

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

ESCUELA DE POSTGRADO

ESPECIALIDAD DE MEJORAMIENTO GENETICO DE  
PLANTAS



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR INTER E INTRA  
GENOTÍPICA DE 16 ACCESIONES DE *Chenopodium quinoa*  
(QUINUA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ISSR

Tesis para optar el grado de:

*Magister Scientiae*

HÉCTOR LUIS TAMAYO CONTRERAS

Lima-Perú

2010

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**

**ESPECIALIDAD DE MEJORAMIENTO GENETICO DE PLANTAS**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR INTER E INTRA  
GENOTÍPICA DE 16 ACCESIONES DE *Chenopodium quinoa*  
(QUINUA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE ISSR**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentado por:**

**HÉCTOR LUIS TAMAYO CONTRERAS**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

M.S. Lourdes Tapia y Figueroa  
**PRESIDENTA**

Dr. Jorge Jiménez Dávalos  
**PATROCINADOR**

Dra. Luz Gómez Pando  
**MIEMBRO**

M.Sc. Julián Chura Chuquiya  
**MIEMBRO**

### **Dedicatoria**

A mi familia, a la enorme contribución de mi tesis. Gracias Dios mío

## **AGRADECIMIENTO**

Al Dr. Jorge Jiménez Dávalos por su gran amistad y sugerencias en la realización del presente trabajo de tesis.

Al Ing. Mg.Sc. Julián Chura Chuquiya por su apoyo incondicional en la realización de la tesis.

A la Blga. Eliana Iglesias por sus consejos y al apoyo con materiales para la presente tesis realizada.

A los profesores miembros del jurado Dra. Luz Gómez P. y Mg.Sc. Lourdes Tapia por su contribución en la tesis.

Al amigo incondicional Ing. Joel N. Flores T. y a la Blga. Estrellita Ponce por su apoyo y consejos en la elaboración de la presente tesis realizada.

Al sub proyecto “mejoramiento genético de la quinua para el Desarrollo Sostenible del Cultivo en la Sierra Central “, financiado por INCAGRO, en la realización de mi tesis.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II OBJETIVO</b>	<b>3</b>
<b>III REVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Características generales del cultivo</b>	<b>4</b>
<b>3.1.1 Origen del cultivo</b>	<b>5</b>
<b>3.1.2 Domesticación</b>	<b>7</b>
<b>3.1.3 Ecología y adaptación</b>	<b>8</b>
<b>3.2 Clasificación taxonómica</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Mejoramiento y herencia del cultivo</b>	<b>10</b>
<b>3.3.1 Reproducción del cultivo</b>	<b>11</b>
<b>3.4 Genética de la quinua</b>	<b>13</b>
<b>3.4.1 Los Cromosomas</b>	<b>15</b>
<b>3.4.2 Erosión genética</b>	<b>15</b>
<b>3.5 Producción del cultivo</b>	<b>15</b>
<b>3.6 Caracterización Molecular</b>	<b>16</b>
<b>3.6.1 Marcadores Moleculares</b>	<b>17</b>
<b>3.6.1.1 Ventajas de los Marcadores Moleculares sobre los Marcadores Morfológicos</b>	<b>19</b>
<b>3.6.2 Marcadores ISSR</b>	<b>20</b>
<b>3.6.3 Identificación del polimorfismo ISSR</b>	<b>21</b>
<b>3.6.4 Ventajas del Marcador</b>	<b>23</b>
<b>3.6.5 Desventajas del Marcador</b>	<b>23</b>
<b>3.6.6 Aplicaciones</b>	<b>24</b>
<b>3.6.7 Usos de ISSR que están siendo Usados en los programas de</b>	
<b>3.6.8 Mejora y Control biológico</b>	<b>24</b>

<b>3.7</b>	<b>Reacción en cadena de polimerasa (PCR)</b>	<b>27</b>
<b>3.8</b>	<b>Electroforesis</b>	<b>28</b>
<b>3.9</b>	<b>Análisis de Marcadores Moleculares</b>	<b>28</b>
<b>3.9.1</b>	<b>Estimación de la Semejanza Taxonómica</b>	<b>29</b>
<b>3.9.2</b>	<b>Coefficientes de Asociación</b>	<b>29</b>
<b>3.9.3</b>	<b>Matriz de Similitud</b>	<b>29</b>
<b>3.9.4</b>	<b>Análisis de agrupamiento</b>	<b>30</b>
<b>3.9.5</b>	<b>Representación gráfica del análisis de agrupamiento</b>	<b>30</b>
<b>3.10</b>	<b>Antecedentes de los Marcadores Moleculares</b>	<b>31</b>
<b>IV</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>Lugar de ejecución</b>	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>Material Vegetal</b>	<b>34</b>
<b>4.3</b>	<b>Material del laboratorio</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Metodología</b>	<b>37</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Germinación de las semillas</b>	<b>37</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Colección de material vegetal</b>	<b>37</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Molido de las muestras secas</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Extracción del ADN</b>	<b>37</b>
<b>4.6</b>	<b>Determinación de la calidad y concentración del ADN</b>	<b>38</b>
<b>4.7</b>	<b>Cuantificación del ADN</b>	<b>38</b>
<b>4.8</b>	<b>Procedimiento de amplificación de ADN</b>	<b>39</b>
<b>4.8.1</b>	<b>Amplificación</b>	<b>41</b>
<b>4.8.1.1</b>	<b>Preparación de la mezcla</b>	<b>41</b>
<b>4.8.1.2</b>	<b>Condiciones de amplificación</b>	<b>41</b>
<b>4.8.2</b>	<b>Preparación de geles de poliacrilamida</b>	<b>42</b>
<b>4.8.3</b>	<b>Tinción de geles</b>	<b>43</b>
<b>4.9</b>	<b>Evaluación de bandas</b>	<b>44</b>

<b>4.9.1</b>	<b>Índice Contenido de Polimorfismo (PIC)</b>	<b>45</b>
<b>4.10</b>	<b>Análisis de datos</b>	<b>46</b>
<b>V</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>5.1</b>	<b>Determinación del Contenido Polimórfico (PIC)</b>	<b>50</b>
<b>5.2</b>	<b>Análisis de agrupamiento</b>	<b>52</b>
<b>5.3</b>	<b>Caracterización intragenotípica</b>	<b>55</b>
<b>VI</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>VII</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>VIII</b>	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>62</b>
<b>IX</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>74</b>

## RESUMEN

La quinua es uno de los cultivos más antiguos de la cultura andina, desde hace más de 5000 años estuvo marginado al igual que los otros granos nativos como la kiwicha y cañihua. Actualmente la quinua en los últimos años ha tomado mayor importancia debido a que esta especie nativa de nuestro país tiene un alto valor agronómico, nutritivo y de exportación. La quinua está siendo explotada tanto para el consumo humano y forraje debido al alto contenido de aminoácidos no presentes en otros cereales. La quinua muestra amplia diversidad de genotipos y silvestres en los alrededores del Lago Titicaca. La diversidad genética se expresa en los diferentes colores de panoja, hojas, altura de planta, contenido de saponina, tipo de panoja y calidad de grano. La quinua es una especie de amplia adaptación a diferentes zonas agroecológicas reportándose la existencia de genotipos tolerantes a sequía, heladas, sales, alta calidad alimenticia, y buen potencial de rendimiento. El empleo de la biotecnología moderna está permitiendo una adecuada caracterización genética que contribuirá al desarrollo de variedades mejoradas. Los ISSR son marcadores moleculares a nivel de ADN que permiten diferenciar los genotipos. La técnica ISSR produce altos niveles de polimorfismo, son reproducibles y útiles para la identificación de la variación intragenotípica y intergenotípica de diversas especies. Se empleó 16 accesiones para la caracterización intergenotípica y 5 individuos de cada accesión para la caracterización intragenotípica. Un total de 10 primers generaron 90 bandas polimórficas con un peso molecular promedio de 400 a 3500pb, todos los individuos fueron scoreados y asignados con un valor numérico 1 a la presencia y 0 a la ausencia de bandas. Una matriz de datos fue realizado por el programa NTSYS versión 2.1 usando el coeficiente de similitud Jaccard, el dendograma fue construido usando el método de ligamiento promedio UPGMA. Los datos moleculares agruparon las accesiones en 3 diferentes grupos a un coeficiente de similitud de 0.79, el grupo 1 estuvo conformado por 12 accesiones: 5 de Puno, 3 de Cusco, 3 de Cajamarca y 1 de Arequipa; el grupo dos por 2 accesiones de Ancash y el grupo 3 por 2 accesiones: Puno y Arequipa. El polimorfismo generado por los marcadores ISSR mostró diferentes grados de relaciones genéticas entre las 16 accesiones. Un bajo nivel de variación intragenotípica se evidenció en las accesiones Cajamarca 1, Arequipa 1, Ancash 2, y Cusco 3 y un alto nivel de variación intragenotípica en las accesiones Cusco 2, Puno 2 y Arequipa 2.



## I. INTRODUCCIÓN

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es uno de los cultivos más antiguos de la cultura andina con 7000 años de antigüedad (Pearsall, 1992). Desde hace más de quinientos años su cultivo estuvo marginado al igual que otros granos nativos como la kiwicha y la cañihua, debido a que fueron considerados de uso en ceremonias religiosas y prohibidos por los españoles a su llegada al Perú.

Actualmente la quinua ha tomado mayor importancia debido a que es una especie nativa de nuestro país con alto valor agronómico, nutritivo y de exportación, debido principalmente a la gran diversidad genética existente, al igual que en los otros granos andinos, que se expresa en los diferentes colores de panojas, de hojas, de grano, altura de planta, contenido de saponina, tipo de panoja y calidad de grano (Esteban, 2001).

La quinua muestra amplia diversidad de genotipos y de parientes silvestres en los alrededores del Lago Titicaca de Puno y Bolivia evidenciándose mayor diversidad en las regiones de Cusco y Puno. Estudios recientes han demostrado que la quinua es una especie de amplia adaptación; sin embargo, existen variedades comerciales que presentan reducida adaptación. Es importante la caracterización y el desarrollo de variedades con buena adaptación a las diferentes zonas agroecológicas del Perú para incentivar su cultivo. Se ha reportado la existencia de genotipos tolerantes a sequía, heladas, sales, alta calidad alimenticia y buen potencial de rendimiento. La producción mundial de quinua es alrededor de 61.490 toneladas anuales (FAO, 2008).

El Perú es uno de los mayores productores de quinua con un 52% de la producción mundial (Mujica, 2005).

Los fenotipos de la quinua se pueden diferenciar por las características morfológicas de planta, grano y otras propiedades agrofisiológicas lo que ha permitido el desarrollo de variedades comerciales que se siembran actualmente. Sin embargo, es importante mejorar la identificación de fuentes de calidad de granos, rendimiento, resistencia a los principales factores bióticos y abióticos a nivel genotípico. Los marcadores moleculares de ADN son herramientas biotecnológicas que permiten diferenciar los

genotipos y características de las poblaciones, siendo de gran utilidad a los fitomejoradores; a la fecha solo unos pocos investigadores han reportado el desarrollo y uso de los marcadores moleculares en quinua. El empleo de la biotecnología moderna está permitiendo una adecuada caracterización genotípica que contribuirá al desarrollo de variedades mejoradas. El empleo de estas variedades podría contribuir al incremento del área de cultivo, disponibilidad de alimentos de calidad y la resistencia frente a determinados factores bióticos y abióticos ya mencionados. La quinua aun no ha sido totalmente explotada, se esta dando mayor énfasis a la caracterización e identificación de accesiones que puedan ser utilizadas en los programas de mejoramiento para el desarrollo de variedades, frecuentemente evaluadas fenotípicamente.

## **II. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la variabilidad genética inter e intra genotípica en 16 accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa*), a través de marcadores moleculares ISSR.

### **III. REVISIÓN DE LITERATURA**

#### **3.1. Características generales del cultivo**

La quinua es una planta anual perteneciente al género *Chenopodium*, de amplia distribución geográfica que va desde Perú, Ecuador, Colombia, Chile y Los Andes de Argentina (Wilson, 1999).

Esta especie andina, muestra amplia variabilidad de formas, diversidad de genotipos y de progenitores silvestres, en los alrededores del lago Titicaca de Perú y Bolivia, encontrándose la mayor diversidad en Bolivia y Perú. (Jacobsen y Mújica 2001)

Bukasov (1965), considera que el cultivo de la quinua en Los Andes de Perú y Bolivia es muy antiguo y que de ahí fue llevado hacia el norte hasta Colombia y hacia el sur de Chile. Estudios posteriores muestran concluyentemente que el centro de origen se encuentra desde el sur del nudo de Pasco hasta el altiplano Boliviano, por la diversidad de ecotipos encontrados.

La quinua es considerado como una especie alotetraploide ( $2n=4x=36$ ) de origen anfidiplóide mayormente distribuidas en el altiplano Perú-Boliviano donde se encuentra concentrada la mayor variabilidad y diversidad del cultivo y parientes silvestres. La quinua muestra un amplio rango de modificaciones adaptativas, condensación de inflorescencia, aumento de tamaño de la planta, fruto y alto nivel de pigmentación. Asimismo posee una gran importancia debido a la enorme variabilidad y diversidad mostrando adaptación a condiciones xerofíticas, suelos salinos, heladas, y sequías. El Perú cuenta con una limitada área agrícola donde hay zonas con problemas diversos el cual se evidencia principalmente por la presencia de sales y baja disponibilidad de agua, una alternativa importante son los diferentes cultivares de quinua en la que se reportan la existencia de genotipos tolerantes a sequía y sales.

La quinua por su amplia adaptación, tiene un enorme potencial de producción inclusive a nivel del mar, donde se han obtenido excelentes resultados.

Recientemente, su cultivo está tomando mayor importancia en nuestra costa, mayormente por el interés de la agroindustria y la exportación. Una mayor demanda de exportación permitiría la ampliación tanto del área cultivada como de su productividad (Mújica, 1996)

La quinua tiene un alto valor proteico y calórico, debido a la proporción adecuada de aminoácidos esenciales que son necesarios para el crecimiento y la reparación de los tejidos, también posee vitaminas y sales minerales indispensables para el control de las funciones corporales humanas. Adicionalmente posee múltiples cualidades nutracéuticas y alto contenido de proteínas en el rango de 12% a 20% (INIA, 2006)

### **3.1.1 Origen del cultivo**

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 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 demuestra que su domesticación tomó mucho tiempo, hasta conseguir la planta domesticada y cultivada. Probablemente el proceso se inició como planta usada principalmente por sus hojas en la alimentación y luego por las semillas. Actualmente, las especies y parientes silvestres se utilizan localmente como verdura de hoja en muchas comunidades del área andina. Posteriormente, la especie fue adaptada a diferentes condiciones agroclimáticas, edáficas y culturales, haciendo que la planta presente una amplia adaptación desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm y usos diversos en las diferentes comunidades étnicas de acuerdo a sus necesidades alimentarias.

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

La quinua ha sido cultivada en la región de los andes por muchos miles de años, siendo uno de los granos principales para los agricultores, esta especie es nativa de sur América, la cual posteriormente fue introducida a los estados Unidos y Europa (FAO, 1998)

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 *Ch. berlandieri ssp nutalliae* (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 coespecíficos, además por haberse obtenido descendencia al realizarse cruzamiento entre ellos. La quinua en la actualidad tiene distribución mundial: en América, desde Norteamérica y Canadá, hasta Chiloé en Chile; en Europa, Asia y el Africa, obteniendo resultados aceptables en cuanto a producción y adaptación. (Mujica *et al.*, 2001)

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 coespecíficos distintos, pero coespecíficos con sus formas silvestres acompañantes, del mismo modo Wilson sugiere que la quinua se habría derivado directamente de algún tipo silvestre en los Andes. También, manifiestan que *Ch. quinoa* habría evolucionado independientemente en sudamérica sin influencia de las especie del Norte, siendo los posibles progenitores *Ch. hircinum* de tierras bajas o una especie silvestre extinguida de los Andes, que pudo haber sido desplazada o asimilada por el acompañante silvestre. El origen de *Ch. quinoa* aún es complejo, especialmente por que están involucradas muchas posibilidades. Se sugiere la participación de dos especies diploides en el origen de *Ch. quinoa*, por lo que la quinua sería un anfidiplóide con herencia disómica, siendo el

pariente silvestre más cercano de *Ch. quinoa*, *Ch. hircinum* y de *Ch. nuttalliae* el silvestre *Ch. berlandieri* respectivamente. Desde el punto de vista de su variabilidad genética puede considerarse como una especie oligocéntrica, con centro de origen de amplia distribución y diversificación múltiple, siendo la región andina y dentro de ella, las orillas del Lago Titicaca, las que muestran mayor diversidad y variación genética. La historia tiene pocas evidencias arqueológicas, lingüísticas y etnográficas, sobre la quinua, pues no se conocen muchos ritos religiosos asociados al uso del grano. Las evidencias arqueológicas del norte chileno, señalan que la quinua fue utilizada 3000 años antes de Cristo, mientras que hallazgos en la zona de Ayacucho indicarían que la domesticación de la quinua ocurrió hace 5000 años antes de Cristo. Existen también hallazgos arqueológicos de quinua en tumbas de Tarapacá, Calama, Arica y diferentes regiones del Perú, consistentes en semillas e inflorescencias, encontrándose abundante cantidad de semillas en sepulturas indígenas de los Tiltil y Quillagua (Chile). ([Wilson y Heiser, 1979](#))

### **3.1.2 Domesticación**

Durante la domesticación de la quinua y como producto de la actividad humana, han ocurrido un amplio rango de modificaciones morfológicas. Entre ellas, la condensación de la inflorescencia en el extremo terminal de la planta, el incremento del tamaño de la planta y la semilla, la reducción de la testa, la pérdida de la dormancia para la germinación, la pérdida de los mecanismos de dispersión de la semilla, y altos niveles de pigmentación, consiguiéndose que la actual planta de quinua tenga 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.

Seguramente, durante la domesticación el hombre andino seleccionó 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 Achachinos 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, 1988)

### **3.1.3 Ecología y adaptación**

Su cultivo se mantiene en todas aquellas regiones andinas que fueron alguna vez dominadas por los incas. Así, la encontramos desde Colombia hasta Argentina y Chile, pero las mayores áreas productivas corresponden a Perú en las zonas agroecológicas Quechua y Suni, y a Bolivia. En el Perú, el departamento de Puno tiene la más extensa superficie de cultivo, con aproximadamente 12,000 ha. El cultivo de quinua se produce en un amplio rango altitudinal que comprende la zona Quechua (piso de valle interandino) hasta la zona de Puna Baja (Altiplano), entre los 2600 a los 3900 msnm. Su cultivo muestra adaptabilidad a pisos altitudinales menores, de tal manera que se la puede producir en zonas bajas y aún en ceja de selva. Recientemente ha sido probado su cultivo en la zona de Huaral que pertenece a la sierra limeña entre los 400 y 500 msnm. El mayor desarrollo de este cultivo se presenta sin embargo en las zonas de Puna Alta y Quechua, como es el caso de Puno y Cusco. En Puno que es el mayor productor de quinua, se cultiva entre los 3800 a los 3900 msnm. En Cusco el rango es más amplio y va de los 2700 a los 3900 msnm. En cuanto al fotoperíodo, o longitud del día, la quinua muestra varias respuestas, desde días cortos requeridos para la floración cerca del Ecuador hasta no respuesta en Chile, pluviosidad entre 300 y 1000 mm, rango altitudinales desde el nivel del mar en Chile hasta 4000 msnm, tolera un amplio rango de temperaturas entre -1° C y hasta 35° C, la planta no es afectada por heladas de -1° C en la etapa de desarrollo, excepto durante la floración, Puede crecer en un amplio rango de pH del suelo entre 6-8.5 tolera suelos infértiles, salinidad moderada y bajos niveles de saturación de base. (Mujica, 1999)



### 3.2. Clasificación Taxonómica

Según GRIN (2009):

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

El género *Chenopodium* es el principal dentro de la familia *Chenopodiaceae* y tiene amplia distribución mundial, con cerca de 250 especies. Dentro del género *Chenopodium* existen cuatro especies cultivadas como plantas alimenticias: como productoras de grano, *Ch. quinoa* Willd. y *Ch. pallidicaule* Aellen, en Sudamérica; como verdura *Ch. berlandieri ssp. nuttalliae*, en México; *Ch. carnosolum* y *Ch. ambrosioides* en Sudamérica; el número cromosómico básico del género es nueve, siendo una planta alotetraploide con 36 cromosomas somáticos. 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 alveolados), 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).Lejosperma (granos lisos no alveolados), ubicando dentro de ella a *Ch. pallidicaule* con  $2n = 2x =18$  cromosomas y *Ch. album* de los Himalayas, con  $2n = 6x = 54$  cromosomas, *Ch. carnosolum*, con  $2n = 2x = 18$  cromosomas; *Ch. petiolare*, con  $2n = 2x =18$  cromosomas; *Ch. papulosum* y *Ch. zobelli*.

c). Undata, ubicando a *Ch. murale* con  $2n = 2x = 18$  cromosomas y

d). Grossefoveata

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

El cultivo de quinua es una planta herbácea anual, de amplia dispersión geográfica, presenta características peculiares en su morfología, coloración y comportamiento en diferentes zonas agroecológicas. Es una planta anual cuyo periodo vegetativo varía de 150 a 240 días, presenta enorme elasticidad para adaptarse a diferentes condiciones medio ambientales, desde los 40 hasta los 4200 msnm, lugares donde las precipitaciones varían de 200 a 800 mm anuales. El color de la planta también varía desde al rojo, pasando por el púrpura con todas sus gamas. La planta puede medir de 1m. a 3, 5 m de altura, según los ecotipos y las razas, siendo influenciadas por el ambiente y las condiciones en las cuales se siembra la especie. Los genotipos que crecen en la costa tienen mayor altura que aquellos que crecen por encima de los 3000 msnm y zonas frías. (Giusti, 1970)

### **3.3. Mejoramiento y herencia del cultivo**

El sistema de cruzamiento es preferentemente autógamo, aunque presenta entre 2 y 9% de alogamia (Simmonds, 1965)

Las flores son pequeñas, incompletas, sésiles y desprovistas de pétalos, constituida por una corola formada por cinco piezas florales tepaloides, sepaloides, pudiendo ser hermafroditas, pistiladas (femeninas) y androestériles, lo que indica que podría tener hábito autógamo como alógamo, en general se indica que tiene 10 % de polinización cruzada (Rea, 1969)

la inflorescencia normal tiene en la misma panoja flores hermafroditas y femeninas. El porcentaje de estas últimas difiere según la variedad, dándose incluso el caso de que en un glomérulo únicamente la flor apical es hermafrodita (Lescano, 1994)

Indudablemente la quinua es la especie mejor adaptada a las condiciones semiáridas y frías del altiplano peruano-boliviano, donde la producción de alimentos tiene especial importancia para soportar una población creciente, tanto rural como urbana. El conocimiento de la herencia de algunos caracteres tan simples como el color de la planta, que son independientes del rendimiento, es de enorme importancia para la producción comercial de la quinua, a fin de prevenir mezclas en el campo que pueden afectar la calidad del grano. La herencia de los caracteres se ha empezado a estudiar, es mucho lo que queda por investigar, si se trata de comparar con los conocimientos que se tienen sobre la genética de otras especies como el trigo, la papa, el algodón, el sorgo o cualquier otra que se cultiva en el hemisferio norte. La quinua presenta una gran variación en cuanto a color de la planta y del fruto, no solamente por la diversidad sino también por el contraste. Son igualmente variables la altura sobre el nivel del mar en que se cultiva, y su adaptación a las diferentes condiciones ambientales típicas de los Andes. La altitud para el cultivo comercial varía desde el nivel del mar a 4000 msnm, la temperatura media entre 10° a 20oC (Lescano, 1994).

### **3.3.1 Reproducción del cultivo**

Según Lescano (1994) 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. La reproducción sexual constituye una fuente importante de variación, la misma que es aprovechada en el mejoramiento genético de los cultivos.

Las investigaciones en la biología floral han mostrado una diversidad en las estructuras florales. Al estudiar las chenopodiáceas del altiplano ha descrito plantas con flores ginomonoicas y ginodioicas. (Rea ,1969)

Se han encontrado flores femeninas y hermafroditas en una misma inflorescencia. La quinua presenta flores con gineceo y androceo (flor perfecta), flores pistiladas (flor imperfecta) y flores androestériles. Los tres tipos de flores se encuentran distribuidos en diferentes plantas de una misma variedad o en diferentes partes de una misma inflorescencia, se reporta resultados similares sobre la biología reproductiva y una posible protandria.

Con respecto a la forma de fecundación en la quinua, se menciona que la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) la kañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) y el Huazontle (*Ch. berlandieri* ssp. *nuttalliae* Safford) son especies autógamas, afirmación similar reportada por Wilson (1988).

Los ensayos conducidos 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 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 . Sobre la base de estos resultados, la quinua ha sido considerada como especie autógama con fecundación cruzada frecuente; por tanto, en el mejoramiento genético de la quinua se han aplicado preferentemente los métodos recomendados para autógamas y especialmente aquellas aplicados en el sorgo y arroz. (Lescano 1994)

### 3.4. Genética de la quinua

Según Cubero (2003) describe un ejemplo de fenotipo y genotipo de la siguiente manera: El individuo A homocigoto para AA tendrá sus flores rojas; aa las tendrá blancas. A la manifestación del genotipo en forma de carácter visible le llamamos (fenotipo). Así pues, a un genotipo AA le corresponde un fenotipo “flor roja”, y al genotipo aa un fenotipo “flor blanca”. El fenotipo es el resultado de las influencias interactivas del genotipo (totalidad de los genes) y del ambiente, asimismo menciona que cuando varios genotipos se expresan de diferente manera en distintos ambientes se dice que hay interacción genotipo-ambiente. El genotipo es la totalidad de los genes, que se encuentran en los cromosomas. Un gen sometido a mutaciones en el transcurso de tiempo, puede tener diferentes estados. Estos estados se llaman alelos. Como la quinua es un tetraploide, un gen puede tener en la misma planta 4 diferentes alelos del mismo gen, uno en cada uno de los 4 genomas. Los alelos pueden reaccionar dominante, recesivo o aditivo. Si los 4 alelos de un gen son idénticos, la planta es homocigótica para éste carácter. Si un alelo o más son diferentes, la planta es heterocigótica para éste carácter (En la tabla 1 se muestra la dominancia de algunos caracteres de la quinua). El color rojo de la planta es dominante sobre el color púrpura y este a su vez es dominante sobre el verde. La forma glomerulada de la panoja domina sobre la forma amarantiforme. El carácter amargo del grano es dominante sobre el carácter dulce. Axilares pigmentados dominan sobre axilares normales. El grano normal es dominante sobre el grano Chullpi (perisperma cristalino). La fertilidad masculina domina sobre la androesterilidad. El color negro del grano es dominante sobre cualquier otro color. (IICA et al., 2005)

Tabla 1: Herencia de algunos caracteres de la quinua

Carácter	Nº de genes	Cifra de genes	Numero de alelos	Tipo de alelos	Dominancia	Heredabilidad	Fenotipo planta	Genotipo
Color planta + color panoja	1	R	3	R r <sup>p</sup> r	Dominante r <sup>p</sup> y r <sup>f</sup> dominante sobre r	Simple	Rojo Púrpura Verde	R r <sup>p</sup> r <sup>p</sup> rr
Tipo panoja	1	G	2	G g	Dominante sobre g	Simple	Glomerulado Amarantiforme	G Gg
Contenido saponina	1	D	2	D d	Dominante sobre d	Simple	Dulce Amargo	D Dd
Esterilidad masculina	1	M	2	M m	Dominante sobre m	Simple	Fértil Estéril	M Mm
Carácter chullpi	1	S	2	S s	Dominante sobre s	Simple	Normal Chullpi	S Ss
Color axilar	1	Ax	2	Ax ax	Dominante sobre ax	Simple	Axilas pigmentadas Axilas sin pigmentación	Ax ax ax
Color grano	2	A       C	5       4	A a <sup>c</sup> a <sup>cc</sup>  a <sup>r</sup>  a   C c <sup>c</sup>  c <sup>cc</sup>  c	Dominante sobre a <sup>c</sup> Dominante sobre a <sup>cc</sup> Dominante sobre a <sup>r</sup> Recesivo  Dominante sobre C <sup>c</sup> Dominante sobre C <sup>cc</sup>  Recesivo	Simple       Interactivo + complementario	Negro  Café  Café claro Amarillo   Rojo Blanco	A-C  a <sup>c</sup> a <sup>c</sup> c <sup>c</sup> c <sup>c</sup> a <sup>c</sup> - c <sup>c</sup>  a <sup>cc</sup> a <sup>cc</sup> cc A C a <sup>c</sup> c <sup>c</sup>  A <sup>r</sup> a <sup>r</sup> aacc

### **3.4.1 Los cromosomas**

Los cromosomas se encuentran en el núcleo celular y son los portadores de los genes y por ende de la sustancia hereditaria. La quinua cultivada tiene 36 cromosomas, repartidos en 4 genomios con el número básico de  $x = 9$  cromosomas, es decir, la quinua es un tetraploide, con  $4x = 36$  cromosomas. Como esta tetraploidia es el resultado, de un cruce de dos diferentes especies diploides (con  $2n = 18$ ), la quinua es más específicamente un alotetraploide con  $2n=4x=36$  cromosomas. (IICA et al., 2005)

### **3.4.2 Erosión genética**

Se denomina erosión genética a la pérdida gradual de la diversidad genética. Aunque generalmente es aceptado que una cantidad significativa de erosión genética ocurre y sigue ocurriendo con la destrucción de ecosistemas y hábitats por las actividades humanas, existe muy poca información sobre las cantidades precisas y extensión de la pérdida. Ciertamente, debido a las comodidades alimenticias actuales ha habido un dramático incremento del uso de un pequeño número de cultivos uniformes altamente seleccionados y esto ha sido asociado a la reducción del número de cultivares y a la reducción de áreas en donde cultivos tradicionales y nativos crecían. (Hodgkin, 1995)

### **3.5. Producción del cultivo**

El rendimiento promedio de la quinua en el Perú fue solo 678 kg/ha en el año 1971, pero en estos últimos años la producción se está incrementando cada vez mas, el área de cosecha y la tendencia a mejorar la producción. En 1998 el área total de quinua cultivada en el Perú fue de 20,720 ha con una producción promedio de 931 kg/ha, la baja producción se debió a las severas condiciones climáticas. Las principales regiones de producción de quinua son Puno con un 75% total de la producción seguido por Junín con un 10% y Cusco con un 5% (Esteban et al., 2001).

Hoy en día la producción preliminar de quinua en el Perú es de 33.920 toneladas donde puno sigue concentrando el 80% del área cosechada y el 81% de la producción nacional (MINAG, 2009).

Los principales productores del cultivo de quinua a nivel internacional son Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia con más de 47534 hectáreas cultivadas y alrededor de 30412 toneladas cosechadas, de las cuales un 49% es consumido por familias productoras, 35% en los mercados locales y el resto para mercado externo. Se ha reportado en los últimos años unos 400 hectáreas de producción en los estados Unidos con un promedio de consumo de 1500 T/año, seguido de Holanda, Dinamarca, Kenia (África), Inglaterra, Italia, entre otros. (Mújica, 2003)

### **3.6. Caracterización Molecular**

La taxonomía siempre ha estudiado características morfológicas, lo cual requiere observaciones muy exhaustivas de los organismos en diferentes estadios de desarrollo. Los criterios utilizados carecen muy a menudo de definición y objetividad, en cualquier caso son marcadores ambiguos debido a las influencias ambientales. Afortunadamente la aparición de los marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva. La caracterización molecular al nivel de ADN de una variedad, línea o híbrido, es una herramienta importante para fines de registro y obtención de patentes de variedades mejoradas.

La utilización de marcadores moleculares requiere del cumplimiento de por lo menos cuatro criterios: variación inter-varietal, mínima variación intra-varietal, estabilidad ambiental y que los experimentos sean reproducibles.(Ferreira y Grattaplagia, 1998)

El empleo de marcadores de alta eficacia permite la diferenciación e identificación rápida de variedades, aun cuando se trata de variedades estrechamente relacionadas entre sí. Los marcadores permiten además detectar diferencias entre clones pertenecientes a la misma variedad. Es importante determinar la posible variabilidad existente entre y dentro de las nuevas variedades para su caracterización, difusión y utilización. La quinua a nivel de



fenotipo se puede diferenciar por sus características morfológicas de planta, grano y otras propiedades agrofisiológicas lo que ha permitido el desarrollo de variedades comerciales que se siembran actualmente. Sin embargo, es importante mejorar la identificación de fuentes de granos valiosos a nivel genotípico. Los marcadores moleculares de ADN permiten diferenciar los genotipos y características de las poblaciones, siendo de gran utilidad por los fitomejoradores; hasta la fecha solo unos pocos investigadores han reportado el desarrollo y uso de los marcadores moleculares en quinua. El empleo de la biotecnología moderna está permitiendo una adecuada caracterización genotípica que contribuirá al desarrollo de variedades mejoradas. El empleo de estas variedades podrían contribuir al incremento del área de cultivo, disponibilidad de alimentos de calidad y la resistencia frente a determinados factores bióticos y abióticos ya mencionados. La quinua aun no ha sido totalmente explotada, se esta dando mayor énfasis a la caracterización e identificación de accesiones que puedan ser utilizadas en los programas de mejoramiento para el desarrollo de variedades, frecuentemente evaluadas fenotípicamente.

### **3.6.1 Marcadores Moleculares**

Tradicionalmente, 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, que contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos Sin embargo, el bajo número de estos marcadores y la posibilidad de interferencia epistática o ambiental limitaban su uso. La revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos. El número de marcadores genéticos disponibles fue ampliado y la aplicación de la técnica se expandió prácticamente a todas las especies de plantas (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Con la llegada de las técnicas modernas de la biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel

del DNA, los llamados marcadores moleculares, que en general, pueden acelerar los programas de mejoramiento genético. Un marcador molecular es cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de DNA, que puede ser detectado y su herencia monitoreada. Un marcador molecular recibe el nombre de marcador genético cuando su comportamiento se rige de acuerdo con las leyes básicas de la herencia mendeliana (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores son secuencias de ADN que permiten identificar y diferenciar los genotipos, los marcadores pueden ser genes o secuencias de ADN, cuya codificación no se conoce y se transmiten con un comportamiento mendeliano y que generan patrones polimórficos y monomórficos (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Los marcadores idóneos son los de ADN, siendo válido cualquier fragmento que se encuentre muy cerca del gen o de la secuencia de interés y que lógicamente no afecte al carácter en estudio. (Azofiefa, 2006)

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

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

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, híbridos, entre otros, permitiendo así la

clasificación taxonómica de ecotipos o muestras que acceden a los Bancos de germoplasma como un complemento de los datos morfológicos. (Moreno, 1999)

Las características que debe poseer un buen marcador molecular, según Ferreira y Grattapaglia (1998) son:

- Polimórfico: debe ser variable entre los individuos.
- Discriminante: permite diferenciar individuos aun muy cercanos genéticamente.
- Multialélico y presencia de varios alelos en un solo locus.
- Codominante: distingue individuos homocigotos de individuos heterocigotos.
- No epistáticos: el genotipo del marcador puede ser determinado por su fenotipo, no importando el genotipo en los otros loci.
- No influenciado por el medio ambiente: el fenotipo no cambia según el medio.
- Distribución uniforme en todo el genoma: para facilitar la evaluación del polimorfismo en muchos lugares del genoma.
- Reproducible de un ensayo a otro.
- Económico y manejable a gran escala.

### **3.6.1.1 Ventajas de los Marcadores Moleculares sobre los Marcadores Morfológicos**

Entre las principales ventajas de los marcadores moleculares descritas por Ferreira y Grattapaglia (1998) tenemos:

- el nivel de polimorfismo de los marcadores moleculares es generalmente alto para cada locus estudiado facilitando la construcción de mapas genéticos. A diferencia del mucho esfuerzo y planificación que son necesarios para construir mapas genéticos a partir de marcadores morfológicos, puesto que el número reducido de marcadores restringe la cobertura total del genoma. El limitado polimorfismo que presentan estos marcadores, generalmente hace que el investigador deba recurrir a un gran número de cruzamientos para el estudio de ligamientos genéticos.

- En general, son neutros con relación a los efectos fenotípicos, con efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo.
- en su mayoría, son codominantes y contienen mayor cantidad de información genética por locus que los marcadores morfológicos, los cuales en su mayoría, son dominantes o recesivos.
- que pueden utilizarse en cualquier fase del desarrollo de la planta. Mientras que los marcadores morfológicos presentan la desventaja de ser identificados, en su mayoría, solamente a nivel de planta entera o adulta.

La identificación de genotipos en fases iniciales del desarrollo de la planta, abre la posibilidad de acelerar el proceso de selección y recombinación de los individuos deseados reduciendo el tiempo para la obtención de nuevas variedades, como en el caso del trigo, en el que los programas de mejoramiento tradicional, utilizando marcadores morfológicos, dura un promedio de veinte años en obtener nuevas variedades mejoradas. Con el auxilio de los marcadores moleculares se ha reducido a un promedio de siete a diez años. (Ferreira y Grattapaglia 1998)

### **3.6.2 Marcadores ISSR**

Los marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) permiten la amplificación de secuencias ubicadas entre dos loci microsatélites. Gracias a la conocida abundancia de secuencias repetitivas esparcidas por todo el genoma, esta técnica puede identificar múltiples loci. La técnica se basa en la amplificación, mediante la PCR, de las secuencias ubicadas entre microsatélites

(Zietkiewicz et al., 1994)

Los marcadores ISSR son dominantes y su iniciador para PCR está compuesto de una secuencia microsatélite como (GACA)<sub>n</sub> anclada al extremo 3' o 5' por dos a cuatro nucleótidos arbitrarios usualmente degenerados (Zietkiewicz et al., 1994).

Los marcadores ISSR proveen información acerca de muchos loci en forma simultánea, esta técnica está siendo usada en varios programas de mejoramiento

principalmente en los estudios de diversidad genética, filogenética, mapas genómicos y evolución de especies. (Pradeep, 2002)

Los marcadores ISSR, son el resultado de una amplificación PCR de partes desconocidas del genoma del organismo en estudio. Los patrones ISSR pueden ser obtenidos al amplificar el ADN de los organismos, usando los iniciadores ISSR disponibles comercialmente. Los iniciadores ISSR consisten de una serie de dinucleótidos repetidos, seguidos por dos bases no repetidas. Por ejemplo, un iniciador ISSR podría ser CTCTCTCTCTCTTG o [CT]<sub>6</sub>TG. Con frecuencia, las dos últimas bases (por ejemplo, TG) son degeneradas, lo cual significa que durante la manufactura del iniciador en una misma posición dentro de este, dos o más bases pueden ocurrir. La degeneración de una posición en la secuencia es indicada con las siguientes letras Y = C / T, R = A / G. Por ejemplo, el iniciador degenerado (CT)<sub>6</sub>RT consistirá de una mezcla de los iniciadores (CT)<sub>6</sub>AT y (CT)<sub>6</sub>GT. La ventaja del uso de iniciadores degenerados es que permiten el reconocimiento y la amplificación de una variedad de secuencias de ADN relacionadas. Los iniciadores ISSR hacen uso de secuencias de microsatélites del ADN dispersas a través del genoma de los organismos. Ya que generalmente hay muchas secuencias diferentes de microsatélites hipervariables en el genoma de los organismos, los marcadores ISSR amplifican probablemente muchas regiones de ADN diferentes. Los iniciadores de ISSR son tratados como marcadores dominantes, por tanto una banda particular esta presente o ausente. Comúnmente es ignorado el hecho de que en un locus individual varios alelos pueden resultar en bandas de un tamaño algo diferentes.

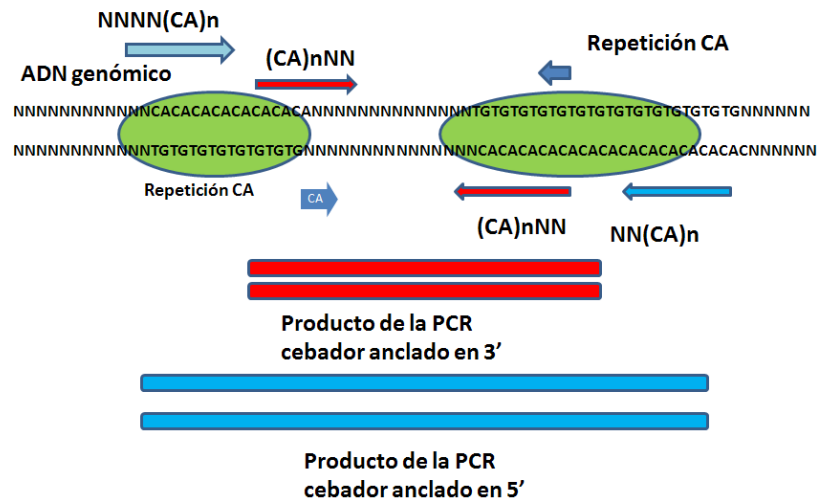
( Stouthamer, 2006)

### **3.6.3 Identificación del polimorfismo ISSR**

Se ejecuta una PCR típica en la cual los cebadores han sido diseñados partiendo de una secuencia repetitiva de microsatélite y se han extendido, en una o varias bases, en la secuencia adyacente a modo de puntos de anclaje. Puede haber varias opciones:

- Se emplea sólo un cebador
- Se emplean dos cebadores de características similares

- Se combinan un cebador de secuencia de microsatélite anclado y un cebador aleatorio (como los usados para RAPD)



**Figura 1: Diseño de iniciadores**

La figura 1 presenta tres puntos diferentes:

- La secuencia del ADN original, en la cual se identifican dos secuencias repetidas diferentes (CA), orientadas en sentido inverso. Entre las dos secciones repetidas hay, además, un espacio bastante corto.
- Si los cebadores se diseñaran solamente del interior de la región repetida, se amplificaría la sección entre las repeticiones pero podría no estar garantizada la especificidad del locus. En la segunda hilera (ver figura 1), aparece un producto de la PCR como resultado de la amplificación de un cebador anclado en 3'  $(CA)_nNN$  en cada extremo de la región entre las repeticiones. CA es la secuencia que se alargó en NN, dos nucleótidos que entran dentro de la región situada entre las repeticiones.
- Alternativamente, las anclas pueden elegirse de la región 5'. El producto de la PCR de la tercera hilera resulta de emplear cebadores basados en la repetición CA pero prolongados en el extremo 5' por NNN y NN, respectivamente.

Los elementos básicos que se requieren para un análisis ISSR de acuerdo a Phillips y Escalant (1995) son los siguientes:

- ADN molde: es el ADN de doble cadena proveniente del organismo que se desea analizar.
- Primer: Son en su mayoría dinucleótidos repetidos de 15 a 25 pares de base, es un segmento corto formado por una cadena simple, con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado.
- Desoxinucleótidos: se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP, y de dTTP, para el análisis en cadena

#### **3.6.4 Ventajas del Marcador**

- Los marcadores ISSR, al contrario que los marcadores microsatélites (SSR), no necesitan información previa de secuencia, mostrándose además más reproducibles que los RAPDs (*Random amplified polymorphic DNA*). Estas características los hacen idóneos para su utilización en la diferenciación de variedades vegetales.
- Se puede encontrar variación dentro de regiones únicas del genoma en varios loci simultáneamente
- Tienden a identificar niveles significativos de variación
- Específicos de secuencias de microsatélites
- Muy útiles para realizar perfiles de ADN, especialmente de especies estrechamente relacionadas.
- Detección significativa de variación

#### **3.6.5 Desventajas del Marcador**

- Marcador dominante
- Estandarización laboriosa
- Puede ser necesario la electroforesis en gel de poliacrilamida y la detección con tinción de plata

### **3.6.6 Aplicaciones**

Los ISSRs se han utilizado mucho por su rápida implementación y por su bajo costo para establecer diversidad genética, identificación varietal, búsqueda de polimorfismo y mapeo genético (Awasthi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2003; Zizumbo *et al.*, 2005)

Se usan para identificar cultivares estrechamente relacionados (Carvalho *et al.*, 2004; González *et al.*, 2005).

Para estudiar procesos evolutivos, biogeografía, así como aspectos relacionados con la ecología de algunas especies vegetales (Liston *et al.*, 2003; Wallace, 2003).

La Técnica ISSR es usada como una técnica de huellas dactilares para determinar la paternidad de la progenie, para diferenciar entre especies o biotipos, y para el mapeo genético de características. Es una técnica particularmente popular para el reconocimiento de biotipos de hongos (Dodd and Stewart, 2003).

### **3.6.7 Usos de ISSR que están siendo Usados en los programas de Mejora y Control biológico**

Los iniciadores ISSR también han sido usados para diferenciar entre especies y poblaciones de algunas especies de *Gonatocerus* (Hymenoptera: Mymaridae) usadas en el control biológico clásico de *H. coagulata* ( Leon y Jones, 2005).

Los iniciadores ISSR han sido usados para identificar y distinguir biotipos del cardo ruso (*Salsola tragus* L.) encontrado en California. Los marcadores mostraron que había dos biotipos (A y B) y que en pruebas de campo en Uzbekistán, un agente potencial de control biológico (una mosquita de las agallas) fue capaz de atacar ambos biotipos, aunque el biotipo A fue preferido. (Sobhian, 2003)



En Nueva Zelanda, la plaga de la alfalfa *Sitona discoideus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae) es controlada exitosamente por el parasitoide *Microctonus aethiopoides* Loan (Hymenoptera: Braconidae). La población de este parasitoide usado en Nueva Zelanda se originó muy probablemente en Marruecos aunque fue importada de una población previamente establecida en Australia. Una segunda plaga de la alfalfa, *Sitona lepidus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae), fue posteriormente descubierta en Nueva Zelanda pero no fue parasitada por *M. aethiopoides*. En Europa, algunos biotipos de *M. aethiopoides* son conocidos por poder parasitar exitosamente ambas especies de *Sitona*. De los experimentos quedó claro que la población de Nueva Zelanda de *M. aethiopoides* originaria de Marruecos no fue capaz de reproducirse exitosamente en el *S. lepidus* europeo mientras que la raza de Francia de *M. aethiopoides* pudo reproducirse tanto en el *S. lepidus* europeo como en el de Nueva Zelanda. Usando marcadores ISSR, fueron comparadas las poblaciones de Nueva Zelanda (de Marruecos) de *M. aethiopoides* y los autores concluyeron que había diferencias genéticas entre ellas. Esas diferencias fueron suficientemente menores para que dichas poblaciones no pudieran ser consideradas especies diferentes, pero aun así las poblaciones diferían en formas importantes para su uso como agentes de control biológico. (Phillips *et al.*, 2002)

Marcadores ISSR fueron usados para examinar y estudiar la taxonomía y relaciones filogenéticas de la especie amarantus y sus especies relacionadas, existiendo alto polimorfismo con el uso de la técnica ISSR. (Xiu, 2001)

Los cultivos ornamentales abarcan un numeroso y heterogéneo grupo de especies, la mayoría de ellas son desconocidas a nivel molecular. Los marcadores ISSR basados en la técnica de PCR son una poderosa herramienta para el análisis de la diversidad genética de estos cultivos. En ese mismo sentido, tanto en horticultura como en los grandes cultivos alimenticios las denominadas huellas digitales ("fingerprints") se han convertido en una evidencia de importancia para determinar la pureza de un cultivar. (Riek, 2001).

Blair *et al* (1999) utilizaron con éxito en estudios de diversidad genética en arroz.

Utilizando marcadores ISSRs fue posible discriminar 21 accesiones de Jacaranda en estudios realizados. Esto indicaría que cualquiera de los ISSRs utilizados sería adecuado para la identificación de estas accesiones. Los ISSRs son una herramienta simple, económica y efectiva para la realización de diagnósticos de diversidad genética y "fingerprinting", particularmente en aquellas especies donde otros marcadores moleculares basados en PCR no hayan sido todavía desarrollados. (Pérez *et al.*, 2003)

Los ISSR se han usado para estudiar la estructura de la diversidad genética intra e inter especie y han demostrado ser eficientes para diferenciar grupos varietales en la colección de fríjol comercial, variabilidad de cultivares criollos y de poblaciones estrechamente relacionadas como las silvestres y domesticadas de *P. vulgaris*. (Gonzales, 2005)

Utilizando métodos precisos para caracterizar y diferenciar plantas en los bancos de germoplasma, se caracterizaron 22 variedades de nopal con marcadores RAPD e ISSR utilizando ADN de semilla y separados en geles de poliacrilamida.. Tanto los perfiles RAPD como ISSR revelaron diferencias entre las variedades y especies consideradas. (Paez, 2007)

Se han usado marcadores ISSR con el fin de evaluar su utilidad en el establecimiento de relaciones genéticas entre *Agave cocui* Trel. y otras especies del mismo género, así como la variabilidad genética existente entre individuos de las especies *A. cocui* Trel., *A. angustifolia* Haw. y *A. tequilana* Weber. (Davila, 2007)

Los marcadores ISSR se utilizan cada vez con más frecuencia en diversos campos de la ciencia (Abbot 2001; Bahulikar *et al.*, 2004; Geldenhuis *et al.*, 2004; Nagaraju *et al.*, 2002 y Nageswara *et al.*, 2005).

Particularmente en plantas, se ha establecido como una herramienta molecular de mucha utilidad para estudios filogenéticos y de variaciones inter e intra específicas (Dangi *et al.*, 2004; Pissard *et al.*, 2006; Vijayan *et al.*, 2004; Taran *et al.*, 2005).

Algunos autores han utilizado de manera simultánea varios tipos de marcadores en estudios de variabilidad genética con el fin de establecer ventajas entre los métodos o ratificar los resultados obtenidos con diferentes tipos de marcadores, por lo general de tipo dominante como los RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA o ADN polimórfico amplificado al azar) y los ISSR (Awasthi *et al.*, 2004; Bruneau *et al.*, 2005; Ducarme y Wesselingh, 2005).

### **3.7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

Es una técnica *in vitro* de amplificación enzimática del ADN, mediante el cual se obtiene millones de copias de secuencias específicas del genoma de un organismo. El proceso es bastante rápido y extremadamente sensible. El PCR utiliza dos oligonucleótidos sintéticos los cuales presentan secuencias complementarias a los extremos 3' de la porción de ADN que se desea amplificar. Estos oligonucleótidos sirven como iniciadores o cebadores de extensión específicos (primers) para el ADN polimerasa presente en la reacción. Los iniciadores es una secuencia corta de ácido desoxirribonucleótido (ADN) que se ancla a una hebra del ADN molde. El cual se requiere para la síntesis de ADN *in vitro* (Reacción de polimerización), ya que el ADN polimerasa solo no es capaz de iniciar la polimerización de ADN (Fleschar y Kimball, 1993)

Un ciclo de PCR consta de tres etapas: denaturalización, apareamiento y elongación o polimerización. En la primera, el ADN de doble cadena es desnaturalizado mediante el aumento de la temperatura que puede variar de 92 a 95°C; en la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida entre 35 y 60°C, dependiendo esencialmente del tamaño y la secuencia del primer utilizado, permite la hibridación de cada primer con las secuencias complementarias que flanquean la región blanco, enseguida la temperatura es elevada a 72°C para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión de la cadena a partir de cada

terminal 3' de los primers, mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde la secuencia blanco. Este ciclo se repite alguna decena de veces y una vez que la cantidad de ADN de la secuencia blanco se duplica en cada ciclo, la amplificación sigue una progresión geométrica de manera que, después de unos 20 ciclos, se produce más de un millón de veces la cantidad inicial de la secuencia blanco. (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

### **3.8. Electroforesis**

Es el movimiento de una partícula cargada en un campo eléctrico, el movimiento se realiza en medio líquido que está sostenida por sustancia sólida inerte, como papel o gel semisólido. El líquido sirve como un medio conductor de corriente eléctrica cuando se aplica un voltaje externo. El grado de movimiento de una molécula depende de su carga eléctrica y su tamaño ( Fleschar y Kimball, 1993)

El gel está compuesto generalmente de almidón, poliacrilamida, acetato de celulosa o agarosa. La técnica se basa en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz tamponada (almidón, agarosa, acrilamida). Esta funciona como un filtro, separando las moléculas en un campo eléctrico, de acuerdo con el tamaño y la carga eléctrica neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es responsable por la fuerte carga negativa en condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos emigren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis, como la carga eléctrica neta de los fragmentos es negativa, la separación ocurrirá según el tamaño de los fragmentos. El proceso de separación de los fragmentos de ADN por electroforesis depende básicamente del tamaño de fragmento concentración de agarosa y voltaje aplicando durante la electroforesis ( Ferreira y Grattapaglia, 1998)

### **3.9. Análisis de Marcadores Moleculares**

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 (Crisci y Lopez, 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 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 construcción de una matriz básica, utilizando un coeficiente en base a los datos que contiene.
- Construcción de una matriz de similitud OTU por OTU con los coeficientes calculados.
- Conformación de grupos, basándose en la matriz de similitud.

### **3.9.1 Estimación de la Semejanza Taxonómica**

La semejanza o el parecido es cuantificable aplicando un coeficiente de similitud. Con el uso de estos coeficientes en operaciones matemáticas pueden calcularse las similitudes respecto a cada par posible de OTU de una matriz básica de datos. (Crisci y López, 1983)

### **3.9.2 Coeficientes de Asociación**

El coeficiente de asociación mide las coincidencias y diferencias en los estados de caracteres entre dos OTU. Esta medición exige datos del tipo de doble estado (presencia, ausencia). El coeficiente más usado es el llamado coeficiente de asociación Jaccard hay otros coeficientes también usados por ejemplo el simple matching coefficient (SMC).

### **3.9.3 Matriz de Similitud**

Los resultados obtenidos de la aplicación de cualquiera de los coeficientes de similitud para los pares posibles de OTU ordenados en forma tabular constituyen la similitud. Los OTU ocupan tanto las filas como las columnas, siguiendo el

mismo orden en ambas, de esta manera se logra comparar cada OTU consigo mismo y con las restantes OTU (Crisci y López, 1983)

#### **3.9.4 Análisis de Agrupamiento**

El análisis multivariado como cluster análisis, facilita la interpretación de datos complejos de dos vías (accesión por atributo). Medidas numéricas de asociación entre cada par de accesiones son necesarias tanto para la clasificación y ordenación. (Crisci y López, 1983)

El análisis de agrupamiento comprende técnicas de agrupamiento que siguiendo reglas más o menos arbitrarias, forman grupos de OTUs que se asocian por su grado de similitud. La técnica de clasificación más utilizada es la técnica Jerárquica que originan conjuntos que presentan rangos, en los cuales los OTUs o grupos de OTUs forman parte de un grupo mayor o inclusivo. Para la inclusión de un nuevo OTU se presentara mediante un ligamiento promedio, en el cual el valor de similitud entre el OTU a incorporarse es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo, la mas utilizada es la media aritmética no ponderada UPGMA (Unweight pair group method Using Arithmetic Average) (Crisci y López 1983)

#### **3.9.5 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 una diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTUs o grupo de OTUs (Crisci y López, 1983)

### 3.10 Antecedentes de los Marcadores Moleculares

Los programas de mejoramiento genético, manejo de germoplasma y los estudios evolutivos se basan en la variación genética dentro de una especie y entre especies estrechamente emparentadas. La Técnica de ISSR son técnicas muy sensibles y fácilmente reproducibles, es un método de detección de bandas polimórficas a través de todo el genoma (Bleas *et al.*, 1998)

Los marcadores moleculares son una manera eficaz de mejorar la eficiencia de los valores de emparentamiento, hasta la fecha, sólo unos pocos investigadores han reportado el desarrollo y la utilización de marcadores moleculares en la quinua (Lande y Patterson, 1991).

Ruas *et al.* (1999) caracterizó 19 accesiones de seis especies de quinua por marcadores RAPDs en el cual dio a conocer que existen altos niveles de polimorfismo observando en todas las especies estudiadas y que hay bajos niveles de variación intraespecífica dentro de las accesiones de quinua. Además Ruas mencionó que cuatro accesiones de *C. ambrosioides* tuvieron una similitud de 0.75 en la cual supone que son nuevas colecciones debido al origen que presentaron estas accesiones y que podrían ser introducidas al banco de germoplasma de Patacamaya, finalmente los marcadores RAPDs fueron identificados como una herramienta útil para detectar la variación genética dentro del género *Chenopodium* (Bolivia)

La técnica de AFLP se utilizó para evaluar la diversidad genética de quinua y sus familias a través de 125 accesiones y 56 accesiones de especies afines. AFLP mostraron algunas variaciones genéticas entre las accesiones de quinua, con una decena de bandas polimórficas por combinación. Los polimorfismos fueron abundantes entre las accesiones de diferentes especies de *Chenopodium* (Pratt, 2000).

Se han realizado estudios de filogenia aplicando AFLP en *Amaranthus*, se encontró gran polimorfismo dentro y entre especies del género *Amaranthus*. Se

mostró una relación cercana entre *A. caudatus* y *A. quitensis*, colocando al progenitor silvestre *A. hybridus* en el mismo clan de granos de amarantos cultivados *A. cruentus*, *A. caudatus* y *A. hypochondriacus*, e indicando que el progenitor silvestre *A. powelii* es el taxón más divergente en el complejo de especies (Xiu y Mei, 2001).

Se han desarrollado marcadores microsatélites (SSR), AFLP y el estudio de una biblioteca genómica en quinua para aislar genes eventuales que estén relacionados con la tolerancia a factores bióticos como sequía y salinidad. Además se han usado una serie de combinaciones de primer AFLP para determinar la diversidad genética en una especie de *Chenopodium* sin clasificar con 182 entradas accesadas al banco de germoplasma en Bolivia (Stevens, 2003)

Maughan *et al.* (2004) generaron el primer mapa genético de la quinua, principalmente empleando marcadores de AFLP. Se informaron el uso de marcadores moleculares de AFLP, SSR Y RAPD para la construcción del primer mapa genético de *Ch. quinoa*, el desarrollo de este mapa genético es un importante paso para la caracterización y la iniciación de la selección asistida por marcadores y dar paso a la selección de individuos que evidencien resistencia a enfermedades como el mildiu y a diferentes factores abióticos como la helada.

Se ha estudiado la diversidad genética en poblaciones de las diferentes variedades nativas y cultivadas de quinua obtenidas de los diferentes bancos de germoplasma de Puno y Huancayo empleando marcadores moleculares de tipo RAPD, permitiendo distinguir dos grupos: Variedades de origen peruano situados en el centro del Perú y variedades de origen Boliviano. (Bustinza, 2004).

Se hicieron estudios acerca de la estructura genotípica de la variación genética en ocho poblaciones de quinua representativos en los principales valles interandinos de Bolivia revelados por los marcadores RAPD (Castillo, 2006).



Se hizo el estudio y análisis de la diversidad genética de las colecciones de *Ch. quinoa* provenientes del Centro internacional de la Papa y la Estación Nacional de los Estados Unidos mediante el uso de marcadores microsatélites (SSR) Los datos reportados se dio a conocer, mediante un estudio del análisis genético de 121 accesiones de quinua mediante marcadores microsatélites , la cual segregaron en dos diferentes grupos: grupo de la sierra y grupo de la costa, la cual el grupo de la sierra segregaron en dos subgrupos: al norte de Perú-Ecuador y al sur de Perú-Bolivia. La diversidad basado en los datos moleculares reportaron una disminución en la variación genética en las regiones del norte y costa del Perú, esta reducción en la diversidad genética podrían ser debido al resultado de efectos asociativos con la dispersión del cultivo del centro de origen o alternativamente como una respuesta a la adaptación selectiva de un cultivar. (Christensen *et al.*, 2007)

Jiménez (2006) analizó la diversidad genética de 28 variedades de quinua mediante AFLP, utilizando para ello 8 combinaciones de primers, la cual el PIC calculado estuvo en un rango de 0.26 a 0.35. La combinación EcoRI-ACT + MseI-CAC mostró el valor PIC mas alto (0.35), la cual fue posible determinar el polimorfismo y diferenciación por este primer en las variedades utilizadas en el estudio. Además indica q esta combinación puede ser usado para futuros trabajos de investigación indicando la mayor informatividad de este primer.

Sarla (2003) analizó la diversidad genética de 24 accesiones de *Oriza nivana*, usando marcadores ISSR en la cual utilizó 6 primers, la cual los primers 842, 812 y 835 amplificaron el mayor numero de bandas polimórficas, mostrando los mayores valores de PIC indicando la utilidad de estos tres primers para estudios de polimorfismo y diversidad, los tres primers restantes fueron marcadores menos informativos mostrando valores bajos en PIC.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

### 4.2. Material Vegetal

Se trabajó con 16 accesiones (cada accesión constituye una población) para determinar la caracterización intergenotípica (interpoblacional) y dentro de cada accesión se evaluó 5 plantas para determinar la caracterización intragenotípica (intrapoblacional), haciendo un total de 80 individuos. Las diferentes accesiones corresponden a una colección realizada por el personal del Programa de Cereales y Granos Nativos. A continuación se detallan las características de cada una de las 16 accesiones utilizadas:

**Tabla 2:** Datos de pasaporte de las 16 accesiones de quinua

Accesión	Nro Pasaporte	Departam.	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud msnm	Color de grano
Puno 1	PEQPC-0850	Puno	Puno	Capachica	Barrio 3	3860	Rojo blanco (mezcla)
Puno2	PEQPC-0769	Puno	Collao	Ilave	Santa María	3847	Amarillo
Puno 3	PEQPC-0762	Puno	Collao	Ilave	Santa María	3890	Blanco
Puno 4	PEQPC-0835	Puno	Puno	Capachica	Barrio 3	3860	Blanco
Puno 5	PEQPC-0283	Puno	Puno	-	-	3827	Blanco
Puno 6	PEQPC-0298	Puno	Puno	-	-	3827	Amarillo
Cusco 2	PEQPC-0444	Cusco	Canchas	Marangani	Quisine	3937	Negro
Cusco 3	PEQPC-0326	Cusco	Calca	Calca	Río Vilcanota	2928	Amarillo
Cusco 4	PEQPC-0321	Cusco	Canchas	Marangani	Mamuera	3725	Rojo
Cajamarca 1	PEQPC-0704	Cajamarca	Cajamarca	Cajamarca	Huacariz	2750	Marrón
Cajamarca 2	PEQPC-0704	Cajamarca	Cajamarca	Cajabamba	Tangalbamba	2950	Morado
Cajamarca 3	PEQPC-0703	Cajamarca	Cajamarca	Cajabamba	Chimibamba	2800	Blanco
Ancash 1	PEQPC-0425	Ancash	Carhuaz	Shilla	Catay	3336	Crema
Ancash 2	PEQPC-0489	Ancash	Recuay	Ticapampa	Ticapampa	3451	Rojizo
Arequipa 1	PEQPC-1900	Arequipa	Caylloma	Cabanaconde	Cabanaconde	2956	Amarillo
Arequipa 2	PEQPC-1905	Arequipa	La Unión	Cotahuasi	Cotahuasi	2800	Amarillo anaranjado

### 4.3. Material del laboratorio

Se utilizó los siguientes reactivos materiales y equipos.

- Agua destilada esterilizada
- Ácido bórico
- Microcentrífuga
- Micropipeta
- Agarosa
- Agitador Magnético
- Balanza Electrónica
- B-Mercaptoetanol
- Buffer Tris
- Buffer EDTA
- Buffer RI
- Buffer PCR
- Buffer de carga formamida
- Bolsa Zipper
- C-TAB
- Cubetas de espectrofotómetro
- Cámara de flujo laminar
- Cloroformo
- Computadora
- Congeladora
- Dinucleótidos (dNTPs)
- EDTA 0.5mg
- Equipo de electroforesis
- Espátula
- Etanol
- Frascos de vidrio
- Guantes
- Hojas Bond
- Impresora
- Macetas de 1 kg
- Marcador peso fago Lambda
- Tips
- NaCl 5M
- Nitrato de plata
- Paletas de identificación
- Poliacrilamida
- Pipeta
- pH metro
- Probeta
- Piceta
- Papel de aluminio
- Plástico sellador
- Racks para PCR
- Racks para tubos de 2.2ml
- Racks para tubos de 1.1 ml
- RNAsa
- Solución cloroformo-alcohol isoamílico
- Tubos de PCR
- Vasos
- Taq DNA polimerasa
- Timer
- Termociclador
- Tubos eppendorf de 2.2 ml
- Tubos eppendorf de 1.1 ml
- Tubos eppendorf de 0.5 ml

#### **4.4. Metodología**

##### **4.4.1 Germinación de las semillas**

Se sembraron las accesiones debidamente identificadas, en las macetas correspondientes con sustrato desinfectado (50% de compost y 50% de arena). Estas macetas permanecieron en el tinglado con mallas antiáfidos.

##### **4.4.2 Colección de material vegetal**

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

##### **4.4.3 Molido de las muestras secas**

Se tomaron las muestras secas (120 mg.) y se colocaron en tubos eppendorf de 2.2 ml conteniendo bolitas de acero estériles y luego fueron molidas utilizando un molino Mill 200.

#### **4.5. Extracción del ADN**

La extracción del ADN se realizó por el método micro CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio) modificado de Doyle y Doyle (1990) siguiendo los siguientes pasos:

- Se agregó 800 ul de buffer CTAB y se mezcló suavemente por inversión, hasta homogenizar la muestra.
- Luego se colocó en baño maría a 60°C por 30 minutos, mezclando suavemente cada 10 minutos.
- Se agregó 800 ul de cloroformo-alcohol isoamílico en la proporción de 24:1, mezclando por inversión y luego centrifugando a 14,000rpm por 10 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se le agregó 50ul de CTAB al 10%(en 0.7M NaCl), se mezcló suavemente hasta obtener una muestra uniforme y luego se agregó 800 ul de cloroformo- alcohol isoamílico 24:1 mezclando nuevamente y luego centrifugando a 14000 rpm por 10 minutos.

- Se transfirió el sobrenadante con mucho cuidado y se precipitó el ADN agregando 800ul de etanol al 96%, mezclando por inversión hasta ver el precipitado.
- Cuando el precipitado fue visible solo se eliminó el sobrenadante y quedó listo para el siguiente paso, en otros casos no fue posible ver el ADN y se centrifugó la muestra por cinco minutos y luego se eliminó el sobrenadante.
- Se agregó etanol al 70% y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó esta vez a 10000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y luego se repitió el lavado y el centrifugado.
- Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar toda la noche dejando los tubitos abiertos invertidos.
- Se re-suspendió el precipitado de ADN en 50 ul de T.E. y luego se le agregó 2 ul de ARNasa (10mg/ml) agitando suavemente e incubando las muestras a 37°C por 1 hora.

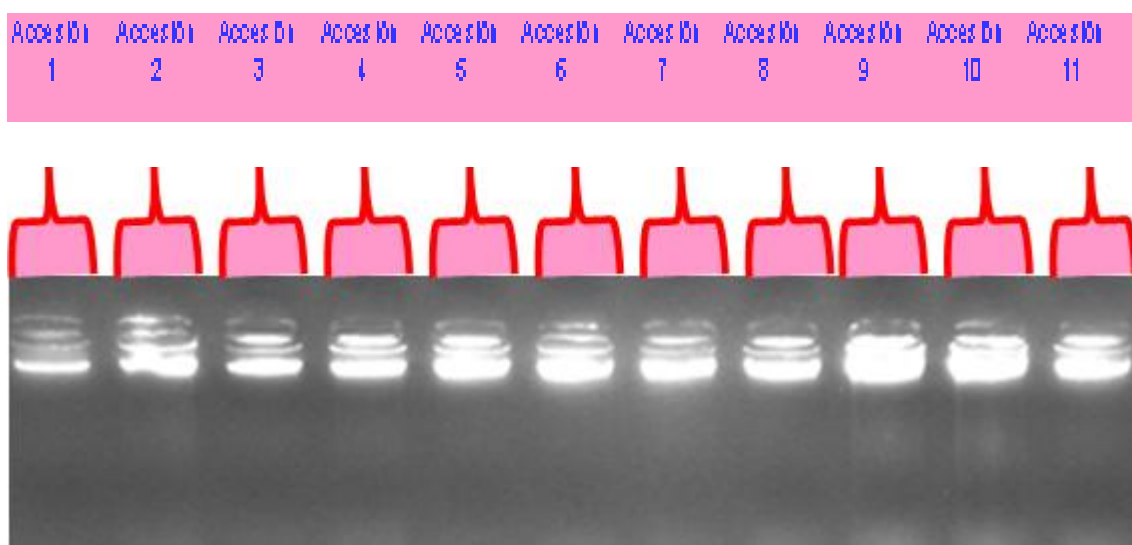
#### **4.6. Determinación de la calidad y concentración del ADN**

La determinación de la pureza, y concentración del ADN se realizó mediante el uso del Biofotómetro. La relación de lectura de absorbancia de A260/A280 proporcionó un estimado de pureza. Una solución de ADN pura tiene una relación A260/A280 a razón de 1.7 a 1.9. Una relación inferior a 1.7 indica que pueden existir proteínas y otros elementos absorbentes de luz ultravioleta en la muestra, una relación superior a 1.9 indica que las muestras pueden estar contaminadas con fenol o cloroformo. (Clark, 1996)

#### **4.7 Cuantificación del ADN**

La cuantificación del ADN se realizó en geles de agarosa para visualizar la calidad del ADN de las diferentes accesiones. La buena carga elevada de ADN aparece como una buena banda de excelente resolución mientras que un barrido o manchado indica degradación mecánica o química del ADN. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% disolviendo 0.8 gramos de agarosa en 100 ml de 1X buffer TBE.

- Se llevó a microondas hasta hervir, se espero que enfrié a 60°C y luego se agregó 2 ul de Bromuro de etidio.
- Se colocó en un molde con peines y se espero hasta que gelifique.
- Una vez gelificado fue puesto en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X .
- 2 ul de la muestra con 8 ul de tampón de carga fueron colocados en los pocillos conjuntamente con un marcador de peso conocido.
- Se aplicó corriente a 80 voltios por una hora, transcurrido este tiempo se visualizo y capturó la imagen del ADN en el Gel Doc 2000.



**Figura 2: Calidad del ADN de 11 accesiones de quinua**

#### **4.8 Procedimiento de amplificación de ADN**

El método de obtención de marcadores moleculares utilizado es la técnica de ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) que esta basado en la amplificación específica de ADN por primers diseñados al azar mediante la reacción en cadena polimerasa (PCR). Para la optimización del protocolo se probaron diferentes volúmenes de ADN, taq polimerasa, MgCl<sub>2</sub> y dNPTs, buffer y albúmina de bovino, variando uno de los componentes de la reacción y manteniendo los otros constantes. Para empezar esta técnica se procedió a diluir las muestras hasta una concentración de 10ng /ul, y luego se procedió a trabajar con la amplificación.

- **Iniciadores:** Se probaron 33 iniciadores, pertenecientes al laboratorio de marcadores moleculares (Programa de Cereales), de los cuales 10 fueron seleccionados por su buena amplificación de bandas polimórficas que se muestra en la tabla a continuación:

**Tabla 3:** Empleo de diferentes iniciadores o primers

Nombre del Primer	Motivos	Secuencias del Primer	Primers Seleccionados
BOR 1	GAGC(CAA) <sub>5</sub>	5'GAGCCAACAACAACAACA3'	
BOR 2	CTG(AG) <sub>8</sub>	5'CTGAGAGAGAGAGAGAGAG3'	
BOR 3	(AG) <sub>8</sub> TG	5'AGAGAGAGAGAGAGAGAGTG3'	
GUP-1	(ACTG) <sub>4</sub>	5'ACTGACTGACTGACTG3'	
GUP 2-2	(GACA) <sub>4</sub>	5'GACAGACAGACAGACA3'	
807	(AG) <sub>8</sub> T	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT3'	X
808	(AG) <sub>8</sub> C	5'AGAGAGAGAGAGAGAGC3'	X
810	(AG) <sub>8</sub> G	5'AGAGAGAGAGAGAGAGG3'	X
811	(GA) <sub>8</sub> C	5'GAGAGAGAGAGAGAGAC3'	
812	(GA) <sub>8</sub> <sup>a</sup>	5'GAGAGAGAGAGAGAGAA3'	
813	(CT) <sub>8</sub> T	5'CTCTCTCTCTCTCTT3'	
814	(CT) <sub>8</sub> <sup>a</sup>	5'CTCTCTCTCTCTCTA3'	
815	(CT) <sub>8</sub> G	5'CTCTCTCTCTCTCTG3'	
816	(CA) <sub>8</sub> T	5'CACACACACACACAT3'	
824	(TC) <sub>8</sub> G	5'TCTCTCTCTCTCTCG3'	
825	(AC) <sub>8</sub> T	5'ACACACACACACACT3'	
826	(AC) <sub>8</sub> C	5'ACACACACACACACC3'	
829	(TG) <sub>8</sub> C	5'TGTGTGTGTGTGTGTC3'	
834	(AG) <sub>8</sub> YT	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYT3'	X
835	(AG) <sub>8</sub> YC	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYC3'	X
841	(GA) <sub>8</sub> YC	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYC3'	X
842	(GA) <sub>8</sub> YG	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYG3'	X
844	(CT) <sub>8</sub> RC	5'CTCTCTCTCTCTCTRC3'	



848	(CA)8RG	5'CACACACACACACACARG3'	
858	(TG)8RT	5'TGTGTGTGTGTGTGTGRT3'	
859	(TG)8RC	5'TGTGTGTGTGTGTGTGRC3'	
860	(TG)8RA	5'TGTGTGTGTGTGTGTGRA3'	
864	(ATG)6	5'ATGATGATGATGATGATG3'	
868	(GAA)6	5'GAAGAAGAAGAAGAAGAA3'	
880	(GGAGA)3	5'GGAGAGGAGAGGAGA3'	
884	HBH(AG)7	5'HBHAGAGAGAGAGAGAG3'	X
890	DVD(TC)7	5'DVDTCTCTCTCTCTC3'	X
891	BDB(CA)7	5'BDBCACACACACACA3'	X

#### 4.8.1 Amplificación

##### 4.8.1.1 Preparación de la mezcla (Mix)

La amplificación se realizó usando 3ul de ADN en una reacción conteniendo 0.4 ul dNTPs, 1.2 ul MgCl<sub>2</sub>, 0.4 ul primer, 2.5 ul taq polimerasa , 0.5 ul de albumina de bovino, 1 ul de buffer (10mM tris-HCl pH8.3, 50mM KCl),1 ul de agua esterilizada , en un volumen final de 10 ul.

##### 4.8.1.2 Condiciones de amplificación

Las amplificaciones se realizaron para cada primer seleccionado con la misma preparación de la mezcla (indicada anteriormente), la cual fueron realizadas en un termociclador marca Eppendorf., usando un programa de 40 ciclos de incubación aproximadamente por cuatro horas, bajo las siguientes condiciones (Ver tabla 4).

**Tabla 4:** Condiciones de amplificación

Reacción	Temperatura	Tiempo
Denaturación	95°C	1 minuto
Apareamiento	50°C	2 minutos
Elongación	72°C	5 minutos

cada amplificación se añadió 6 ul de tampón de carga (95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05 de azul de bromofenol y 0.05 de xilen cianol). La muestra fue desnaturada a 94°C por 3 minutos y cargada en un gel vertical de poliacrilamida al 6% y 7 M de úrea, catalizada con Temed y APS (persulfato de amonio) en 1X tri-borato EDTA (TBE). La pre-corrída se realizó a 500 V por 30 minutos y la corrída con la muestras a 500 V por 6 horas. Los geles fueron revelados empleando tinción con nitrato de plata.

#### **4.8.2 Preparación de geles de poliacrilamida**

La preparación de geles se realizó para cada producto amplificado.

- Se lavaron los vidrios con abundante agua y luego se limpiaron con etanol de 95% para eliminar toda la grasa posible.
- A uno de los vidrios, en este caso al que tiene la muesca, se colocó y extendió sobre todo el vidrio en forma uniforme 1ml de sigmacote que es la solución repelente y se dejó secar por media hora.
- Sobre el otro vidrio se colocó 800ul de la solución adherente (1ml de alcohol de 95%, 3 ul de silane y 3 ul de ácido acético), y se distribuyó en forma uniforme, dejándolo secar por media hora.
- Después de la media hora se procedió a ensamblar los vidrios, se colocaron separadores en los costados y en la parte inferior, se usaron

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

- Se prepararon 45 ml de acrilamida al 6% y se agregó 300ul de 10% de APS y 30 ul de Temed, se mezcló y agregó esta solución entre los dos vidrios procurando no formar burbujas; y luego se colocó el peine y se dejó polimerizar por una hora.
- Luego se limpiaron los vidrios para colocarlos en el aparato de electroforesis sacando el peine con mucho cuidado, una vez colocados los vidrios con el gel, se procedió a llenar las cubetas (superior e inferior) con buffer TBE al 1%
- Se limpió, usando una jeringa con aguja delgada, cada uno de los pocillos formados por el peine, esto se hizo para eliminar la urea o pequeñas cantidades de gel que estuvieron deformando el pocillo,
- Se recorrió el gel a 500 voltios por media hora.
- Se prepararon las muestras, agregando 6ul de stop buffer a los 15 ul de la reacción de PCR y fueron desnaturalizadas por 3 minutos a 94°C
- Antes de colocar las muestras tuvimos que volver a limpiar los pocillos, para asegurarnos que no quede urea en los pocillos.
- Se corrió el gel a 500 voltios por unas cuatro horas

### **4.8.3 Tinción de geles**

Del mismo modo para cada gel corrido a 500 voltios se procedió a teñir en forma independiente.

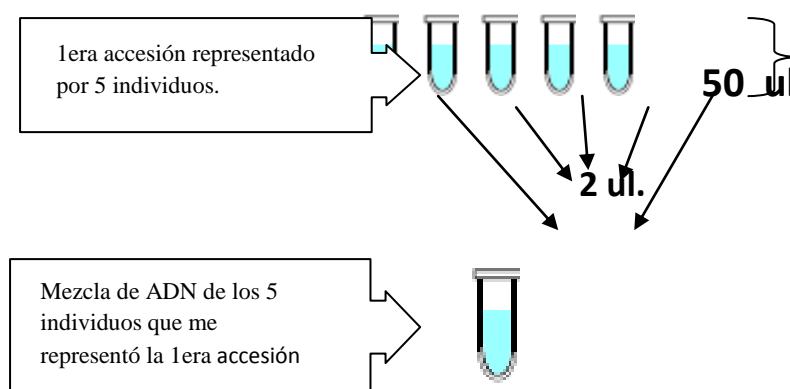
- Se separaron los vidrios con mucho cuidado y se colocó el que tiene el gel en una bandeja que contenía medio litro de la solución de fijación por unos 10 minutos.

- Se pasó el gel a otra bandeja que contenía medio litro de solución de tinción por unos 10 minutos
- En otra bandeja se colocó agua y se pasó el gel a esta para darle un enjuague de dos minutos
- Se transfirió el gel a una bandeja conteniendo la solución reveladora, en este caso el tiempo no fue fijo, tuvimos que ir viendo como aparecieron las bandas y decidir en que momento ver las bandas lo suficiente para el revelado.
- Luego del revelado, volvimos a poner el gel en la solución de fijación por unos cinco minutos, y luego de esto le dimos un enjuague en agua corriente por unos tres minutos y lo dejamos secar.

#### 4.9 Evaluación de bandas

Se buscó polimorfismo según la presencia o ausencia de bandas en toda la población evaluada, se hicieron dos tipos de análisis:

- Se analizaron las 16 accesiones para determinar la caracterización intergenotípica. Cada accesión estuvo representado por 5 individuos, la cual cada individuo se tomo una alícuota de 2  $\mu$ l de ADN y luego se mezclaron las alícuotas de los cinco individuos para formar el ADN de la accesión.



- Se analizaron cinco individuos por cada accesión para determinar la caracterización intragenotípica, en la cual se hizo mediante el conteo de bandas polimórficas y bandas monomórficas, mientras menor sea el porcentaje de bandas polimórficas los individuos tienden a presentar menor probabilidad de polinización cruzada (para cada accesión estudiada), mientras que un mayor porcentaje de bandas polimórficas los individuos presentarían mayor variación y mayor probabilidad de polinización cruzada.

#### 4.9.1 Índice Contenido de Polimorfismo (PIC)

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

Ghislain *et al.* (1999) manifiestan que el índice contenido de polimorfismo (PIC) es la capacidad de cada iniciador (primer) para detectar loci polimórfico. El valor mas alto de PIC indica el primer mas informativo. En el caso de marcadores ISSR considera que  $PIC = 1 - [(p/n)^2 + (q/n)^2]$  siendo p la frecuencia de bandas presentes, q la frecuencia de bandas ausentes y n el total de bandas presentes en la población.

Según Botstein *et al.* (1980) el PIC oscila entre 0 y 1, donde 0 indica marcadores monomórficos a 1 para marcadores con muchos alelos con igual frecuencia. Este índice evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos. Para marcadores dominantes tales como los RAPDs y ISSR, el valor del PIC es de 0 que indica marcadores monomórficos a 0.5 para marcadores con igual frecuencia (bandas monomórficas y polimórficas)

#### **4.10 Análisis de datos**

##### **A) Construcción de una matriz básica de datos (MBD)**

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

##### **B) Estimación de la similitud taxonómica**

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

##### **C) Coeficiente de asociación**

El coeficiente Jaccard es la proporción de caracteres presentes que comparten, respecto al total de caracteres presentes en las 2 OTUs, la cual solamente cuenta las bandas presentes, las ausentes dobles se consideran como datos ausentes. Un criterio valido fue considerar que dos muestras son mas parecidos cuanto más uno compartan.

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

Donde:

a: Presencia de los dos alelos

b: Presencia del alelo en el genotipo 1 y ausente en el genotipo 2

c: Presencia del alelo en el genotipo 2 y ausente en el genotipo 1

##### **D) Matriz de similitud**

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

o SAHN construye la jerarquía tomando elementos individuales y fusionándolos progresivamente según la medida de similitud.

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

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

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

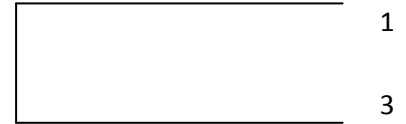
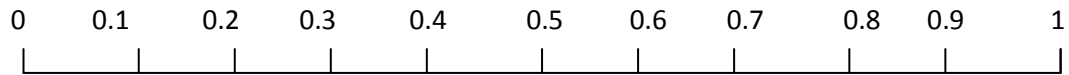
$$d(\{A,B\},C) = \frac{d(A,C) + d(B,C)}{2}$$

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

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

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

Coeficiente de similitud



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

- a) ligamiento máximo
- b) ligamiento mínimo
- c) ligamiento promedio

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

$$(1-3) 2 \longrightarrow (0.50 + 0.43)/2 = 0.465$$

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

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

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

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

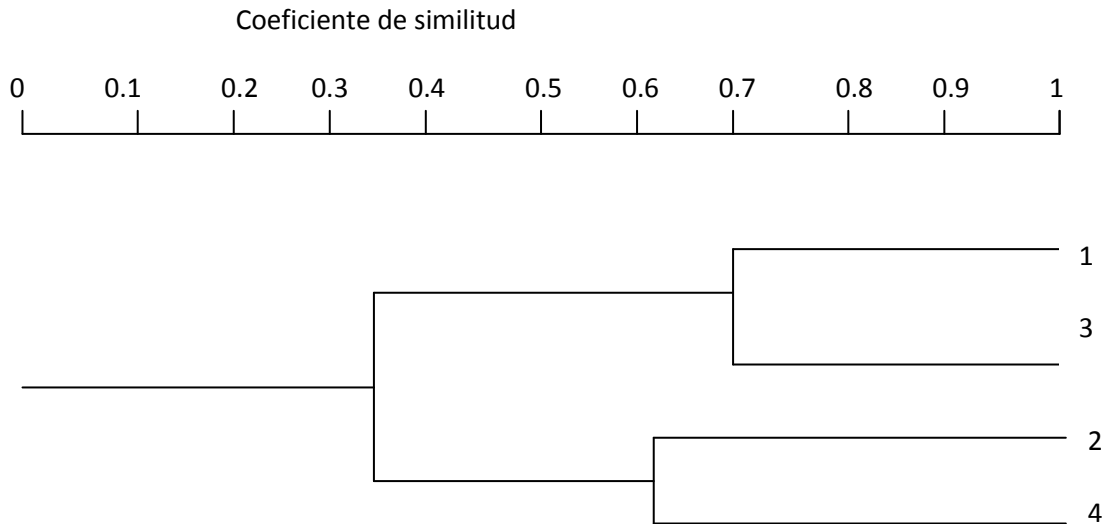
$$(1-3) 2 \text{ y } (1-3) 4 \quad (0.465 + 0.22) / 2 = 0.3425$$

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



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

Ahora puede construirse el dendrograma completo:



### E) Análisis de grupos

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

## V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

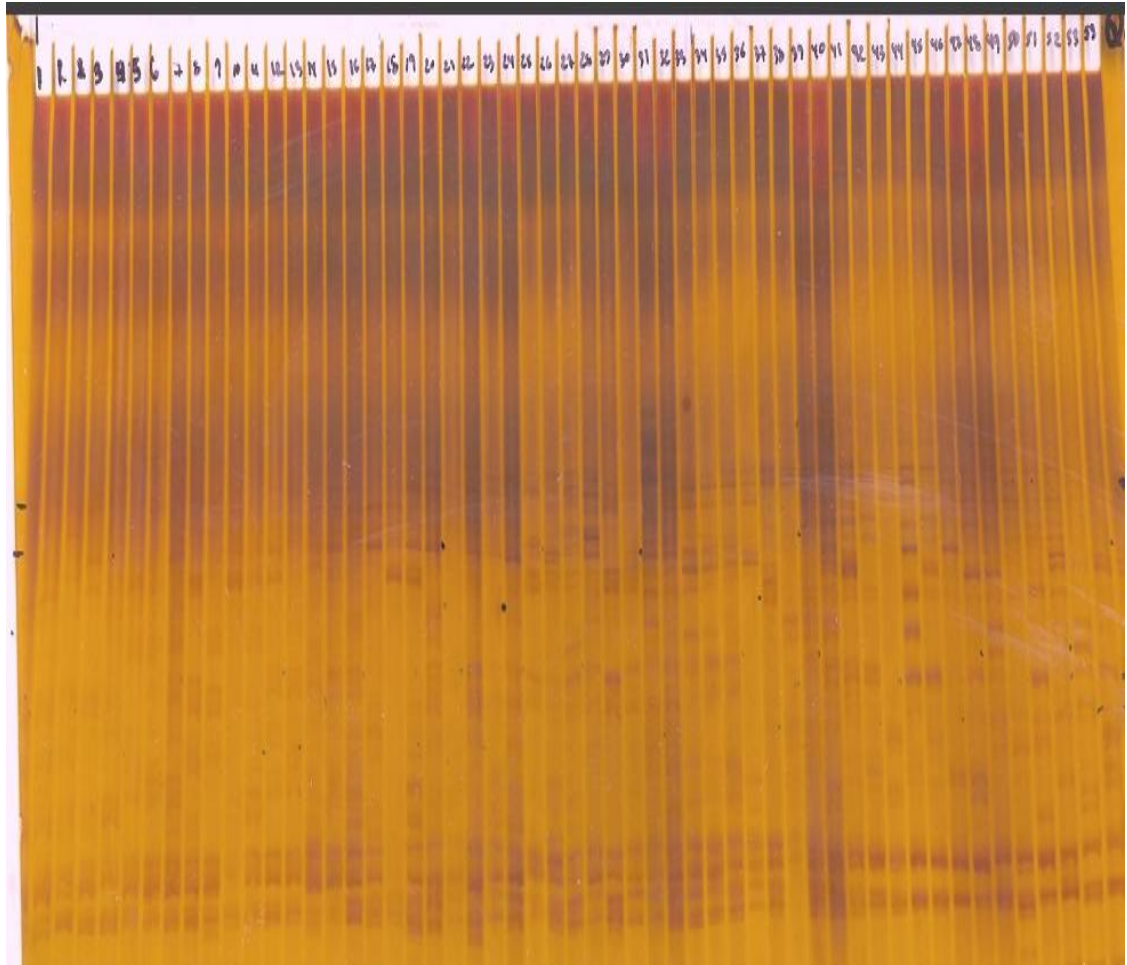
### 5.1 Determinación del Contenido Polimórfico (PIC)

De los 33 primers utilizados para la caracterización molecular inter e intragenotípica en las 16 accesiones de quinua provenientes del Banco de Germoplasma del Programa de Cereales, 23 primers no amplificaron seleccionando al final los 10 mejores primers por su alta resolución y la obtención de bandas polimórficas.

El PIC varió entre 0.21 y 0.48 (ver tabla 5). De los 10 primers ISSR, 2 tienen niveles de polimorfismo más alto, el primer 835 con un PIC de 0.46 y 834 con un PIC de 0.48 respectivamente.

**Tabla 5:** Índice del contenido de polimorfismo (PIC) observado en 10 primers

Primers	Secuencia	PIC
		(peso molecular ubicado entre 400pb a 3500pb)
808	5'AGAGAGAGAGAGAGAGC3'	0.33
842	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYG3'	0.27
841	5'GAGAGAGAGAGAGAGAYC3'	0.24
891	5'BDBCACACACACACA3'	0.34
890	5'DVDTCTCTCTCTCTC3'	0.38
807	5'AGAGAGAGAGAGAGAGT3'	0.27
884	5'HBHAGAGAGAGAGAGAG3'	0.32
810	5'AGAGAGAGAGAGAGAGG3'	0.21
835	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYC3'	0.46
834	5'AGAGAGAGAGAGAGAGYT3'	0.48



**Figura 3:**Primer 834 que muestra el mayor grado de polimorfismo

Los 8 primers restantes con un PIC de 0.21 a 0.38 fueron menos informativos para detectar polimorfismo. Los primers 834 y 835 con un PIC de 0.48 y 0.46 respectivamente fueron los mejores para detectar polimorfismo en las accesiones de quinua estudiada. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Sarla (2003) quien analizó la diversidad genética de 24 accesiones de *Oriza nivana*, usando marcadores ISSR en la cual los primers 842, 812 y 835 mostraron los mayores valores de PIC, indicando la utilidad de estos tres primers como los marcadores más informativos para determinar polimorfismo y diversidad. Coincidentemente Jiménez (2006) analizó la diversidad genética de 28 variedades de quinua mediante AFLP, utilizó para ello 8 combinaciones de primers, la cual el PIC calculado estuvo en un rango de 0.26 a 0.35. La combinación EcoRI-ACT + MseI-CAC mostró el valor PIC mas alto (0.35) para estudios de polimorfismo. Asimismo Christensen *et al.* (2007) señaló que un

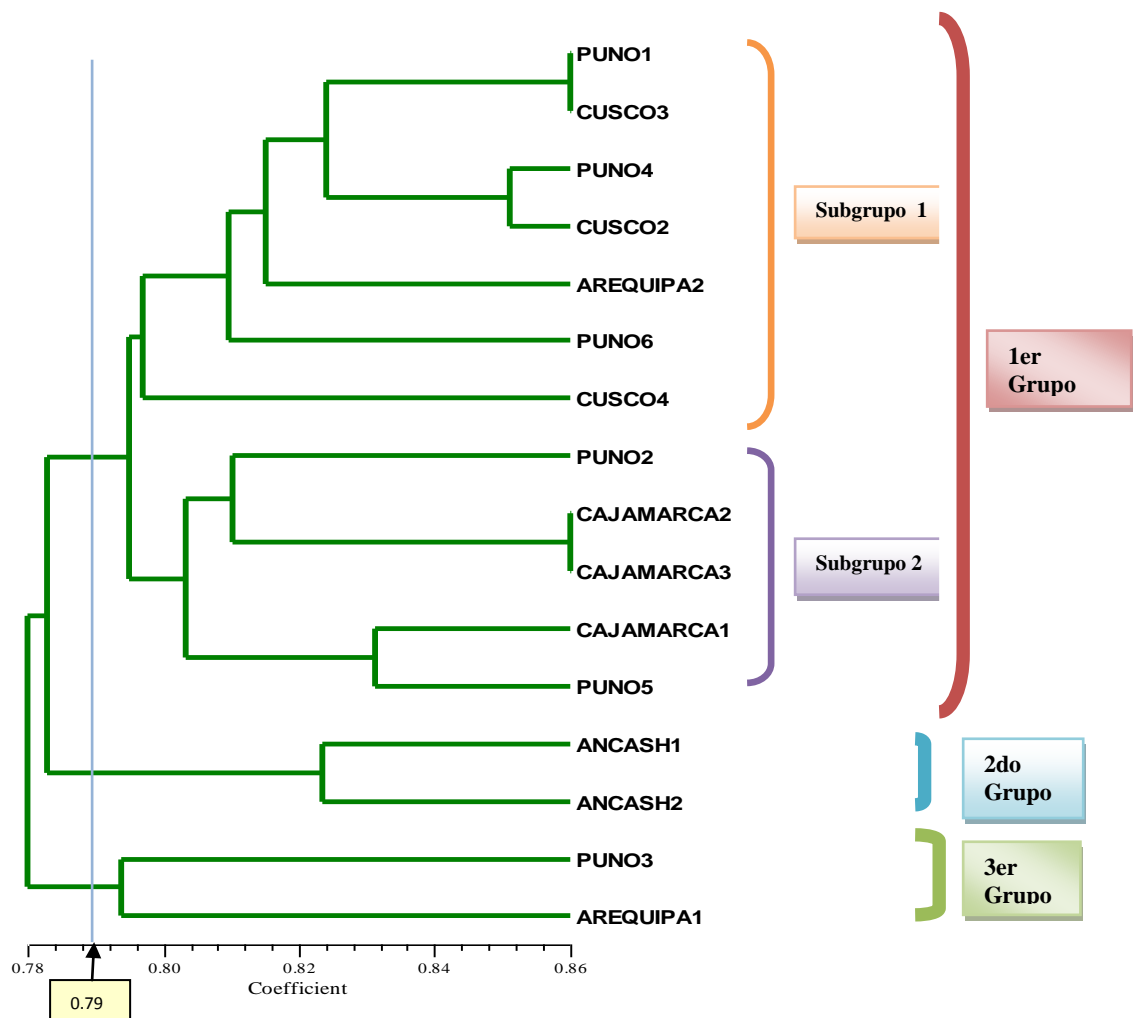
buen marcador informativo con una alto índice de polimorfismo permite el estudio de la diversidad genética de las diferentes cultivares existentes. Adicionalmente Koskinen (2004), menciona que cuando las posibilidades de hacer este tipo de estudio, están limitadas por los recursos, es muy importante poder seleccionar cuales primers pueden ser más eficientes que otros en la determinación de la variabilidad genética de una población.

## **5.2 Análisis de agrupamiento**

### **5.2.1 Caracterización intergenotípica**

El análisis se realizó utilizando los datos obtenidos de los 10 iniciadores para las 16 accesiones de quinua, el primer paso fue la construcción de la matriz de similitud obteniendo un rango de similitud de 0.78 a 0.86, estos resultados permitieron conocer la variabilidad existente entre las accesiones analizadas contenida en la información de los marcadores ISSR.

De las 178 bandas generadas entre los 16 genotipos, 90 fueron polimórficas representando el 50.6%.



**Figura 4: Dendrograma de las 16 accesiones de quinua analizadas, mostrando los grupos formados.**

En la figura 3 se puede apreciar que las accesiones formaron 3 grupos diferentes a un coeficiente de 0.79. El grupo 1 lo conformaron 12 accesiones (5 de Puno, 3 de Cusco, 3 de Cajamarca y 1 de Arequipa) la cual a su vez se dividieron en dos subgrupos, el primer subgrupo estuvo conformado por 7 accesiones (3 de Puno, 3 de Cusco y 1 de Arequipa), la similaridad en las accesiones Puno1 y Cusco 3 pertenecientes al primer subgrupo haría suponer que podría ser el mismo cultivar siendo aun de diferentes departamentos. El segundo subgrupo lo conformaron 5 accesiones (3 de Cajamarca y 2 de Puno), la similaridad en las accesiones Cajamarca 2 y Cajamarca 3 pertenecientes al segundo subgrupo probablemente son el mismo cultivar, ambos provienen del mismo distrito aunque de diferentes localidades, mientras que Cajamarca 1 presentó menor similaridad la cual probablemente sea un cultivar diferente

provinendo de diferente localidad; sin embargo en este segundo subgrupo se incluyeron 2 accesiones de diferente origen (Puno 2 y Puno 5), probablemente haya existido un intercambio de semillas en el tiempo, migración y dispersión de semillas de su centro de origen hacia el norte y centro del Perú o viceversa mediada por los humanos.

El grupo 2 está formado por las 2 accesiones de Ancash, la cual están relacionadas genéticamente, siendo colectados en diferentes provincias como Carhuaz (distrito de Shilla) y Recuay (distrito de Ticapampa) del mismo departamento; estas dos accesiones probablemente están relacionadas geográficamente.

El grupo 3 lo conforman las accesiones de Puno3 y Arequipa 1, probablemente la proximidad entre estos dos departamentos, sea la causa de la similitud observada entre ellas en el dendograma.

Así mismo se puede apreciar que las accesiones pertenecientes al grupo 1 y 3 presentaron la mayor disimilitud genética, evidenciándose que la accesión Arequipa 1 ubicado en el grupo 3 se aleja bajo el análisis molecular de la accesión Arequipa 2 del grupo 1, siendo estas dos accesiones colectadas en el mismo departamento. La accesión Puno3 perteneciente al grupo 3 se distancia genéticamente de las accesiones Puno 1, Puno 2, Puno 4, Puno 5 y Puno 6 (pertenecientes al primer grupo) existiendo la mayor disimilitud genética habiéndose colectado aun en el mismo departamento. Por lo tanto las accesiones del grupo 1 y 3 presentaron la mayor disimilitud genética y variabilidad según los niveles de polimorfismo reportados por los marcadores ISSR. Debemos mencionar también que la región del sur del Perú presenta la mayor diversidad y representa centro de origen de este cultivo. Por su parte Gandarillas (1979) y Wilson (1988) sugirieron también que la sierra sur cercana al lago Titicaca representa el centro de diversidad basándose en los altos niveles de morfología y a la diversidad obtenida a través de estudios en izoenzimas ; de mismo modo Castillo (2006) estudió la estructura genética de las diferentes poblaciones de quinua en tres regiones distintas del altiplano Perú-boliviano, en la cual dio a

conocer que las poblaciones de quinua exhibieron polimorfismo generados por marcadores RAPDs, evidenciando amplia divergencia en los diferentes cultivares de quinua sembrado en Los Andes, adicionalmente Ruas *et al.* (1999) caracterizó 19 accesiones de seis especies de quinua en marcadores RAPDs en el cual dio a conocer que existen altos niveles de polimorfismo entre todas las especies estudiadas y bajos niveles de variación intraespecífica dentro de las accesiones de quinua dependiendo del origen de cada accesión. Finalmente los resultados de este estudio sugieren que las accesiones de quinua provenientes de los departamentos de Puno, Cusco y Arequipa, presentarían una mayor disimilitud genética, amplia variabilidad y probablemente heterogeneidad.

Las accesiones Ancash 1 y Ancash 2 pertenecientes al grupo 2 se agruparon por su origen de colecta, resultados que coinciden con la investigación realizada por Bustinza (2007), el cual mediante marcadores RAPDs pudo agrupar por origen las accesiones de quinua del centro del Perú y sur de Bolivia, indicando además la existencia de niveles bajos de variación genética en el centro del Perú. Además Christensen *et al.* (2007) hizo el análisis genético en 121 accesiones de quinua mediante marcadores microsatélites (SSR), indicando una disminución en la variación genética en las regiones del norte y costa del Perú, esta reducción en la diversidad genética podrían ser debido al resultado de efectos asociativos con la dispersión del cultivo del centro de origen o alternativamente como una respuesta a la adaptación selectiva de un cultivar.

### **5.3 Caracterización Intragenotípica**

La variabilidad intragenotípica pudo observarse dentro de cada genotipo en base al polimorfismo mostrado, en la tabla 6 se puede apreciar la accesión que presentó mayor porcentaje de polimorfismo fue Puno 2 con 54.03%, seguido de Cusco 2 con 52.63%, Arequipa 2 con 47.05% y Puno 5 con 41.86%, mientras que la accesión Cajamarca 1 con 16.56% presentó el menor porcentaje de polimorfismo. Esto significaría que los individuos pertenecientes a una misma accesión de quinua no son iguales genéticamente probablemente debido a una mayor polinización cruzada, intercambio de genes, mezcla de semillas

realizadas por los agricultores, durante los viajes de colección o accesadas al banco de germoplasma.

**Tabla 6:** Porcentaje de Polimorfismo dentro de cada accesión de quinua

Accesión	Bandas Polimórficas	Bandas monomórficas	Total	Porcentaje de polimorfismo
Puno 1	30	90	120	25%
Puno 2	87	74	161	54.03%
Puno 3	40	108	148	27.02%
Puno 4	44	112	156	28.20%
Puno 5	72	100	172	41.86%
Puno 6	55	99	154	35.71%
Cusco 2	90	81	171	52.63%
Cusco 3	31	118	149	20.80%
Cusco 4	37	129	166	22.29%
Cajamarca 1	27	136	163	16.56%
Cajamarca 2	36	122	158	22.78%
Cajamarca 3	42	115	157	26.75%
Ancash 1	41	127	168	24.40%
Ancash 2	33	115	148	22.29%
Arequipa 1	34	130	164	20.73%
Arequipa 2	80	90	170	47.05%
Promedio	48.68	109.12	157.81	30.51%

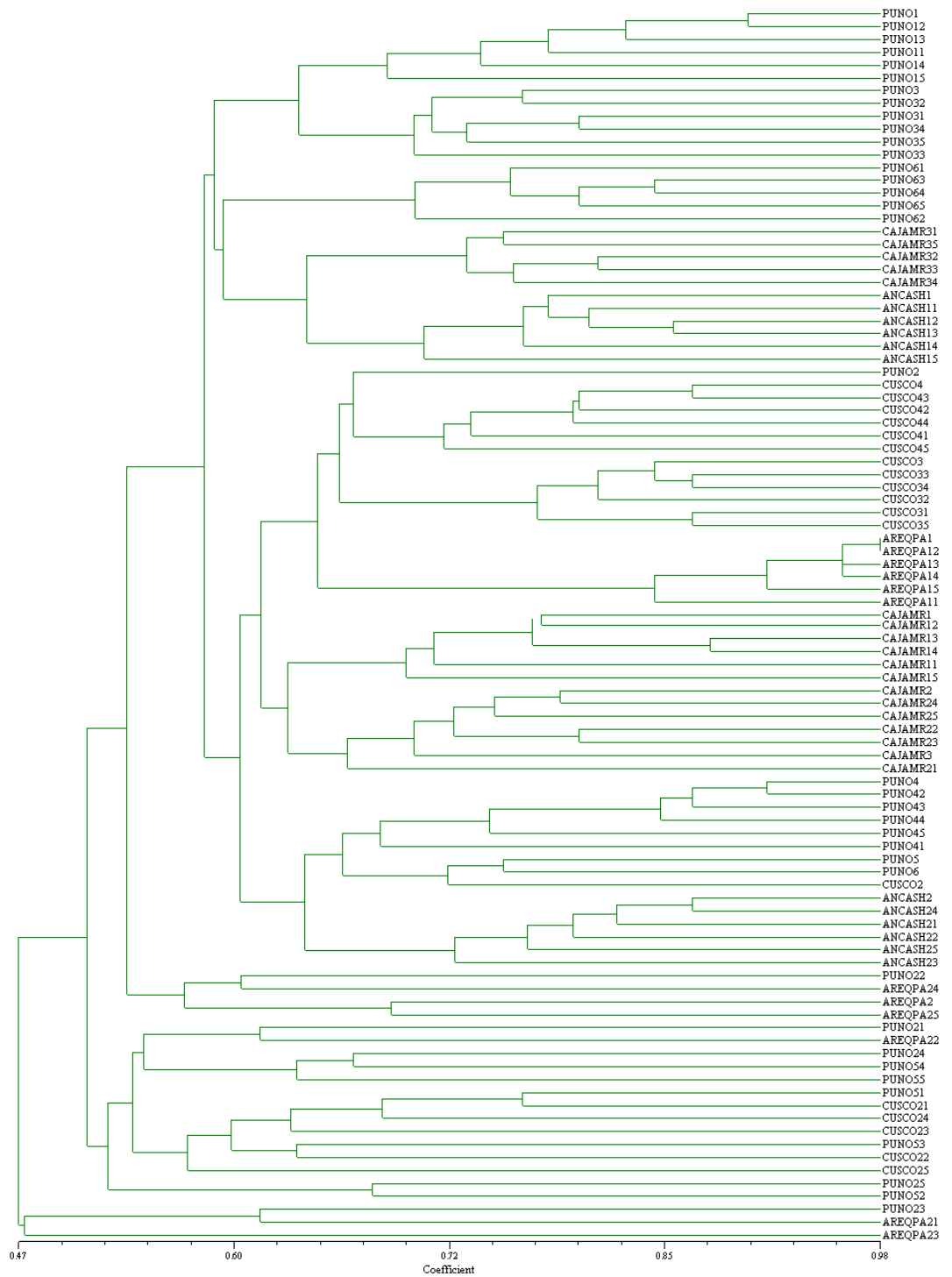
Por otro lado, podemos mencionar que las accesiones pertenecientes al departamento de Puno presentó un promedio de polimorfismo de 35.30%, Arequipa 33.89% y Cusco 31.90% respectivamente; en comparación con las accesiones de Ancash (23.34%) y Cajamarca (22.03%) que presentaron un menor promedio de polimorfismo. Las procedencias de estas accesiones (Puno, Cusco y Arequipa) indicarían que existe una mayor variabilidad genética y un intercambio de genes constante entre y dentro de los cultivares de quinua en esta región. Estos resultados coinciden con la obtenida por Cruz (2002), quien evaluó morfológica y molecularmente una colección de fríjol ñuña, en la cual hizo un análisis



comparativo intrapoblacional mediante la técnica de RAPDs en cuatro accesiones tomando cinco plantas por accesión, determinando que si existía variabilidad dentro de una accesión. Coincidentemente Bonifacio *et al.* (2001) detectó un promedio de 32% de polimorfismo dentro de diferentes accesiones de quinua en estudio, indicando que la heterogeneidad podría ser debido al grado de polinización cruzada o a la mezcla de semillas. Sin embargo Castillo (2006) estudió la diversidad genética dentro de ocho accesiones de quinua con RAPD en el altiplano Boliviano y noto que había entre 31.2% y 55.3% de bandas polimórficas en las accesiones estudiadas, posiblemente debido al tipo de reproducción y a la procedencia de diferentes zonas geográficas; del mismo modo la National Research Council (1989), da a conocer que existe alta variabilidad y polinización cruzada en los diferentes ecotipos y variedades locales en los alrededores del lago Titicaca y Puno. Las accesiones que presentaron menor polimorfismo fueron: Cajamarca con un rango de 16.56% a 26.75%, Ancash con un rango de 22.29% a 24.40%, Cusco con un rango de 20.80% a 22.29% y Arequipa con 20.73%. Probablemente este polimorfismo se deba a que los individuos pertenecientes a cada accesión tengan un menor porcentaje de polinización cruzada, mayor homogeneidad de la semilla y a los intercambios frecuentes de semillas entre los agricultores. Por su parte Doebley *et al.* (1985) mencionan que la baja variación intrapoblacional puede deberse a un menor tamaño de muestra por accesión o a la procedencia de la colección. Además mencionan que es importante examinar la variación genética en los diferentes campos de cultivo para una mejor identificación del cultivar y la conservación genética futura. Ruas *et al.* (1999) reportaron también un bajo nivel de variación intrapoblacional en seis accesiones de quinua provenientes del banco de germoplasma de Bolivia basados en marcadores RAPDs.

#### **5.4 Análisis de agrupamiento**

El análisis se realizó utilizando los datos obtenidos de los 10 iniciadores para los 96 individuos de quinua estos resultados permitieron conocer la variabilidad y heterogeneidad existente dentro de cada accesión analizada contenida en la información de los marcadores ISSR.



**Figura 5: Dendrograma de los 96 individuos de quinua**

En el análisis intragenotípico, las accesiones que presentaron la mayor homogeneidad debido al agrupamiento de los individuos pertenecientes a cada accesión fueron: Puno 1, Puno 3, Puno 4, Cajamarca 1, Cajamarca 2, Cajamarca 3, Ancash 1, Ancash 2, Cusco

3,Cusco 4 y Arequipa 1. Estos resultados coinciden con las accesiones que presentaron menor porcentaje de polimorfismo (Ver tabla 6), probablemente esta agrupación se deba a la mayor homogeneidad entre los individuos pertenecientes a cada accesión.

Los individuos restantes pertenecientes a las otras accesiones como Puno 2,Puno 5, Cusco 2 y Arequipa 2 no formaron grupo, probablemente sea debido a la mayor variabilidad y heterogeneidad existente dentro de cada accesión, estos resultados también coinciden con el mayor porcentaje de polimorfismo encontrado en cada accesión analizada (Ver tabla 6). Además debemos mencionar que la accesión Cajamarca 3 no se agrupa con el resto de individuos que pertenecen a la misma accesión posiblemente a que este individuo sea el responsable de la variabilidad existente dentro de la accesión o a un error en la toma de muestra de colecta, del mismo modo ocurre con la accesión Puno 6 debido a que no se agrupa con el resto de individuos pertenecientes a la misma accesión la cual probablemente indicaría que este individuo sea también el responsable de la heterogeneidad o a un error en la alícuota para formar la accesión.

## VI. CONCLUSIONES

1. La técnica de ISSR probó ser un método eficiente para la caracterización inter e intra genotípica de las 16 accesiones de quinua. Los primers 834 y 835 fueron los más informativos para determinar el polimorfismo.
2. La caracterización molecular permitió identificar el coeficiente de similitud entre las accesiones de quinua. Las accesiones Cajamarca 2, Cajamarca 3, Puno 1 y Cusco 3 fueron similares a un coeficiente de 0.86, en cambio las demás accesiones presentaron un nivel de similitud menor a 0.86.
3. Los marcadores ISSR permitieron identificar la variación entre los individuos de las diferentes accesiones estudiadas. El rango de variación estuvo entre 16% y 54% de polimorfismo, la cual se relacionaría con el grado de polinización cruzada.

## **VII RECOMENDACIONES**

1. Complementar el análisis molecular con el análisis morfológico para identificar, seleccionar y determinar la variabilidad genética de la quinua.
2. Aumentar el número de marcadores ISSR para tener un agrupamiento más consistente y una mayor cobertura del genoma de quinua.

### VIII REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1.- Awasthi, A. K.; G. M. Nagarajal; G.V. Naik; S. Kanginakudru; K. Thangavelu; J. Nagaraju. 2004. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 5:1.
- 2.- Azofeifa A. 2006. Uso de Marcadores Moleculares en Plantas. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-2242. Costa Rica
- 3.- Abbot, P. 2001. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science* 8:1-3.
- 4.- Bahulikar, R. A.; D. Stanculescu; C. A. Preston; I.T. Baldwin. 2004. ISSR and AFLP analysis of the temporal and spatial population structure of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*, in SW Utah. *BMC Ecology* 4:1-13.
- 5.- Bonifacio A.; Mújica A.; Álvarez A.; Roca W. 2001. Mejoramiento genético, germoplasma y producción de semillas en quinua, ancestral cultivo andino. *Cultivos andinos*. FAO, Santiago, Chile.
6. - Botstein D.;White R.;Sholmick H;Davus R.1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*.32:314-331
7. - Bruin A. (1964). Investigación of the food value of quinua and cañihua seed. *Food sci.*, 29, 872-876.
- 8.- Bruneau, A. ; J. Simon ; J. Starr ; J. Drouin. 2005. Molecular markers indicate that the narrow Québec endemics *Rosa rousseauiorum* and *Rosa williamsii* are synonymous with the widespread *Rosa blanda*. *Can. J. Bot.* 83: 386–398.
- 9.- Bukasov S. 1965. Las plantas cultivadas en México, Guatemala y Colombia. *Publicación miscelánea Nro 20*. 261 p.

- 10.- Bustinza B, 2004.Diversidad de Marcadores RAPDs entre cultivares y variedades nativas de quinua. Universidad Nacional Federico Villareal. Lima. Libro de resúmenes Pág.3
  
- 11.- Blears M.J.;Grandis SA, Lee H.;Trevors 1998. AFLP, review of the procedure and its applications, Journal of industrial microbiology and biotechnology.
  
- 12.- Blair, M.W; Panaud O.; Mccouhc S.R. 1999. Inter-simple sequence repeat amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 98: 780-792.
  
- 13.- Carvalho, M.; M. Hopkins; S. Mitchell; S. Kresovich; J. Montenegro; M. Ferreira. 2004. Genetic diversity of peanut ( *Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. BMC Plant Biology 4: 1186-1471.
  
- 14.- Castillo C. 2006. Genetic structure of quinua (*Chenopodium quinoa*) from Bolivia altiplano as revealed by RAPD. Universidad Mayor de San Andres Bolivia. Crop evolution Pag: 1-22
  
- 15.- Centro internacional de la Papa, 2007. Assesment of genetic diversity collections of quinua using microsatellite markers. Plant genetic resources: Characterization and utilization 5:82-95
  
- 16.- Christine pratt, Melissa D. Mc Carty, 2000 Agronomy and Horticulture Department, 275 WIDB, Brigham Young University. Provo, U.S.A.
  
- 17.- Christensen; D. B. Pratt; C. Pratt; P. T. Nelson; M. R. Stevens;E. N. Jellen; C. E. Coleman; D. J. Fairbanks; A. Bonifacio<sup>3</sup> and P. J. Maughan. 2007.Review agronomy and horticulture.Young university, CIP. Department of plant and animal. Crop sciences. Vol. 12:12-16

- 18.- Clark M. S. 1996. Plant molecular biology a laboratory manual Springer.
- 19.- Crisci J.; López M. 1983. Introducción a la teoría de la taxonomía numérica serie biológica Nro. 26. Programa regional de desarrollo científico y tecnológica. Washington D.C. 132p.
- 20.- Cruz L. 2002. Evaluación morfológica y caracterización molecular preliminar de semillas de un colección de germoplasma de frijol ñuña (*Phaseolus vulgaris L.*). Tesis para optar el grado de Mg. Sc .Especialidad de Mejoramiento genético de Plantas. Universidad Nacional Agraria la Molina
- 21.- Cubero J. 2003. Introducción a la mejora genética vegetal. 2a.ed.: Mundi Prensa. España 567 p.
- 22.- Dangi, R.; D. Meena; L. B. Choudhary; P. K. Ranjekar; V. S. Gupta. 2004. Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biology 4:13.
- 23.- Davila L, 2007. Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en Agave. Revista Facultad Agronomía Maracay. 33:93-111. 2007
- 24.- Dodd S. L.; Stewart A., 2003. RAPD-PCR and UP-PCR techniques distinguish a *Pithomyces chartarum* isolate with biocontrol capabilities against *Botrytis cinerea* on grape (*Vitis vinifera*). Crop and horticultural science. Vol 31:55-56
- 25.- Doebley J.; Goodman M.; Stuber C. 1985. Isozyme variation in the races of maize from Mexico. Am. Bot. 72. Pág. 629-639
- 26.- Doyle J. y Doyle, 1990. Isolation of ADN from small amounts of plant tissues. BRL Focus 12:13-15, modified at the Forest Biotechnology lab at NCSU.



- 27.- Ducarme,V.; R. A. Wesselingh. 2005. Detecting hybridization in mixed populations of *Rhinanthus minor* and *Rhinanthus angustifolius*. *Folia Geobotanica* 40: 151–161.
- 28.- Esteban R. Brenes, F. Crespo y K. Madrigal. 2001. Proyecto andino de competitividad. Setiembre.
- 29.- Fang Xiu; Mei S. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives using internal transcribe spacer, AFLP. *Molecular phylogenetics and evolution*.
- 30.- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2008. Underutilized Andean food crops. Latin America and the Caribbean, Rome, Italy.
- 31.- FAO 1998. Under Utilized Andean Food Crops. Rome, Italy
- 32.- Ferreira ME; Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa–Cenargen Documento 20. Embrapa–Cenargen, Brasilia, Brasil.
- 33.- Fleschar R.; Kimball M. 1993. Glossary of biotechnology terms technomic publishing company, Inc. Lancaster, Pennsylvania, USA 153p.
- 34.- Gandarillas H. 1979. Botánica. En: Quinoa y kañiwa, cultivos andinos. Publ. CIID, Bogotá, Colombia.
- 35.- Geldenhuis, M. M.; J. Roux; M. J. Wingfield; B. D. Wingfield. 2004. Development of polymorphic markers for the root pathogen *Thielaviopsis basicola* using ISSR-PCR. *Molecular Ecology Notes* 4: 547-550.
- 36.- Gonzales A. 2005. Assesment of inter simple sequence repeat to differentiate sympatric wild and domestication population. *Crop sci* 45:606-615.

- 37.- González, A.; A. Wong; A. Delgado-Salinas; R. Papa; P. Gepts. 2005. Assessment of inter simple sequence repeat markers to differentiate sympatric wild and domesticated populations of common bean. *Crop Science* 45:606-616.
- 38.- Guisti, L. 1970. El género *Chenopodium* en Argentina. Numero de Cromosomas. Departamento de botanica. Editor Sprenger netherland. *Darwiniana* 16: 98-105
- 39.- Ghislain M.; Zhang D.; Fajardo Z. 1999. Marker assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum Fureja*. Colección using RAPD marker. *Genetic resources and crop evolution* 46:547-555 p.
- 40.- Jacobsen E. y Mujica A. 2001. Memorias del primer taller internacional en quinua: Recursos genéticos y sistemas de producción 10-14 de mayo 1999. La Molina Perú. Proyecto Quinua CIP.
- 41.- Hodgkin T. 1995. Some current issues in the conservation and use of plant genetic resources. Report of IPGRI workshop 9-11, Rome Italy pag:3-22
- 42.- Hunziker, A.T. 1952. Los pseudocereales de la agricultura indígena de América. ACME Agency, Buenos Aires, Argentina
- 43.- Instituto Nacional de investigación y Extensión Agraria (INIA), 2006. Conservación in Situ de cultivos Nativos y sus Parientes silvestres. Boletín Técnico Trilingue Nro1. Lima, Perú.
- 44.- IICA et al. Manual de producción de quinua de calidd en el Ecuador disponible en URL <http://www.ecuarural.gov.ec/ecuagro/pàginas/productos manuales>
- 45.- Instituto Nacional de investigación y Extensión Agraria (INIA), 2008. Variedades para Agroindustria, Exportación y Consumo Nacional. Estación Experimental Illpa Puno. Boletín Técnico Nro 9. Puno-Perú.

- 46.- Jacobsen E.; Mújica A.; 2001. Ancestral cultivos andinos de Quinoa. Santiago Chile. Pág. 16
- 47.- Jiménez J. 2006. Biodiversity tradicional propagated crop cultivated peruvian highland. Tesis para optar el grado de PhD. Facultad de Biología y Protección Ambiental, Universidad de Silesia. Polonia.
- 48.- Jin Y.; T. He; B. Lu. 2003. Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. *New Phytol.* 159:513-519.
- 49.- Karp, A.; Edward, K. 1998. DNA markers: a global overview. *In: G. Caetano-Anollés, P.M. eds. DNA markers: protocols, aplicaciones and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.*
- 50.- Koskinen, M.T.; H. Hirnoven; P.A. Landry; C. Primmer. 2004. The benefits of increasing the number of microsatellites used in genetic population studies: an empirical perspectiva. *Hereditas* 141:61-67.
- 51.- Lande R; Patterson, R. 1991. Marker-Assisted selection in relation to traditional methods of plant breeding. *In plant breeding in the 1990. Edited by Staker and Murphy. International Wallingford U.K.*
- 52.- Leon J.H.; Jones, W.A. 2005. Phylogenetic relationships of *Gonatocerus* species. *In: Proceedings of the CDFA Pierce's Disease Control Program Research Symposium. San Diego, California. p. 309-312.*
- 53.- Lescano, J.L. 1994. Genética y mejoramiento de cultivos andinos. Programa Interinstitucional de waru waru, Puno, Perú. 459 p
- 54.- Liston, A.; B. L. Wilson; W. A. Robinson; P. S. Doescher; N. R. Harris; T. Svejcar. 2003. The relative importance of sexual reproduction versus clonal spread in an aridland bunchgrass. *Oecologia* 137:216-225.

- 55.- Li Wen H. 1997. Molecular Evolution. Chapter 2: Dynamics of genes in Population. Sinauer associates, INC, Publishers.
- 56.- MINAG (Ministerio de Agricultura), 2009. Boletín Estadística Agraria mensual. Perú.
- 57.- Mújica A. 2005. Descriptores para la caracterización del cultivo de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): En: Manual para caracterización *In situ* de cultivos nativos: Conceptos y Procedimientos. Ministerio de Agricultura, INIA, Fondo Mundial del Medio Ambiente-FMAM, Cooperación Italiana y PNUD. Lima, Perú. pp.90-105.
- 58.- Mújica, A. 2003. Investigaciones Agroindustriales de Quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen.) en Puno, Perú. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 66 p.
- 59.- Mújica A.; Jacobsen E. 2001. Biodiversidad un desafío en la región centro oeste de Sudamérica en agricultura andina. Puno. Perú.
- 60.- Mújica A. 1999. Libro de Campo de la Prueba Americana y Europea de Quinua. FAO, UNA-Puno. Editor CIP, Lima, Peru, 41 p.
- 61.- Mújica A. 1996. Agroindustria de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en los Países Andinos. CONCYTEC, UNA-Puno, PROINPA, BOLIVIA, UNC, COLOMBIA. Editorial Altiplano. Puno, Perú. 115 p.
- 62.- Mújica A; Izquierdo; Quispe, 1995. Prueba regional de cultivares de Amaranto. Red de cooperación técnica en producción de cultivos alimenticios. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Lima, Perú.
- 63.- Mujica, A. 1988. Parámetros genéticos e índices de selección en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Centro de Genética. Montecillos, México. 122p.

- 64.- Maughan, P.J.; Saghai Maroof and Buss G.R. 2004. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome* 38. p 715-723.
- 65.- Moreno G. 1999. Marcadores moleculares en el mejoramiento genético de plantas. Centro de Investigación Agraria. Paper nro 10. Coruña, España.
- 66.- Nacional Research Council 1989. Lost crops of the incas: Little-known plants of andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press. Washington, USA
- 67.- Nagaraju, J.; M. Kathirvel; R. Ramesh; E. A. Siddiq; S. E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non- Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:5836-5841.
- 68.- Nageswara, S. ; B. Rao ; N. Surendra ; B. Saratchandra. 2005. Characterization and phylogenetic relationships among microsporidia infecting silkworm, *Bombyx mori*, using inter simple sequence repeat (ISSR) and small subunit rRNA (SSU-rRNA) sequence analysis. *Genome* 48:355-366
- 69.- Paez L. 2007, Caracterización de *Opuntia* spp. Mediante Semilla con Marcadores RAPD e ISSR y su Posible Uso para Diferenciación. *Plant Cell Reports* 22::71-78.
- 70.- Pearsall D. 1992. The origins of plant cultivation in South America. In the origins of agriculture. An international perspective (Wesley cowan C., Watson P., Editores) Smithsonian institution Press Washington, London, 173-205.
- 71.- Pissard, A. ; M. Ghislain ; P. Bertin. 2006. Genetic diversity of the Andean tuber-bearing species, oca ( *Oxalis tuberosa* Mol.), investigated by inter-simple sequence repeats. *Genome* 49: 8–16.

- 72.- Phillips W, Mora A, Johnson ES, Astorga C. 2002. Recent efforts to improve the genetic diversity using ISSR in the alfalfa, San Jose, Costa Rica. pp 611–623
- 73.- Phillips W; Escalant J. 1995. Caracterización molecular de los recursos fitogenéticos. Resúmenes Turrialba, Costa Rica., CR. CATIE. Pág. 4-6
- 74.- Pradeep M., 2002. Inter Simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Netherlands. Euphytica 128:9-17
- 75.- Pratt C., 2000. AFLP analysis of genetic diversity in the USDA. *Chenopodium quinoa* collection. M.S. Thesis. Brigham Young. University, Provo, UT, USA
- 76.- Pérez de la torre M.; Acevedo A.; Cerpa J.; Miyajima I. y Escandón S. 2003. Puesta a punto de la técnica de microsatélites anclados para la caracterización de individuos selectos de jacarandá. Floricultura en la Argentina. Investigación y Tecnología de Producción, pp.: 3-12.
- 77.- Rea, J. 1969. Biología floral de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Turrialba 19: 91-96. Rodríguez, 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.
- 78.- Repo Carrasco, R. Espinoza, Jacobsen E. 2001. Valor nutricional y usos de la quinua (*C. quinoa*) y de la kañiwa (*C. pallidicaule*). En memoria, primer taller internacional sobre Quinua, recursos genéticos y sistemas de producción. UNALM, Lima-Perú.
- 79.- Riek J. 2001 Are molecular markers strengthening plant variety registration and protection. Symp. On New Ornamental. Acta Hort. 552: 215-223
- 80.- Risi, J. and N.W: Galwey. 1984. The *Chenopodium* grains of the andes, Inca crops for modern agriculture. Adv. Applied Biology, Vol 10:145-1216.

- 81.- Ruas P.M., Bonifacio A. and Anderson W.R. 1999. genetic relationship among 19 accesions of six species of chenopodium l. by Randon Amplified Polymorphic DNA fragments. *Euphitica* 105:25-32
- 82.- Ruas C.;Ruas P.; Matzenbacher, N. Ross, G. Bernini C. y Vanzella 1995. Cytogenetics studies of some Hypochoeris species from Brazil.
- 83.- Sarla N. 2003. ISSR and SSR markers based on diverse Oriza nivara accessions and reveal rare alleles. *India current science* vol 84. pag:5-10
- 84.- Simmonds N. 1965. The grain chenopods of the tropical American highlands. *Economic Botany* 19, 223-235
- 85.- Stevens M.2003. "Development and use of microsatellite and aflu markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)." *Crop Science*. 45.4 (2005): 1618-1630.
- 86.- Stouthamer R. 2006.Herramientas Moleculares en el control biológico. Universidad de California. *Biológica Control* 15: 1-24
- 87.- Sobhian R. 2003. DNA phenotyping to find a natural enemy in Uzbekistan for California biotypes of *Salsola tragus* L. *Biological Control Program USA*. Vol 10: 12-16
- 88.- USA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network (GRIN) (Base de Datos en Linea). National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?409941> (16 November 2009)
- 89.- Taran, B.; C. Zhang; T. Warkentin; A. Tullu; A. Vandenberg. 2005. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome* 48:257–272.

- 90.- Paulo M. Ruas. A. Bonifacio 1999. Department of botany and range science, Brigham Young University. Provo. U.S.A.
- 91.- Valadez E.; Kahl G. 2000. Huellas de AND en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio) Ed. Mundo prensa. México. 147p.
- 92.- Valls A.; Gómez C. 2007. El algoritmo de microagregación para anonimización de secuencias de datos categóricos. Departamento de matemáticas. Catalonia, España. ITAKA. pág.1-8
- 93.- Vijayan, K.; P. P. Srivastava; A. K. Awasthi. 2004. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry ( *Morus*) species using molecular markers. *Genome* 47: 439–448.
- 94.- Wallace, L. E. 2003. Molecular evidence for allopolyploid speciation and recurrent origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae) . *International Journal of Plant Sciences* 164: 907-916.
- 95.- Wilson, H.D. 1999. Crop/weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd. And *C. berlandieri* Moq. *Theor. Appl. Genet.* 86:642-648.
- 96.- Wilson, H.D. 1976. A biosystematic study of the chenopods and related species. Ph. D. Thesis, Indiana University U.S.A.
- 97.- Wilson, H.D. 1988. Allozyme variation and morphological relationships of *Chenopodium hircinum* (s.l.). *Syst. Bot* 13(2):215-228
- 98.- Wilson, H. and Heiser, C.B. Jr. 1979. The origen and evolutionary relationship of huauzonthe (*Chenopodium nuttalliae*) domesticated chenopod of Mexico. *Am. J. Bot.* 66: 198-206.



- 99.- Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.
  
- 100.- Zizumbo-Villarreal, D.; P. Colunga-García Marín; E. P. de la Cruz; P. Delgado-Valerio; P. Gepts. 2005. Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science* 45:1073-1083.

## IX ANEXOS

**Tabla 7:** Lectura del biofotómetro de las 16 accesiones y de los cinco individuos por cada accesión.

<b>Accesión</b>	<b>260/280</b>	<b>ng/ul</b>
1	2,02	1936
2	1,92	4042
3	2,01	1000
4	1,95	2135
5	1,99	1972
6	1,95	3688
7	1,97	4023
8	1,4	491
9	1,95	1178
10	1,85	3284
11	2	2330
12	1,74	888
13	1,98	2801
14	1,89	1935
15	2,01	1430
16	1,95	6571
17	1,97	2480
18	2	1719
19	1,87	3825
20	1,85	2694
21	1,87	1451
22	1,68	1555
23	1,78	1535
24	1,83	2256
25	1,9	3272
26	1,87	2988
27	1,93	3842
28	1,9	3632
29	1,9	2359
30	1,83	1829
31	1,93	4290
32	1,87	3570
33	1,9	2287
34	1,88	2396
35	1,9	1315
36	1,85	1679
37	1,96	3402
38	1,83	3027
39	1,96	2748

40	1,93	3886
41	1,94	2469
42	1,97	2298
43	1,75	911
44	1,92	3327
45	1,9	4020
46	1,87	2590
47	1,85	2129
48	1,91	1886
49	1,83	1482
50	1,9	2191
51	1,89	2975
52	1,94	2838
53	1,86	2553
54	1,89	1924
55	1,9	3516
56	1,93	2619
57	1,93	3326
58	1,93	2765
59	1,87	3103
60	1,91	2966
61	1,89	2721
62	1,89	4219
63	1,92	2364
64	1,8	1328
65	1,85	1686
66	1,94	2788
67	1,87	1988
68	1,96	4146
69	1,84	2437
70	1,94	3595
71	1,86	4165
72	1,85	1500
73	1,93	2450
74	1,93	2056
75	1,91	2952
76	1,9	2163
77	1,93	3813
78	1,84	4079
79	1,87	3490
80	1,91	3385
81	1,89	4389
82	1,94	4062
83	1,9	3658
84	2	223
85	1,41	760
86	1,78	522

87	1,72	565
88	1,68	645
89	1,74	573
90	1,55	283
91	1,89	992
92	1,87	378
93	1,93	3031
94	1,95	1833
95	1,37	627
96	1,82	322

**Tabla 8:** Reactivos usados para la extracción de ADN

**T.E.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concent. Final</b>	<b>1 litro</b>
Tris HCl pH8	1M	10 ml.
EDTA	0.25M	4 ml
Agua milipure		986 ml.

**Buffer de extracción CTBA**

<b>Reactivo</b>	<b>Conc. Final</b>	<b>1000ml</b>
CTAB	2%	20 gr.
NaCl	1.4M	81.2gr.
EDTA	20mM	40 ml.
Tris HClpH8	100mM	100ml.
PVP	1%	10gr.

**TBE 10X**

<b>Reactivo</b>	<b>10 litros</b>	<b>Concentrac. Final.</b>
Tris	1210 gr.	1 M
EDTA	33.6 gr.	10 mM.
NaOH.	170.1 gr.	125 mM