacciones; equipos que no siempre están a disposición de todos los laboratorios de los países en desarrollo

2.2.1.14. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN que se consideran marcas o puntos de referencia para el análisis del genoma, representan cualquier característica química o molecular medible; que es heredada según un modelo mendeliano (Phillips 1998).

Actualmente existen un sinnúmero de marcadores moleculares. Si bien la tecnología se inició con la utilización de marcadores basados en proteínas (isoenzimas, aloenzimas) a partir de la posibilidad de aislar ADN se implementó la técnica de RFLP (Restriction fragment length polymorphism), sin embargo esa técnica implicaba un mayor nivel técnico y de infraestructura. A partir de la implementación de la técnica de PCR se facilitó el desarrollo y uso de los diversos tipos de marcadores moleculares, otro factor que ayudó a este desarrollo fue la factibilidad de utilizar métodos de tinción no-radioactivos para la visualización de los fragmentos (Delgado 2006).

Los marcadores pueden diferenciarse en anónimos, es decir aquellos que no requieren de información previa sobre la secuencia y los dependientes de la secuencia. Entre los anónimos se incluyen: RAPD (random amplified polymorphic DNA), ISSR (Inter simple sequence repeats), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), y otros. Entre el segundo grupo están los microsatélites o SSR (simple sequence repeats), GAPS (Gleaved amplified

polymorphic sequence), SCAR (Sequence characterized amplified region), SNP (Single nucleotide polymorphism). Los polimorfismos en los cuales se basan estos marcadores son únicos para cada tipo y deben ser considerados al momento de entender cada uno de las técnicas. La existencia de polimorfismos en las poblaciones es de gran importancia para el estudio de procesos biológicos en la ecología evolutiva y la sistemática (Narváez 2008).

Para esto, un marcador molecular debe reunir ciertas características tales como: alto grado de polimorfismo; herencia codominante; distribución frecuente y uniforme en todo el genoma, facilidad de estudio, rapidez en los resultados, y costo de desarrollo bajo o proporcional a la cantidad de información reunida. Además, debe poseer un nivel de reproducibilidad adecuado para comparar resultados entre distintos laboratorios. Desafortunadamente, no existe un único marcador que cumpla con estas características, por lo cual es necesario probar diferentes técnicas para aprovechar sus características específicas (Chalhoub *et al* 1997).

2.2.1.15. Marcadores moleculares como herramienta para la selección.

El mejoramiento clásico de plantas ha logrado importantes avances en la obtención de variedades mejoradas para garantizar la producción de alimentos para el hombre y materias primas para la industria. Este trabajo de centenares de fitomejoradores ha representado el esfuerzo personal de los investigadores y el apoyo de instituciones gubernamentales y privados. Sin embargo; en los últimos años, los requerimientos de los productores y consumidores son cada vez más exigentes lo que implica la adopción de nuevas técnicas de mejoramiento con apoyo de la tecnología desarrollada en el campo de la

biología y la genética. El desarrollo de la tecnología molecular ha registrado avances espectaculares. Actualmente, los geneticistas moleculares han logrado desarrollar técnicas aplicadas a la caracterización y selección del material genético. Los marcadores moleculares aplicados indirecta o directamente al mejoramiento de plantas son RFLP, RAPD, AFLP y SSR (Andersen y Fairbanks 1990; Powell *et al* 1996; Cregan *et al* 1999).

En lo que se refiere al mejoramiento de la quinua, se han realizado trabajos iniciales con marcadores bioquímicos y moleculares. Entre los reportes sobre la utilización de isozimas en las quenopodiáceas se cita a Wilson (1988), Terrence y Walters (1988) y otros para la caracterización de material genético con propósitos de establecer las relaciones filogenéticas de las especies del género *Chenopodium*. Por otra parte, Bonifacio (1995), empleó los marcadores RAPD para identificar la condición híbrida de las progenies provenientes de cruza interespecíficas e intergenéricas y Ruas *et al* (1999), en base a marcadores RAPD que reportaron la relación genética de la quinua silvestre y cultivada.

La aplicación de las técnicas moleculares ofrece perspectivas para la aplicación de las técnicas de selección asistida por marcadores moleculares, pero para ello previamente es necesario buscar los marcadores ligados a caracteres de interés y construir los mapas genéticos como en otros cultivos como la soya y otros (Cregan *et al* 1999). Otro aspecto es la transferencia de genes de resistencia presente en especies silvestres, tal es el caso de *Suaeda foliosa* que es resistente a heladas y salinidad del suelo.

2.2.1.16. Estudios moleculares en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)

Hasta la fecha, sólo unos pocos investigadores han informado de la elaboración y el uso de marcadores moleculares, para tener información completa sobre diversidad y variabilidad genética en el cultivo de la quinua, entre estos tenemos a Wilson (1988), quien utilizó marcadores aloenzimáticos para confirmar la diferencia genéticos entre eco-tipos de quinua del altiplano y de la costa. Fairbanks *et al* (1990), usó la electroforesis de proteínas en semillas para la caracterización de germoplasma en quinua. Ruas *et al* (1999), empleó marcadores RAPD's, para detectar polimorfismo entre cultivares y malezas de quinua. Maughan *et al* (2004), generó el primer mapa genético de la quinua, principalmente sobre la base de marcadores AFLPs. Mason *et al* (2005), realizó un estudio sobre el desarrollo y uso de microsatélites. Rojas *et al* (2007), realizó un estudio sobre la diversidad genética de la colección boliviana de quinua utilizando marcadores microsatélites. Sin embargo, no se ha documentado información molecular sobre el flujo genético entre la quinua cultivada y sus poblaciones silvestres, en la región andina por lo que nuestra investigación es de carácter preliminar.

2.2.1.17. Marcador Genético

Cualquier característica física o molecular heredada que difiere entre individuos y que puede ser detectado fácilmente (Moreno 1999).

2.2.1.18. Tipos de Marcadores Genéticos

1. Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos son controlados por un solo locus; éstos pueden ser usados como marcadores genéticos si sus expresiones son reproducibles sobre un rango aceptable en el medio ambiente (Staub 1996). La posibilidad de usar marcadores morfológicos como una ayuda en la selección de caracteres cualitativos y cuantitativos en plantas fue sugerida hace ya más de 70 años. A lo largo de la historia de la mejora de plantas, se han hecho intentos para seleccionar caracteres con utilidad agronómica utilizando marcadores morfológicos (denominados también alelos mutantes en contraposición al alelo normal). De hecho, se han observado asociaciones entre los caracteres seleccionados y determinados marcadores morfológicos (Moreno 1999):

2. Marcadores bioquímicos

a) Proteínas de almacenaje

En la actualidad existen diversos métodos analíticos para el estudio de las proteínas de almacenaje tales como: centrifugación, cromatografía (HPLC), análisis de aminoácidos y electroforesis. Dentro de ellas, la electroforesis ha sido desarrollada de diferentes formas, tales como: geles de almidón de una dimensión; poliacrilamida (PAGE; con o sin SDS), punto isoelectrico (IEF= y poliacrilamida de dos dimensiones. Entre estas formas, la de mayor uso en estudios de diversidad ha sido la electroforesis en poliacrilamida vertical (PAGE- SDS) por presentar una buena resolución de las proteínas (Paredes y

Gepts 1995). Hay tres factores fundamentales que afectan la movilidad de una proteína bajo condiciones de electroforesis:

La carga de la proteína; que determina en esta la dirección de la migración y que influye directamente en su velocidad de movilidad. Las proteínas son electrolitos débiles y su ionización está muy afectada por el pH del medio que las rodea. La carga de la proteína en solución se puede controlar usando diferentes sistemas buffer (Paredes y Gepts 1995).

La fuerza del campo eléctrico, que afecta directamente la movilidad y Las fuerzas de fricción, las cuales se oponen a la migración (Paredes y Gepts 1995).

La matriz o soporte en el que se realiza la electroforesis es generalmente un gel de poliacrilamida. El soporte tridimensional de los geles de poliacrilamida consta de polímeros de acrilamida entrecruzados a manera de red por un segundo agente, generalmente el denominado bis (N,N – metilen – bisacrilamida).

La electroforesis en geles de poliacrilamida y empleando SDS (dodecil sulfato de sodio) es la mas usada cuando se analizan proteínas de una mezcla, su abundancia relativa y la medida de su peso molecular. El SDS es un detergente aniónico que reacciona con las proteínas antes de la electroforesis; después de esa reacción, la proteína adopta una carga negativa uniforme y una estructura alargada. El complejo SDS-proteína es soluble; y bajo condiciones de electroforesis viajará a través del gel de poliacrilamida hacia el ánodo (Roca 1993).

El uso de las proteínas de almacenaje en sistemática y diversidad genética se basa en el hecho que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies; son homólogas y que al tener movilidad en un gel producirán bandas similares o diferentes en intensidad y grosor al ser teñidas. Estas bandas, como patrones representan características discretas, producto casi directo del gen (Becerra 1999):

Estudios genéticos han demostrado que los patrones son heredados en forma simple y codominante, observándose en algunos casos un efecto materno. El número de genes que controlan estas características es reducido y varía de acuerdo a la especie. Sin embargo, la base molecular de los distintos patrones electroforéticos puede ser compleja e incluir: sustituciones nucleotídicas; inserciones, pérdidas y o modificaciones pre y post traduccionales. Hasta ahora ha sido difícil relacionar los cambios fenotípicos de los patrones de bandas con el tipo de cambio (Becerra 1999).

Como marcadores bioquímicos, las proteínas se han caracterizado por permitir detectar un nivel de polimorfismo aceptable, poseer una baja influencia del ambiente sobre el patrón electroforético; aunque sean reportadas algunas excepciones, y por ser un método simple que permite un análisis rápido de decenas de muestras a un bajo costo comparado con otras técnicas (Becerra 1999):

b) Isoenzimas

Con el avance tecnológico ocurrido en los años 70; el uso de geles de almidón y el teñido histoquímica de las proteínas, se demostró la existencia de formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan la misma

reacción. El efecto de una sustitución alélica es detectado con certeza sobre el fenotipo, debido a la sensibilidad de movilidad electroforética. Esta ventaja hizo que la técnica haya revolucionado los estudios de evolución genética en diversas especies (Toledo 2000).

Muchas de las proteínas obtenidas de los extractos crudos de semillas o de tejidos son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas específicas. Una vez separadas estas enzimas por medio de la electroforesis, se puede localizar una enzima específica colocando el gel en una bandeja que contenga el sustrato, junto con cofactores y colorantes adecuados. Los productos de esta reacción enzimática reaccionan a su vez con la solución de tinción formando complejos coloreados; éstos dan lugar a una banda visible en el sitio donde se halla dentro del gel. El conjunto de bandas generadas en la tinción se denomina zimograma (Roca 1993).

Se dice que una proteína; una isoenzima o un fragmento de restricción de ADN es un marcador de clasificación cuando presenta variaciones electroforéticas (polimorfismo) en los materiales de la especie analizada. Para seleccionar las isoenzimas que podrían usarse como marcadores de clasificación, se hará primero un rastreo de todas las isoenzimas que se puedan teñir en todos los tejidos posibles; luego se seleccionan los marcadores que muestren mayor polimorfismo y el tejido donde mejor se presenten. Cuando se utiliza un marcador isoenzimático para caracterizar materiales dentro de una colección, no es necesario el conocimiento genético de la misma. Cuando se trata, en cambio, de estudios de ligamento de marcadores isoenzimáticos o de ADN con ciertas características de interés

agronómico, se requiere conocer muy bien la genética de los marcadores (Roca 1993).

Para estos estudios se han utilizado varias estructuras de la planta, tales como hojas, raíces o botones florales, de las cuales se obtiene un extracto crudo protéico. La técnica consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable (almidón, etc.) bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de un teñido histoquímico. La separación se realiza mediante carga eléctrica neta, peso molecular, punto isoeléctrico y o combinación de estos criterios (separación multidimensional) (Roca 1993).

De este modo se separan enzimas codificadas por genes diferentes o productos de diferentes alelos de un mismo gen.

Las principales ventajas de las isoenzimas incluyen la simplicidad, mínima cantidad de material en estudio, costo bajo y una cobertura del genoma de 10-20 loci por especie. Además estas proteínas están libres de epistásis e influencias ambientales (Roca 1993).

Genéticamente su expresión alélica es de tipo codominante ; lo que permite establecer comparaciones entre especies, poblaciones de una misma especie y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes (Paredes y Gepts 1995):

Entre las desventajas se incluye un nivel bajo de polimorfismo al presentar pocos alelos por locus, especialmente cuando la base genética es estrecha. Para aumentar la eficiencia de la técnica ante este factor, deben ser

identificados los estados de desarrollo de la planta el cual la proteína es estable (Rodríguez y Col 1999; Paredes y Gepts 1995).

Las isoenzimas, no obstante sus aplicaciones biológicas, tienen limitaciones cuando se evalúan materiales muy cercanos genéticamente. Las principales causas de estas limitaciones son: Las isoenzimas representan sólo una pequeña porción de todo el genoma de la planta. La técnica de tinción de isoenzimas no detecta las siguientes especies proteicas: Las enzimas que están por debajo de los límites de su detección; las proteínas estructurales; las enzimas que están presentes en el extracto pero no pueden detectarse porque aún se desconoce la forma de teñir sus productos y las enzimas que intervienen en muchas vías metabólicas, y que aún se desconocen. Las isoenzimas están influenciadas por la edad de la planta, ya que los genes que codifican para ellas sólo se expresan en estadios específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos (Roca 1993).

Los marcadores genéticos descritos hasta el momento (morfológicos; proteínas e isoenzimas) tienen una desventaja: son regulados a través del desarrollo; es decir, sólo serían expresados fenotípicamente en estados específicos del desarrollo y en órganos o tejidos específicos. Además, los caracteres morfológicos pueden tener efectos pleiotrópicos en características agronómicas de interés (Becerra 1999).

3: Marcador molecular

Secuencia de ADN que permite identificar o diferenciar individuos y capaz de ser detectado, pueden ser genes, segmentos de genes de ADN de función desconocida. Son transmitidos de forma mendeliana y generan patrones

polimórficos y monomórficos. Los marcadores moleculares pueden ser expresados como regiones de ADN que puede ser codificante (gen) o no codificantes (Moreno 1999).

Los marcadores moleculares se pueden utilizar en los siguientes aspectos de la genética de plantas como la estimación de distancias genéticas entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos. Esto permite: a) la clasificación taxonómica de ecotipos o muestras que acceden a los Bancos de Germoplasma como un complemento de los datos morfológicos; y b) la asignación de líneas puras a grupos heteróticos con objeto de predecir el valor de los híbridos resultantes del cruce.

Identificación y distinción de variedades, líneas puras e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el Registro de Variedades Protegidas: Los marcadores de ADN permiten además una distinción más precisa de genotipos que los “descriptores” morfológicos requeridos hoy día. Sin embargo; estos marcadores no han sido todavía adoptados por los organismos oficiales encargados de la protección de variedades (Moreno 1999).

Localización e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños afectando a caracteres cuantitativos (QTL): El polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas; pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores tales como: RFLP, RAPD, AFLP, mini y microsatélites, entre otros (Moreno 1999).

4. AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”)

Los AFLPs (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) es una técnica reciente que permite la obtención de un gran número de marcadores moleculares en genomas procarióticos y eucarióticos. Los AFLPs combinan especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con velocidad y practicidad por medio de la PCR. Esta técnica desde su desarrollo ha sido utilizada con diversos fines, tales como mapeo genético localizado y construcciones de mapas genéticos; principalmente en especies de plantas cultivadas con una baja tasa de polimorfismo de ADN (Ferreira y Grattapaglia 1998).

a): Principio del método

En esta técnica se combinan los principios de los RFLPs y PCR; donde una sub muestra de fragmentos producidos por la restricción del ADN bajo estudio son amplificados selectivamente en cascada. Los AFLPs usan como primer o iniciadores oligonucleótidos complementarios a secuencias que han sido ligadas a cada extremo del ADN analizado. El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos y son normalmente de herencia dominante (Vos 1995):

Con esta técnica se puede detectar una variación considerable del genoma, lo cual se refleja en el número de productos amplificados con una sola combinación de partidores. La eficiencia en detectar polimorfismo pueden ser varias veces mayor que la obtenida con RAPDs y RFLPs. Esta metodología ha sido ampliamente usada en diversas especies para medir diversidad genética (Vos 1995).

b). Etapas del análisis del AFLP

En la primera etapa el ADN genómico es cortado con dos enzimas de restricción, para lo cual se usa una enzima de corte raro que reconoce de 6 a 8 pares de base, combinado con una enzima de corte frecuente que reconocen cuatro pares de bases generándose tres clases de fragmentos. Fragmentos grandes resultantes de la digestión por la enzima de corte raro en ambos extremos, fragmentos pequeños resultantes de la digestión de la enzima de corte frecuente en ambos extremos; fragmentos de tamaños intermedios generados por la combinación de las enzimas de corte frecuente y de corte raro (Vos 1995)..

En la segunda etapa se realiza la unión de los adaptadores específicos (20 a 30 pares de bases) que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con la enzima de restricción (Vos 1995)..

En la tercera etapa se seleccionan aquellos fragmentos que serán amplificados, para lo cual se emplea primer o iniciadores específicos de 20 a 25 nucleótidos complementarios a la secuencia a los adaptadores que contienen además .de 1 a 3 nucleótidos adicionales de forma aleatoria. La acción selectiva de los fragmentos se realiza primeramente realizando una amplificación preselectiva para lo cual se emplean primer que poseen 1 nucleótido adicional; lo cual permitirá que uno de cada 16 fragmentos sea amplificado, luego se realiza una amplificación selectiva a partir de los fragmentos obtenidos en la amplificación preselectiva; en este caso, los primer contienen 2 nucleótidos arbitrarios de forma adicional, con lo cual se logra una

selección de mayor intensidad. Así, solo uno de cada 43 x 43, es decir uno de cada 4096 fragmentos existentes serán amplificados (Vos 1995).

En la cuarta y última etapa, los fragmentos amplificados obtenidos de la amplificación selectiva serán visualizados en geles de alta resolución; para ello, en esta última etapa se realiza un marcaje radioactivo (Ferreira y Grattapaglia 1998):

En la actualidad, se viene empleando la visualización de las bandas a partir de la tinción con nitrato de plata, lo que da resultados comparables a los obtenidos con radioactividad.

c): Ventajas de la técnica

Entre las ventajas que ofrece esta técnica tenemos: Presenta un gran poder de detección de variabilidad genética, explorando simultáneamente el polimorfismo en los sitios de restricción como en los ensayos RFLP y la amplificación de las secuencias arbitrarias como en la técnica RAPD. Se incrementa la especificidad de la amplificación debido a que se emplea primers de mayor tamaño comparados a los empleados por los RAPDs (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Los AFLPs, en una sola reacción, permiten identificar alrededor de 50 loci (Breyne 1999).

Los loci de AFLPs son tan reproducibles como los RFLPs, pues son prácticamente insensibles a las condiciones de la reacción, aunque ambas

técnicas si requieren de una buena calidad de ADN para el proceso de restricción. Comparativamente, ambas técnicas son de mayor precisión que los RAPDs; que a veces son sensibles a una falta de estandarización en el proceso de amplificación (Becerra 1999).

d). Desventajas de la técnica

La desventaja que presentan los AFLPs es que ofrecen poca información genética, siendo marcadores dominantes. También, la técnica requiere de un mayor número de etapas en el análisis; así como de una mayor cantidad de reactivos y de un mayor equipamiento en Biología Molecular, así como de un buen adiestramiento en la realización de este tipo de análisis. Además, un ADN de baja calidad puede contener fragmentos adicionales no cortados con la enzima de restricción, dando un falso análisis (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Una de las desventajas para la interpretación de los datos es que el tiempo de análisis se alarga cuando se realiza en forma no automatizada (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Ventajas y desventajas de los principales marcadores moleculares

CUADRO 2

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

Característica	Proteína	Isoenzima	RFLP	RAPD	VNTR	SSR	AFLP
Polimorfismo	Alto	Bajo	Medio-alto	Medio-alto	Medio-alto	Medio-alto	Muy alto
Estabilidad Ambiental	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Número de loci	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Muy alto
Reproducibilidad	Alta	Moderada alta	alta	Moderada alta	Alta	Alta	Alta
Aplicación	Rápida-barata	Rápida-barata	Lenta-cara	Rápida-car	Intermedia	Lenta-clara	Rápida-clara

Fuente: Becerra y Paredes, 1999.

2.2.1.19. Análisis de Información

Los datos resultantes a partir de la aplicación de los marcadores moleculares pueden ser evaluados como unidades taxonómicas para encontrar las diferencias y afinidades correspondientes. Los pasos elementales comunes en la mayor parte de las técnicas numéricas, se mencionan a continuación en orden estricto que no puede ser alterado sin destruir la racionalidad del proceso clasificativo (Crisci y López 1983):

Elección de los organismos a evaluar y definición de las unidades a clasificar llamadas **Unidades Taxonómicas Operativas (OTU)**.

Elección de caracteres que contribuirán a las OTU:

Construcción de una matriz básica de datos (MBD) para cada OTU con su correspondiente estado en el carácter. Obtención de un coeficiente de similitud para cada pareja posible de OTU en base a la MBD, utilizando un coeficiente en base a los datos que contiene. Construcción de una matriz de similitud OTU por OTU con los coeficientes calculados en el paso anterior.

Conformación de grupos en base a la matriz de similitud y empleando distintas técnicas, con la obtención final de la estructura taxonómica del grupo analizado: Generalizaciones acerca de los taxones, tales como elección de caracteres discriminatorios, relación entre organismos, inferencias acerca de los taxones, etc (Crisci y López 1983):

2.2.1.20. Elección de las Unidades Taxonómicas Operativas, (OTU)

Consiste en elegir los caracteres a clasificar (OTU): El investigador puede tener una gran variedad de caracteres (individuos, poblaciones, especies, etc), cuya elección dependerá de la estrategia y objetivos del trabajo. La única regla general en esta elección es que cada una de las OTU sean internamente lo más homogéneas posibles. De acuerdo a su número, se recomienda usar tantas como se necesitan de acuerdo a las circunstancias del trabajo (Crisci y López 1983):

2.2.1.21. Elección de caracteres

Se define como carácter a cualquier propiedad que varía en las OTU que se están evaluando. En los posibles caracteres que se pueden presentar se consideran su estado. Existe una lista muy grande de caracteres que puede haber; ya sean estos de orden morfológico, fisiológico, químico, ecológico, geográfico, genético, etc. No existe un consenso en cuanto al número de caracteres que deben ser evaluados. El número de caracteres posibles es casi ilimitado. Algunos autores señalan como 50 al número mínimo a utilizar, sin embargo; es esto una afirmación intuitiva (Crisci y López 1983).

2.2.1.22. Datos del tipo doble estado y su codificación

Son aquellos datos que solo presentan dos estados (datos binarios o predicados dicotómicos), pudiendo indicar presencia/ausencia o estados excluyentes. Numéricamente, se expresan como 1 (presencia) y 0 (ausencia), pudiendo ser expresados además como + (presencia) y - (ausencia) o cualquier otra forma convencional (Crisci y López 1983).

2.2.1.23 Matriz básica de datos

Los datos analizados se presentan en tablas denominadas matriz básica de datos (MBD), la cual es una matriz $n \times t$, donde la n columnas representan los caracteres y las t filas representan las OTU. La alternativa contraria también es válida. Es necesario, además, tener un símbolo para datos no obtenibles, éstos son descartados finalmente durante el procesamiento de los datos (Crisci y López 1983).

2.2.1.24. Obtención del coeficiente de similitud

Aplicando un coeficiente de similitud, es posible cuantificar el parecido o similitud entre dos OTU, calculando ya sea similitudes o diferencias respecto a cada par posible de OTU de una matriz básica de datos. Existen tres grandes grupos: los coeficientes de distancia, de correlación y de asociación. Los dos primeros grupos se utilizan para datos multiestado, mientras que los coeficientes de asociación miden las coincidencias y diferencias en los estados de caracteres entre dos OTU y exigen datos de tipo doble estado (presencia/ausencia), tal como es el caso de las técnicas moleculares como RAPD y AFLP (Crisci y López 1983).

Cuando se quiere comparar dos OTU para un carácter doble estado se tienen cuatro posibilidades:

A: presencia en los genotipos

B: presencia en el genotipo 1 y ausencia en el genotipo 2

C: ausencia en el genotipo 1 y presencia en genotipo 2

D: ausencia del carácter en ambos genotipos

CUADRO 3

COMPARACION ENTRE DOS OTU (Unidades Taxonómicas Operativas)

Comparación entre dos OTU		OTU	
		1	0
OTU	1	A	B
	0	C	D

Fuente: Crisci y López, 1983

2.2.1.25. Matriz de similitud

Luego del cálculo de todas las asociaciones de todos los pares posibles de OTUs con el coeficiente de similitud, estos resultados son ordenados en forma tabular para constituir la matriz de similitud.

Las OTU ocuparán tanto las filas como las columnas, siguiendo el mismo orden en ambas; de esta manera, se logra comparar cada OTU consigo misma y con las demás OTUs . Así estructurada la matriz, cada valor de la diagonal principal (S11, S22,S33.....Sn) representa a cada OTU comparada consigo misma : Este valor corresponde al de máxima similitud; que es igual a 1 (Crisci y López 1983).

2.2.1.26. Análisis de agrupamiento

Franco - Hidalgo (2003); señalan que las técnicas más utilizadas son el análisis de agrupamiento (clúster analysis) y el método de ordenación (Ordenation). El análisis de ordenamiento comprende técnicas de agrupamiento que, siguiendo reglas más o menos arbitrarias, forman grupos de OTUs que se asocian por su grado de similitud. Entre las técnicas de agrupamiento tenemos:

- Técnicas Exclusivas: Originan grupos donde las OTU son exclusivas del grupo del cual forman parte y no pueden pertenecer a otro grupo que se halle en un mismo rango o nivel.
- Técnicas Jerárquicas: Originan conjuntos que presentan rangos; en los cuales las OTUs o grupos de OTUs subsidiarios forman parte de un grupo mayor o inclusivo.
- Técnicas Aglomerativas: Son las que partiendo de n OTUs separadas; las agrupan en sucesivos conjuntos, siempre en número menor que n para llegar más fácilmente a un solo conjunto que contiene a las n unidades.
- Técnicas secuenciales: Cada grupo es formado uno por vez hasta que se agota el conjunto total.

La incorporación de nuevos OTUs o núcleos (formados por dos OTUs) o grupos existentes (formados por conjuntos con mas de dos OTUs), se puede realizar de tres maneras distintas denominados:

Ligamento simple: Las OTUs se incorporan a núcleos o grupos ya establecidos, tomando en cuenta que el valor de la similitud entre la OTU candidata y el grupo o núcleo es igual a la similitud entre el candidato y la OTU integrante del núcleo o grupo más parecido a ella (de mayor valor de similitud).

Ligamento completo: En este caso, se considera que el valor de similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a la similitud entre el candidato y la OTU integrante del grupo o núcleo mas parecido a él (de mayor valor de similitud) (Franco – Hidalgo 2003).

Ligamento Promedio: Aquí se considera que el valor de similitud entre la OTU a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo, la más utilizada es la media aritmética no ponderada UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average).

1.3.8. Representación gráfica del análisis de agrupamiento. La estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente de varias formas; siendo la más utilizada el dendograma, que es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTUs o grupo de OTUs (Franco – Hidalgo 2003):

2.3. Métodos estadísticos multivariados aplicados a biología molecular:

El origen del análisis multivariado se remonta a los comienzos del siglo XX; con Pearson y Sperman, época en la cual se empezaron a introducir los conceptos de la estadística moderna. En términos generales, el análisis

multivariado se refiere a todos aquellos métodos estadísticos que analizan simultáneamente medidas múltiples (más de dos variables) de cada individuo.

En sentido estricto; son una extensión de los análisis univariados (análisis de distribución) y bivariados (clasificaciones cruzadas, correlación, análisis de varianza y regresiones simples) que se consideran como tal si todas las variables son aleatorias y están interrelacionadas (Franco e Hidalgo 2003): Los métodos estadísticos multivariados más utilizados en estudios biotecnológicos son las distancias genéticas, los coeficientes de similitud, dendogramas y conglomerados:

Los coeficientes de similitud se recomiendan para comparar accesiones cuyas características son evaluadas en una escala nominal o de datos de doble estado (presencia o ausencia) de las características medidas. Los valores que se obtienen de los coeficientes de similitud varían entre uno (1) y cero (0); siendo el valor 1 el de máxima similitud y el valor 0 el de mínima. Entre los índices más usados se tienen 'Simple Matching Coefficient' (SMC), Jaccard (CAJ), Rogers y Tanimoto (RT), y Dice o Sorensen (SD). Las distancias genéticas representan la similitud como la proximidad de las variables o accesiones con respecto a las demás. Son en realidad medidas de diferencias donde los valores elevados indican una menor similitud (Franco – Hidalgo 2003):

Los análisis de conglomerados proveen al investigador de agrupaciones naturales de un conjunto de individuos, razas o variedades. Colocan conjuntos de individuos en grupos exhaustivos y mutuamente excluyentes; de tal forma que se puedan hacer inferencias estadísticas de semejanza o diferencias en

los grupos y entre los grupos provistos por el análisis. En los dendogramas visualmente se reconocen primero los grandes grupos, es decir los que se han originados a niveles bajos de similitud; luego se analizan dichos grupos separándolos en subgrupos, conjuntos y subconjuntos hasta llegar a los núcleos que representan la máxima similitud hallada en los individuos que se estudian (Franco – Hidalgo 2003).

En el análisis de componentes principales las variables originales definen un espacio euclideo en las cuales la similitud entre ellas es medida como una distancia euclidea. Los resultados de este análisis se grafican sobre ejes ortogonales que representan los componentes principales y que delimitan un espacio bi o tridimensional en donde los individuos se sitúan dentro del espacio delimitado por las componentes según los valores de sus coordenadas con respecto a estas (Franco – Hidalgo 2003).

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. DISEÑO METODOLOGICO

3.1.1. Ámbito de estudio

3.1.1.1. Fase de campo

La colecta del material vegetal (semilla) de las variedades nativas y las accesiones de quinua para el banco de germoplasma se realizó en las diferentes localidades y provincias donde existe mayor población de estas; los mismos que son cultivadas en forma permanente en la región de Puno, mientras que el material vegetal de los parientes silvestres, fueron colectadas las hojas tiernas; conforme al protocolo de colecta del material vegetal; luego fue enviada al laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina – Lima.

En los cuadros que se presenta; tenemos las variedades nativas; accesiones y parientes silvestres.

CUADRO 4**LUGARES DE COLECCIÓN DE LAS ACCESIONES DE QUINUA (SEMILLA)
PARA EL BANCO DE GERMOPLASMA REGION PUNO 2009-2012**

N°	CODIGO	DESCRIPCION	PROVINCIA	LONGITUD	LATITUD
01	03-20-001	Pomata – Lampa Grande	Chucuito-Juli	16 19 90	69 17 25
02	03-20-006	Pomata – Lampa Grande	Chucuito-Juli	16 19 90	69 17 25
03	03-08-036	Ilave – Challacollo	El Collao	16 08 32	69 34 56
04	03-20-044	Pomata – Batalla	Chucuito-Juli	16 18 44	69 15 82
05	03-20-050	Ilave – Quetty	El Collao	16 10 79	69 41 07
06	03-08-017	Ilave – Siraya	El Collao	16 11 28	69 41 31
07	03-20-049	Ilave – Quetty	El Collao	16 10 79	69 41 07
08	03-20-061	Ilave – Quetty	El Collao	16 10 79	69 41 07
09	03-20-064	Pomata – Ampatiri	Chucuito-Juli	16 18 38	69 15 13
10	03-20-086	Juli – Pomata	Chucuito-Juli	16 16 83	69 29 29
11	03-20-103	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
12	03-08-101	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
13	03-20-102	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
14	03-20-104	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
15	03-20-106	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
16	03-20-108	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
17	03-20-129	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
18	03-20-149	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
19	03-20-165	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38

20	03-20-168	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
21	03-20-192	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
22	03-20-203	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
23	03-20-216	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
24	03-20-214	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
25	03-20-228	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
26	03-20-230	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
27	03-08-231	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
28	03-20-223	Puno Selección Masal	Puno	15 57 48	69 51 38
29	03-20-241	Culta – Acora	Puno	16 01 16	69 44 10
30	03-20-267	Culta – Acora	Puno	16 01 16	69 44 10
31	03-20-252	Culta – Acora	Puno	16 01 16	69 44 10
32	03-20-293	Ayaviri	Melgar	14 52 47	70 35 97
33	03-20-301	Ayaviri	Melgar	14 50 17	70 35 07
34	03-20-320	Ayaviri	Melgar	14 55 39	70 32 15
35	03-20-321	Culta – Acora	Puno	16 01 11	69 44 10
36	03-20-284	Ayaviri	Melgar	14 51 04	70 45 49

Fuente: Elaboración propia 2009-2012

3.1.1.2 Fase de laboratorio

La caracterización molecular se realizó en los laboratorios de la unidad de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina – Lima

El laboratorio de Biotecnología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT), cuenta con sala de extracción, sala de preparación de medios, sala de gases; sala de PCR; sala de electroforesis vertical y sala de genotipaje y sala de autoclavado.

a). Material vegetal

El material vegetal (semilla y partes vegetativas) utilizado proviene del departamento de Puno, en total se analizaron 68 cultivares, de las cuales 13 son variedades nativas y 10 son parientes silvestres; 36 accesiones del banco germoplasma y 9 accesiones no identificadas (lugares de recolección). Y se seguirán el siguiente procedimiento:

- 1: Las semillas de las variedades nativas y accesiones del Banco de Germoplasma de la Facultad de Ciencias Agrarias U.N.A. Puno fueron germinadas en el invernadero de IBT de UNALM, hasta que se desarrollen los primeros primordios foliares (8 hojas verdaderas) para la extracción de ADN
2. Los parientes silvestres, fueron colectadas de diferentes localidades y enviadas al laboratorio IBT de UNALM, tabla 9, fueron colectadas las plantas en estado verde y se tomaron las muestras las hojas apicales; según el protocolo.

b). Colecta de germoplasma

La colecta de germoplasma de semilla de quinua se realizó desde los años 1978, almacenadas en el Banco de Germoplasma de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno; estas vienen siendo refrescadas cada 4 a 5 años; para diferentes este trabajo de Investigación.

Para localizar las plantas dentro de los lotes de 13 variedades nativas fue necesaria la colaboración de gente nativa, agricultores y de técnicos de la zona, los 10 especies de parientes silvestres, se muestrearon aquellos ubicados a los bordes del camino, orillas del lago y áreas de rotación de cultivos:

Se colectaron hojas jóvenes de 05 plantas seleccionadas aleatoriamente por lote, las mismas que fueron mantenidas en 25 gr de sílica gel con el fin de evitar la degradación del material genético. Se seleccionó las hojas que no presentaban síntomas de enfermedad (manchas amarillas o negras); Las muestras recolectadas fueron etiquetadas con las iniciales de las localidades, el número del lote y el número de individuo por ejemplo: HCC1-Carnosolum; significa código, nombre de accesión y lugar de recolección.

c. Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación corresponde a una investigación aplicada por tener propósitos prácticos inmediatos bien definidos, es decir se investiga para actuar, transformar, modificar o producir cambios en un determinado sector de la realidad. Así mismo corresponde a un diseño transversal descriptivo correlacional/causal toda vez que la investigación se realizó sin manipular

deliberadamente las variables de la presente investigación: Universo, población y muestra

3.2. Metodología

3.2.1. Germinación de las semillas

Se sembraron las accesiones debidamente identificadas, en las macetas correspondientes con sustrato desinfectado (90% de compost y 10% de arena). Estas macetas permanecieron en el tinglado con mallas antiáfidos.

3.2.2. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizaron hojas jóvenes de las accesiones a estudiar. El ADN fue extraído por el método CTAB según los protocolos (Doyle y Doyle 1990).

3.2.3. Determinación de calidad y concentración de ADN

Se preparó previamente una dilución 1:10 de 1 μ l de ADN con 9 μ l de tampón de carga (Blue juice), esta mezcla luego se corrió en geles de agarosa al 1%.

La estimación de la concentración de las muestras se realizó haciendo la comparación de la intensidad de banda de ADN con la primera banda del estándar de ADN Lambda (λ) digerida con la enzima de restricción *Pst* I. El cual se encontraba a una concentración de 280 ng/ μ l, cuya banda de más alto peso molecular es de 14800 pb.

Para la determinación de la calidad del ADN se observó que ninguna de las bandas presente indicios de degradación.

3.2.4. Técnica de AFLP

La técnica usada para detectar los marcadores AFLP se realizó según el manual de Protocolos de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT). Esta metodología constó de 4 pasos importantes según el método desarrollado por Vos *et al* (1995). En este estudio se utilizó el “kit” AFLP Core Reagent (INVITROGEN) con ligeras modificaciones para ADN genómico de plantas como se describe a continuación.

3.2.5. Digestión del ADN genómico.

Para este paso la calidad de ADN fue un factor crítico en la obtención de marcadores AFLP confiables, debiendo ser este de buena calidad, no degradado, sin contaminantes, ni inhibidores.

Para la digestión se preparó una solución conteniendo ADN genómico, agua libre de nucleasas, buffer de reacción 10X, albúmina de suero bovino (BSA); enzimas *Mse* I y *Eco* RI en las cantidades necesarias:

Posteriormente la reacción se incubó a 37°C toda la noche (over night) y para inactivar las endonucleasas de restricción, las muestras se incubaron a 65°C por 15 minutos obteniéndose el ADN digerido, y con el fin de detener la reacción las muestras fueron colocadas en hielo. Se verificó el proceso de digestión tomando 5 µl de la muestra en un gel de agarosa al 1%. Donde se observó un arrastre de color tenue a lo largo de la corrida.

3.2.6. Ligación de Adaptadores

A los fragmentos producidos después de la digestión del ADN se le agregaron componentes del master mix (MMx) para llevar a cabo la ligación de los adaptadores complementarios a los cortes de cada una de las enzimas de restricción. Para lo cual se preparó una solución conteniendo ADN digerido, T4 ADN ligasa, buffer de reacción, adaptador *Mse* I, adaptador *Eco* RI y agua destilada (H₂O_{dd}) libre de nucleasas, posteriormente la solución se incubó a temperatura ambiente (20°C) over night. El ADN digerido y ligado se almacenó a -20°C, para posteriormente realizar la pre-amplificación.

Finalizado este procedimiento, se realizó una dilución 1:5 de la mezcla digestión/ligación con solución buffer T₁₀E_{0.1} tomando 4 µl y 16 µl respectivamente.

3.2.7: Reacción de Pre-Amplificación (+1/+1)

Se preparó el master mix (MMx) en tubos eppendorf de 0.2 ml, con los componentes mencionados en el anexo 6 manteniendo cada componente sobre hielo para mantener la estabilidad de los mismos. A 20 µl del MMx se adicionó 5 µl de ADN ligado (del paso anterior). Los cuales fueron dispensados en placas de policarbonato PCR de 96 pocillos (MJ Research) mezclados suavemente para luego cubrir con 25 - 30 µl de aceite mineral a cada muestra.

La reacción de pre-amplificación de PCR se realizó en el termociclador (GeneAmp PCR System 9700), el cual se programó con las condiciones de temperatura y tiempo que se muestra a continuación.

CUADRO 5

PROGRAMA DE PRE – AMPLIFICACION

PROGRAMA DE PRE - AMPLIFICACION			
Temperatura (°C)	Tiempo		Ciclos
72	2	Minutos	1
94	30	Segundos	24
56	60	Segundos	
72	60	Segundos	
4	∞	Segundos	Fin de programa

Fuente: Elaboración propia 2012

3.2.8. Amplificación Selectiva (+3/+3)

Para esta reacción se utilizaron 8 combinaciones de primers específicos conteniendo 3 nucleótidos adicionales en sus extremos 3' para amplificar un número menor y específico de fragmentos de ADN:

Se preparó una solución de master mix (MMx) conteniendo agua destilada (H₂Odd) libre de nucleasas, Buffer 10X, d NTPs, *Eco* + 3 - *Mse* + 3, Taq "R" manteniendo cada componente sobre hielo para mantener la estabilidad de los mismos, el MMx previamente mezclado luego se dispensó en las placas de policarbonato PCR de 96 pocillos (MJ Research): Luego se añadió a cada pocillo el ADN pre-amplificado.

Previamente al realizar la reacción de amplificación PCR se añadió 25 - 30 μ l de aceite mineral a cada muestra, la PCR se realizó en el termociclador

(GeneAmp PCR System 9700) el cual se programó con las condiciones de temperatura y tiempo que se muestra a continuación.

CUADRO 6

PROGRAMA DE AMPLIFICACION SELECTIVA - AFLP

Programa de AMPLIFICACION SELECTIVA - AFLP			
Temperatura (°C)		Tiempo	Ciclos
94	4	Minutos	1
94	20	Segundos	1
65	30	Segundos.	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	1
64	30	Segundos	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	1
63	30	Segundos	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	1
62	30	Segundos	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	1
61	30	Segundos	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	1
60	30	Segundos	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	1
59	30	Segundos	
72	2	Minutos	

94	20	Segundos	1
58	30	Segundos	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	1
57	30	Segundos	
72	2	Minutos	
94	20	Segundos	20
56	30	Segundos	
72	2	Minutos	
60	30	Minutos	1
10	∞		Fin del programa

Fuente: Elaboración propia 2012

3.2.9. Selección de combinaciones de iniciadores

El "kit" AFLP Gore Reagent (INVITROGEN) empleado en este estudio permite realizar 64 combinaciones posibles de iniciadores con 3 nucleótidos adicionales tanto para *Eco* RI como para *Mse* I. Se realizó un ensayo (screening) con 12 combinaciones de iniciadores, en 8 individuos (genotipos) escogidos al azar. Se eligieron las cuatro mejores combinaciones, por presentar buena resolución de bandas, buen nivel de polimorfismo y reproducibilidad. La secuencia de los iniciadores se muestra en la cuadro 7.

CUADRO 7

SECUENCIA DE LOS INICIADORES DE MUESTRA

<i>EcoRI</i> -ATG	/	<i>MseI</i> -CTG	[E45 M42]
<i>EcoRI</i> -ATG	/	<i>MseI</i> -AGG	[E45 M41]
<i>EcoRI</i> -AG	/	<i>MseI</i> -AGC	[E13 M40]
<i>EcoRI</i> -ACT	/	<i>MseI</i> -AGG	[E38 M41]

Fuente: Elaboración propia 2012

3.2.10. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los productos de la amplificación selectiva (+3/+3) se separaron con un equipo de electroforesis vertical en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y 0.4 mm de espesor, siguiendo el protocolo sugerido por Bio-Rad con algunas modificaciones, que se describen en el protocolo. Los patrones de bandas obtenidos fueron analizados por visualización directa mediante el método de tinción con nitrato de plata.

3.2.11. Tinción y revelado de geles de poliacrilamida

La tinción y revelado de los geles de poliacrilamida se realizó basándose en los protocolos de Laboratorio CIMMYT (Laboratorio de Genética Molecular Aplicada – 3ra Edición):

3.2.12. Escaneado y lectura (escoreo) de bandas

Se leyeron las bandas con mejor resolución y se enumeraron consecutivamente empezando desde el primer individuo del primer carril. Una

vez hecha la lectura de las bandas, cada gel fue escaneado para almacenar su patrón de bandas.

Los diferentes fragmentos fueron visualizados y analizados a su vez para realizar el scoreo empleando el Software Paint Shop Pro 5.01 (Jasc Corporate; MN; USA)

3.2.13. Análisis Estadístico

3.2.13.1. Registro de datos

Se creó un registro de datos conteniendo los scoreos, cada banda de ADN se consideró como un locus individual, con dos posibles alelos: presencia de la banda (1) y a la ausencia (0); para cada fragmento de interés generado por cada primers usado. Mientras que a las bandas de presencia dudosa o faltante se le asignaron el valor de (9). Se asume que el patrón de las bandas muestra dominancia, es decir, la presencia de la banda representa el genotipo homocigótico dominante y heterocigótico, y la ausencia corresponde al genotipo recesivo. Todos los datos fueron ingresados a una tabla u hoja de cálculo Microsoft Excel 2003, siendo las filas los loci AFLP y las columnas las entradas de Quinoa.

3.2.13.2. Determinación del índice de contenido polimórfico

Se determinó el índice de contenido polimórfico (PIC) para cada marcador. Los PIC fueron sumados para marcador AFLP generado obteniéndose el Índice de iniciador AFLP, con la siguiente fórmula (Señor *et. al* 1998; Ghislain 1999):

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 = 1 - p^2 - q^2$$

3.2.13.3. Análisis de similitud

Para el análisis de datos se ingresaron éstos a una matriz binomial; la que fue usada para calcular valores de similitud genética entre cada par de genotipos usando los coeficientes de Simple Matching, icluídos en el paquete estadístico NTSYS pc versión 2.00 (Applied Biostatistics Inc.; Setauket; Nueva Cork, EE.UU). Los análisis con los coeficientes de similitud genética fueron corridos usando el módulo SIMQUAL, obteniéndose una matriz de similitud genética para cada coeficiente.

3.2.13.4. Análisis de Agrupamiento

En base a las matriz de similitud que fue obtenida del análisis de similitud con cada uno de los coeficientes usados anteriormente se prepararon los dendogramas, que se realizaron según el algoritmo UPGMA (*Unweigthed Pair-Group Method using Arithmetic Averages*), dentro del módulo SAHN del programa NTSYS-pc versión 2.00 (Applied Biostatistics Inc.; Setauket, Nueva York, EE. UU.).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Caracterización mediante métodos moleculares de las variedades nativas y sus parientes silvestres de quinua, utilizando el sistema AFLP

Las variedades nativas de quinua caracterizadas mediante métodos moleculares utilizando el sistema AFLP, se muestran en la Cuadro 8, clasificadas según su código, la provincia del cual procede y la ubicación de la longitud y la latitud:

En la actualidad las variedades nativas, es decir las más utilizadas y mas comerciales en la producción por el poblador antio andino de la región, no se tiene caracterizado genéticamente, si embargo existe avance de los trabajos de caracterización morfológica y agronomica, los resultados del presente trabajo reforzaran esta caracterización, faltando a ella la caracterización bioquímica, lo cual permitirá identificar a plenitud las diferentes variedades existentes en nuestra región de Puno; de ahí la importancia del presente trabajo de investigacion.

CUADRO 8

VARIETADES NATIVAS DE QUINUA, MAS CULTIVADAS REGION PUNO

N°	Código	Descripción	Provincia	Longitud	Latitud
1	1001	Chullpi	Azángaro	14 51 01	70 17 43
2	1002	Toledo	Puno	15 57 90	69 49 91
3	1003	Huallata	Melgar	14 52 75	70 28 28
4	1004	Pasankalla	Puno	15 56 00	69 51 98
5	1005	Negro Collana	San Román	15 39 87	70 21 47
6	1006	Rosada Frutilla	Puno	15 56 77	69 51 25
7	1007	Salcedo INIA	Puno	15 52 16	70 00 46
8	1009	Choclito	Azángaro	14 52 65	70 06 98
9	1010	Wariponcho	Lampa	15 37 78	70 20 19
10	1011	Kancolla	Yunguyo	16 26 89	69 03 92
11	1012	Airampo	Chucuito - Juli	16 13 92	69 29 39
12	1013	Puca kello	Azángaro	14 48 75	70 21 34
13	1014	Antahuara	Puno	15 57 73	69 1 17

Fuente: Elaboración propia 2009 - 2011

La técnica de AFLP, es un método eficiente para la caracterización molecular, que permite identificar las diferentes variedades y accesiones un cultivo en estudio, como en este caso el cultivo de quinua entre las variedades nativas y sus parientes silvestres.

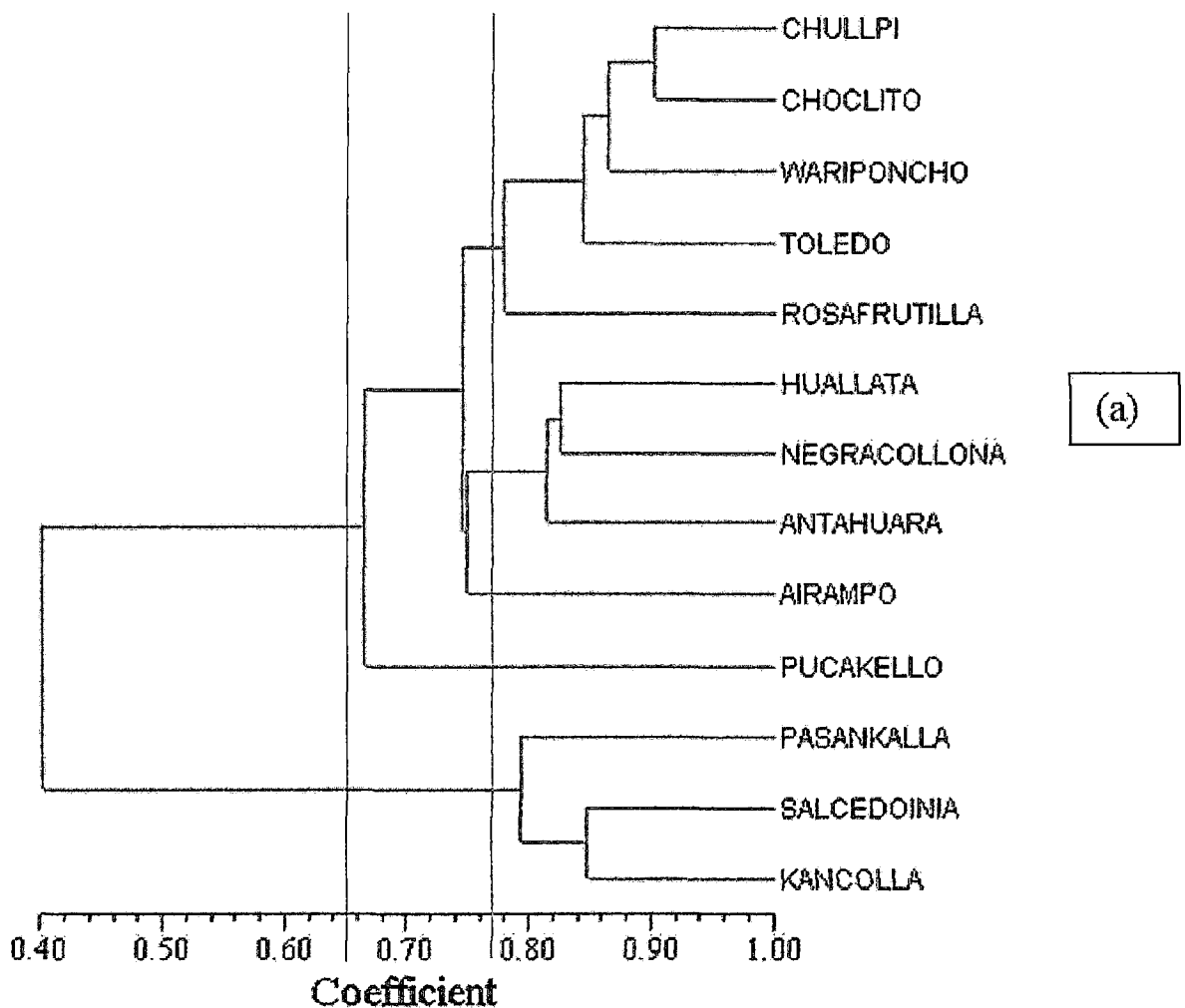


Figura 1: Dendrograma que agrupa a 13 variedades nativas de quinua según los marcadores AFLP 2012.

En la Figura 1; se muestra el dendrograma obtenido del análisis de las 13 muestras de quinua cultivadas, y que a un coeficiente de similitud de 0,65 se forman dos clusters. El primer cluster estuvo conformado por las variedades nativas: Ghullpi; Ghoclito; Wariponcho; Toledo; Rosa Frutilla; Huallata, Negra Collona, Antahuara, Airampo y Pucakello y el segundo cluster fue constituido por las variedades nativas: Pasankalla, Salcedo INIA y Kancolla.

Mientras que a un coeficiente de similitud de 0,77 se llegan a formar 5 clusters, el primero está formado por 5 variedades nativas: Chullpi, Choclito, Wariponcho; Toledo y Rosa Frutilla; el segundo cluster está formado por 3: Huallata, Negra Collona y Antahuara; el tercer cluster está conformado por la única variedad Airampo, igual que el cuarto clúster está formado la variedad nativa Pucakello; y el quinto cluster está constituido por 3 variedades nativas: Pasankalla, Salcedo INIA y Kancolla.

Costa Tártara *et al* (2009), Utilizando la técnica de Microsatélites, y a una distancia promedio de 0,86, encontraron 5 clusters, el primero que se diferencia agrupó a las poblaciones procedentes de los valles orientales del NOA; luego se observan dos pequeños grupos formados por las poblaciones procedentes de la costa del Lago Titicaca, Altiplano Norte (Perú), Ecuador y las de la zona de transición entre el valle y la quebrada del NOA. El siguiente grupo reúne las poblaciones procedentes del sur de Chile y el cluster superior agrupa las poblaciones de quebrada y altiplano del NOA uniéndose a éstas últimas las poblaciones de quinua tipo Real. Estos resultados de agrupaciones, coinciden con lo reportado por (Christensen *et al* (2007) respecto al agrupamiento de las poblaciones del Altiplano, las cuales fueron separadas entre las quinuas del norte y las del sur y del agrupamiento del germoplasma del sur de Chile y su mayor cercanía genética a las poblaciones del Altiplano.

Del Castillo *et al* (2012); afirman que la quinua muestra gran variación genética, tanto molecular como morfológica, cuya organización sigue poco

conocida, a pesar de ello obtuvieron resultados que la varianza morfo – fenológica se concentra en niveles de población y familia, cuando los rasgos relacionados con la producción de biomasa muestran alta variación inter – individual. Sin embargo estos investigadores concluyen afirmando que las implicancias agroecológicas de los resultados son discutibles y que la comparación de clasificaciones fenotípica y molecular sugiere que no hay erosión genética en las poblaciones muestreadas, lo cual contradicen a lo mencionado por Costa Tártara *et al* (2009), Costa Tártara *et al* (2012) y Christensen *et al* (2007), quienes afirman que el medio ambiente es un factor influyente.

Del Castillo *et al* (2012), clasifica a las quinuas evaluadas, en los grupos A, cuando proceden del altiplano norte a menos de 4000 msnm de altitud y B corresponden a poblaciones del valle inter – andino; mientras que a las poblaciones del grupo C, las sitúan en el altiplano sur o en el norte a más de 4000 m de altura. La variación genética de las plantas cultivadas contribuye a la estabilidad de la producción agrícola, permitiendo: a) elegir variedades adaptadas a condiciones ambientales y b) guiar el mejoramiento genético hacia variedades tolerantes a la sequía, la salinidad, o el frío. Pero a nivel de parcela, la variación entre plantas se considera generalmente como desfavorable para la producción. Esta variación intra – población parece, sin embargo, adaptada a las variaciones imprevisibles del clima (Winkel *et al* 2009):

Existe entonces una discrepancia respecto al interés agronómico de la variabilidad genética intra – varietal. Aunque preferentemente autógama, la

quinua muestra una notable variación genética inter e intra – población, fácilmente observable en parcelas campesinas, y cuantificable por marcadores moleculares (Del Castillo *et al* 2007). En cuanto a los marcadores morfológicos; los estudios sobre la diversidad genética de la quinua incluyen: sobre los patrones de la diversidad genética en los Andes (Risi y Galway 1989), sobre la herencia del color de granos y de hojas (Bonifacio 1992); sobre las clasificaciones campesinas de cultivares (Canahua Murillo *et al* 2004), y sobre los rasgos morfológicos y de calidad de varios *Chenopodium* recientemente introducidos en la India (Bhargava *et al* 2007). Pero ninguno de estos estudios buscó explicar la distribución de la variación genética entre los varios niveles de organización de la especie: poblaciones de varias ecoregiones, familias de una población y finalmente, individuos dentro de las familias (Castillo *et al* 2012).

Carvajal Rodríguez *et al* (2005), concluyen afirmando que los rasgos morfo – fenológicos, cuantitativos, y sensibles al medio ambiente, permiten evidenciar las relaciones entre limitaciones ambientales, rasgos de vida, y capacidades de adaptación de las poblaciones. Mientras que Del Castillo *et al* (2012), muestran una estructura poblacional en estos rasgos, lo que justifica su uso como descriptores de poblaciones. A pesar de las discrepancias, las clasificaciones molecular y fenotípica revelan una estructuración geográfica de las poblaciones que, en el caso de los marcadores morfo – fenológicos, separa las quinuas de los sectores más limitantes para la agricultura (altiplano sur y zonas frías del altiplano norte) de aquellas cultivadas en zonas más templadas del lago Titicaca o de los valles inter – andinos.

Adicionando, Del Castillo *et al* (2012), afirma que la variación intra – población de estos rasgos también muestra estructura, con una variación inter – familias predominantes; lo que sugiere una elevada herencia. Al contrario, rasgos relacionados con la producción de biomasa (panojas y granos en particular); presentan una fuerte variabilidad inter – individual y son sensibles a cambios ambientales. Una elevada variación intra – población en los rasgos cuantitativos indica una presión selectiva poco intensa, posible resultado de una importante varianza ambiental. Este argumento parece válido en el caso del altiplano boliviano, donde el clima tiene un papel mayor en la variabilidad ambiental. De hecho, éstos investigadores observaron una gran variación fenotípica entre las poblaciones de quinua procedentes de las regiones templadas pero sujetas a sequías y heladas eventuales, mientras que las restantes poblaciones de sectores constantemente áridos y fríos mostraron menor variación intra – población. La diferenciación de las poblaciones de quinua en el altiplano boliviano estaría así ampliamente determinada por la selección bajo factores ambientales, en particular climáticos, y por la variabilidad local de los mismos.

En cuanto a biodiversidad; la quinua tiene una gran variabilidad genética y; según Nieto (1986), no es posible hablar de variedades puras, sino más bien, de poblaciones seleccionadas que presentan cierto grado de pureza y uniformidad. Las flores en esta especie pueden ser hermafroditas, pistiladas o androestériles, lo cual indica que puede tener hábito autógeno y halógeno; pero en general, la quinua se considera una especie autógena, ya que el porcentaje de polinización cruzada natural no sobrepasa el 10% (Mujica 1997 citado por Cortés y Rubiano 2007).

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. A la fecha no se ha podido cuantificar la existencia de la erosión genética en quinua, puesto que para ello se requiere de presupuesto y una planificación adecuada para poder realizar el muestreo correspondiente de las localidades y realizar la cuantificación comparativa de los genotipos existentes en la recolección inicial y la recolección objeto del muestreo (FAO 1996).

Fuentes *et al* (2009), luego de realizar la revisión de los aspectos relacionados con la diversidad genética y el uso de una de las especies de mayor importancia en Los Andes de Sudamérica (*Chenopodium quinoa* Willd. y sus parientes silvestres del género *Chenopodium*), revelan grandes desafíos para los científicos y mejoradores de la quinua; relacionándose por una parte al fomento de iniciativas que tengan por objetivo ampliar y mantener colecciones de germoplasma *in situ* y *ex situ* de quinua y sus parientes silvestres; como también aumentar la caracterización de estos recursos a fin de contribuir a nuevos programas de mejoramiento genético y a revelar el poder real de las actuales colecciones de germoplasma. Para ello, plantean también la necesidad de completar la clasificación taxonómica incompleta del género *Chenopodium*; a fin de maximizar la capacidad de almacenamiento y uso de la diversidad genética en bancos de germoplasma y programas de mejoramiento.

La morfología variada que presenta esta especie en las principales áreas de cultivo, ha significado que los agricultores andinos hayan aprovechado sus formas para hacer uso de ella como alimento. Por ejemplo se puede observar en los campos de cultivo de quinua, una amplia variedad de colores en plantas y semillas; o diferencias en los tipos de ramificación y/o arquitectura general de plantas, al mismo tiempo se puede observar una variada productividad de grano asociada a estas formas. En este sentido, el uso de este recurso genético ha implicado que los fitomejoradores estudien la variación de estas características morfológicas y otros parámetros genéticos para el entendimiento de cómo éstas variables se asocian con caracteres de interés; tales como la producción de grano, contenido de saponina en los granos, tolerancia al frío y/o resistencia a las enfermedades (Fuentes *et al* 2009).

Debido a la existencia de adaptaciones particulares de quinua en diferentes zonas a lo largo de Los Andes, es que se reconocen cinco ecotipos asociados a sub – centros de diversidad. Estos corresponden a: quinua de los valles interandinos (Colombia, Ecuador y Perú), quinua del altiplano (Perú y Bolivia), quinua de las Yungas (Bolivia); quinua de los salares (Bolivia; Chile y Argentina) y quinua de la costa o de nivel del mar (Chile) (Risi y Galwey 1984).

En relación a la diversidad genética de la quinua en Chile, esta es conservada principalmente por agricultores indígenas Aymaras por el norte y Mapuches por el sur en un fragmentado patrón genético. En este sentido esta diversidad es caracterizada por un amplio rango de variación morfológica, resultado probablemente de la selección artificial, natural y deriva genética, así como también la introducción de arquetipos de quinua en la zona centro sur de

Chile mediante comercialización y migración de poblaciones indígenas. No obstante, esta diversidad presente en Chile no es del todo utilizada con fines de mejoramiento, principalmente por la falta de estudios en germoplasma originario de las distintas zonas de cultivo en ese país (Fuentes *et al* 2005).

Fuentes *et al* (2009); indica que la historia natural y política sugiere que la diversidad genética de la quinua podría haber pasado al menos por tres eventos genéticos de cuello de botella, los cuales no han resultado en una gran pérdida de diversidad genética. El primero y potencialmente el más severo de los cuellos de botella pudo haber ocurrido cuando los dos ancestros diploides de la quinua tuvieron sus hibridaciones, asumiendo: 1) que las posteriores progenies resultaron a partir de especies alotetraploides aisladas con capacidad reproductiva; y 2) que este evento ocurrió sólo una vez, significando que las especies del complejo tetraploides del nuevo mundo tuvieron un origen monofilético.

En tanto, los parientes silvestres de quinua caracterizadas mediante métodos moleculares utilizando el sistema AFLP, se muestran en la Cuadro 9, clasificadas según su código, su descripción, la provincia del cual procede y la ubicación de la longitud y la latitud.

CUADRO 9

PARIENTES SILVESTRES DE QUINUA COLECTADAS EN PUNO 2012

N°	Código	Descripción	Provincia	Longitud	Latitud
1	HAY1	Ayara – Huataraqui	Puno	15 55 35	69 50 32
2	HCH1	Hirsinum – Huataraqui	Puno	15 55 35	69 50 32
3	HCP1	Pallidicaule – Huataraqui	Puno	15 56 86	69 50 85
4	HCC1	Carnosolum – Huataraqui	Puno	15 56 15	69 50 90
5	RCHA	Ambrosoide – Rinconada	Puno	15 57 01	69 50 99
6	UCC2	Carnosolum – Camacani	Puno	15 57 28	69 51 16
7	SAY2	Ayara – Salcedo	Puno	15 51 45	69 59 05
8	SCH2	Hirsinum – Salcedo Rinconada	Puno	15 52 26	70 00 63
9	SCH3	Hirsinum – Salcedo Lago	Puno	15 51 75	69 59 69
10	HCP2	Pallidicaule – Huataraqui Lago	Puno	15 55 83	69 50 38

Fuente: Elaboración propia 2010 – 2011

Los parientes silvestres, fueron colectadas en las zonas de mayor población de estas como riberas del lago, áreas de descanso de los cultivos, pies de laderas, teniendo presente zonas de mayor cultivo de las variedades nativas en la región de Puno.

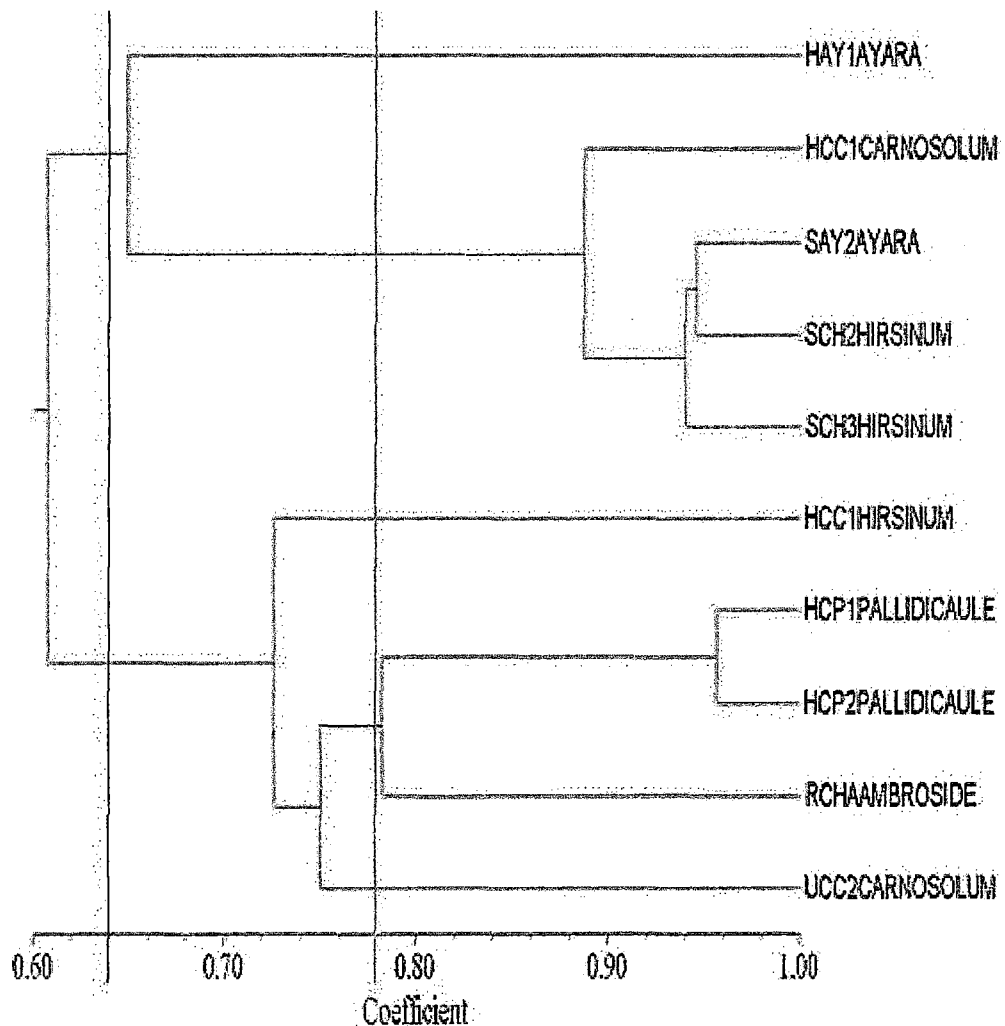


Figura 2. Dendrograma que agrupa los parientes silvestres de quinua según los marcadores AFLP 2012.

En la Figura 2, se muestra el dendrograma obtenido del análisis de las 10 muestras de quinua silvestre. A un coeficiente de similitud de 0,64 se forman dos grupos, el primer grupo formado por 5 accesiones: HAY1, HCC1, SAY2, SCH2, SCH3; y el segundo grupo constituido por 5 accesiones conformado por HCC1, HCP1, HCP2, RCHA y UCC2.

A un coeficiente de similitud de 0,78 se llegan a formar 5 grupos, el primero está formado por HAY1, el segundo grupo está formado por cuatro accesiones

HCC1, SAY2, SCH2 y SCH3, el tercer grupo está conformado por la accesión HCC1, el cuarto grupo está formado por tres accesiones: HCP1, HCP2 y RCHA y el quinto grupo está formado por una accesión UCC2.

Costa Tártara *et al* (2009), demostraron que las poblaciones nativas del Noroeste de Argentina (NOA), se agrupan según la subregión de procedencia, tales como: quebrada, altiplano, valles orientales y una zona de transición entre quebrada y valle. Según los dendogramas presentados, existen diferentes clusters que agrupan a las quinuas estudiadas, y que esta variabilidad se debe al ambiente de procedencia, el cual origina una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones y de las mismas dentro de las regiones. Asimismo estos mismos investigadores Costa Tártara *et al* (2009), reportan una mayor diversidad genética entre las poblaciones de quinua del Altiplano Peruano, siendo diferentes entre las poblaciones de la quebrada, los valles orientales y la zona de transición en Argentina, concluyendo que el germoplasma local (argentino) deriva de más de un proceso de introducción de diferentes regiones ecológicas. Estos resultados coinciden con los dendogramas obtenidos.

El segundo cuello de botella, pudo haber ocurrido cuando la quinua fue domesticada a partir de sus ancestros tetraploides silvestres; sin embargo, esta constricción genética pudo no ser del todo muy significativa, dada la capacidad de quinua para tener cruzamientos con otras especies tetraploides (Wilson y Manhart 1993), y de hecho este evento posee múltiples formas tetraploides de *C. hircinum* y/o *C. quinoa* var. *melanospermum* (Wilson 1988b; Mujica y Jacobsen 2006).

La significancia de este segundo cuello de botella es directamente dependiente sobre el primero, del cual a partir de la monofilia del complejo tetraploide; implica la presencia de una diversidad genética relativamente pequeña para intercambiar en sus cruzas compatibles con parientes silvestres. Otra posibilidad, que recientemente se informa a través de estudios de diversidad genética usando marcadores de ADN; es que quinua fue domesticada dos veces: una en las alturas de Los Andes y una segunda vez en tierras bajas de Chile (Christensen *et al* 2007; Fuentes *et al* 2009c).

El tercero, considerado un cuello de botella de tipo político; pasó hace más de 400 años atrás, desde el período de la conquista hasta la década de los ochenta, período durante el cual la quinua fue marginada de los procesos productivos por razones culturales. Existe abundante evidencias de que la quinua en tiempos de la conquista estaba relegada a tierras marginales (salinas y/o de secano) (Lescano 1994; Risi y Galwey 1984).

A la luz de estos antecedentes, se puede también agregar la hipótesis de colonización ancestral de la quinua en la zona centro – sur de Chile, seguida de largos períodos de deriva genética (Wilson 1988b; Wilson (1988a); también ha planteado que las poblaciones chilenas de quinua tienen su origen en el área sur del altiplano (Bolivia). Esto último ha sido respaldado por datos encontrados por Christensen *et al* (2007); los cuales muestran que poblaciones del sur de Chile son más similares a poblaciones bolivianas que otras quinuas provenientes del altiplano andino.

Sin embargo Fuentes *et al* (2009c), evaluando diversidad genética con marcadores de ADN; señala que el germoplasma Chileno de la costa se

presenta mucho más diverso de lo creído y reportado. Esta observación se relaciona directamente con la pregunta realizada por Wilson (1988a), en relación a la hipótesis del origen de la quinua de la costa.

La gran diversidad observada a nivel molecular de este estudio podría alternativamente ser explicada por el sistema de polinización cruzada existente en quinuas de la costa en campos de cultivo en conjunto con poblaciones de malezas de *G. album* y/o *G. hirsinum*; Esta última hipótesis explica en cierto sentido la dificultad experimentada por mejoradores de quinua de la costa en la obtención de nuevos cultivares puros en la zona centro sur de Chile.

Estudios realizado por Fuentes *et al* (2009c); en poblaciones de quinua del norte y sur de Chile reveló que el 21,3% de alelos de marcadores de microsatélites involucrados en el estudio estuvieron compartidos entre ambas poblaciones; estos datos coinciden con la hipótesis de Wilson (1988b); y datos reportados por Christensen *et al* (2007), en relación a la mayor similitud genética entre quinuas del altiplano sur de Los Andes y quinuas del sur de Chile. Adicionalmente esta investigación reveló que las quinuas del norte de Chile (altiplano); presentaron un 28,6% de alelos únicos y quinuas del sur (costa) un 50%. Esta última información más observaciones de segregantes entre quinua y probablemente *G. hirsinum* Schrad.; en campos de cultivo en Temuco, permiten plantear una nueva hipótesis con respecto a la diversidad genética de quinuas del sur: "quinuas del sur estarían en continua hibridización con parientes silvestres que coexisten en campos de cultivos".

G. hirsinum; es una especie silvestre; considerada como una maleza abundante en cultivos de quinua en la región de la Araucanía en Chile

(Fuentes *et al* 2009c). De esta forma quinuas del sur de Chile presentarían un sistema mixto de polinización cruzada y de autopolinización, lo cual abre la posibilidad de un constante intercambio de información genética intra y/o inter – específica.

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, 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

(Stevens *et al* 2006; Turner 2007; Sederberg 2008; Soliai 2009; Fuentes *et al* 2009b).

4.2. Determinación del parentesco y las distancias genéticas entre las variedades nativas y parientes silvestres de quinua.

En la Figura 3, se presenta el dendograma obtenido del análisis de las 23 accesiones de quinua entre nativas y silvestres. A un coeficiente de similitud de 0,64 se forman tres clúster; el clúster (a) formado por 10 accesiones; el clúster (b) constituido por 7 accesiones y el clúster (c) constituido por 6 accesiones. Asimismo en esta figura se observa que muchas variedades nativas (cultivadas); poseen características genéticas similares en los tres clúster (a, b y c). Es así que la variedad silvestre HAY1 (Ayara – Huataraqui) se encuentra dentro del clúster (a), lo cual indica que posee características genéticas coincidentes con las variedades cultivares Chullpi, Choclito, Wariponcho; Toledo; Rosa Frutilla; Huallata; Negra Collona; Antahuara y Airampo. Pero a un coeficiente de similitud de 0,70 la variedad silvestre HAY1, se encuentra separado en otro clúster.

A un coeficiente de similitud de 0,65; el cluster (b) está conformado por las variedades silvestres HCC1 (Carnosolum – Huataraqui), SAY2 (Ayara – Salcedo), SCH2 (Hirsinum – Salcedo Rinconada) y la SCH3 (Hirsinum – Salcedo – Lago); los cuales presentan similitudes genéticas con las variedades cultivadas Pasankalla, Salcedo INIA y Kancolla.

Mientras que a un coeficiente de similitud de 0,78, en éste mismo cluster, las variedades cultivadas se encuentran separadas del grupo de las variedades silvestres. Por otro lado a un coeficiente de similitud de 0,92, se observa diferencias genéticas entre las variedades silvestres, así se observa que poseen mayores características genéticas en común las variedades SAY2; SCH2 y SH3 separadamente con la variedad silvestre HCC1.

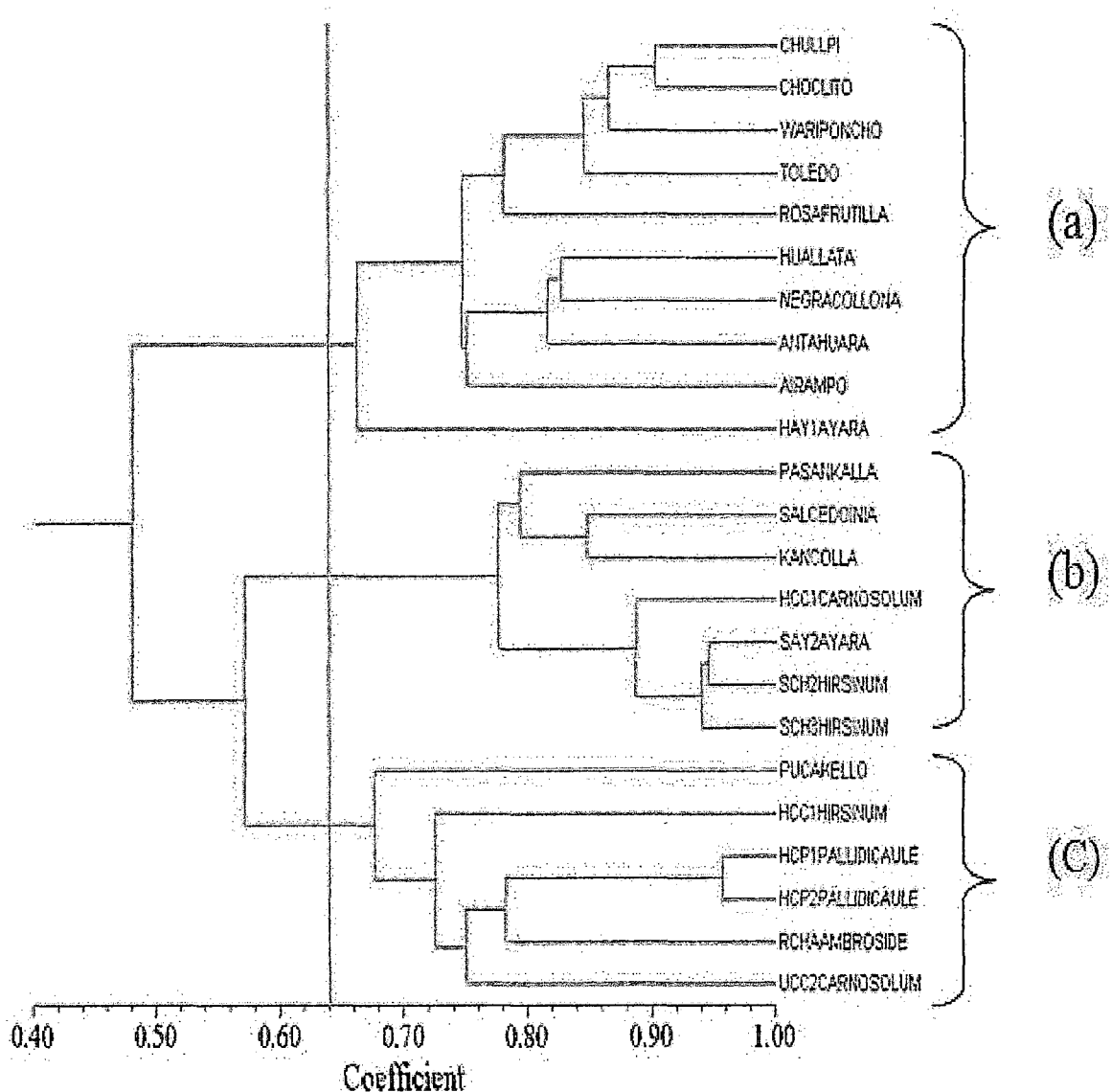


Figura 3. Dendrograma que agrupa las quinuas nativas (cultivadas) y sus parientes silvestres según los marcadores AFLP 2012.

En el tercer cluster (c), a un coeficiente de similitud de 0,65, la variedad cultivada de quinua Pukakello, se encuentra emparentada con las variedades silvestres HCC1; HCP1; HCP2; RCHA y UCC2. Mientras que a un coeficiente de similitud de 0,92, tan solamente las variedades silvestres HCP1 y HCP2 son las más emparentadas genéticamente, y estas dos variedades poseen características genéticas diferentes a la variedad cultivada Pucakello y las variedades silvestres HCC1, RCHA y UCC2.

En la Figura 4, se observa el dendograma obtenido del análisis del total de las 68 accesiones de quinua. A un coeficiente de similitud de 0,64 se forman tres grupos, el grupo (a) formado por 32 accesiones; el grupo (b) constituido por 6 accesiones y el grupo (c) constituido por 30 accesiones.

De otra forma, un número que expresa similitud o distancia genética es aquel que evalúa la cantidad de variación compartida entre diferentes grupos. Si la medida es de 0; generalmente significa que no hay diferencia alguna entre los grupos. Estas similitudes o diferencias en el tipo, cantidad y patrón de variación genética entre poblaciones puede ser resultado de factores tales como que dos poblaciones se hayan separado recientemente, o que haya flujo génico entre ellas, o que sean poblaciones muy grandes (con poco deriva génica) o que las presiones de selección que afectan a los mismos locus sean similares en ambas poblaciones. Por otra parte, si dos poblaciones son diferentes se debe posiblemente a que esas poblaciones se aislaron mucho tiempo atrás y no hay flujo génico entre ellas o que la deriva génica ha generado grandes diferencias o que hay diferentes presiones selectivas en las dos poblaciones (Hedrick 2000).

Pregunta ¿Cuál es la distancia genética entre las variedades cultivadas y las variedades silvestres de quinua?

González (2009); reporta en su estudio de flujo de genes en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en campo de agricultores mediante el uso de marcadores microsatélites, que la distancia promedio entre todos los pares de poblaciones posibles fue moderado ($D = 0,138$): En una matriz de distancias genéticas de Nei, calculadas a partir de 77 muestras de quinua, determinó que el valor más bajo resultó de la comparación entre quinuas silvestres y malezas ($D = 0,051$); en cambio que las distancias mayores resultó entre quinuas cultivadas y silvestres ($D = 0,202$), mientras que un valor intermedio correspondió a la comparación entre quinuas cultivadas y malezas ($D = 0,161$).

Por otro lado Gonzáles (2009), reporta que el valor F_{st} se mide en una escala de 0 a 1, mientras mayor es el valor menos intercambio genético hay entre las poblaciones (0,05 – 0,15 poca diferenciación genética, 0,15 – 0,25 diferenciación genética moderada, 0,25 – 0,99 gran diferenciación genética (Navarro 1999)); Este autor; determinó una diferenciación genética moderada de 0.2178 entre los grupos de quinua cultivado y silvestre, mientras que respecto a las quinuas maleza el valor fue bajo (0.0651) con el grupo silvestre, en cambio las quinuas cultivadas con las quinuas malezas su diferencia genética fue moderada con un valor de 0,161.

Cabe mencionar que estos valores de F_{st} fueron similares con los datos de las distancias genéticas de Nei, ya que entre el grupo silvestre y maleza de nuestro estudio la distancia genética fue menor ($D = 0,051$). Según González

(2005); esto se debe a que estas poblaciones han divergido hace poco tiempo o que existe flujo génico entre ellas, mientras que las poblaciones cultivadas y silvestre ($D = 0.202$); tuvieron una distancia mayor. Según Hedrick (2000); nuestros parámetros de distancias y diferenciación genéticas al ser menores indicarían que existen altas tasa de flujo génico. Esto mismo fue reportado por Wilson y Manhart (1992); que indicaron que la alta tasas de flujo génico que ocurre en *Chenopodium quinoa* Willd. y que a pesar de ser especies alógamas facultativas, predicen con una alta probabilidad el hecho de que estas poblaciones híbridas; parcialmente fértiles; puedan introgresar genes en las poblaciones naturales.

Los valores intermedios de distancia genética ($D = 0,161$) y el índice de diferenciación genética ($F_{st} = 0,161$), así como la detección de individuos malezas híbridos encontrado en los lotes de producción de quinua, reflejan una tasa de flujo genético moderadamente alta (González 2009).

4.3. Identificación de los parientes silvestres de la quinua en base a la caracterización molecular.

Según lo presentado en la Figura 3; la variedad HAY1 (Ayara – Huataraqui), se constituye en pariente silvestre de las variedades nativas Chullpi, Choclito, Wariponcho, Toledo, Rosada Frutilla, Huallata, Negra Gollona, Antahuara y Airampo.

Mientras que las variedades HCG1 (Carnosolum – Huataraqui), SAY2 (Ayara – Salcedo), SCH2 (Hirsinum – Salcedo Rinconada) y SCH3 (Hirsinum – Salcedo Lago), serían parientes silvestres de las variedades nativas Pasancalla, Salcedo INIA y Kancolla. Y finalmente las variedades silvestres

HCC1 (Carnosolum – Huataraqui), HCP1 (Pallidicaule – Huataraqui), HCP2 (Pallidicaule – Huataraqui Lago), RCHA (Ambrosoide – Rinconada) y UCC2 (Carnosolum – Camacani), serían parientes silvestres de la variedad cultivada Pucakello.

En la Figura 4, el dendograma representado posee tres clusters (a, b y c); en los cuales se relacionan todas las accesiones de quinua entre cultivadas y sus parientes silvestres. En el clúster (a), se observa que las variedades silvestres HCC1 (Carnosolum – Huataraqui), SAY2 (Ayara – Salcedo), SCH2 (Hirsinum – Salcedo Rinconada), SCH3 (Hirsinum – Salcedo Lago) y la HAY1 (Ayara – Huataraqui), están emparentadas con las variedades cultivadas como Kancolla, Salcedo INIA, Pasankalla, Quinua Blanca, diversos individuos de la variedad Selección masal, entre otros.

En el cluster (b), las variedades silvestres HCC1 (Carnosolum – Huataraqui), HCP1 (Pallidicaule – Huataraqui), HCP2 (Pallidicaule – Huataraqui Lago) y

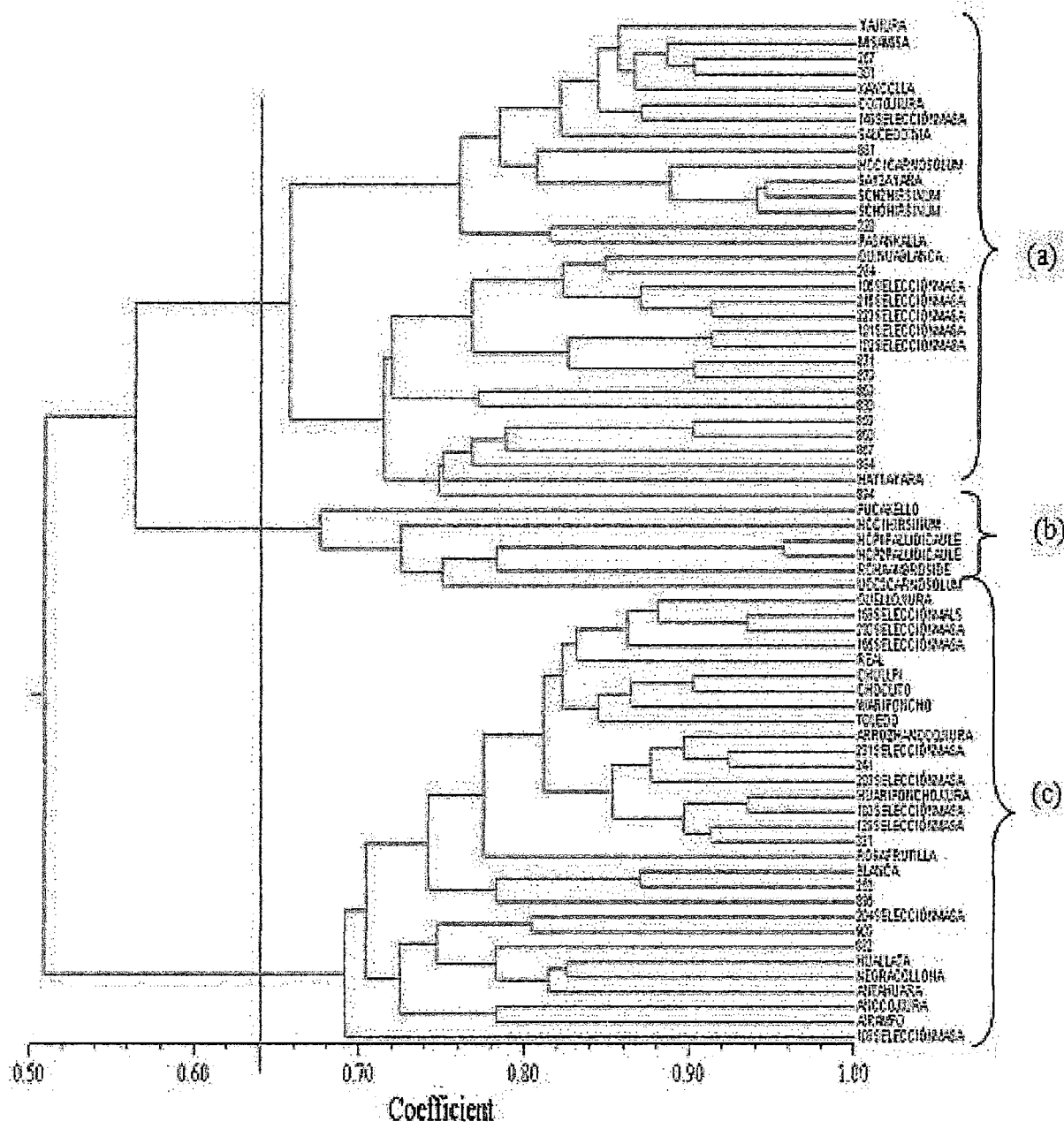


Figura 4: Dendrograma que agrupa a todas las quinuas (total) según los marcadores AFLP. 2012

RCHA (Ambrosoide – Rinconada) están muy emparentadas con la variedad cultivada Pucakello. Y finalmente en el cluster (c), la variedad silvestre UCC2 (Carnosolum – Camacani); está emparentada con las variedad cultivadas como algunas accesiones de Selección Masal, quinua Real, Chullpi, Choclito,

Wariponcho, Toledo, Rosa Frutilla, quinua Blanca, Huallata, Negra Collona, Antahuara, Airampo, entre otros.

Fuentes *et al* (2009b); reportan que las relaciones genéticas existentes en una población de *C. quinoa* del sur de Chile bajo cultivo y parientes silvestres del género *Chenopodium* provenientes del mismo cultivo y de diversas zonas del norte de Chile. A partir de los resultados obtenidos en este estudio se identificaron tres grupos de similitud genética, los cuales revelaron similitudes entre *C. quinoa* y *C. hircinum* a nivel de ADN nuclear y de cloroplasto, avalando la hipótesis de que quinuas bajo condiciones de cultivo en el sur de Chile presentan un sistema de constante intercambio de información genética intra y/o ínter específica. De este modo se comprueba indicios naturales de hibridación de quinuas de la zona sur de Chile con parientes silvestres (*C. hircinum*).

De la Cruz (2010); reporta que en variedades de huauzontle (*Chenopodium berlandieri* sbp. *nuttalliaer*) a una distancia de 0,619, se formaron 6 clusters. El primer cluster está integrado por las colectas 1, 2, 3, 4, 5 y 6; que proceden de lugares relativamente distantes como Atlacomulco, Lerma, Xonacatlán y Tenango las cuales, no obstante que exhiben diferencias morfológicas como variación en altura de 0,40 m (colecta 1) a 1,50 (colecta 4), son genéticamente afines. En el cluster 2 se presentan las colectas 7, 8, 9, 10, 11 y 12, las cuales reflejaron afinidad genética correspondiendo a colectas realizadas en sitios relativamente cercanos como Toluca, Xonacatlán y la Villa Cuauhtémoc.

En el cluster 3 se ubicó a la colecta 13 perteneciente al municipio de San Francisco Tlalcilcalpan, material valioso ya que aunque no exhibe grandes diferencias morfológicas; es genéticamente distinto al resto de las colectas analizadas. En el cluster 4 se ubicaron las colectas de la 14 a la 24, procedentes de localidades muy próximas (San Andrés Cuexcontitlán y San Cristóbal Huichochitlán): La similitud genética observada nos indica que en las localidades muestreadas puede darse el intercambio de semilla entre productores. En los clusters 5 y 6 se ubicaron las colectas 25 a 30 y la 38, todas ellas de las comunidades vecinas de San Cristóbal Huichochitlán y San Andrés Cuexcontitlán, corroborando el agrupamiento genético asociado al lugar de origen (Xingú 2009).

Los métodos de conservación de recursos fitogenéticos pueden clasificarse en dos grandes categorías: métodos de conservación in situ, los cuales consisten en preservar las variedades o poblaciones vegetales en sus hábitat originales y métodos de conservación ex situ, en los cuales la conservación se realiza en los denominados bancos de germoplasma e implica el desarrollo de colecciones de recursos fitogenéticos y presenta ventajas como reducción en costos, control y facilidad en el suministro de material a científicos y usuarios en general, debido a la concentración del material genético y a la información asociada al mismo (FAO 1994);

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, se espera, que las poblaciones más cercanas geográficamente también sean las más cercanas genéticamente, a éste principio se le conoce como "aislamiento

por distancia” y nos dice que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría al azar (Wright 1951).

Mujica y Jacobsen (2006), reportan que la diversidad y variabilidad en usos de la quinua y los parientes silvestres (*Chenopodium carnosolum*, *C. petiolare*, *C. pallidicaule*, *C. hircinum*, *C. quinoa* subsp. *melanospermum*, *C. ambrosoides* y *C. incisum*) son debidamente conocidas y utilizadas por los campesinos andinos, puesto que cada especie y ecotipo es utilizado en forma diferenciada en la alimentación, medicina, ritual y en la transformación. El uso de las especies de *Chenopodium* es como planta entera o parte de la misma. Podemos encontrar la diversidad de formas (ramificada o sencilla), tamaño (hasta 2 m), color de la panoja (blanca, amarilla, morena, negra), diversidad en precocidad (3 – 8 meses), tamaño de grano (hasta 3,5 mm), formas de inflorescencia, características agronómicas diferenciales como son estrías en el tallo, parámetros genéticos, componentes de rendimiento y otras, de la especie cultivada, así como la diversidad de los parientes silvestres y escapes de cultivo. Encontramos la mayor diversidad de la quinua en los aynokas, los campos comunales de las comunidades campesinas, que nos servirá en el futuro para conservar y usar la quinua y sus parientes silvestres.

Una especie cultivada posee las siguientes características como la diversidad de formas, tamaños y colores, diversidad en precocidad, tamaño de grano, formas de inflorescencia, características agronómicas diferenciales como son estrías en el tallo, parámetros genéticos y componentes del rendimiento (Mujica 1988, Mujica y Jacobsen 2006), reportan que a los parientes silvestres de la quinua, los podemos encontrar en forma aislada, ya

sea en los bordes de las chacras o lugares considerados sagrados, que son reductos donde se desarrollan y son cuidados por los propios campesinos. En muchos casos están utilizados en la alimentación, como medicina o para usos rituales, sobretodo en épocas de extrema sequía o desastres climáticos característicos de la zona altiplánica de Perú y Bolivia. Estos lugares reciben el nombre de *Gentil Wasi* o *Phiru*.

Según Mujica *et al* (2000); existen parientes silvestres de la quinua, con características de gran tolerancia al exceso de humedad y a la salinidad (*Chenopodium carnosulum* Moq.), algunos poseen una alta concentración en saponina (*Chenopodium petiolare* Kunth); algunas son resistentes a las bajas temperaturas y a las granizadas (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), otras poseen una gran resistencia a la sequía, incluso en casos extremos de falta de precipitación pluvial; llega a eliminar gran parte de las hojas inferiores hasta quedarse sin hojas para reducir la transpiración; sin embargo, produce semillas debido a un reemplazo de la fotosíntesis laminar por la del tallo y la panoja (*Chenopodium hircinum* Schrad.); otros poseen el mejor desarrollo en sequías severas y que vendría a ser escape del cultivo de la quinua que estaría entrecruzando en forma natural, tanto con la especie cultivada como con la silvestre y otras están postradas en zonas secas y frías, erectas en los valles interandinos y zonas abrigadas y algunos genotipos presentan raíces profundas muy ramificadas y en algunos casos de reserva, que les permite tener hábito perenne (*Chenopodium ambrosoides* L.).

Según Mujica (1992) las quinuas cultivadas tienen una gran diversidad genética, mostrando variabilidad en la coloración de la planta, inflorescencia y

semilla, en los tipos de inflorescencia, y en el contenido de proteína, saponina y betacianina en las hojas, con lo que se obtiene una amplia adaptación a diferentes condiciones agroecológicas (suelos, precipitación, temperatura, altitud, resistencia a heladas, sequía, salinidad o acidez).

Según Lescano (1989) y Tapia (1990), las quinuas están clasificadas en 5 grandes grupos, de las cuales las quinuas de altiplano, se desarrollan en áreas mayores como cultivos puros o únicos, entre los 3600 a 3800 msnm, lo cual corresponde a la zona del altiplano peruano – boliviano. En esta área se encuentra la mayor variabilidad de caracteres y se producen los granos más especializados en su uso. Las plantas crecen con alturas entre 0,5 a 1,5 m, con un tallo que termina en una panoja principal y por lo general compacta. En este grupo es donde se encuentra el mayor número de variedades mejoradas y también los materiales más susceptibles al mildiu cuando son llevados a zonas más húmedas.

Por lo mencionado anteriormente y con el objeto de mostrar la amplia variabilidad genética de quinua que se dispone, se presentan a continuación los parámetros de algunas variables de interés de la colección boliviana de quinua (Rojas *et al* 2009): color de la planta antes de la floración (verde, púrpura, mixtura y rojo), color de la planta a la madurez fisiológica (presenta varios colores intermedios entre blanco, crema, amarillo, anaranjado, rosado, rojo, púrpura, café y negro), forma de panoja (amarantiforme, glomerulada e intermedia), densidad de la panoja (compacta, laxa e intermedia), color del grano -blanco, crema, amarillo, naranja, rosado, rojo, púrpura, café, negro- y se han identificado 66 colores de grano (Cayoja 1996), ciclo vegetativo (110 a 210

días), rendimiento de grano por planta (48 a 250 g), diámetro de grano (1,36 a 2,66 mm), peso de 100 granos (0,12 a 0,60 g), contenido proteico del grano (10,21 a 18,39%) y el diámetro de gránulo de almidón (1,5 a 22 μ).

CONCLUSIONES

- Primera.** La caracterización molecular mediante AFLP, ha permitido determinar la presencia de variabilidad genética entre las variedades nativas o cultivadas de quinua; y muestran que existe coeficiente de similitud a 0.65, formando dos grupos. El primer clúster estuvo conformado por las accesiones: Chullpi, Choclito, Wariponcho, Toledo, Rosa Frutilla, Huallata, Negra Collona, Antahuara, Airampo y Pucakello y el segundo clúster fue constituido por las accesiones Pasankalla, Salcedo INIA y Kancolla.
- Segunda.** Del análisis de las 23 accesiones de quinua entre nativas y parientes silvestres a un coeficiente de similitud de 0,64 se muestra que existe distancia genética muy pequeña entre las variedades cultivadas y parientes silvestres; en cambio existe distancias genéticas muy distantes entre las variedades cultivadas y los parientes silvestres; entre estas forman tres clúster, el clúster (a) formado por 10 accesiones, el clúster (b) constituido por 7 accesiones y el clúster (c) constituido por 6 accesiones. Asimismo en esta figura se observa que muchas

variedades nativas (cultivadas), poseen características genéticas similares en los tres clúster (a, b y c). Es así que la variedad silvestre HAY1 (Ayara – Huataraqui) se encuentra dentro del clúster (a), lo cual indica que posee características genéticas coincidentes con las variedades cultivares Chullpi, Choclito, Wariponcho, Toledo, Rosa Frutilla, Huallata, Negra Collona, Antahuara y Airampo. Pero a un coeficiente de similitud de 0,70 la variedad silvestre HAY1, se encuentra separado en otro clúster.

Tercera. La mayor variabilidad genética de los parientes silvestres de quinua se encuentran en las riberas del lago Titicaca y cercanas a campos de cultivos de quinua en la zona media y muy poco en la zona alta, porque no existe cultivos. Sin embargo la característica molecular entre parientes silvestres se muestran que a un coeficiente de similitud de 0,64 se forman dos grupos, el primer grupo formado por 5 accesiones: HAY1, HCC1, SAY2, SCH2, SCH3, y el segundo grupo constituido por 5 accesiones conformado por HCC1, HCP1, HCP2, RCHA y UCC2.

RECOMENDACIONES

- Primera.** Extender el análisis molecular incrementando el número de combinaciones de primers para el análisis de AFLP, así mismo probar empleando otros marcadores moleculares como los cpSSR, SSR, etc.
- Segunda.** Correlacionar información de la caracterización molecular con los datos de la caracterización morfológica, así como con datos de caracterización agronómica que permitan seleccionar las mejores entradas por su potencialidad agronómica.
- Tercera.** Complementar los estudios de caracterización del germoplasma de quinua con estudios de citogenética, adaptación, distribución geográfica, composición química del grano, así como también mediante cruzamientos para verificar la compatibilidad y fertilidad sexual de las accesiones, que serán una ayuda importante en los programas de mejoramiento genético de la quinua.

BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal, R. K., D. S. Brar, S. Nandi, N. Huang and G. S. Khush. (1999). Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1320-23+++1328.
- Andersen, W.R. y Fairbanks, D.J. (1990). Molecular markers: Important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity* 6(3 - 4):51-53.
- Becerra V. y M. Paredes. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica* 60(3): pp 270-281.
- Becerra, V. & Paredes, M. (1999). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudio de diversidad genética. *Agricultura técnica (Chile)* 60(3):270 – 281
- Bonifacio, A. (1995). Interspecific and Intergeneric hybridization in *Chenopod* species. Tesis M.Sc. Brigham Young University. Provo, Utah, USA. 150 p.
- Bonifacio, A. (1990). Caracteres hereditarios y ligamiento factorial en la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) Tesis Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 189 p.
- Bonifacio, A. (1990). Materiales de aislamiento en cruzamientos de la quinua. In: Congreso Internacional sobre Cultivos Andinos, 6to. Quito, Ecuador. pp. 67-68

- Bhargava A., Shukla S. and Deepak O. (2007). Gynomonoeicy in *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae): variation in inflorescence and floral types in some accessions. *Biología*. Vol. 62, No. 1: p. 19 – 23.
- Bhargava A., Shukla S., Rajan S. and Ohri D. (2007). Genetic diversity for morphological and quality rasgos in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Vol. 54: p. 167 – 173.
- Breyne, P., D. Rombaut, A. Van Gyset, M. Van Montagu and T. Gerarts. (1999). AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Mol. Gen. Genet.* 261: 627-634.
- Canahua Murillo A., Mujica A., Apaza V. y Quispe M. (2004). Revaloración de quinuas de color (*Chenopodium quinoa* Willd.) en el altiplano de Puno, Perú: experiencias y perspectivas. CD-Rom: XI Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Fundación PROINPA. Cochabamba – Bolivia.
- Carvajal Rodríguez A., Rolán Álvarez E. and Caballero A. (2005). Quantitative variation as a tool for detecting human – induced impacts on genetic diversity. *Biological Conservation*. Vol. 124: p. 1 – 13.
- Cayoja R. (1996). Caracterización de variables continuas y discretas del grano de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) del banco de germoplasma de la Estación Experimental Patacamaya. Tesis de Lic. en Agronomía. Oruro, Bolivia, Universidad Técnica Oruro, Facultad de Agronomía. Oruro – Bolivia. 129 p.

- Chalhoub, B., Thibault, S., Laucou, V., Rameau, C., Höfte, H. & Cousin R. (1997). Silver staining and recovery of AFLPTM amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques* 22: 216-220.
- Christensen S., Pratt D., Pratt C., Nelson P., Stevens M., Jellen E., Coleman C., Fairbanks D., Bonifacio A. and Maughan P. (2007). Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. Vol. 5: p. 82 – 95.
- Cortés A. y Rubiano A. (2007). Caracterización de tres ecotipos de quinua "*Chenopodium quinoa* Willd" mediante técnicas agroecológicas, en dos zonas agroclimatológicamente diferentes del departamento de Cundinamarca. *Revista Inventum*. Bogotá – Colombia. No. 2: p. 89 – 101.
- Cornide, M. T. (2000). Diversidad genética y marcadores moleculares. Departamento de Bioplantas CINC. La Habana, Cuba. 150 p.
- Costa Tártara S., Maníffesto M. y Bertero H. (2009). Caracterización molecular de poblaciones nativas de quinoa cultivada (*Chenopodium quinoa* spp. *quinoa*) del Noroeste Argentino (NOA) utilizando microsatélites (SSR). Artículo científico presentado al VII Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Pucón – Chile.
- Costa Tártara S., Miníffesto M. y Bertero H. (2012). Caracterización genética de *Chenopodium quinoa* nativa del noroeste argentino y su relación con germoplasma de Sudamérica. Página web:. Fecha de revisión: 20 – Dic – 2012. Buscador: www.google.com.pe.

- Crawley, M., Brown, R., Hails, D., Kohn, D. & Rees, M. (2001). Transgenic crops in natural habitats. *Nature*: 409:682-683. Pg.
- Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Khaler, A.L., Kaya, N., Van Toai T.T., Lohnes, D.G., Chung, J. y Specht J.E. (1999). An integrated genetic map of the soybean genome. *Crop. Sci.* 39:1469-1490.
- De la Cruz E. (2010). Aplicación de técnicas moleculares en el estudio del huauzontle, cultivo prehispánico alternativo para zonas agrícolas. *Revista Contacto Nuclear*. p. 16 – 21.
- De Riek, J., E. Calsyn, L. Everaert and E. Van Bockstaele. (2001). AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theor. Appl. Genet.* 103: 1254-1265.
- Delgado, A. (2006). *Agronomía Mesoamericana: Uso de marcadores moleculares en frutales tropicales*. 17(2): 221-242. ISSN: 1021-7444
- Del Castillo C., Conde H., Auza J., Vicente J., Winkel T. y Mahy G. (2012). Variación fenotípica intra e inter – poblaciones en siete poblaciones de quinua del altiplano boliviano. Página web: Fecha de revisión: 20 – Dic – 2012. Buscador: www.google.com.pe
- Del Castillo C., Winkel T., Mahy G. and Bizoux P. (2007). Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Vol. 54: p. 897 – 905.
- Doebley, J. (1990). Molecular evidence for gene flow among *Zea* species.

Bioscience 40: 443–448 Pg .

Eguiarte, L., Souza, V. & Montellano, S. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, Biología reproductiva y Genética de Poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 131-150.

Ellstrand, N. (2003). Current Knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. Department of Botany and plants science, and center for conservation biology. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 358, 1163 -1170

Ellstrand, N., Prentice, H., & Hancock, J. (1999). Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst* 30, 539-563. Evaluation: opportunities and challenges. *Nat Biotechnol* 15: 626-628.

Erschadi, S., G. Haberer, M. Schöniger and R. A. Torres-Ruiz. (2000). Estimating genetic diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Theor. Appl. Genet.* 100:633-640.

Fairbanks, D. Burgener, L. & Robison, W. (1990). Electrophoretic characterization of quinoa seed proteins. *Plant Breed.* 104:190–195. F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. *Heredity* 82:117-25. *Garden* 68:233-253.

FAO. (1994). Código Internacional de Conducta para la Recolección y transferencia de Germoplasma Vegetal. Roma, Italia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Federici, M. T., D. Vauhan, N. Tomooka, A. Kaga, X. W. Wang, K. Doi, M. Francis and G. Zorrilla. (2001). Analysis of Uruguayan weedy rice genetics

diversity using AFLP molecular markers. EJB: 4, 3: 1- 16

Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento 20. 220.p

Franco, T.L, Hidalgo, R. (eds.). (2003). In Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico nº 8, Instituto Internacional De Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.

Fuentes F., De La Torre J., Tello V., Arenas J., Riquelme A., Oliva M., Lanino M., Carevic A. (2005). Diversidad genética intrapredial en germoplasma nativo de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la Comunidad de Ancovinto, Altiplano de la I Región de Chile. En Anales del V SIRGEALC. Vol. 121. Montevideo, Uruguay.

Fuentes F., Espinoza P., Von Baer I., Jellen N. y Maughan J. (2009b). Determinación de relaciones genéticas entre *Chenopodium quinoa* Willd del sur de Chile y parientes silvestres del género *Chenopodium*. En Anales del XVII Congreso Nacional de Biología del Perú. Tacna – Perú.

Fuentes F., Martínez E., Hinrichsen P., Jellen E., Maughan J. (2009c) Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. Conservation Genetics. Vol. 10. No. 2: p. 369 – 377.

- Fuentes F., Maughan P. y Jellen E. (2009). Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Rev. Geogr. Valpso. No. 42: p. 20 – 33.
- Gandarillas, H. (1967). Observaciones sobre la biología reproductiva de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Saya. Sociedad de Ingenieros Agrónomos de Bolivia. Abril-Noviembre. La Paz, Bolivia. 4 p.
- Gandarillas, H. (1984). Obtención experimental de *Chenopodium quinoa* Willd. MACA, IBTA. La Paz, Bolivia. 21 p.
- Gandarillas, H. (1967). Observaciones sobre la biología reproductiva de la quinua. Sayaaná 5(2):26-29.
- Gandarillas, H. (1979). Genética y origen. In: Quinua y Kanihua, Cultivos Andinos. M.E. Tapia et al. (Ed.). IICA, Bogotá, Colombia. pp. 45-64.
- Gandarillas, H. (1979). Mejoramiento genético. In: Quinua y Kanihua, Cultivos Andinos. M.E. Tapia et al. (Ed.). IICA, Bogotá, Colombia. pp. 65-82.
- Gandarillas, H. (1979). Investigaciones Agrícolas, Universo. La Paz, Bolivia. Boletín Experimental No.34.35 p.
- Gandarillas, H. (1984). Obtención experimental de *Chenopodium quinoa* Willd. Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios. La Paz, Bolivia. 21 p.
- Gandarillas, H. y Luizaga, J. (1969). Número de cromosomas de *Chenopodium quinoa* Willd. En radícalas y raicillas. Turrialba 17(3):275-279.

- García-Mas, J., M. Oliver, H. Gómez-Panigua and M. C. E. Vicente. (2000). Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in Melon. *Theor. Appl. Genet.* 101: 860-864
- Gillespie, J. (1998). *Population Genetics, A Concise Guide*. USA. The Johns Hopkins University Press.
- Giusti, K. (1970). El género *Chenopodium* en la Argentina. I. Numero de cromosomas. *Darwiniana* 16: 98-105.
- González A. (2005). *Biología reproductiva y genética de poblaciones de Agave garciae – mendozae*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 70 p.
- González S. (2009). Estudio de flujo de genes en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) en campo de agricultores mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para el optar el Título de Ingeniera en Biotecnología. Departamento de Ciencias de la Vida, Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí – Ecuador. 119 p.
- Harrison, S. (1991). Local extinction in a metapopulation context: an empirical evaluation. *Biological Journal of the Linnean Society* 42: 73-88.
- Hartl, D. & Clark, A. (1997). *Principles of Population Genetics*, Sinauer Associates, Inc.
- Hedrick W. (2000). *Genetics of Populations*. USA, Jones and Bartlett Publishers, Inc.

- Heiser, C. (1973). Introgression re-examined. *The Botanical Review* 39 (4):347-366.
- Heiser, C. y D. Nelson. (1974). On the origin of the cultivated *Chenopods (Chenopodium)*. *Genetics* 78: 503-505.
- House, L.R. (1982). El sorgo. Guía para su mejoramiento. Universidad Autónoma Chapingo, México, Gaceta. 425 p.
- Innis, M.; Gelfand, D.; J. Sninsky; T. White. (1990). PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, USA. Academic Press. 482 p.
- Jacobsen E. S. and A. Mujica. (2001). Genetic resources and breeding of the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Submitted Plant Genetic Resources Newsletter.
- Karp, A., Edwards, K., & Bruford, M. (1997). Molecular technologies for diversity.
- Karp, A., Isaacs, G., Isaac, P., & Ingram, D. (1998). Molecular Tools for Screening Biodiversity. London, Chapman & Hall, 498 pp.
- Langevin, S., Clay, K. & Grace, B. (1990). The incidence and effect of hybridization between cultivated rice and its related weed, red rice (*Oryza sativa* L.). *Evolution* 44: 1000-1008. Pg.
- Lescano L. (1994). Mejoramiento y fisiología de cultivos andinos. Cultivos andinos en el Perú. CONCYTEC. Proyecto FEAS. 231 p.

- Lescano, J.L. (1989). Recursos fitogenéticos altoandinos y bancos de germoplas. In: Curso: "Cultivos altoandinos". Potosí, Bolivia. 17 - 21 de abril de 1989. p. 1 – 18.
- Lescano, J.L. (1994). Genética y mejoramiento de cultivos andinos. Programa Interinstitucional de waru waru, Puno, Perú. 459 p.
- López V, Y.E. (1999). Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. Ex. Blom de Centroamérica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.
- Mace, E. S., C. G. Gebhardt and R. N. Lester. (1999). AFLP analysis of genetic relationship in the tribe Daturae (Solanaceae). *Theor. Appl. Genet.* 99: 634-641.
- Mason, S. Stevens, M. Jellen, N. Bonifacio, A. Fairbanks, D. y Coleman, C. (2005). Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science* 45: 1618-1630.
- Maughan, P. Bonifacio, E. Jellen, M. Stevens, C. Coleman, & Mason, D. (2004). A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD and SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:1188–1195.
- Medina, A. 2004. FAUTAPO Programa *Quinoa* Altiplano Sur de Bolivia. RESUMEN, Oruro Bolivia

- Moreno Gonzáles, J. (1999). Marcadores Moleculares en la mejora genética de Plantas. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo . Paper N 10 . Coruña. España.
- Morganre, A., & Olivieri, J. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plants. *Plant J.* 3:175-182.
- Mujica, A., Cutipa, R., Gomel, W., Jacobsen, S. (2006). CICA- DOCE.. XII Congreso Internacional de Cultivos Andinos: Conservación *in situ* de parientes silvestres de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en el altiplano Peruano
- Mujica A. (1992). Granos y leguminosas andinas. In: J. Hernandez, J. Bermejo y J. Leon (eds). Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. Roma. p. 129 – 146.
- Mujica A. y Jacobsen S. (2006). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz – Bolivia. p. 449 – 457.
- Mujica A., Ortiz R. y Jacobsen E. (2000). Uso potencial de *Chenopodium carnosolum* Moq. en zonas áridas. p. 16 – 21. En: Resúmenes II Congreso Internacional de Zonas Áridas, Iquique.
- Navarro A. (1999). Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir

de RAPD's. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 96 p.

Nieto, C. y Vimos C., Monteros C., Caicedo C. y Rivera C. (1992). "INIAP-INGAPIRCA- TUNKAHUAN. Dos variedades de quinua de bajo contenido de saponina". Quito Ecuador. INIAP: Boletín Divulgativo N° 228, Estación "Santa Catalina". 23 p.

Otero, A.; M. De la Cruz; K. Onaya. (1997). El Uso de los RAPD's como marcadores moleculares en plantas. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 60:pp 85-117.

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

Paredes M, ; P. Gepts. (1995). Extensive introgression of middle American germoplasm into Chilean common vean. Geneic Research N° 42. Chile.

Phillips W. 1998. Marcadores Moleculares en Plantas. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Phillips-Mora, W.; H., Rodríguez; P., Fritz. (1995). Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba, Costa Rica, CATIE 183 p. Serie técnica. Informe técnico No. 252.

Powell, W., Machray, G., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Elsevier Science*: 1(7), 215-222.

- Rea, J. (1969). Biología floral de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Turrialba 19: 91-96.
- 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.
- Renno, J., & Winkel, T. (1996). Phenology and reproductive effort of cultivated and wild forms of *Pennisetum glaucum* under experimental conditions in the Sahel: implications for the maintenance of polymorphism in the species. *Can. J. Bot.* 74: 959–964.
- Risi J. and Galwey N. (1984). The *Chenopodium* grains of the Andes: Inca crops for modern agriculture. *Adv Appl Bot.* Vol. 10: p. 145 – 216.
- Risi J. and Galwey W. (1989). The pattern of genetic diversity in the Andean grain crop quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). I. Associations between characteristics. *Euphytica.* Vol. 37: p. 147 – 162.
- Roa, A. C., M. M. Maya, M. C. Duque, J. Tohme, A. C. Allem and M. W. Bonierbale. (1997). AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theor. Appl. Genet.* 95: 741-750.
- Rojas, J., Beltran, A., Sanchez, Y., Bonifacio, A., Maughan, J., & Fairbanks, D. (2007). Avances en el Estudio de la diversidad genética de la colección boliviana de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) utilizando marcadores microsatélites. Fundación PROINPA (Cochabamba-Bolivia).

- Roca, W.; L. Mroginski. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro de Investigación de la Agricultura Tropical. Cali. Colombia.
- Rodriguez M, Paredes M, Becerra V. (1999). Diversidad isoenzimática en el germoplasma de lentejas *Lens culinaris* en Chile. Agricultura técnica N° 59. Chile.
- Rojas, W., M. Pinto y E. Mamani. (2009). Logro e impactos del Subsistema Granos Altoandinos, periodo 2003 – 2008. En Encuentro Nacional de Innovación Tecnológica, Agropecuaria y Forestal. INIAF. Cochabamba, 29 y 30 de junio de 2009. p. 58 – 65.
- Ruas, P. Bonifacio, A. Ruas, D. Fairbanks y Anderson, W. (1999). Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L. by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). *Euphytica* 105:25–32. *Sci.* 46: 313–317.
- Rusell, J. R., J. D. Fuller, M. Macaulay, B G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714-722.
- Saravia, R. (1990). La androesterilidad en quinua y forma de herencia. Tesis Ing. Agr. Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 139 p.
- Sederberg M. (2008). Physical mapping of ribosomal RNA genes in new world members of the genus *Chenopodium* using fluorescence *in situ* hybridization. M. S. Thesis, Brigham Young University.

- Simmonds, N. (1965). The grain chenopods of tropical american highlands. *Economic Botany*, 19 (3): 223-235.
- Simmonds, N. (1995). Evolution of crop plants. Longman Scientific and Technical, New York.
- Soliai M., Maughan J., Espinoza A., Fuentes F., King B., Petty A., Raney J., Adhikary D., Elzinga D., Leggett A., Coleman E., Stevens R., Udall A. and Jellen N. (2009). Genome Relationships in New World *Chenopodium* Species: II. Evidence from DNA Sequencing. Plant & Animal Genomes XVII Conference Proceeding, San Diego, USA, January. p. 10 – 14.
- Staub, J; Felix S. (1996). Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *Revista Hort Science* Vol. 31 paper N°5 University of Wisconsin-Madison.
- Stevens R., Coleman C., Parkinson S., Maughan P., Zhang H., Balzotti M., Kooyman D., Arumuganatha K., Bonifacio A., Fairbanks D., Jellen E. and Stevens J. (2006). Construction of a quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) BAC library and its use in identifying genes encoding seed storage proteins. *Theoretical and Applied Genetics*. Vol. 112, No. 8: p. 1593 – 1600.
- Tapia M. (1990). Cultivos Andinos subexplotados y su aporte a la alimentación. Instituto Nacional de Investigación Agraria y Agroindustrial INIAA – FAO, Oficina para América Latina y El Caribe. Santiago de Chile.
- Toledo, J. (2000). Avances tecnológicos para la conservación de germoplasma de papa, camote, raíces y tubérculos andinos. Centro Internacional de la Papa. Lima Perú.

- Turner T. (2007). Cloning and characterization of the Salt Overly Sensitive 1 (sos1) gene in *Chenopodium quinoa* Willd. M. S. Thesis, Brigham Young University.
- Vos, Pieter; Rene Hogers; Marjo Bleeker; Martin Reijans, (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprint. Nucleic Acids Research Vol 23 paper N°21. Oxford University.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van De Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. (1995). AFLP: a new technique for DANN fingerprint. Nucleic Acids res. 23:4407-4414.
- Ward, S. y Jonhson, D. (1993). Cytoplasmic male sterility in quinoa. Euphytica 66:217-223.
- Walters, T.W. (1988). Relationship between isozymic and morphologic variation in the diploids *Chenopodium fremontii*, *C. neomexicanum*, *C. palmeri* and *C. watsonii*. Amer. J. Bot. 75(1):97-105.
- Welsch, J. Y McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Researcher 18 (24): 7213-7218.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Meyer, W. (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press Incl. Boca Ratón, Florida.
- Wilson H. (1988). Quinoa biosystematics II: free living populations. Econ Bot. Vol. 42: p. 478 – 494.
- Wilson H. (1988a). Allozyme variation and morphological relationships of *Chenopodium hircinum*. Systematic Botany. Vol. 13: p. 215 – 228.

- Wilson H. (1988b). Quinoa biosystematics II: free living populations. *Econ Bot.* Vol. 42: p. 478 – 494.
- Wilson H. and Manhart J. (1992). Crop/Weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd. and *C. berlandieri* Moq. *Theor. Appl. Genet.* Vol. 86: p. 642 – 648.
- Wilson H. and Manhart J. (1993). Crop/weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd. and *C. berlandieri* Moq. *Theor Appl Genet* 86:642-648.
- Wilson, H.D. (1976). A biosystematic study of the Chenopods and related species. Ph.D. Thesis. Indiana University. USA.
- Wilson, H. and Heiser, C.B. Jr. (1979). The origin and evolutionary relationship of huauzonthe (*Chenopodium nuttalliae*) domesticated chenopod of Mexico. *Am. J. Bot.* 66: 198-206.
- Wilson, H. (1988). Quinoa biosystematics. I: Domesticated populations. *Econ. Bot.* 42:461–477.
- Wilson, H.D. (1988). Allozyme variation and morphological relationships of *Chenopodium hircinum* (s.l.). *Syst. Bot* 13(2):215-228.
- Wilson, H y Manhart, J. (1993). Crop/weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd. And *C. berlandieri* Moq. *Theor. Appl. Genet.* 86:642-648.
- Williams, JKG.; AR., Kubelik; KJ., Livak; JA., Rafalski; SV., Tingey. (1990). DNA Polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 (24). 6531-6535.

- Winkel T., Lhomme J., Nina Laura J., Mamani Alcón C., Del Castillo C. y Rocheteau A. (2009). Assessing the protective effect of vertically heterogeneous canopies against radiative frost: the case of quinoa on the Andean Altiplano. *Agricultural and Forest Meteorology*. Vol. 149: p. 1759 – 1768.
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* Vol. 15: p. 323 – 354.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Xingu A., De La Cruz T., Balbuena M., Laguna C. e Iglesias G. (2009). Caracterización de germoplasma de huauzontle (*Chenopodium berlandieri* ssp. *nuttalliae*) mediante técnicas moleculares SSR. XIX Congreso técnico Científico ININ_SUTIN. Centro Nuclear de México.
- Zemetra, R., Hansen, J., & Mallory, C. (1998). Potential for gene transfer between wheat (*Triticum aestivum*) and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*). *Weed*.

FUENTES ON LINE:

Cornide, M. (2002). Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas. Ed. Félix Varela, La Habana, Cuba. (en línea).
Consulta: 26 de marzo del 2009. Disponible en http://www.cnic.edu.cu/pub_biot.htm.

Food and Agricultural Organization of the United Nations FAO. (en línea).
Consulta: 23 de enero del (2009). Disponible en < www.fao.org >.

INIAP & Fundación IDEA. (2001). Manual de producción de Quinoa de calidad, en el Ecuador. (en línea). Consulta: 23 de septiembre del 2008. Disponible en:

<http://images.google.com.ec/imgres?imgurl=http://www.concope.gov.ec/Ecuaterritorial/paginas/Apoyo_Agro/Tecnologia_innovacion/Agricola/Cultivos_Tradicionales/Manuales/IMAGENES_QUINUA/36a.gif&imgrefurl=http://www.concope.gov.ec/Ecuaterritorial/paginas/Apoyo_Agro/Tecnologia_innovacion/Agricola/Cultivos_Tradicionales/Manuales/Marroz_quinoa/Manual_Quinoa.htm&usg=__C06Q5nubcn5ivLGUuMiH96fUMj4=&h=292&w=406&sz=19&hl=es&start=1&um=1&tbnid=YchWJM:&tbnh=89&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Detapas%2Bfenologicas%2Bde%2Bquinua%26um%3D1%26hl%3Des%26sa%3DN>

Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295. (DOI 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x). (en línea)
Consulta: 23 de septiembre del 2008. Disponible en <<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAIEx/>>

Salinas, C. (2004). Sanjinés. Fundación PROINPA: Estudio de los impactos sociales, ambientales y económicos de la promoción de la quinua en Bolivia (en línea). Consulta: 24 de Junio de 2009. Disponible en http://www.underutilizedspecies.org/Documents/PUBLICATIONS/quinoa_case_study_es.pdf

BOLETIN DIVULGATIVO:

Consejo Internacional de Recursos Filogenéticos (CIRF). (1981). Descriptores de quinua. Roma. 15pp,

FERPE – Fundación Escuelas Radiofónicas Populares del Ecuador. (2000). Quinoa Orgánica. Quito / Riobamba

Gandarillas, H. (1989). Razas de quinua en Ecuador. EESC. INIAP. Boletín Técnico No. 67. 16 pp,

Landázuri, A. (1992). Siembra, cultivo y exportación de la quinua. Universidad San Francisco de Quito. 5pp,.

Nieto, C., Vimos, C., Monteros, C., Caicedo, C., & Rivera, C. "INIAP- Ingapirca-Tunkahuan. (1992). Dos variedades de quinua de bajo contenido de saponina". (INIAP: boletín divulgativo nº 228), estación "santa catalina". Quito- Ecuador.23 pp,

Villaseñor, J., & Espinosa, F. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

TESIS:

Aguirre, X. (2004). Genética de Poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., p73.

Andrade, R. P. (2009). Caracterización morfo-agronómica y molecular de la colección de chirimoya *Annona cherimola* Mill en la granja experimental Tumbaco INIAP- Ecuador. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí – Ecuador. p 15

García, K. I. (2008). Estudio de la diversidad genética de *Phaseolus lanatus* L. en zonas silvestres y cultivadas en la provincia de Imbabura –Ecuador mediante el uso de microsatélites. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí – Ecuador. p 39 -41

González, A. (2005). Biología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave garciae-mendozae*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., 70 p

Navarro, A., (1999). Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir

de RAPD's. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. México, D.F., UNAM. p 96.

OTROS:

Mujica, A., Jacobsen, S., Ortiz, R., Canahua, A., & Apaza, V. (2005). Diversidad genética de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres en la zona andina. In. Memorias del XI Congreso de Cultivos Andinos. Soporte CD.

Narváez, A. (2008). Técnicas moleculares para el Análisis de genoma: Marcadores moleculares de ADN. PUCE- ECUADOR. pp: 1 – 6. Soporte CD.

Rohlf J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America.

ANEXOS

Técnicas, instrumentos, equipos de investigación.

Material para la extracción de ADN

Material químico

Acido acético glacial

Agua destilada

Alcohol isoamílico, (Merck)

Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB), (Sigma)

Bomba de vacío

β – mercaptoetanol, (Sigma)

Cloroformo, (Merck)

Cloruro de sodio, (Merck)

EDTA (ácido etilen diamino tetra – acético), (Sigma)

Etanol absoluto 70º y 96º, (Merck)

Isopropanol, (Merck)

Nitrógeno líquido

RNAase A, (Concert TM Invitrogen Life Technologies)

SDS (Sodium dodecil sulfato)

PVP (polyvinilpirrolidone)

Tris (Tris[hidroxiometil] amino etan), (Merck)

Material de Laboratorio

Agitadores magnéticos

Espátulas, pinzas, tijeras.

Contenedor de Nitrógeno Líquido

Gradillas y soportes para tubos.

Guantes de vinilo, (Guardian TM)

Juego completo de pipetores (BIO-RAD)

Magnetos

Matraces erlenmeyer, (Pirex®)

Morteros de porcelana con su respectivo pistilo
Puntas plásticas de 10, 200 y 1000 µl de capacidad (Axygen)
Probeta de 10, 100, 1000 ml. (pirex®)
Racks polypropylne, (Axygen)
Tubos para microcentrífuga de 0.6, 1.7 y 2 ml. (Eppendorf), (Axygen)
Vasos de precipitado (pirex ®)

Equipos

Autoclave (Market Forge, modelo Sterlimatic)
Balanza analítica, (Sartorius, modelo CP323S)
Cámara de Baño maría, (Cimatec S.A)
Cámara de Flujo laminar
Centrífuga refrigerada (4°C) (Mikro 22R Hettich Zentrifugen)
Congelador a - 20 °C (Electrolux)
Congelador a - 70 °C (Electrolux)
Estufa (Lab – line Instruments. Inc) modelo 3511-1
Horno microondas, (Electrolux)
Potenciómetro, (HANNA intruments pH 211)
Refrigeradora, Electrolux
Vórtex, (Scientific Industries, Vórtex – Genie1

Material para la electroforesis

Material químico

Acido Acético glacial, (Merck)
Acrilamida, (BIO-RAD 99.9%)
Agarosa, (Gibco BRL. Ultra pure)
Agua destilada
Azul de bromofenol (Sigma)
Bind Silano adherente, Silane A 174 (Merck)
Bromuro de Etidio, (Sigma)
Bisacrilamida (N,N' – Methyllene- bis- acrymalide), (Sigma)
Carbonato de Sodio, (Merck)

Glicerol
Formaldehído al 37%, (Sigma)
Formamida, (Applichem)
Fuente de poder, (BIO-RAD)
Marcador de peso molecular, (Gene Ruler TM 100 bp DNA Ladder, Fermentas Life Sciences).
Marcador de peso molecular, ADN del fago Lambda λ Pst I, (Gibco)
Nitrato de plata, (Merck)
Papel Tissue (Kimwipe®)
Película fotográfica (Kodak, APC film)
Persulfato de Amonio, (Sigma)
Revelador y fijador de fotografía (Kodak GXB, 5X)
TEMED (N,N,N'N'- Tetra – metil etilen di-amina) (Sigma)
Tiosulfato de sodio, (Merck)
SigmaCote, (Sigma - Aldrich)
Urea, (Merck)

Materiales de Laboratorio

Cajas de dilución de 96 pocillos, 1 ml de capacidad c/u; (Axygen científico)
Gradillas y soportes para tubos
Placas de vidrio para electroforesis vertical
Racks polypropylne, (Axygen)
Termómetro, (Fisherbrand ®)
Vasos de precipitado, (Pyrex)

Equipos

Cámara de video, tarjeta capturadora de imágenes digital, (Digital Color CCD, AVC 591) y computadora
Cámaras de electroforesis horizontal, (EC Minicell y BIO-RAD SubCell – 192)
Cámara de electroforesis vertical, Sequi – Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis CELL, (BIO-RAD)
Cámara digital, (AVC 591 Digital Color CCD)
Expositor de luz UV Transiluminador 2000, (BIO-RAD)

Escáner, (Epson Perfection 1260)
Horno Microondas, (Electrolux)
Impresora Láser, (Seros Phaser 3120)
Purificador de agua, (Milipore, Simplicity 185)
Refrigeradora, (Electrolux)
Shaker, (Modelo C10 Platform, New Brunswick Scientific)

Material para PCR

Material químico

Aceite mineral, (Sigma)
Agua libre de nucleasas, (Sigma)
Alcohol 96%
Cloruro de Magnesio 1 M solución, (Sigma Lote 99H8925)
Desoxinucleótidos, (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas Lote: 0354)
EDTA, (Sigma)
Enzima T4 ADN ligasa
Enzimas de restricción: EcoRI - MseI
Enzima Taq ADN polimerasa y solución tampón de almacenamiento.
Iniciadores para Eco RI y Mse I
Kit de AFLP® Core Reagent Kit (INVITROGEN)
Solución tampón 10X PCR Buffer II (INVITROGEN)
Xilén cianol (Sigma)

Material de Laboratorio

Micropipetas regulables de 0.5–10µl, 5–20µl, 100–1000µl (uso exclusivo para PCR), (BIO-RAD)
Placas de policarbonato PCR de 96 pocillos, (Axygen)
Puntas para micropipeta 0.5-10µl, 20-100 µl, 100-1000 µl, (Axygen)
Tapa de placas PCR de 96 pocillos, (Axygen)
Tubos en tiras y tapas en tiras para PCR, (Axygen)
Tubos Strips 0.2 ml para PCR, (Axygen)

Equipos

Microcentrífuga para tubos de 1.7 ml, de un máximo hasta 10000 rpm, (Denver Instruments co.)

Termociclador, (GeneAmp ® PCR System 9700)

Software

NTSys -pc versión 2.00 (Applied Biostatistics Inc., Setauket, Nueva York, EE. UU).

Paint Shop Pro 5.01 (Jasc Corporate, MN, USA)

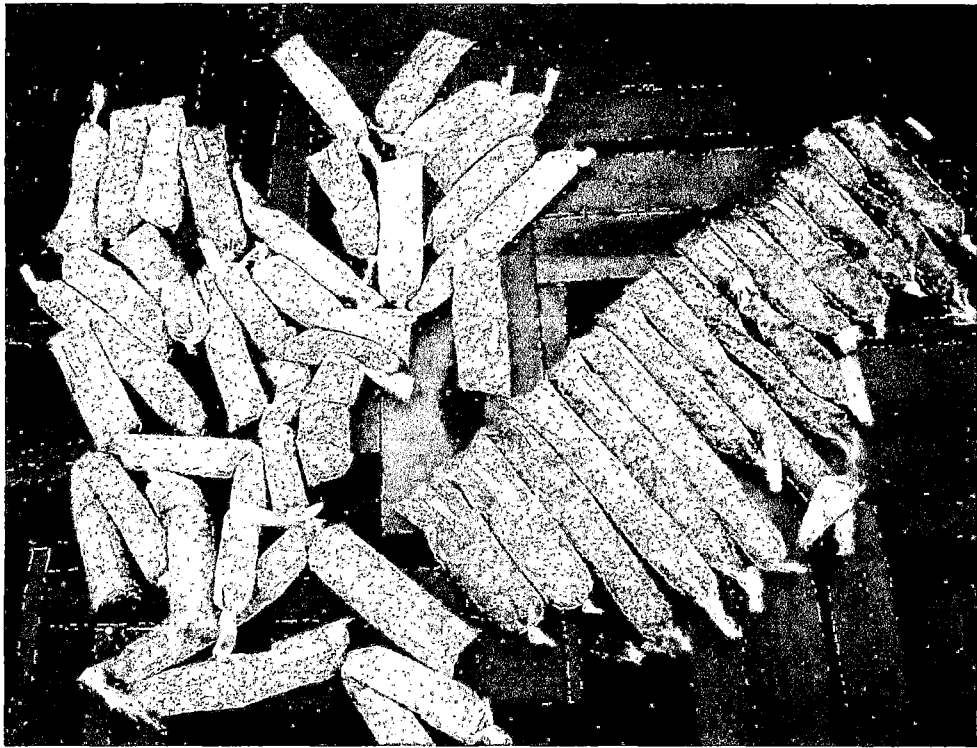


Figura 5 Muestras de variedades nativas de quinua en estudio

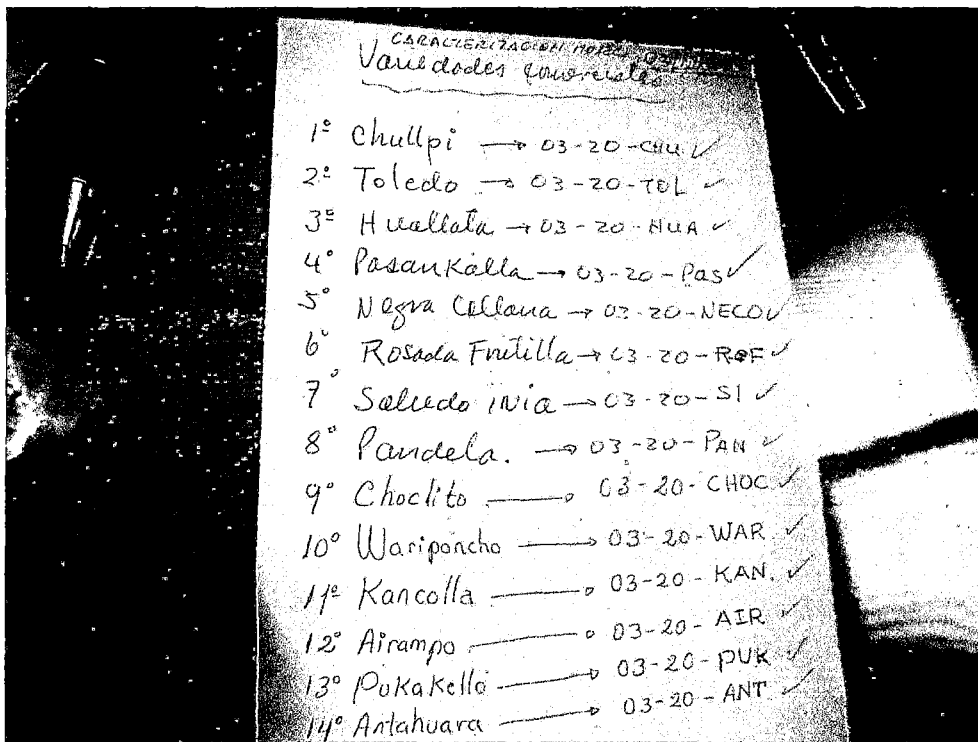


Figura 6 Nombre de las variedades nativas de quinua en estudio



Figura 7 Muestras de quinua del Banco de Germoplasma CIP Camacani.

RELACION DE ACCESIONES
VARIETADES NATIVAS DE QUINUA.
ESPECIE: QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willdenow)

N°	CODIGO	N°	CODIGO	N°	CODIGO	N°	CODIGO
01	03-20-001	26	03-20-895	51	03-20-214	76	ANTAHUARA
02	03-20-301	27	03-20-860	52	03-20-228	77	PUKA KILLU
03	03-20-320	28	03-20-879	53	03-20-293	78	AYRAMPU
04	03-20-321	29	03-20-880	54	03-20-231	79	PHASANOALLA
05	03-20-192	30	03-20-869	55	03-20-796	80	03-08-716
06	03-08-101	31	03-20-882	56	03-20-267	81	03-08-645
07	03-20-149	32	03-20-886	57	03-20-216	82	03-08-063
08	03-20-103	33	03-20-885	58	03-20-230	83	0775
09	03-20-165	34	03-20-776	59	03-20-241	84	03-08-74
10	03-20-928	35	03-20-719	60	03-20-223	85	03-08-693
11	03-20-991	36	03-20-759	61	03-20-230	86	03-20-749
12	03-20-973	37	03-20-749	62	03-08-228	87	03-08-671
13	03-20-980	38	03-20-701	63	03-20-211	88	03-08-904
14	03-20-935	39	03-20-639	64	03-20-284	89	948
15	03-20-909	40	03-20-650	65	216	90	03-08-044
16	03-20-980	41	03-08-654	66	03-20-252	91	03-08-017
17	09-08-885	42	03-20-653	67	03-08-049	92	09-08-1030
		43	03-08-661	68	03-08-061	93	03-08-106
		44	03-20-659	69	03-20-086	94	03-08-168
20	03-20-871	45	03-20-695	70	03-20-061	95	03-08-104
21	03-20-857	46	03-20-690	71	03-20-050	96	03-08-129
22	03-20-862	47	03-20-690	72	03-20-006	97	03-08-108
23	03-20-824	48	03-20-620	73	03-20-020	98	03-08-280
24	03-20-880	49	03-08-241	74	03-20-036	99	09-08-888
25	03-20-884	50	03-20-203	75	03-20-064		
						101	03-08-852
						102	03-08-867

Figura 8 Accesiones de quinua del Banco de germoplasma CIP Camacani

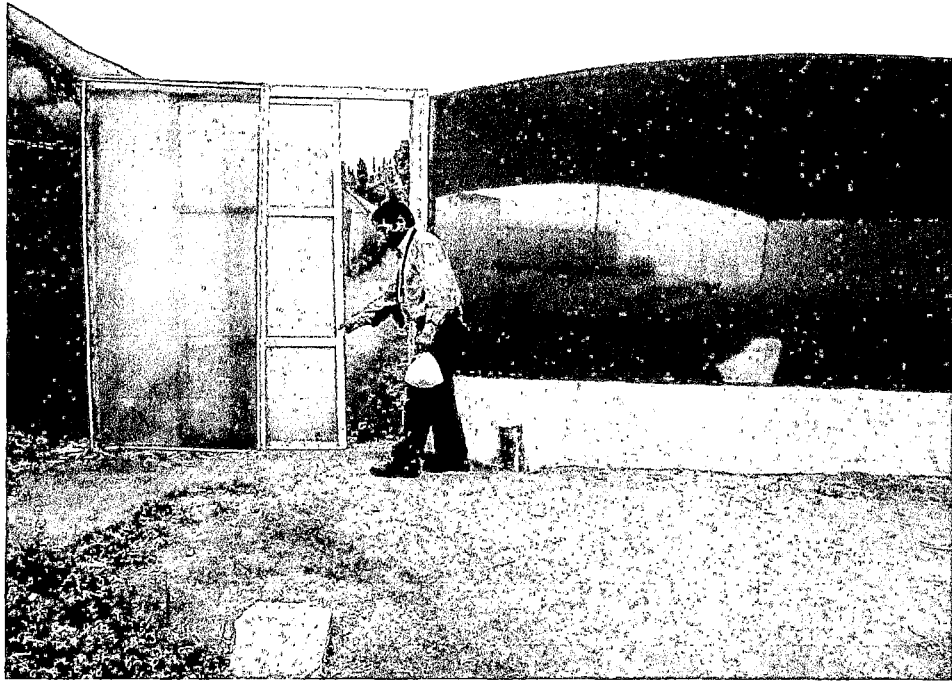


Figura 9 Invernaderos donde germinaron las muestras de quinua UNALM



Figura 10 Instalacion de muestras de quinua para la germinación UNALM



Figura 11 Instalacion de muestras de quinua para germinación UNALM



Figura 12 Plantulas de 8 hojas verdaderas de variedades nativas UNALM

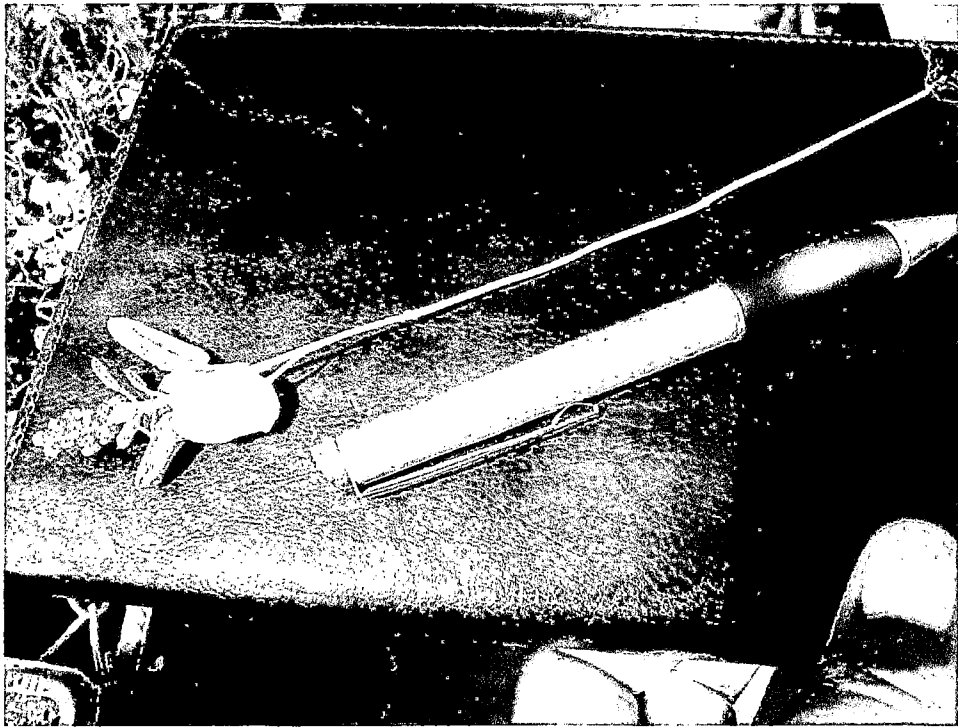


Figura 13 Plantulas en panojamiento, tomadas para extracción ADN



Figura 14 Preparacion de materiales para extracción de ADN de muestras



Figura 15 Equipos para determinar el ADN de las muestras de quinua

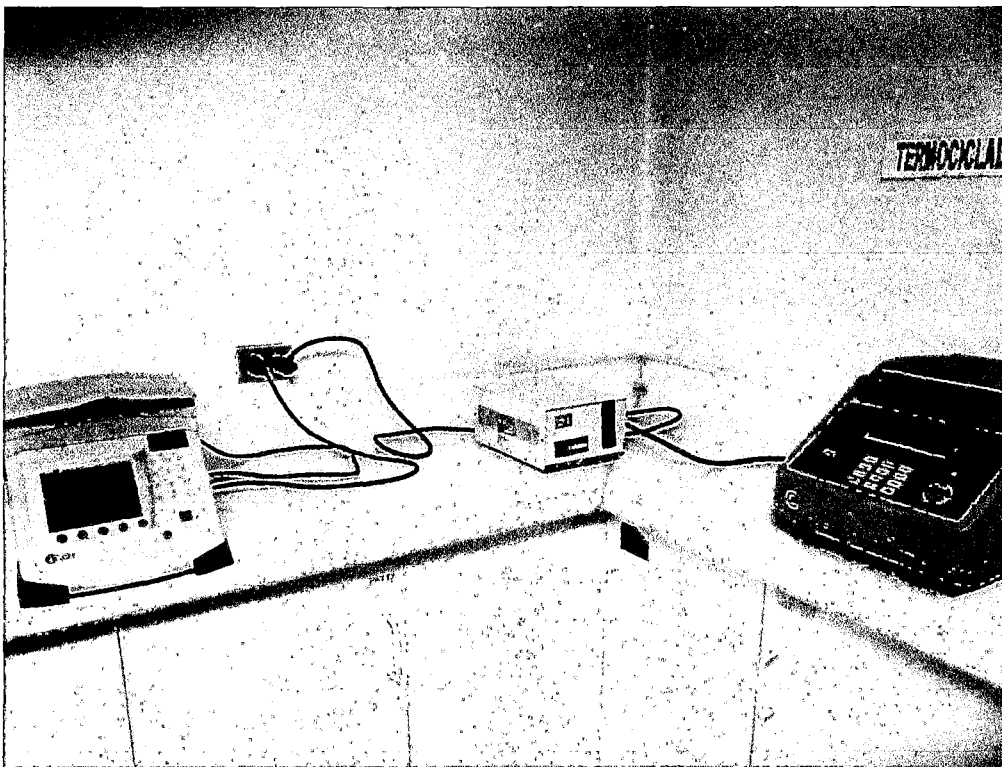


Figura 16 Termociclador que permitirá determinar el ADN UNALM



Figura 17 Equipo de escoreo de las muestras en estudio UNALM

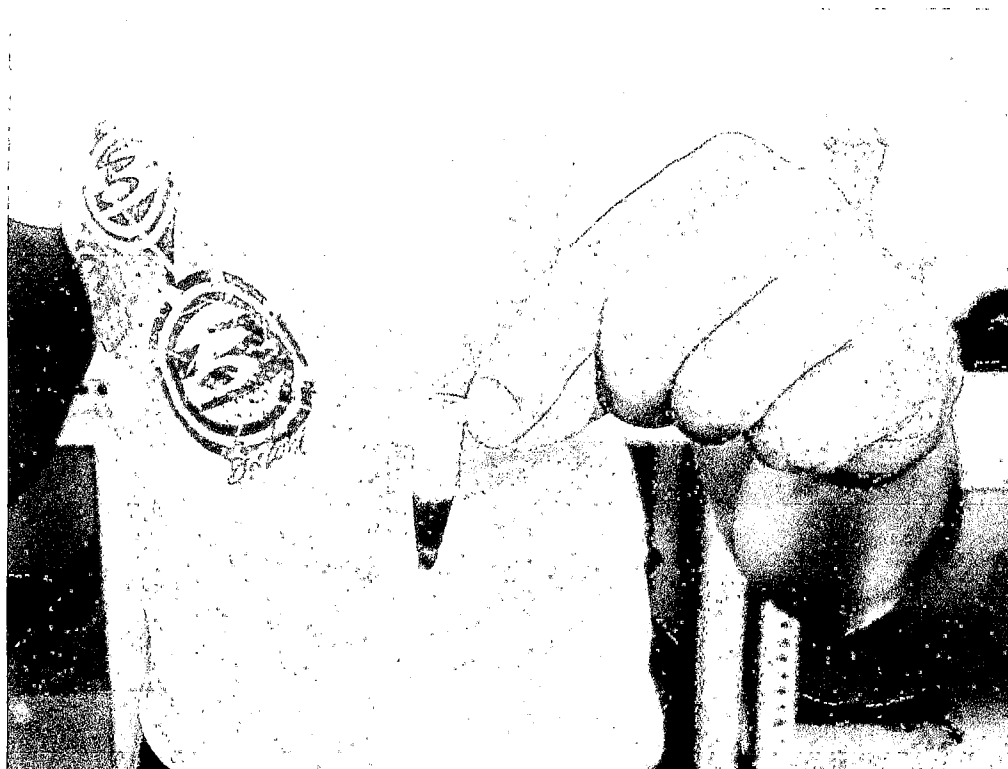


Figura 18 Obtencion de las muestras para poner en termociclador

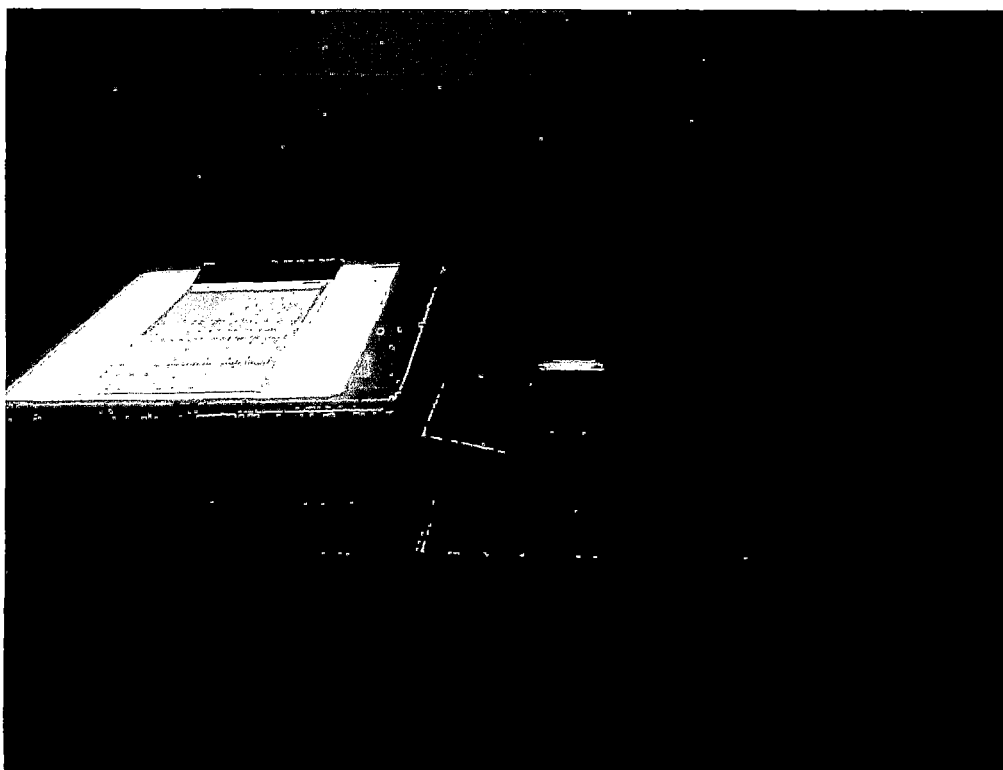


Figura 19 Zona de lectura de las bandas después del escaneo

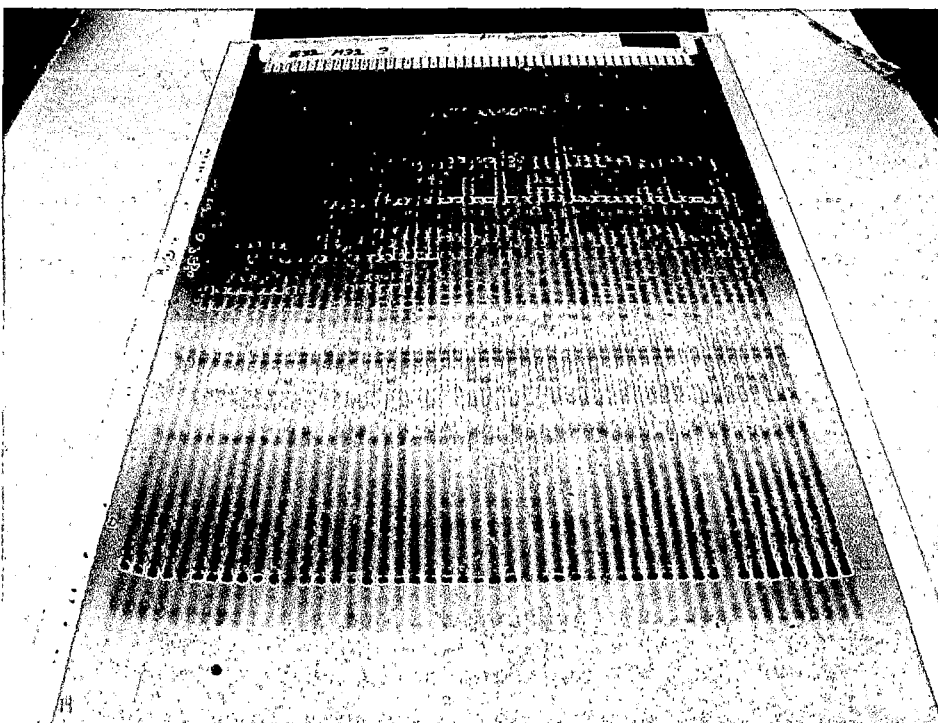


Figura 20 Lámina de escaneo de las muestras en estudio en IBT UNALM

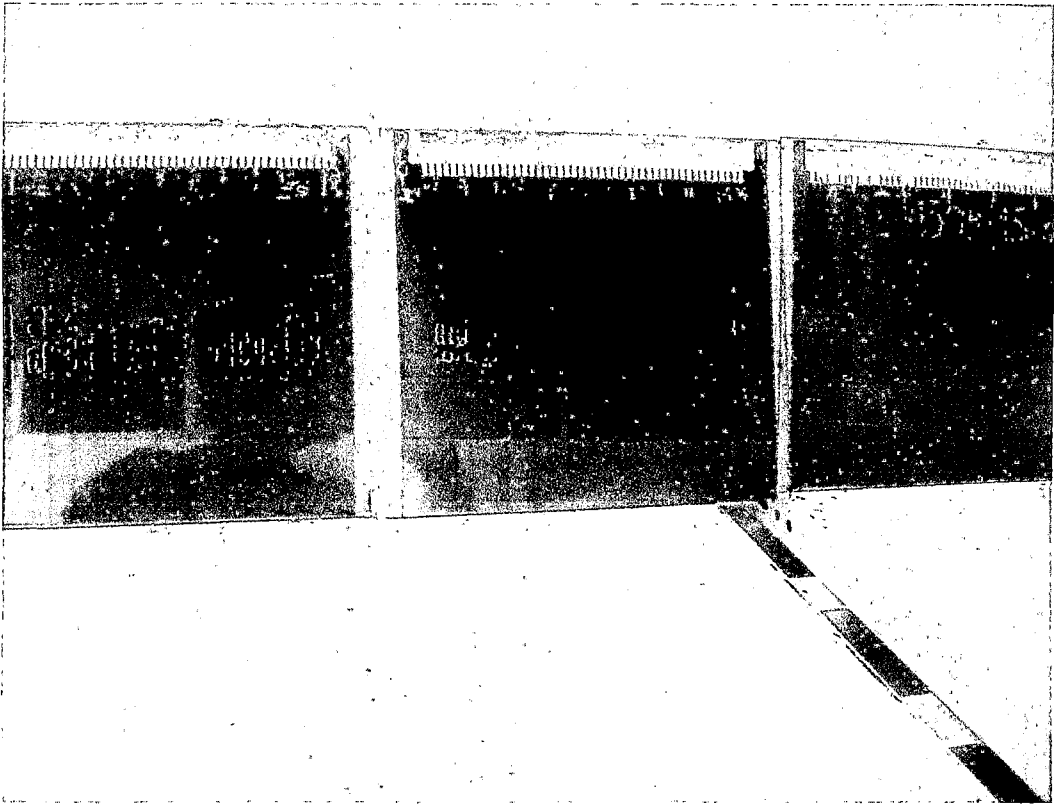


Figura 21 Láminas después del escaneo para la lectura en laboratorio IBT

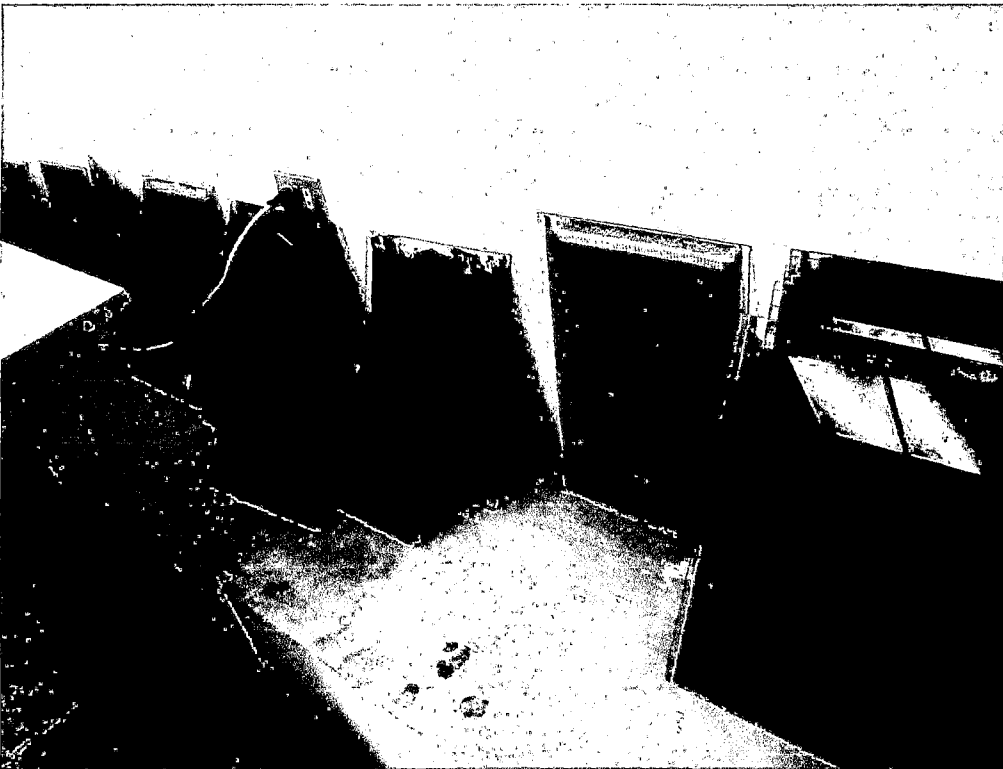


Figura 22 Zona de almacen después de las lecturas de las muestras