

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Variabilidad genética de *Chenopodium quinoa* Willd.
"quinua" del Banco de Germoplasma del INIA mediante
marcadores AFLP - Ayacucho 2014.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA

Presentado por la:

Bach. CUEVA CASTILLO, Judith Miriam

AYACUCHO – PERÚ

2015

Tesis
B711
Cue
Ej. 1

Acta de Sustentación de Tesis
Bach. Judith Miriam Cueva Castillo
RD N° 156-2015-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde con diez minutos del día miércoles diecinueve de agosto del año dos mil quince, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas los miembros del Jurado Calificador, bajo la presidencia del Dr. Jesús De la Cruz Arango, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, actuando como Secretario y Jurado a la vez el Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, con la asistencia de la Blga. Laura Aucasime Medina y de la Mg. Paula García Godos Alcázar, Asesora; con la finalidad de recepcionar en acto público el Trabajo de Tesis: Variabilidad genética de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA mediante marcadores AFLP – Ayacucho 2014, presentado por la señorita Bachiller en Ciencias Biológicas Judith Miriam Cueva Castillo, con la que pretende optar el Título Profesional de Bióloga con Mención en la Especialidad de Biotecnología.

Para dar inicio al Acto de Sustentación, el Señor Decano dio a conocer la conformidad de la documentación presentada, luego de lo cual autorizó a la sustentante el inicio de su exposición teniendo en cuenta de que dispone de un máximo de cuarenta y cinco minutos. A continuación, la sustentante procedió con su exposición, la misma que concluyó siendo las cuatro con cuarenta y cinco minutos.

Concluida la exposición, el Decano de Facultad invitó a los miembros del Jurado Calificador a participar con sus preguntas, comentarios y aclaraciones, en el orden siguiente: Mg. Fidel Rodolfo Mujica, Blga. Laura Aucasime y Mg. Paula García Godos. Finalmente, el Decano solicitó a la sustentante y al público asistente a fin de que abandonen momentáneamente el recinto, con la finalidad de que el Jurado Calificador realice las deliberaciones del caso y establezca la calificación, siendo el resultado el siguiente:

Blgo. Jurado	Exposición	Respuestas a Preguntas	Promedio
Blga. Laura Aucasime Medina	18	17	18
Mg. Fidel R. Mujica Lengua	18	18	18
Mg. Paula García Godos Alcázar	20	19	20
		Promedio:	19

Dando como resultado la nota promedio aprobatoria de 19 (diecinueve). A continuación, se invitó a la sustentante y al público presente a fin de que reingresen al

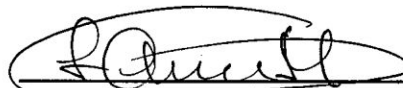
Auditorio para dar a conocer públicamente los resultados de la calificación. Acto seguido, el Decano impuso a la sustentante la medalla de la Universidad en reconocimiento a la nueva profesional y le tomó el Juramento de Ley.

El Acto de Sustentación culminó siendo las seis y treinta de la tarde, en fe de lo cual firman:



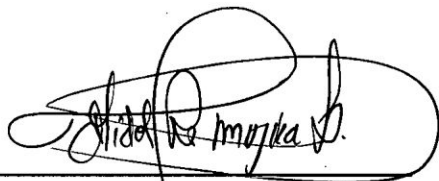
Dr. Jesús De La Cruz Arango

DECANO



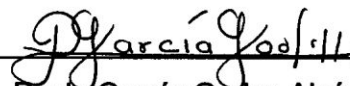
Blga. Laura Aucasime Medina

JURADO



Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua

JURADO



Mg. Paula García Godos Alcázar

ASESORA-JURADO

A mis padres Carlos y
Maritza, con amor y
agradecimiento por su apoyo
incondicional.

A mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga mi reconocida y respetada *Alma Mater*, por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los docentes de la Escuela Profesional de Biología, quienes me brindaron sus conocimientos durante mi formación profesional.

A la profesora Mg. Paula García Godos Alcázar, asesora del presente trabajo, por confiarme la responsabilidad de llevar a cabo la presente tesis, por su amistad y apoyo que hicieron posible la presente investigación.

Al profesor Mg. Reynán Cóndor Alarcón, por su apoyo incondicional, por compartir sus conocimientos, orientaciones y oportunas sugerencias las cuales me permitieron concluir la investigación.

Al Ing. Juan Tineo Canchari, por las facilidades para contar con las muestras de quinua del Banco de Germoplasma del INIA.

Al Ing. Juan Flores Ticona, por las sugerencias y facilidades para la realización del trabajo de tesis.

A todos mis amigos que me brindaron su apoyo en este proyecto.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.4. Taxonomía	6
2.5. Descripción Botánica	6
2.7. Importancia de la quinua	8
2.8. Variabilidad genética de la quinua	9
2.10. Genética de la quinua	12
2.11. Germoplasma Vegetal	12
2.12. Diversidad y variabilidad genética	13
2.13. Caracterización molecular	14
2.14. Extracción del ADN genómico	14
2.15. Marcador molecular	16
2.16. Reacción en cadena de la polimerasa	19
2.17. Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados	20
2.18. Análisis de Marcadores Moleculares	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Lugar de ejecución	25
3.2. Colección de muestra	25
3.3. Extracción de ADN	25
3.4. Calidad y Cuantificación de ADN	26
3.5. Análisis de AFLP	27
3.6. Análisis estadístico	31
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	57
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Comparación del contenido de aminoácidos esenciales en granos de quinua, cañihua, cereales, frejol, carne, pescado, leche y la proteína patrón.	9
Tabla 2.	Agentes contaminantes en preparaciones de ADN y alternativas para su extracción.	17
Tabla 3.	Combinaciones de iniciadores AFLPs utilizados en la selección de mejores combinaciones.	30
Tabla 4.	Bandas monomórficas y polimórficas obtenidas con cada combinación de iniciadores en el análisis de AFLPs en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua".	39
Tabla 5.	Porcentaje de bandas polimórficas obtenidas con cada combinación de iniciadores en el análisis de AFLPs de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua".	40
Tabla 6.	Índice del contenido de información polimórfica (PIC) y promedio del índice de contenido polimórfico empleados en el análisis de marcadores AFLPs en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua".	41
Tabla 7.	Índice de Heterocigocidad e Índice de Shannon empleados en el análisis de marcadores AFLPs en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua".	42

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Gel de agarosa al 1% mostrando la calidad de ADN genómico de 29 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua". Marcador λ (M) digerido con <i>Pst</i> I.	36
Figura 2. Patrón de bandas AFLPs obtenidas de siete combinaciones de iniciadores en <i>Chenopodium quinoa</i> "quinua".	37
Figura 3. Perfil de amplificación AFLP de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua".	38
Figura 4. Dendrograma de Similaridad de Jaccard obtenido del análisis de 29 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua", provenientes del Banco de Germoplasma del INIA.	43
Figura 5. Diagrama en 2D de Coordenadas Principales de 29 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua".	44

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
ANEXO 1. Datos pasaporte de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua" INIA.	64
ANEXO 2. Flujograma extracción de ADN de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua".	66
ANEXO 3. Composición del Buffer de extracción CTAB 2X.	67
ANEXO 4. Composición del Buffer de extracción CTAB 10X.	68
ANEXO 5. Composición del Buffer TBE 10 X.	69
ANEXO 6. Componentes del Tampón T ₁₀ E ₁ .	70
ANEXO 7. Preparación del gel agarosa 1 %.	71
ANEXO 8. Equipo de electroforesis Electronyx Maxi Model EH20 (Nyxtechnik).	72
ANEXO 9. Termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler.	73
ANEXO 10. Cleaver Scientific, model CSQ20.	74
ANEXO 11. Preparación de la solución de poliacrilamida al 6%.	75
ANEXO 12. Protocolo de tinción de geles con nitrato de plata.	76
ANEXO 13. Matriz de Similitud de 29 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	77
ANEXO 14. Matriz de consistencia.	80

RESUMEN

Chenopodium quinoa Willd. "quinua", actualmente 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. Considerando la importancia de estudios de variabilidad de quinua en la región de Ayacucho mantenida en el Banco de Germoplasma del INIA-Ayacucho, se colectaron 29 accesiones, las cuales fueron caracterizadas a nivel molecular, en donde se desarrolló el análisis de la variabilidad genética de quinua utilizando marcadores moleculares AFLP. La calidad del ADN extraído mediante el protocolo Doyle y Doyle modificado, fue óptima para todas las muestras, obteniéndose concentraciones en un rango de 100 – 400 ng/μl. En la estandarización de la técnica AFLP se determinó que concentraciones entre 100 y 200 ng/μl de ADN digerido fueron adecuadas para continuar de manera eficiente la técnica de AFLP, además se determinó que los productos de preamplificación que mostraron perfiles de amplificados mucho más claros e intensos fueron las concentraciones 1:4. Un total de 7 combinaciones de primers generaron 220 bandas de ADN, siendo 201 *loci* polimórficos. Los datos moleculares agruparon las accesiones en siete grupos a una similitud de 0,81 unidades ultramétricas, de los cuales el Grupo I está constituido por 23 accesiones con 5 subgrupos a una similitud de 0,86 unidades ultramétricas, el primer subgrupo está conformado por una sola accesión, el segundo subgrupo lo conforman dos accesiones, el tercero lo integran 19 accesiones, el cuarto y quinto subgrupo lo constituyen solo una accesión cada uno. Los grupos II, III, IV, V, VI y VII están conformados cada uno por solo una accesión. Se encontró que la variancia genética promedio fue de $0,306 \pm 0,011$, con un índice de información de Shannon de $0,463 \pm 0,015$, estos resultados mostraron un alto grado de variabilidad genética en las accesiones de quinua por las combinaciones de iniciadores AFLP evaluadas.

Palabras Claves: *Chenopodium quinoa* Willd. , marcadores moleculares, AFLPs, variabilidad genética.

I. INTRODUCCIÓN

Chenopodium quinoa Willd., comúnmente conocida como quinua, es un cultivo que presenta importancia alimenticia por su alto valor nutricional, ya que contiene ácidos grasos insaturados (linoleico y oleico) y alto contenido de aminoácidos¹, siendo considerada como una de las principales fuentes de proteínas para la alimentación humana.

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, 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.² Además de su importancia tanto económica, social como cultural de la especie, se conserva y maneja con fines de investigaciones agronómicas el Banco de Germoplasma de *Chenopodium quinoa* Willd. en el Instituto Nacional de Innovación Agraria-Ayacucho.

Siendo de mucha importancia el conocimiento de la diversidad genética y el uso apropiado de la quinua, se hace necesaria la caracterización de los individuos que allí se mantienen. Las caracterizaciones y evaluaciones de las colecciones de quinua actualmente se realizan mediante metodologías complementarias basadas en marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares, con el fin de conocer la composición genética de este recurso.

Las técnicas moleculares han sido relevantes para el estudio de genomas vegetales, ofreciendo niveles de confiabilidad más elevados si se les compara con las que sólo se limitan a estudiar características morfológicas, anatómicas o ecofisiológicas.³

Considerando la importancia de estudios de variabilidad de quinua en la región de Ayacucho mantenida en el Banco de Germoplasma del INIA-Ayacucho y la

potencial pérdida de diversidad genética de quinua, se colectaron 29 accesiones del Banco de Germoplasma del INIA - Ayacucho, las cuales fueron caracterizadas a nivel molecular, desarrollándose el análisis de la variabilidad genética de quinua utilizando marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), lo que permitió contar con información valiosa para fortalecer la conservación y utilización de los recursos genéticos del cultivo de quinua, cuya importancia va creciendo progresivamente no solo para los pobladores andinos sino para el mundo.⁴

Teniendo en cuenta éstas consideraciones se planteó los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo General:

Determinar la variabilidad genética de accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA, mediante marcadores AFLP.

1.2. Objetivos Específicos:

- Estandarizar el protocolo de extracción de ADN en *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua".
- Estandarizar el protocolo de marcadores AFLP en *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua".
- Interpretar la variabilidad genética de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" mediante marcadores AFLP.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Nolasco *et al.*⁵, realizaron la evaluación del polimorfismo de ADN de seis variedades de quinua utilizando marcadores AFLP en combinaciones de cinco pares de iniciadores *EcoRI* y *MseI*. Resultando tres combinaciones de mayor polimorfismo E33/M60, E32/M48 y E32/M61, discriminando la variedad Mantaro como una variedad alejada de las variedades propias del sur del altiplano peruano - boliviano, de acuerdo al análisis promedio aritmético no ponderado por pares (UPGMA). Con los marcadores AFLP se obtuvo suficiente polimorfismo para diferenciar las variedades de quinua como en otras especies. Corroborando que los marcadores AFLP son adecuados para la evaluación de la diversidad genética por su alto grado de polimorfismo.

Tamayo⁶, empleó 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" para la caracterización intergenotípica y 5 individuos de cada accesión para la caracterización intragenotípica mediante marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). Un total de 10 iniciadores generaron 90 bandas polimórficas con un peso molecular promedio de 400 a 3500 pb. 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 4 accesiones y un alto nivel de variación intragenotípica en 3 accesiones. La técnica de ISSR probó ser un método eficiente para la caracterización inter e intra genotípica de las 16 accesiones de quinua.

Costa *et al.*⁷, realizaron la caracterización molecular de 51 poblaciones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" procedentes del germoplasma nativo de Argentina y de otros sitios de Sudamérica, mediante marcadores SSR

(Simple Sequence Repeats) y se determinaron las relaciones genéticas entre ellas. Se detectaron 283 alelos entre los 11 *loci* microsatélites analizados, con un contenido de información polimórfica (PIC) promedio de 0,88, y alta diversidad genética ($H_e = 0,355 \pm 0,034$). Los resultados obtenidos sugieren que la variabilidad genética entre las poblaciones locales es consecuencia de más de un proceso de ingreso de germoplasma procedente de regiones ecológicas diferentes.

Veramendi *et al.*⁴, realizaron la caracterización molecular de 2515 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" correspondientes al altiplano boliviano, valles del Perú, de materiales silvestres y otros países, utilizando ocho marcadores SSR, determinándose que estos microsatélites presentaban un alto nivel de polimorfismo, con valores de contenido de información polimórfica de 0,73 a 0,95. Se encontraron 129 alelos, con un rango de 5 a 30 alelos por *locus* y tamaño que va de 111 a 239 pb. Los resultados muestran una diversidad genética en general elevada para todas las regiones mencionadas, en orden descendente se ubicaron el altiplano centro, sur, valles y norte.

Jiménez⁸, analizó la diversidad genética de 28 variedades de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" mediante AFLP, utilizando para ello 8 combinaciones de iniciadores, donde el PIC calculado estuvo en un rango de 0,26 a 0,35. La combinación *EcoRI*-ACT + *MseI*-CAC mostró el valor PIC más alto (0,35), que permitió determinar el polimorfismo y diferenciación por este iniciador en las variedades utilizadas en el estudio. Además indica que esta combinación puede ser usada para futuras investigaciones indicando la mayor informatividad de este iniciador.

Anabalón y Thomet⁹, en su estudio "Análisis comparativo de la diversidad genética y morfológica entre las accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" del sur de Chile y las tierras altas", estudiaron el nivel de polimorfismo y la relación genética mediante marcadores moleculares utilizando la técnica AFLP y veinte caracteres morfológicos. Fueron analizados catorce accesiones de quinua recogidas en las regiones de Araucanía y Los Ríos, tres accesiones andinas, y un cultivar comercial, incluyendo dos padres silvestres como controles del exogrupo. Se realizó una similitud árbol-diagrama, sobre la base de todas las bandas AFLP generadas en el rango entre 70 y 300 pares de bases. Con estas herramientas, fue posible identificar las diferencias y similitudes moleculares que

podrían estar asociadas con importantes rasgos morfológicos como el color de grano, color de panícula, fenología y distribución geográfica.

2.2. CENTRO DE ORIGEN

La especie *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" ha sido descrita por primera vez en sus aspectos botánicos por Willdenow en 1778, como una especie nativa de Sudamérica¹⁰, cuyo centro de origen, según Buskasov¹¹ se encuentra en los Andes de Bolivia y Perú y que de ahí fue llevado hacia el norte hasta Colombia y hacia el sur de Chile.

Esto fue corroborado por Gandarillas *et al.*¹², quienes indican que su área de dispersión geográfica es bastante amplia abarcando desde el sur de Nudo de Pasco hasta el altiplano boliviano, no sólo por su importancia social y económica, sino porque se encuentra la mayor diversidad de ecotipos tanto cultivados técnicamente como en estado silvestre.

Heisser y Nelson¹³ indican hallazgos arqueológicos en Perú y Argentina alrededor del inicio de la era cristiana, mencionan también hallazgos de semillas de quinua en las tumbas indígenas de Tarapacá, Calama, Tiltel y Quillagua, demostrando este hecho que su cultivo es de tiempo muy remoto. Según Jacobsen¹⁴, la quinua es uno de los cultivos más antiguos de la región Andina, con aproximadamente 7000 años de cultivo, en cuya domesticación y conservación han participado grandes culturas como la Tiahuanacota y la Incaica.

2.3. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La quinua puede considerarse como una especie oligocéntrica, con centro de origen de amplia distribución y diversificación múltiple, considerándose las orillas del Lago Titicaca como la zona de mayor diversidad y variación genética.¹⁵

Según Lescano¹⁶, la quinua está distribuida en toda la región andina, desde Colombia (Pasto) hasta el norte de Argentina (Jujuy y Salta) y Chile (Antofagasta).

Según Rojas¹⁷ la distribución geográfica de la quinua en la región se extiende desde los 5° Latitud Norte al sur de Colombia, hasta los 43° Latitud Sur en la Décima Región de Chile, y su distribución altitudinal varía desde el nivel del mar en Chile hasta los 4000 msnm en el altiplano que comparten Perú y Bolivia, existiendo así, quinuas de costa, valles, valles interandinos, puna y altiplano.

2.4. TAXONOMÍA

Según Cronquist¹⁸, la quinua presenta la siguiente clasificación taxonómica:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Chenopodiaceae

Género *Chenopodium*

Sección: Chenopodia

Especie: *Chenopodium quinoa* Willd.

Nombres comunes

Español	:	"quinua", "quinoa", "quinqua", "kinoa", "trigo inca"
Quechua	:	"kiuna"
Aymara	:	"shupa", "jopa", "jupha", "jiura", "aara", "ccallapi"
Chibcha	:	"suba", "pasca"
Mapuche	:	"quinhuia", "quinua"
Azteca	:	"huatzontle"
Francés	:	"quinoa", "riz de peruo", "ansérine", "petit riz de Pérou"
Inglés	:	"petty rice", "inca rice", "peruvian rice"
Alemán	:	"reismelde", "inkaweizen", "peruanischer", "reis-gerwacks"
Italiano	:	"quinua", "chinua"
Portugués	:	"arroz miudo do Perú", "quinoa"

2.5. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es una planta herbácea de desarrollo anual, dicotiledónea, erguida de variada altura dependiendo del genotipo, de las condiciones ambientales donde crece y de la fertilidad de los suelos. El período vegetativo varía desde los 90 hasta los 240 días. La coloración varía según los genotipos y etapas fenológicas, desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillento, anaranjado y granate.¹⁹ Posee un sistema radicular pivotante, bastante ramificado y fibroso. Tiene un tallo erecto, cilíndrico en el cuello de la planta y anguloso a partir de las ramificaciones. Es de color verde (a veces con estrías o líneas rojas), rojo o amarillo. Las hojas son alternas, de longitud variable dentro de la misma planta, la lámina es polimorfa²⁰ y la morfometría es variable según el genotipo. La inflorescencia es una panoja de 15 a 70 cm de longitud con un eje principal del

cual se originan ejes secundarios y terciarios.²¹ Fueron descritos dos tipos de inflorescencia para quínoa: amarantiforme y glomerulada, dependiendo de la inserción del glómulo. Las flores son incompletas ya que carecen de pétalos; el glómulo puede presentar flores perfectas y pistiladas. La flor perfecta presenta un perigonio sepaloide, anteras y un ovario superior del cual emergen dos o tres estigmas.²² En general las flores perfectas están ubicadas en el extremo distal del glómulo sobresaliendo sobre las pistiladas, ubicadas en el extremo proximal.²³

El fruto es un aquenio, tiene forma elipsoidal o redonda de diferentes colores dado por el perigonio que lo recubre y que se desprende fácilmente cuando está seco. El pericarpio del fruto está pegado a la semilla (a veces se separa fácilmente) y es donde está presente la saponina, un antinutriente que le transfiere sabor amargo; la semilla está envuelta por el episperma en forma de una delgada membrana. El embrión está formado por un eje hipocotile-radícula y los cotiledones, que envuelven al perisperma como un anillo. El perisperma es almidonoso, generalmente de color blanco, y constituye la mayor parte de la semilla. Los diferentes colores del perigonio, pericarpio y episperma hacen que la inflorescencia de quínoa presente colores muy variados.²³

2.6. PRODUCCIÓN DEL CULTIVO

Según el reporte del Sistema Integrado de Estadística Agraria²⁴, el mes de diciembre del 2014 ha sido muy positivo para la producción de la quinua registrándose aproximadamente 6,900 toneladas, mayor en 279% que lo producido en el mismo mes del año 2013.

Con respecto a la producción anual el documento oficial menciona que durante el año 2014 se registraron 114,000 toneladas, cifra mayor en 61,000 toneladas en comparación al año 2013 en que se produjeron 52 mil toneladas. Las regiones de mayor contribución a dicho crecimiento en el 2014 fueron Arequipa, Junín, Puno y Ayacucho (este grupo explicó el 75% del aumento de la producción nacional de quinua). Asimismo es de destacar la importante dinámica productiva en las regiones de la Costa Norte, principalmente lo registrado en los departamentos de Lambayeque, La Libertad y Ancash, los cuales han logrado incrementar hasta en nueve veces el volumen producido.

Es importante destacar el buen comportamiento de las exportaciones de quinua, las cuales subieron en forma muy significativa, tanto en valor (152%) como en

cantidad exportada (98%), y que permitieron posicionar a la quinua como el quinto producto bandera de nuestra canasta de agroexportación y el cuarto entre los productos agrarios no tradicionales.²⁴

En cuanto a las exportaciones, en el 2014 Perú superó a Bolivia y se convirtió en el primer productor y exportador mundial de quinua al lograr 104,000 toneladas. El valor de la exportación de quinua peruana creció seis veces más en los últimos dos años. En 2012 los envíos de este alimento alcanzaron valores por US\$31 millones, mientras que en 2013 y 2014 sumaron US\$79 y US\$196 millones, respectivamente. Esto representa un crecimiento de 148% al año pasado. Junto con el incremento de la demanda y la oferta de quinua, el interés por el producto ha generado que el precio del grano andino aumente en promedio un 50% en los últimos dos años. Por este resultado, en 2014 la quinua ocupó el cuarto puesto de las exportaciones agropecuarias, antecedido por otros productos como las uvas frescas, espárragos y las paltas, y desplazando al cacao, mango y la leche evaporada.²⁴

2.7. IMPORTANCIA DE LA QUINUA

El valor nutritivo de la quinua es excepcional debido a que tiene un excelente balance de carbohidratos, grasas y proteínas para la alimentación humana.

La cantidad de proteínas y la calidad son especialmente importantes. El contenido de proteína de las semillas de quinua varía entre 14 y 22%, siendo significativamente mayor que la de cereales. Sin embargo, la ventaja nutricional más importante de la quinua es la composición de aminoácidos esenciales, los cuales están muy cerca de los recomendados por la FAO/OMS/UNU para todos los grupos de edad.²⁵

En la Tabla 1 se presenta la relación de aminoácidos de la quinua, comparadas con la de la cañihua, cereales, frejol y algunos alimentos de origen animal y la proteína patrón. Se puede apreciar la superioridad de la quinua sobre los cereales, especialmente en el contenido de lisina. La lisina es uno de los aminoácidos más escasos en los alimentos de origen vegetal y su proporción en la quinua casi duplica la contenida en los cereales.²⁵

Con respecto al contenido de carbohidratos y las kilocalorías de la quinua, éstos aportan un nivel de calorías similares a la de los cereales y leguminosas.²⁵

La composición del aceite de quinua es similar al de la soya y constituye una fuente importante de los ácidos grasos esenciales linoleico y linolénico.²⁵

Tabla 1. Comparación del contenido de aminoácidos esenciales en granos de quinua, cañihua, cereales, frejol, carne, pescado, leche y la proteína patrón.

Aminoácido	Quinua (a)	Cañihua (a)	Arroz (b)	Cebada (c)	Maíz (d)	Trigo (d)	Frejol (e)	Carne (f)	Pescado (f)	Leche (f)	Patrón FAO (g)
Arginina	8,1	8,3	6,9	4,8	4,2	4,5	6,2	6,4	5,6	3,7	
Fenilalanina	3,7	3,7	5,09	5,2	4,7	4,8	5,4	4,1	3,7	1,4	6,0
Histidina	2,7	2,7	2,1	2,2	2,6	2,0	3,1	3,5		2,7	
Isoleucina	3,4	3,4	4,1	3,8	4,0	4,2	4,5	5,2	5,1	10,0	4,0
Leucina	6,1	6,1	8,2	7,0	12,5	6,8	8,1	8,2	7,5	6,5	7,0
Lisina	5,6	5,3	3,8	3,6	2,9	2,6	7,0	8,7	8,8	7,9	5,5
Metionina	3,1	3	2,2	1,7	2,0	1,4	1,2	2,5	2,9	2,5	3,5
Treonina	3,4	3,3	3,8	3,5	3,8	2,8	3,9	4,4	4,3	4,7	4,0
Triptófano	1,1	0,9	1,1	1,4	0,7	1,2	1,1	1,2	1,0	1,4	1,0
Valina	4,2	4,2	6,1	5,5	5,0	4,4	5,0	5,5	5,0	7,0	5,0

Fuente: Promedios de datos presentados por: (a) Repo-Carrasco²⁶, Mahoney et al.²⁷, Marroquin²⁸, Risi y Galwey²¹ y Romero²⁹. (b) Lásztity³⁰ y Romero²⁹; (c) Lásztity³⁰ y Risi y Galwey²¹; (d) Lásztity³⁰, Risi y Galwey²¹ y Romero²⁹; (e) Sosulski³¹; (f) Romero²⁹; (g) Mahoney et al.³² y Romero²⁹.

Así también la quinua es una buena fuente de riboflavina y alfatocoferol y carotenos comparados con los cereales, el frejol y la papa. Es una fuente importante de minerales superando a los cereales y al frejol en contenido de Ca, Fe, Mg, Cu y Mn. Destaca su contenido de hierro que es equivalente al doble de la cebada y el trigo, tres veces mayor que el del arroz y casi seis veces a la del maíz.²⁵

2.8. VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA QUINUA

Entre los cultivos andinos, la quinua recibió la mayor dedicación y apoyo principalmente en Ecuador, Perú y Bolivia; de ahí que en estos países se tienen los trabajos más adelantados y además es donde se encuentra la mayor variabilidad. Las evaluaciones de la variabilidad genética disponible, permitió agrupar a las quinuas en 5 grupos mayores según sus características de

adaptación y algunas morfológicas de alta heredabilidad, fácilmente detectables y capaces de mantenerse en toda el área de difusión.³³

A continuación se describen los cinco grupos de quinua de acuerdo a Lescano³³ y Tapia³⁴:

a. Quinuas del nivel del mar: Se han encontrado en las zonas de Linares y Concepción (Chile) a 36° Latitud Sur. Son plantas más o menos robustas, de 1,0 a 1,4 m de altura, de crecimiento ramificado, producen granos de color crema transparente (tipo Chullpi). Estas quinuas guardan gran similitud con la *Chenopodium nutfalliae* "huahzontle" que se cultiva en forma aislada en México a 20° Latitud Norte.

b. Quinuas de valles interandinos: Son las que se adaptan entre los 2500 a 3500 msnm, se caracterizan por su alto desarrollo, hasta 2,5 m o más de altura y con muchas ramificaciones, con inflorescencia laxa y que normalmente presentan resistencia a *Peronospora farinosa* "mildiu". Existen diferencias entre aquellas que se desarrollan en valles con acceso al riego, como ocurre en Urubamba (Perú), Cochabamba (Bolivia) y aquellas que se cultivan a secano como Huaraz, parte alta del Valle de Mantaro, Ayacucho y Abancay. Se cultivan normalmente en forma intercalada con maíz y en forma de cultivo de borde con otras especies o en forma dispersa en el mismo campo.

c. Quinuas del altiplano: Se desarrollan en áreas mayores como cultivos puros o únicos y entre los 3600 a 3800 msnm, corresponde a la zona del altiplano peruano-boliviano; en esta área se encuentran la mayor variabilidad de caracteres y se producen los más especializados en su uso. Las plantas crecen con alturas entre 0,5 a 1,5 m, con un tallo que termina en una panoja principal y por lo general compacta. En este grupo, es donde se encuentra el mayor número de variedades mejoradas y también los materiales susceptibles al mildiu cuando son llevados a zonas más húmedas.

d. Quinuas de salares: Son las que crecen en las zonas de los salares al sur del altiplano boliviano, ésta es la más seca con 300 mm de precipitación, se cultiva como cultivos únicos a distancias de 1 m x 1 m y en hoyos para aprovechar mejor la escasa humedad. Son quinuas de tallo principal muy robusto, algunas de tallo único, otras con ramificaciones, corresponden además a las quinuas de mayor tamaño de grano (2,2 mm de diámetro), se las conoce como "Quinua Real" y sus granos se caracterizan por presentar un pericarpio grueso y con alto contenido de saponina.

e. Quinuas de los Yungas: Es un grupo reducido de quinuas que se han adaptado a las condiciones de los Yungas de Bolivia a alturas entre los 1500 y 2000 msnm, y se caracterizan por ser de desarrollo algo ramificado, alcanzan alturas de hasta 2,20 m; son plantas verdes, y cuando están en floración toda la planta íntegra, toma la coloración anaranjada. Existe una sola colección efectuada en Bolivia y las 18 muestras crecieron adecuadamente en Cusco a 3300 m.

Según Mújica¹⁵, las quinuas cultivadas tienen una gran diversidad genética, mostrando variabilidad en la coloración de la planta, inflorescencia y semilla, en los tipos de inflorescencia, en el contenido de proteína, saponina y betacianina en las hojas, con lo que se obtiene una amplia adaptación a diferentes condiciones agroecológicas (suelos, precipitación, temperatura, altitud, resistencia a heladas, sequía, salinidad o acidez).

2.9. REPRODUCCIÓN DEL CULTIVO

Según Lescano¹⁶, la quinua normalmente se reproduce por la vía sexual, es decir, mediante semilla botánica, aunque la propagación asexual no está 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.

Con respecto a la forma de fecundación en la quinua, Wilson³⁵ menciona que *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua", la *Chenopodium pallidicaule* Aellen "kañihua" y *Ch. berlandieri ssp. nuttalliae* Safford "huauzontle" son especies autógamias.

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. Lescano¹⁶ 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 autógena con fecundación cruzada frecuente; por tanto, en el mejoramiento genético de la quinua se han aplicado preferentemente los métodos recomendados para autógenas y especialmente aquellos aplicados en el sorgo y arroz.¹⁶

2.10. GENÉTICA DE LA QUINUA

El número de cromosomas de la especie es $2n = 4x = 36$. Siendo el número básico de cromosomas para el género *Chenopodium* $x = 9$.³⁶ Como la quinua es una especie 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 expresar dominancia o pueden ser aditivos. 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 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.³⁷

2.11. GERMOPLASMA VEGETAL

El germoplasma en general es el material donde se encuentra un principio que puede crecer y desarrollarse. El germoplasma de un cultivo, incluye a cultivares nativos, cultivares mejorados, poblaciones en proceso de mejoramiento, especies silvestres relacionadas y especies cultivadas relacionadas. El germoplasma es parte de los recursos genéticos, el cual se refiere a la variabilidad genética almacenada en los cromosomas y en otras estructuras que contienen ADN.³⁸

Se colecta germoplasma para conservarlo y evaluarlo, evitando de esta manera que desaparezcan ciertos clones o variedades, permiten también ampliar la base

genética del cultivo, y realizar estudios de mejoramiento genético y de evolución de estos cultivos. Cada muestra de la colección se denomina *accesión* y la información mínima que se debe obtener de cada una de ellas son los datos de *pasaporte* tomados durante su colecta, como son nombre del colector, número de muestra, fecha, género, especie, localidad, latitud, categoría de la muestra, fuente de la muestra, partes de la planta utilizada, usos de la planta, tipo de muestra, entre otros.³⁸

2.12. DIVERSIDAD Y VARIABILIDAD GENÉTICA

La variación entre poblaciones de una especie más la variación dentro de poblaciones es la *diversidad genética total* de una especie. Los individuos de una especie difieren entre sí en muchas características que tienen causas genéticas y ambientales. El conocimiento de la base genética de las diferencias es indispensable para entender la *diversidad genética*, prerrequisito para coleccionarla, conservarla, caracterizarla y utilizarla. Es mucho más difícil estimar la diversidad de una especie que la *variabilidad* de características específicas dentro de variedades o poblaciones. No es posible estimar la *diversidad genética* en términos estadísticos o cuantitativos y en general lo que se hace es clasificar la especie en categorías *intraespecíficas* como razas, *ecotipos*, *morfotipos* y variedades; la *diversidad genética relativa* de una especie en una región se da en términos del número de categorías *intraespecíficas*.³⁹

La *variabilidad genética* es característica de poblaciones dentro de una especie. Las especies pueden ser más o menos diversas; las características dentro de las poblaciones pueden ser más o menos variables. La *variabilidad* se aplica a las características; por ejemplo, la *variancia genética* de un *ecotipo* de *camu-camu* para el contenido de ácido ascórbico del fruto, puede ser cuantificada en términos de *variancia genética aditiva* y no aditiva. Si no hay *variancia genética* para una característica dentro de una población, el carácter no puede ser modificado por selección y si un cambio en el ambiente o en las condiciones de vida afecta a esa característica, puede desaparecer toda la población.³⁹

Toda la *variabilidad genética* de una especie se origina por *mutación*. En su concepto más simple, la *mutación* se produce por un cambio en un *nucleótido* en el sector de la cadena de ADN que codifica a un gen. En los primeros años del desarrollo de la ciencia de la genética se creía que había solo dos *alelos* por *locus*. Cada vez que un gen se estudiaba con más detalle, se encontraban más

de dos alelos lo que permite generalizar que los alelos múltiples son comunes en la naturaleza. El polimorfismo derivado de la interacción de alelos de un mismo gen es la base de muchos métodos para estimar la variabilidad genética.³⁹

2.13. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

La caracterización es el acto de determinar los atributos peculiares de alguien o de algo, de modo que claramente se distinga de los demás. Para este estudio el carácter es cualquier propiedad o atributo que varía en la Unidad Taxonómica Operativa (OTU) en estudio y los posibles valores que ése carácter pueda presentar se les considera sus estados.⁴⁰

En la Genética Molecular los caracteres o atributos están relacionados a puntos de referencia en los cromosomas y técnicamente son denominados marcadores moleculares, con los que se pueden estimar la variabilidad genética y otros parámetros poblacionales; además de hallar el grado de diversidad genética de una especie.⁴⁰

2.14. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El aislamiento o purificación de ADN es el primer paso a desarrollar en muchos de los estudios y técnicas de biología molecular, por lo tanto el método de extracción que ha de emplearse debe ser el más apropiado para el laboratorio. Rocha⁴¹ menciona que para la extracción del ADN vegetal es necesario tener en cuenta lo siguiente:

- a. El tipo de planta y de tejido que se va a emplear como fuente. Por ejemplo, los tejidos jóvenes contienen más ADN que los tejidos viejos. Además, es necesario considerar la composición bioquímica de los tejidos. Por ejemplo, el método de extracción del material genético proveniente de tejidos ricos en compuestos fenólicos es diferente al método empleado con tejidos ricos en carbohidratos o aceites.
- b. El tipo de ADN que se va a extraer. Las plantas poseen tres tipos de ADN: el nuclear, el mitocondrial y el cloroplástico. Los distintos tipos de ADN tienen características bioquímicas semejantes. Sin embargo, el tipo de información biológica que codifican es completamente diferente.
- c. El tipo de análisis a realizar. Con base en la cantidad y la calidad del ADN se pueden desarrollar diversas técnicas de análisis, tales como: RFLP (Restriction

Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP, secuenciación, etc.

El objetivo principal de un procedimiento de extracción es obtener un ADN de buena calidad y cantidad. La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN por tiempo indefinido, manteniendo su estructura y propiedades; por lo que es la calidad del ADN el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores. La cantidad, por su parte, es un concepto relativo que depende, entre otros, del número y estado de las células propias del tejido a estudiar. Por lo tanto, como regla general, un buen método de extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración.⁴¹

En plantas existen múltiples protocolos para extraer y purificar el ADN genómico; sin embargo, según Rocha⁴¹ todos los procedimientos incluyen los siguientes pasos:

- a. Ruptura de tejidos y paredes celulares. Este paso consiste en pulverizar el material vegetal a bajas temperaturas, generalmente empleando nitrógeno líquido o hielo seco.⁴² También existe la pulverización en seco, un proceso en el cual los tejidos se deshidratan por secado en un horno o con silicagel. Además también se pueden hacer trituraciones mecánicas sin nitrógeno líquido.
- b. Ruptura de la membrana celular y nuclear para liberar el ADN hacia el buffer de extracción. Una vez que el tejido es disgregado en células, se hace necesario romper las membranas celulares para liberar el ADN. Esto puede ser llevado a cabo químicamente con detergentes; por ejemplo: SDS (dodecilsulfato sódico), Triton X-100, CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) o detergentes comerciales.
- c. Inhibición de enzimas que destruyen el ADN. Como un mecanismo de defensa natural, las células contienen enzimas que destruyen el ADN (ADNasas). Estas enzimas deben ser inactivadas para garantizar la calidad de las preparaciones de ADN. La inhibición puede realizarse mediante métodos físicos, tales como desnaturalización por calor (temperaturas de 65 °C) o con métodos químicos. Estos últimos incluyen tratamiento con solventes orgánicos (fenol y cloroformo), con antioxidantes (Ditiothreitol y β -mercaptoetanol), con agentes quelantes como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) que captura los iones magnesio necesarios para la funcionalidad de las ADNasas, o con agentes caotrópicos que actúan removiendo el agua estructural de las proteínas.⁴² Por lo general se

utilizan mezclas de varios de estos reactivos para asegurar la inhibición de tales enzimas.

d. Extracción de contaminantes. El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones enriquecidas en esta molécula. Sin embargo, el ADN está asociado con proteínas (histonas) e inmerso en un medio que contiene estructuras de composición química diversa. Además, los reactivos empleados en los procesos iniciales de purificación se convierten en agentes contaminantes, como se observan en el Tabla 2.

Las metodologías para retirar los contaminantes de una preparación de ADN incluyen: la centrifugación a altas velocidades, la electroforesis, la separación a través de columnas e incluso la utilización de imanes (biomagnética) para obtener preparaciones de alta pureza.

El ADN aparte de ser una molécula de alto peso molecular, muy larga y delicada, es un ácido capaz de formar sales con iones cargados positivamente (cationes). Además, es soluble en soluciones concentradas de sales (cloruro de sodio, por ejemplo), pero insoluble en alcoholes (tipo etanol o isopropanol). Adicionalmente, el ADN es destruido (depurinado) a pH ácido (menor de 4,0), es insoluble a pH 5,6 pero es soluble a pH 8,0. Por lo tanto, los procesos de extracción, purificación y almacenamiento del ADN deben mantener el pH óptimo y brindar una alta concentración iónica.⁴¹

2.15. MARCADOR MOLECULAR

Un marcador molecular es cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen o de segmentos específicos de ADN, 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.⁴³

Los marcadores basados en ADN son altamente polimórficos y varios de ellos proveen el marcador genético ideal porque la variación de la secuencia de nucleótidos es selectivamente neutra, y se pueden minimizar ciertas complicaciones que reducen la heredabilidad en el análisis de proteínas, tales como mutaciones indetectables y modificaciones postraduccionales. Además estos marcadores, debido a que evalúan cambios directos a nivel de ADN, tienen la ventaja de no ser afectados por el medio ambiente donde se desarrolla el organismo en estudio y no dependen del estado fisiológico o de desarrollo del

individuo. Estos marcadores se pueden agrupar de manera convencional en dos categorías: 1) hibridación de cadenas complementarias de ADN, tales como los RFLP y, 2) basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁴⁴ Algunos ejemplos de marcadores de ADN son: RFLP, RAPD, AFLP, SSR y microarreglos.⁴⁵

Tabla 2. Agentes contaminantes en preparaciones de ADN y alternativas para su extracción.

Contaminante	Tratamiento
Polisacáridos	Uso de detergentes (CTAB).
Lípidos y grasas	Incubación enzimática (con lipasas).
	Uso de detergentes (SDS, Triton).
	Tratamiento con cloroformo/alcohol isoamílico.
Proteínas	Incubación enzimática (con proteasas).
	Extracción con fenol y cloroformo.
	Uso de detergentes.
Pigmentos	Uso de alcoholes.
ARN	Incubación enzimática (con ARNasa).
	Electroforesis.
	Cambios en el pH.
Alcoholes	Evaporación a temperatura ambiente.
Compuestos fenólicos	Tratamiento con cloroformo y alcoholes.
Detergentes	Uso de solventes orgánicos.
Sales	Uso de etanol al 70 por ciento.
Sólidos insolubles	Uso de soluciones acuosas con posterior centrifugación.

Fuente: Rocha⁴¹

El desarrollo de la biología molecular ha permitido obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada, debido a que el factor de error generado por el ambiente no existe ya que la información está tomada directamente del genoma de las plantas. Además, se reconocen las diferencias

genéticas entre individuos, al obtener un “perfil molecular” característico para cada variedad e independiente de las condiciones de crecimiento de las plantas. Una ventaja adicional es la posibilidad de analizar *loci* únicos (regiones únicas en el genoma) o *loci* múltiples (regiones repetidas a través del genoma).^{46,43}

Por tanto estos marcadores moleculares son usados para determinar la identidad de las accesiones y los cambios genéticos que pueden ocurrir durante la conservación y regeneración de las especies; permitiendo asegurar la representatividad y el tamaño de la muestra, detectando duplicados y vacíos en los bancos de germoplasma, manteniendo la identidad de las colecciones durante la regeneración. También permiten determinar el grado de similitud entre individuos de una accesión o entre accesiones dentro de una colección definiendo la estructura genética y la variación de individuos, accesiones, poblaciones o especies, lo que lleva a la formación de las colecciones núcleo.⁴⁷

Ambos, tanto las caracterizaciones morfológicas y los marcadores moleculares ofrecen información complementaria, lo cual es importante para obtener una mejor descripción e interpretación de la diversidad genética de los individuos.⁴⁸

Las características que debe poseer un buen marcador molecular, según Ferreira y Grattapaglia⁴³ son:

- Polimórfico: debe ser variable entre los individuos.
- Discriminante: permite diferenciar individuos aún 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

2.15.1. VENTAJAS DE LOS MARCADORES MOLECULARES SOBRE LOS MARCADORES MORFOLÓGICOS

Entre las principales ventajas de los marcadores moleculares descritos por Ferreira y Grattapaglia⁴³ 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.

2.16. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) fue concebida por Kary Mullis a mediados de la década del 80.⁴⁹ La PCR es una técnica que comprende la síntesis enzimática *in vivo* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa. La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos utilizados como iniciadores que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena que es blanco de la amplificación. Estos iniciadores son sintetizados artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos sean complementarias a las secuencias específicas que flanquean la región blanco.⁴³

Muchos métodos tradicionales de clonación, secuenciación y análisis de polimorfismos de ADN fueron acelerados o sustituidos por el uso de numerosas

derivaciones de la técnica de PCR.⁴³ La introducción de esta tecnología permitió nuevas posibilidades para la detección del polimorfismo genético que se observa debido a que la variación en la secuencia del genoma altera los sitios de reconocimiento del iniciador.⁵⁰

Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, 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 °C a 95 °C. En la segunda etapa, la temperatura es rápidamente reducida entre 35 °C y 60 °C, dependiendo esencialmente del tamaño y la secuencia del iniciador utilizado, permite la hibridación ADN-ADN de cada iniciador 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 iniciadores mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde secuencia-blanco. Este ciclo se repite algunas decenas de veces. 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.⁴³

Las técnicas basadas en la PCR permiten la generación de grandes números de marcadores, su utilización no es técnicamente difícil y solo utiliza mínimas cantidades de material genético. Estas técnicas difieren entre sí en la longitud y secuencia de los iniciadores empleados, condiciones de la PCR y en el método de separación y detección de los fragmentos. Los marcadores de PCR emplean iniciadores de secuencia arbitraria, semiarbitraria o específico.⁵¹ Las técnicas más usadas en las que se utiliza la amplificación de ADN son: RAPD, SSR, ISSR y AFLP.

2.17. POLIMORFISMO DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

El análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) es la tecnología que permite la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariontes y eucariontes.⁴³

El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de

información previa del genoma a estudiar. Desde su desarrollo y divulgación esta técnica se utiliza ampliamente en el análisis de plantas.⁵²

Al igual que las otras técnicas de marcadores, la técnica de AFLP inicia con el aislamiento del ADN genómico y su restricción completa con dos endonucleasas distintas. Una de ellas, *EcoRI*, es una enzima que reconoce 6 pares de bases y corta dentro de ellas, la otra es *MseI*, que reconoce y corta dentro de una secuencia de 4 pares de bases. La primera enzima corta por ejemplo, al ADN de *Arabidopsis* cada 2 a 2,5 kb, mientras que *MseI* lo hace cada 0,3 a 0,4 kb. A través de la acción combinada de ambas endonucleasas, se genera un gran número de fragmentos cuyas frecuencias son en número descendente: *MseI* – *MseI*>>>*MseI-EcoRI*>>>*EcoRI-EcoRI*. La técnica de AFLP selecciona únicamente a los fragmentos *MseI-EcoRI*. La restricción es seguida por la ligación de un adaptador específico de doble cadena de 25 a 30 pares de bases a cada lado del fragmento de restricción, dichos adaptadores presentan una pequeña cola 5'. Las secuencias de los adaptadores son reconocidas por iniciadores específicos y complementarios que se unen para dar inicio a la primera amplificación. Sin embargo, si todos los fragmentos de restricción *MseI-EcoRI* se amplificaran, el número de productos podría ser muy grande y los amplicones analizados serían muy complejos. Por lo que, solo una parte de los fragmentos *MseI-EcoRI* se amplifican selectivamente en la primera etapa de la reacción (amplificación preselectiva). Esta amplificación, se lleva a cabo con el uso de iniciadores que contienen una base extra en el extremo 3'; resultando un conjunto de fragmentos que además de llevar la secuencia complementaria al iniciador, complementan a la base extra adicionada. Posteriormente estos productos amplificados, sirven para hacer una segunda selección, que es más rigurosa, en donde se consideran iniciadores con dos o tres bases extras. Los fragmentos resultantes son complementarios, además del iniciador, a las extensiones consideradas, razón por la cual sólo una porción del genoma fragmentado es amplificado finalmente. Normalmente uno de los dos iniciadores de AFLP se marca radiactivamente y los fragmentos amplificados pueden ser detectados después de su separación en geles de secuenciación de alta resolución con autorradiografía.⁴⁴

El polimorfismo detectado mediante AFLPs puede resultar de varios tipos de cambios: (1) Mutaciones en los sitios de restricción o en la secuencia complementaria a los nucleótidos selectivos de los iniciadores; y (2) Inserciones

o deleciones dentro de los fragmentos de restricción, lo cual se ponen de manifiesto por la presencia de bandas de diferentes tamaños.⁵³

Las ventajas más importantes de esta técnica son:

- La ventaja que más destaca esta tecnología de las demás es indiscutiblemente el gran número de fragmentos que se originan y revelan en un único gel. La tecnología de AFLP es, por lo tanto, muy eficiente para el muestreo amplio y simultaneo de un genoma.⁴³ En general, en cada amplificación se obtienen entre 50-100 fragmentos por muestra.
- La tecnología AFLP presenta un gran poder de detección de variabilidad genética. Ya que explora simultáneamente el polimorfismo de presencia y ausencia de sitios de restricción, como el ensayo de RFLP y la existencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias, tal como el ensayo RAPD. Con lo que se consigue una flexibilidad significativa en la obtención de marcadores polimórficos.
- No se requiere un conocimiento previo de la secuencia de ADN.
- Las regiones que se analizan se encuentran distribuidas por todo el genoma.
- Los marcadores AFLPs presentan mayor robustez comparado al ensayo RAPD. Esto se debe básicamente a que se utilizan iniciadores más largos en la etapa de PCR, lo que aumenta significativamente la especificidad de la amplificación, evitando la competición que ocurre durante la PCR en el ensayo RAPD. Por lo tanto la reproducibilidad es alta.

Entre los inconvenientes hay que señalar los siguientes:

- La principal limitación de los marcadores AFLPs es el bajo contenido de información genética por *locus*. Los marcadores AFLPs son, por tanto, marcadores dominantes y los datos tienen naturaleza binaria. Los genomas heterocigotos no pueden discriminarse directamente de los homocigotos.⁴³ Aunque actualmente se han desarrollado softwares que permiten diferenciar heterocigotos y homocigotos dominantes en función de la intensidad de bandas, su elevado costo hace que se haya difundido poco.⁵³
- Se necesita ADN de buena calidad y en cantidades entre 0,3 y 1,0 µg por reacción.⁵² Se necesita un alto nivel de pureza para garantizar la

digestión completa por las enzimas de restricción en todas las muestras, también la digestión parcial o la mala calidad del ADN puede fácilmente llevar a interpretaciones erróneas del polimorfismo.⁴³

- El elevado coste tanto en fungible como en infraestructura.
- La incertidumbre acerca de la homología de los fragmentos amplificados de igual peso molecular.

2.18. 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 continuación⁵⁴:

- 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 OTUs
- 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.

2.18.1. 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.⁵⁴

Estos miden las coincidencias y diferencias en los estados de los caracteres entre dos OTUs. Las medidas de similitud presentan un valor máximo para dos objetos idénticos y mínimo para dos objetos totalmente diferentes.⁵⁵

Los coeficientes de similaridad según, Everitt⁵⁶ y Sneath y Sokal⁴⁰ son de tres tipos: Coeficiente de Dice, Coeficiente de Concordancia Simple y Coeficiente de Jaccard.

Luego de calculadas las asociaciones de todos los pares posibles de OTUs con el coeficiente de similitud, estos resultados son ordenados en forma tabular para constituir la matriz de similitud. Las OTUs ocuparán tanto las filas como las columnas, siguiendo el mismo orden en ambas, de esta manera se logra comparar cada OTU consigo misma y con las restantes OTUs. Así estructurada la matriz cada valor diagonal principal ($S_{11}, S_{22}, S_{33}, \dots, S_{tt}$), como se observan en el Anexo 13, representa a cada OTU comparada consigo misma, este valor corresponde al de máxima similitud, que es 1.⁵⁴

2.18.2. 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.⁵⁴

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 más utilizada es la media aritmética no ponderada UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average).⁵⁴

La estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente de varias formas, siendo la más utilizada el dendograma, que es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTUs o grupo de OTUs.⁵⁴

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga.

3.2. COLECCIÓN DE MUESTRA

La colección de las muestras se realizó en la Estación Experimental Agraria Canaán - Ayacucho (INIA), las diferentes accesiones corresponden al Banco de Germoplasma de esta institución, cuyos datos pasaporte se detallan en el Anexo 1.

Se colectaron hojas de 3 semanas de 29 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Una vez colectadas las hojas, fueron empaquetadas en papel húmedo debidamente rotuladas, para luego ser transportadas al laboratorio de Biotecnología de la UNSCH para realizar la extracción de ADN y posterior análisis de AFLPs en quinua.

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN

El procedimiento de extracción de ADN se realizó usando el método CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio) establecido por Doyle & Doyle⁵⁷ modificado por el CIP.⁵⁸ Este protocolo fue estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología de la UNSCH (Flujograma Anexo 2). La extracción de ADN consistió en los pasos siguientes:

1. Se procedió a obtener aproximadamente entre 2 a 3 hojas en buen estado y se trituró utilizando 700 µl de buffer CTAB 2X- 2 µl mercaptoetanol. Luego, el material triturado fue transferido a un tubo eppendorf. Se homogenizaron

- las muestras por inversión y se colocaron a 60 - 65 °C en baño maría por 45 minutos, mezclando ocasionalmente cada 15 minutos.
2. Seguidamente a cada tubo se le agregó 700 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) se mezclaron por inversión para luego ser centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm. Finalizada la centrifugación se apreció la formación de dos fases.
 3. El sobrenadante fue removido a un tubo eppendorf estéril. Luego se añadió 50 µl de CTAB 10 % - NaCl 7M, se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C por 15 minutos. Al mismo tubo Eppendorf se añadió 700 µl cloroformo - alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló hasta lograr una disolución total, para centrifugarlo por 10 minutos a 14000 rpm.
 4. Se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos y se agregó 200 µl NaCl 5 N, el tubo fue agitado suavemente, y se añadió 500 µl cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) luego se mezcló y centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm.
 5. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo al cual se le agregó 500 µl de isopropanol frío, mezclándolo suavemente hasta que se observó la formación de la medusa de ADN. Se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm apreciándose la formación del pellet de ADN.
 6. El sobrenadante fue descartado y el pellet de ADN obtenido fue lavado dos veces con 700 µl de etanol al 70% y centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm. Y una tercera vez con etanol al 90% y centrifugado por 10 minutos a 10000 rpm. Finalmente se descartó el etanol y se invirtieron los tubos abiertos para secar el pellet de ADN a temperatura ambiente durante toda la noche.
 7. Para diluir el ADN se resuspendió el pellet en 60 - 80 µl de buffer T₁₀E₁ (Tris-HCl 10 mM/EDTA 1mM), se trató con 2 µl de RNAsa y se incubó a 37 °C durante 3 horas. Las muestras se almacenaron a -20°C.

3.4. CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

La calidad y cuantificación del ADN genómico se determinaron en geles de agarosa al 1%. Para ello, se tomó 1 µl del stock de ADN extraído y 9 µl de tampón de corrida 1X, y la mezcla fue colocada en gel que previamente se trató con bromuro de etidio, la preparación del gel se detalla en el Anexo 7. También se cargaron 6 µl del marcador de tamaño molecular λ ADN digerido con *Pst* I (genbiotech) representando la primera banda 280 ng/µl que representa 14000

pb. Se realizó la corrida electroforética con el equipo horizontal Electronyx Maxi Model EH20, Nyxtechnik (Anexo 8), a una carga de 90 voltios durante 60 minutos, usando como tampón de carga TBE 1X. La cuantificación se realizó comparando la intensidad de fluorescencia del ADN de cada muestra con la intensidad fluorescente del marcador λ ADN, lo cual permitió estimar la concentración de ADN de las muestras.

3.5. ANÁLISIS DE AFLP

El análisis de AFLP, se realizó según el procedimiento descrito por Vos *et al.*⁴⁶ en el manual del Kit AFLP de Invitrogen⁵⁹, adaptado por el CIP⁵⁸ con algunas modificaciones.

3.5.1. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO

El ADN extraído de las muestras de accesiones de quinua se llevó a una concentración final de 50, 100, 200, 300 y 400 ng/ μ l para la estandarización de la técnica, las cuales fueron digeridos con dos enzimas de restricción, una de corte raro *EcoRI* (reconoce una secuencia de restricción de 6 pb) y otra de corte frecuente *MseI* (reconoce una secuencia de restricción de 4 pb). Se preparó una mezcla de reacción conteniendo H₂O libre de nucleasas (9,5 μ l), *MseI* NEB 5U (0,5 μ l), *EcoRI* NEB 10 U (1 μ l), buffer 10X (2,0 μ l), BSA 1mg/ml (2,0) y ADN (5 μ l) obteniéndose un volumen de 20 μ l, luego esta mezcla de reacción de digestión fue incubada a 37 °C hasta el día siguiente. Finalizado el proceso de digestión del ADN de las muestras de quinua, se conservaron a -20 °C.

Se verificó la digestión del ADN genómico, realizando electroforesis de 5 μ l de muestra de ADN digerido en geles de agarosa 1%, en el cual se visualizó un barrido de ADN muy tenue en el transiluminador UV.

3.5.2. LIGACIÓN DE ADAPTADORES

3.5.2.1. PREPARACIÓN DE ADAPTADORES

a. Preparación de adaptador *EcoRI*:

Se mezcló 10 μ l de la cadena *EcoRI* adapter1 y 10 μ l de la cadena de *EcoRI* adapter2, y se adicionó agua hasta un volumen final de 100 μ l. Los adaptadores *EcoRI* se prepararon bajo condiciones de PCR. La concentración del adaptador

EcoRI fue de 10 µM. A continuación se muestra la secuencia de las cadenas *EcoRI* adapter1 y *EcoRI* adapter2:

EcoRI adapter1 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'

EcoRI adapter2 5'-AATTGGTACGCAGTC-3'

b. Preparación de adaptador *MseI*:

Se mezcló 33,3 µl de la cadena *MseI* adapter1 y 33,3 µl de la cadena de *MseI* adapter2, y se adicionó agua hasta un volumen final de 100 µl. Los adaptadores *MseI* se prepararon bajo condiciones de PCR. La concentración del adaptador *MseI* fue de 100 µM.

A continuación se muestra la secuencia de las cadenas *MseI* adapter1 y *MseI* adapter2:

MseI adapter1 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

MseI adapter2 5'-TACTCAGGACTCATC-3'

Las condiciones de la PCR para la preparación de adaptadores en termociclador consistió en programar el termociclador a 95 °C x 2 min, 65 °C x10min, 37 °C x 10 min, 25 °C x 10 min, 4 °C x 25 min. Luego de la preparación de los adaptadores se conservaron a -20 °C.

3.5.2.2. LIGACIÓN

Para realizar la ligación de adaptadores complementarios a los cortes de cada una de las enzimas de restricción, se prepararon mezclas de reacción de ligación con los siguientes componentes: ADN genómico digerido (21 µl), H₂O libre de nucleasas (0,2 µl), adaptador *EcoRI* 10 µM (1 µl), adaptador *MseI* 100 µM (1 µl), Buffer de ligasa NEB (2,5 µl) y T4 ADN ligasa (0,3 µl). Una vez obtenido la mezcla de ligación se agregó a 21 µl de ADN genómico digerido. Luego esta mezcla de reacción de digestión/ligación (DL) se mezcló, centrifugó y se incubó a 16 °C por toda la noche. Finalizada la incubación, se realizó una dilución de 1:3 de la mezcla digestión/ligación (DL) con solución tampón TE (10Mm, Tris-HCL (pH 8,0), 0,1 mM EDTA).

3.5.3. PREAMPLIFICACIÓN (+1/+1)

Para la preamplificación (+1/+1) se utilizaron strips para PCR y se les adicionaron los siguientes componentes: 14,05 µl de H₂O libre de nucleasas, 2,5 µl de Buffer 10X PCR, 1,25 µl de mezcla de dNTPs 5 mM, 1 µl de iniciador

EcoRI+1 (50 ng/μl), 1 μl de iniciador *MseI*+1 (50 ng/μl), 0,2 μl de Taq polimerasa y 5 μl la dilución 1:3 de ADN digerido/ligado.

Todas las reacciones de amplificación llevadas a cabo en este estudio se realizaron en un termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler (Anexo 9). El perfil de temperatura utilizado para la PCR +1/+1 fue: un ciclo de 72 °C por 2 minutos, un ciclo de 94 °C por 4 min, veintidós ciclos de 94 °C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, y un ciclo de 72 °C por 5 minutos, luego fue conservado a 4 °C.

Finalizada la preamplificación, se realizaron diluciones (1:4, 1:6, 1:10 y 1:20 para la estandarización de la técnica) del PCR +1/+1 con H₂O libre de nucleasas.

3.5.4. AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Para la amplificación selectiva (+3/+3) se adicionaron los siguientes componentes a la mezcla de reacción: 0,9 μl de H₂O libre de nucleasas, 1,1 μl de Buffer 10X PCR, 0,6 μl de mezcla de dNTPs 5 mM, 2 μl de iniciador *EcoRI* +3 (50 ng/μl), 0,3 μl de iniciador *MseI*+3 (50 ng/μl), 0,1 μl de Taq polimerasa y 5 μl de ADN preamplificado. La mezcla obtenida se agitó suavemente, centrifugó y se amplificó en el termociclador.

El programa utilizado para la amplificación selectiva fue el siguiente: un ciclo de 94 °C por 4 minutos, 94 °C por 20 segundos, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos. Diez ciclos de 94 °C por 20 segundos, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos, veinte ciclos de 94 °C por 20 segundos, 56 °C por 30 segundos, 72 °C por 2 minutos, por último un ciclo de 60 °C por 30 minutos y a 4 °C para su almacenamiento.

Para este estudio se realizó un tamizado de 12 combinaciones de iniciadores AFLP en ocho accesiones de quinua escogidos al azar, fueron elegidas las siete mejores combinaciones (Tabla 3).

3.5.5. SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AFLP EN GELES DE POLIACRILAMIDA AL 6%

Los productos de la amplificación selectiva fueron separados con un equipo de electroforesis vertical Cleaver Scientific, model CSQ20 (Anexo 10) en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%.

Se mezcló el producto de la amplificación selectiva con 5 μl de tampón de carga. Luego se incubó la mezcla a 95 °C (en el termociclador) durante 5 minutos y

después se enfrió rápidamente en hielo. La preparación de los geles se detalla en el Anexo 11.

Tabla 3. Combinaciones de iniciadores AFLPs utilizados en la selección de mejores combinaciones. Ayacucho 2014.

Combinación de iniciadores AFLP	<i>EcoRI</i>		<i>MseI</i>	
	Initiator	Adapter	Initiator	Adapter
E32M48*	E32	AAC-3	M48	CAC-3
E33M60*	E33	AAG-3	M60	CTC-3
E32M61	E32	AAC-3	M61	CTG-3
E38M60	E38	ACT-3	M60	CTC-3
E38M47*	E38	ACT-3	M47	CAA-3
E45M61*	E45	ATG-3	M61	CTG-3
E38M32	E38	ACT-3	M32	AAC-3
E38M61*	E38	ACT-3	M61	CTG-3
E45M32	E45	ATG-3	M32	AAC-3
E32M60	E32	AAC-3	M60	CTC-3
E33M48*	E33	AAG-3	M48	CAC-3
E33M61*	E33	AAG-3	M61	CTG-3

*Combinaciones de iniciadores seleccionados.

3.5.6. TINCIÓN Y REVELADO DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

Se realizó el revelado de la corrida electroforética utilizando el método de tinción en nitrato de plata y el revelado con hidróxido de sodio (como se detalla en el Anexo 12).

Como referencia se utilizó un marcador de tamaño molecular de 100 bp Plus DNA Ladder (genbiotech).

3.5.7. LECTURA DE GELES

La lectura de las bandas de los geles se realizó registrando la presencia o ausencia de bandas para cada accesión, lo cual se expresó en una matriz binaria como "1" para indicar presencia y "0" para indicar ausencia de una banda específica. Los fragmentos del mismo peso molecular se consideraron ser el mismo *locus*.

Una vez hecha la lectura de las bandas, cada gel fue registrado digitalmente para almacenar su perfil de bandas de ADN.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para este análisis, previamente se han elegido como Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) a las muestras correspondientes a las accesiones de quinua, y como caracteres, al dato doble-estado (presencia o ausencia del marcador molecular AFLP).

3.6.1. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE CONTENIDO POLIMÓRFICO (PIC)

El poder discriminatorio de los pares de iniciadores utilizados, se evaluó mediante el cálculo del contenido de la información polimórfica (CIP o PIC).⁶⁰ $PIC_i = 2f_i (1-f_i)$. Donde PIC_i es el contenido de información polimórfica del marcador; es la frecuencia de las bandas del marcador que están presentes y es la frecuencia de las bandas del marcador que están ausentes. En el caso de los marcadores dominantes como los AFLP, el valor máximo de PIC es de 0,5 cuando la mitad de los individuos tiene la banda y la otra mitad no lo presenta.⁶¹ Los PIC fueron sumados para cada combinación de iniciadores AFLP, obteniéndose el índice de la combinación de iniciadores AFLP.⁶² Luego se calculó el promedio del contenido de información polimórfica de la combinación de iniciadores.

Índice de la combinación de iniciadores: $\sum PIC_i$

Promedio del contenido de información polimórfica de la combinación de

iniciadores:
$$\frac{\sum PIC_i}{N^\circ \text{ de marcadores por combinación de iniciadores}}$$

3.6.2. ESTIMACIÓN DE ÍNDICES DE VARIABILIDAD GENÉTICA Y PROPORCIÓN DE *LOCI* POLIMÓRFICO

La estimación de la variación genética promedio (H_i), índice de información de Shannon (I) y la proporción de *loci* polimórficos (P_s) de las accesiones de quinua, se realizó mediante el programa GenAlEx 2,5.

Asumiendo Equilibrio de Hardy-Weinberg

$$q = \sqrt{(1 - \text{Band freq.})}$$

$$p = 1 - q$$

$$\text{Heterocigocidad esperada: } H_e = 2 \times p \times q$$

$$\text{Heterocigocidad esperada promedio: } H_i = \frac{\sum H_e}{\text{número de loci}}$$

$$\text{Índice de información de Shannon: } I = -1 \times (p \times \ln(p) + q \times \ln(q))$$

$$\text{Proporción de } \textit{loci} \text{ polimórfico (95\% y 99\%): } P_s = \frac{\text{nro. } \textit{Loci} \text{ polimórfico}}{\text{nro. total de loci}}$$

Donde:

Banda freq: frecuencia de bandas de ADN

p= frecuencia de alelos dominantes

q= frecuencia de alelos recesivos

3.6.3. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD

A partir de las lecturas de las bandas que se obtuvieron con cada combinación de iniciadores se construyó una matriz de presencia y ausencia de bandas de ADN (1 y 0) con la que se realizó el análisis de similaridad.

La similaridad genética entre todas las accesiones se estimó calculando el coeficiente de Jaccard.⁶³ Para la obtención de la matriz de similaridad se utilizó el programa Numerical Taxonomy System (NTSYS) versión 2,2.

3.6.4. CONFORMACIÓN DE GRUPOS

Mediante la matriz de similaridad entre las accesiones de quinua, se realizó el análisis de agrupamiento por el método basado en el ligamiento promedio entre grupos UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average), incluido dentro del módulo SAHN – Clustering del programa NTSYS 2,2, con ello se generaron dendrogramas y coordenadas principales que permitieron visualizar las distancias genéticas de las accesiones de quinua.

3.6.5. ANÁLISIS COFENÉTICO

Luego de conformar los grupos según los procedimientos UPGMA y SAHN-clustering, se determinó el coeficiente de correlación cofenético, utilizando la matriz del coeficiente de similitud, con su correspondiente matriz cofenético.

Para la construcción de la matriz cofenética y para el cálculo del coeficiente de correlación, también se utilizó el programa NTSYS 2,2.

IV. RESULTADOS

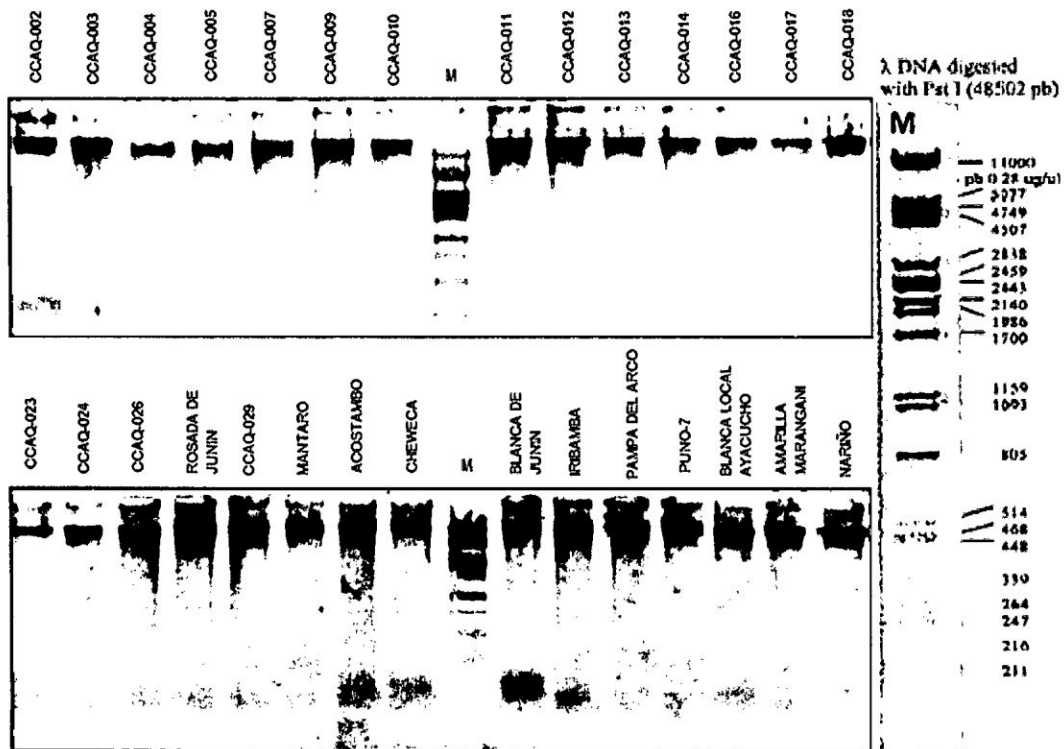


Figura 1. Gel de agarosa al 1% mostrando la calidad de ADN genómico de 29 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Marcador λ (M) digerido con *Pst I*. TBE 1X, 90V. Ayacucho 2014.

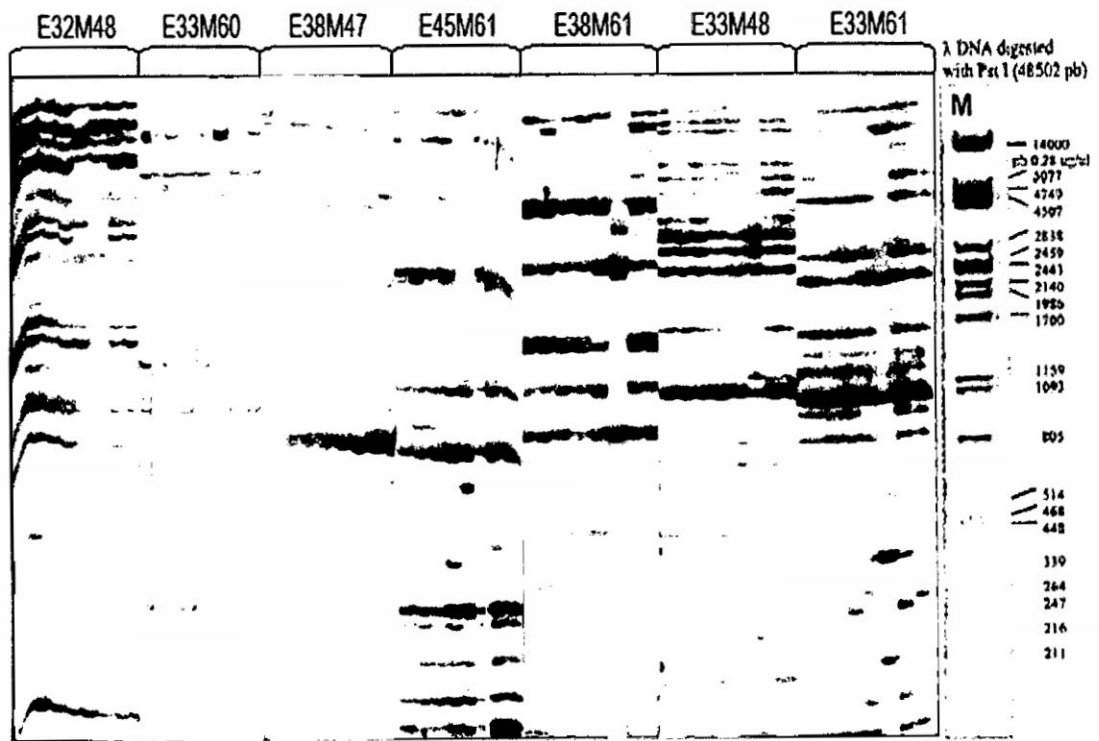


Figura 2. Patrón de bandas AFLPs obtenidas de siete combinaciones de iniciadores en *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Poliacrilamida 6%, TBE1X, 400V. Ayacucho 2014.

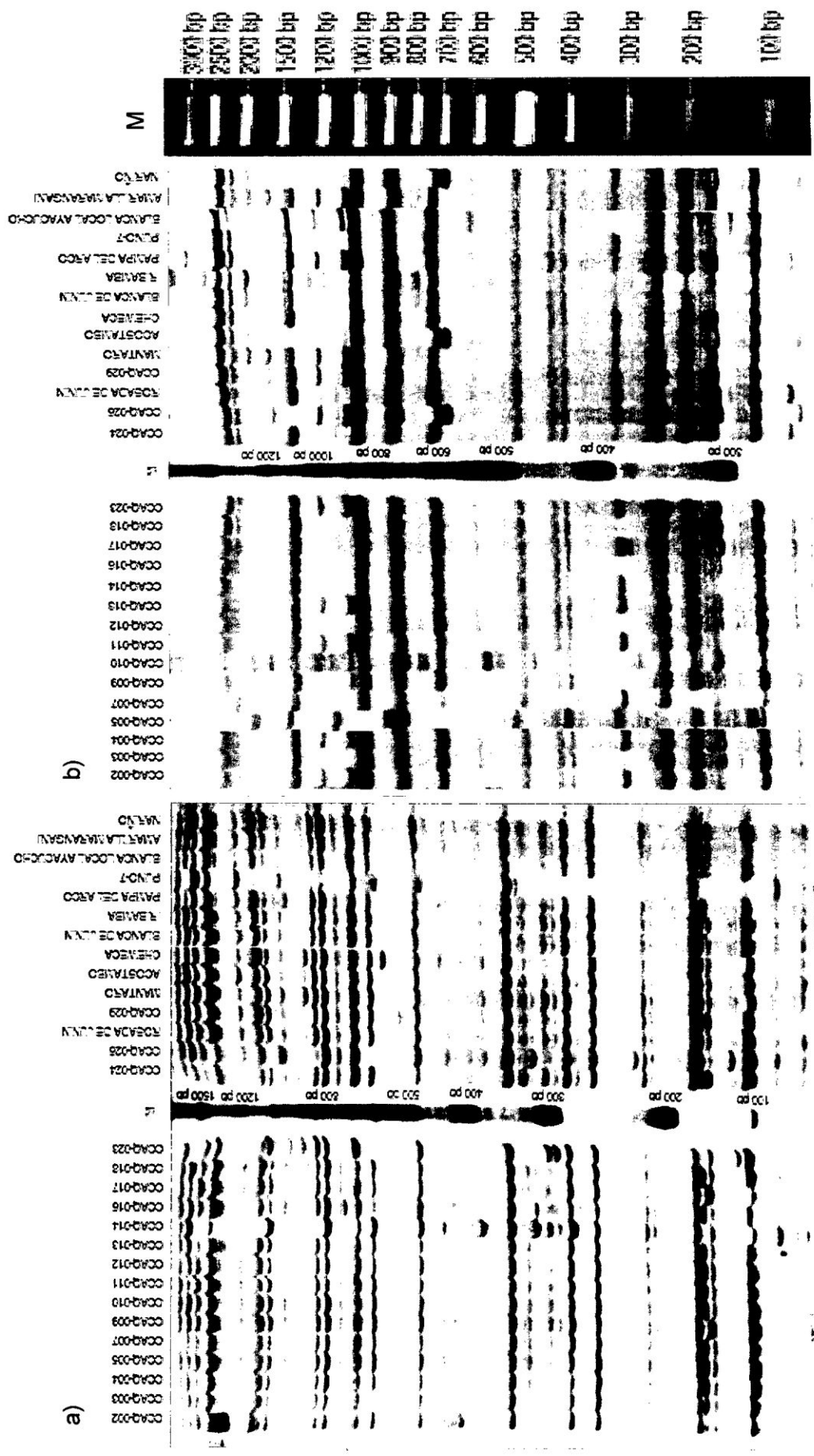


Figura 3. Perfil de amplificación AFLP de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" (a) Combinación de iniciadores E32M48 y (b) Combinación de iniciadores E38M61. "M" representa el marcador de tamaño molecular. Poliacrilamida 6%, TBE1X, 400V. Ayacucho 2014.

Tabla 4. Bandas monomórficas y polimórficas obtenidas con cada combinación de iniciadores en el análisis de AFLPs en *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Ayacucho 2014.

Combinación de Iniciadores	Total de bandas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas
E45M61	29	3	26
E38M61	31	1	30
E33M48	23	4	19
E33M61	31	1	30
E33M60	34	4	30
E38M47	31	2	29
E32M48	41	4	37
Total	220	19	201
Promedio	31,4	2,7	28,7
%	100	8,6	91,4

Tabla 5. Porcentaje de bandas polimórficas obtenidas con cada combinación de iniciadores en el análisis de AFLPs de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Ayacucho 2014.

Combinación de iniciadores	Bandas polimórficas	Porcentaje de bandas polimórficas (%)
E45M61	26	12,94
E38M61	30	14,93
E33M48	19	9,45
E33M61	30	14,93
E33M60	30	14,93
E38M47	29	14,43
E32M48	37	18,41
Total	201	100

Tabla 6. Índice del contenido de información polimórfica (PIC) y promedio del índice de contenido polimórfico empleados en el análisis de marcadores AFLPs en *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Ayacucho 2014.

Combinación de Iniciadores AFLP	Índice del contenido de información polimórfica (PIC)	Promedio del Índice de Contenido Polimórfico
E45M61	4,36	0,17
E38M61	5,00	0,17
E33M48	3,2	0,17
E33M61	6,99	0,23
E33M60	4,17	0,14
E38M47	5,49	0,19
E32M48	4,78	0,13

Tabla 7. Variación genética e Índice de Shannon empleados en el análisis de marcadores AFLPs en *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Ayacucho 2014.

Combinación de Iniciadores	Variación genética (He)	Índice de Shannon (I)	Proporción de loci polimórfico Ps (%)
E45M61	0,266	0,407	89,655
E38M61	0,253	0,393	96,774
E33M48	0,278	0,427	82,609
E33M61	0,371	0,549	96,774
E33M60	0,302	0,456	88,235
E38M47	0,355	0,529	93,548
E32M48	0,303	0,464	90,244
Promedio	0,306	0,463	91,120

Distrito	Color de grano
Huamanguilla	Blanco
Ayacucho	Amarillo
Ayacucho	Naranja
Vinchos	Blanco
Quinua	Blanco
Chiara	Blanco
San Juan Bautista	Rosado
Chiara	Morado
Chiara	Naranja
Vinchos	Amarillo
Cusco	Blanco (crema)
Socos	Crema
Luricocha	Morado
Ayacucho	Naranja
El Mantaro	Rosado
Jauja	Amarillo
Chiara	Amarillo
Huamanguilla	Blanco (crema)
San Juan Bautista	Amarillo
Quinua	Blanco (crema)
Ayacucho	Blanco (crema)
Socos	Morado
Ayacucho	Blanco
Huamanguilla	Blanco (crema)
Socos	Blanco (crema)
Ayacucho	Plomo
Socos	Naranja
Carmen alto	Blanco (crema)
Ayacucho	Plomo

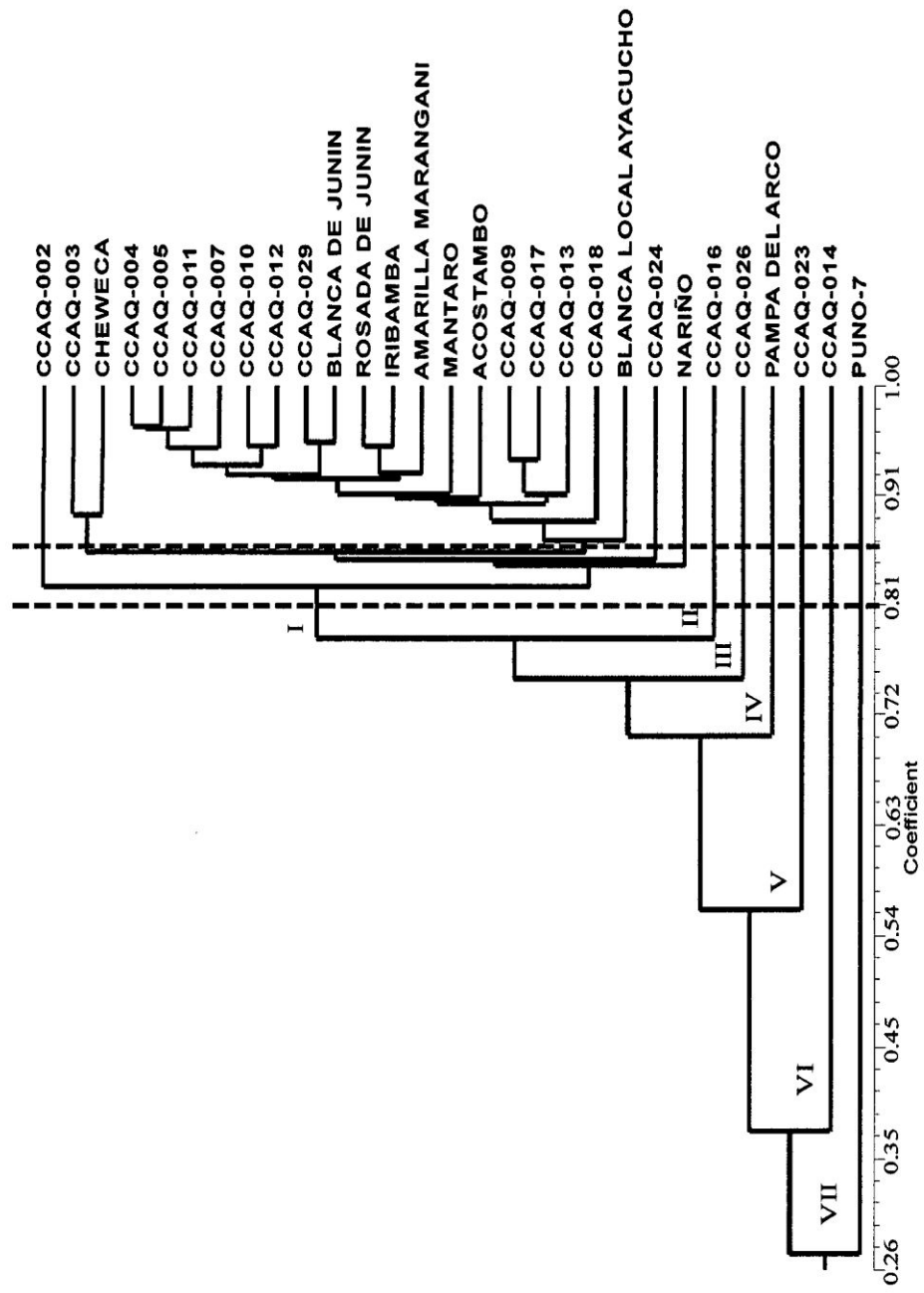


Figura 4. Dendrograma de Similaridad de Jaccard obtenido del análisis de 29 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua", provenientes del Banco de Germoplasma del INIA. Ayacucho 2014.

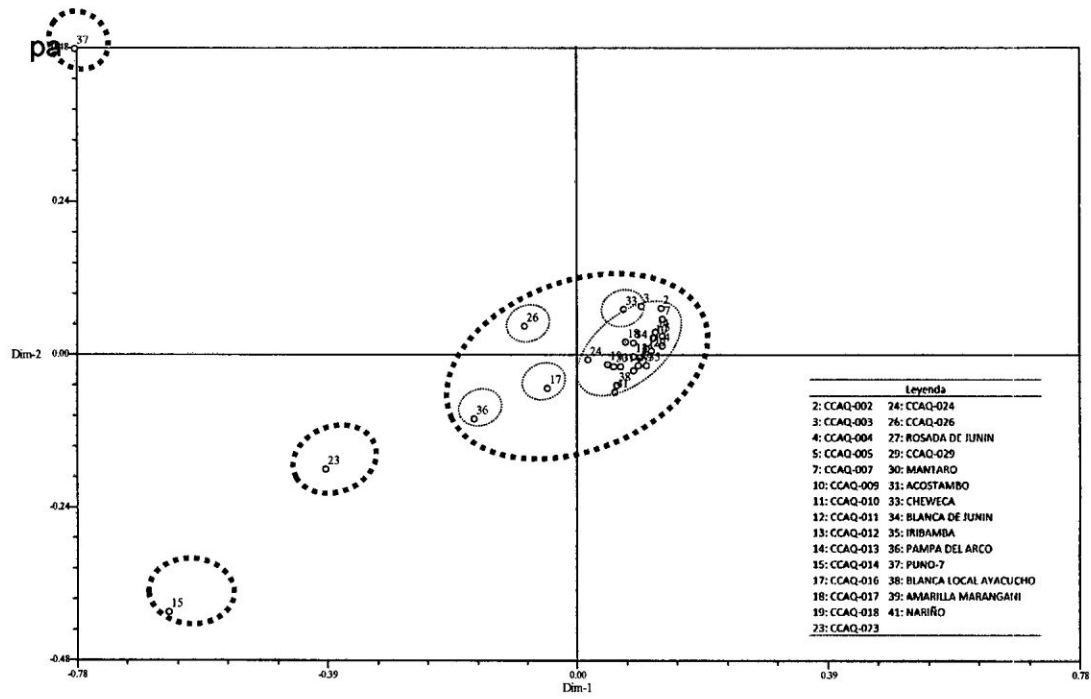


Figura 5. Diagrama en 2D de Coordenadas Principales de 29 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Ayacucho 2014.

V. DISCUSIÓN

5.1. EXTRACCIÓN DE ADN, CALIDAD Y CONCENTRACIÓN

En la extracción de ADN de quinua las concentraciones obtenidas se encontraron en un rango de 100 – 400 ng/ μ l.

La calidad del ADN extraído mediante el protocolo Doyle y Doyle (1990)⁵⁷ modificado, fue óptima para todas las muestras, obteniéndose un ADN genómico no degradado ya que se observaron bandas bien definidas sin la presencia de un barrido que indica degradación ADN.

Las concentraciones de ADN obtenidas en el presente estudio fueron mayores a las obtenidas por Gonzales (2009)⁶⁴ quien utilizó los primordios foliares, esto indicaría que el resultado del proceso de extracción estaría influenciado por el tipo de tejido, como lo indica Rocha (2002).⁴¹

Similares resultados a los nuestros fueron reportados por Tamayo (2010)⁶ quien usó hojas a los 30 días después de la siembra, obteniendo ADN en una concentración de 200-500 ng/ μ l.

En la Figura 1 se observa un gel donde se muestra las bandas de ADN genómico sin la presencia de ARN y las bandas no presentan degradación por parte de las ADNasas.

Estas características son las ideales para iniciar el protocolo de AFLP, ya que se necesita ADN de alta pureza para garantizar la digestión completa por parte de las enzimas de restricción en todas las muestras y así no tener problemas en la interpretación de los polimorfismos.⁴³

5.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA AFLP

La optimización de la técnica propuesta se inició con la modificación de la cantidad de ADN con que se inició la digestión enzimática ya que se contaba con diferentes concentraciones (100-400 ng/ μ l). Se realizaron varios ensayos (50,

100, 200, 300 y 400 ng/μl), determinándose que a concentraciones entre 100 y 200 ng/μl de ADN digerido fueron adecuadas para continuar de manera eficiente la técnica de AFLP (concentraciones menores no fueron suficientes para continuar con la técnica y concentraciones mayores no permitieron una digestión completa).

Posteriormente, el producto de preamplificación se diluyó 1:4, 1:6, 1:10 y 1:20 según las recomendaciones de la técnica, para posteriormente realizar las reacciones de amplificación selectiva, estos productos se observaron en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% sobre el cual se evaluaron las diluciones de la preamplificación. En el presente trabajo se ha encontrado mejores resultados con diluciones menores a las recomendadas por la técnica, siendo la dilución 1:4 los que mostraron perfiles de amplificados mucho más claros e intensos en comparación a los perfiles obtenidos cuando las diluciones fueron mayores.

Este resultado es coherente con las modificaciones que se realizó a la técnica AFLP en el trabajo de Córdor (2013).⁶⁵ Al respecto Zhu *et al.* (1998)⁶⁶ menciona que el ajuste en la dilución del producto de la preamplificación puede realizarse de 1 a 50 veces, dependiendo de la intensidad de las bandas, lo que permite obtener mejor resolución en los geles.

5.3. SELECCIÓN DE COMBINACIONES DE INICIADORES AFLP Y MARCADORES AFLP DETECTADOS

Con respecto al análisis molecular, los marcadores AFLP mostraron ser de gran utilidad para el análisis de diversidad genética en quinua. En el análisis de AFLP se eligieron las siete mejores combinaciones (E32M48, E33M60, E38M47, E45M61, E38M61, E33M48, E33M61), por presentar buena resolución de bandas, buen nivel de polimorfismo y buena reproducibilidad (Figura 2).

De acuerdo a Wolfe y Liston (1998)⁶⁷, una de las características resaltantes de la técnica AFLP, consiste en la detección de grandes cantidades de bandas polimórficas, lo cual se constató en la investigación, además Mueller y Wolfenbarger (1999)⁶⁸, indican que la técnica es altamente reproducible.

En la Figura 3 se muestran bandas polimórficas y monomórficas producidas con los marcadores AFLP, estos perfiles de amplificación AFLP corresponden a las combinaciones E32M48 y E38M61.

En el Tabla 4 se observa que las siete combinaciones de iniciadores AFLP generaron un total de 220 bandas de ADN. El número de bandas totales varió de 23 (con la combinación de los iniciadores E33M48) a 41 (con la combinación de los iniciadores E32M48), con un promedio de 31,4 bandas por combinación. Alrededor del 91,4% de las bandas (201 bandas) mostraron polimorfismo, el número de bandas polimórficas por combinación varió de 19 bandas (combinación E33M48) a 37 bandas de ADN (combinación E32M48). La detección de bandas polimórficas se realizó en un rango de 100 – 2000 pb (Figura 3).

En la tabla 5 se observa que la combinación de iniciadores que detectó un mayor porcentaje de bandas polimórficas fue la combinación E32M48 con 18,41%, y la combinación de iniciadores que detectó menos porcentaje de bandas polimórficas fue la combinación E33M48 con tan solo 9,45%.

Resultados similares fueron reportados por Nolasco *et al.* (2013)⁵, quienes realizaron el tamizado de cinco combinaciones de iniciadores para el análisis de AFLP, observando que la combinación de iniciadores con mayor número de bandas polimórficas fue la E32M48, confirmando el obtenido con la misma combinación en esta investigación.

5.4. ÍNDICE DE INICIADORES AFLP

Se determinó el contenido de información polimórfica (PIC) para cada marcador polimórfico (*locus*), aquellos marcadores que mostraron valores PIC menores a 0,05 no fueron incluidos en el análisis estadístico (no se consideraron 19 marcadores). En la tabla 6 se muestran el promedio de PIC de cada combinación de iniciadores AFLP, observándose que el promedio de PIC va desde 0,13 con la combinación E32M48, hasta 0,23 con la combinación E33M61.

El cálculo del contenido de información polimórfica permitió estimar también los “índices de iniciadores” de las combinaciones de iniciadores AFLP; estos índices indican el poder de discriminación para cada combinación de iniciadores.

Al analizar todas las accesiones de quinua, podemos observar que la combinación de iniciadores E33M61 mostró ser el más discriminante porque su índice de iniciador fue 6,99 y su promedio de PIC fue 0,23, seguido por la combinación de iniciadores E38M47 con un índice de 5,49 y un promedio de PIC de 0,19. Indicando la utilidad de estos dos iniciadores como los marcadores más informativos para determinar polimorfismo y diversidad. Mientras que la

combinación menos informativa fue la combinación E33M48 con un índice de iniciador de 3,2 y un promedio de PIC de 0,17.

Al respecto Christensen *et al.* (2007)⁶⁹ 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)⁷⁰, menciona que cuando las posibilidades de hacer este tipo de estudio, están limitadas por los recursos, es muy importante poder seleccionar cuales iniciadores pueden ser más eficientes que otros en la determinación de la variabilidad genética de una población.

5.5. ESTIMACIÓN DE ÍNDICES DE VARIABILIDAD GENÉTICA Y PROPORCIÓN DE *LOCI* POLIMÓRFICO (Ps)

Se determinó la variación genética promedio “*H_i*” (o índice de heterocigocidad), el índice de información de Shannon “*I*” y la proporción de *loci* polimórficos con un criterio del 95%.

En este estudio se evaluaron 201 *loci* polimórficos que fueron obtenidos en el análisis de AFLP de 29 accesiones de quinua procedentes del Banco de Germoplasma del INIA; se encontró que la variación genética promedio fue de $0,306 \pm 0,011$, con un índice de información de Shannon de $0,463 \pm 0,015$. La proporción de *loci* polimórfico de las combinaciones elegidas fue de 91,120% (tabla 7).

Recordando que el máximo valor que puede alcanzar la heterocigocidad en un estudio con marcadores dominantes es de 0,5, y el índice de Shannon 0,69 podemos indicar estos resultados mostraron un alto nivel de polimorfismo genético en las accesiones de quinua por las combinaciones de iniciadores AFLP evaluadas.

Los valores de diversidad encontrados para las accesiones analizadas son altos y reafirman el alto grado de diversidad genética mantenido en el Banco de Germoplasma del INIA-Ayacucho.

Los resultados concuerdan con Costa *et al.* (2010)⁷ quienes caracterizaron molecularmente 51 poblaciones de *Chenopodium quinoa* Willd. “quinua” del Banco de Germoplasma de Argentina encontrando una alta diversidad genética ($H_i=0.355$).

De igual modo Cardozo *et al.* (2009)⁷¹ investigaron la variabilidad genética de *Ralstonia solanacearum* resultando un índice de variación genética de $0,32 \pm$

0,16, y de diversidad genotípica de Shannon de $0,48 \pm 0,2$ considerándolo altamente variable.

Sin embargo podemos sugerir la necesidad de ampliar la base genética para tener poblaciones con mayor variabilidad, lo que implica incrementar la heterocigocidad en las poblaciones de quinua. Al respecto, Solano (2010)⁷² investigó la variabilidad genética de *Gmelina arbórea*, encontrando que sus colecciones presentaron una variabilidad genética inferior a 0,4 ($H_i < 0,4$), recomendando la necesidad de ampliar la base genética de esta especie.

5.6. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD Y COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENÉTICO (r)

El coeficiente de Correlación Cofenética (r) de la matriz de similaridad y la matriz cofenética del dendrograma de 29 accesiones de quinua, fue realizado mediante el coeficiente de Jaccard, siendo ésta 0,99350 el cual indicó que existía una buena estructura jerárquica entre la matriz de similaridad y su correspondiente dendrograma, ya que cuando el coeficiente de correlación cofenética es mayor a 0,9 éste puede ser interpretado como un buen ajuste del análisis de agrupamiento.

Resultados similares fueron obtenidos por Florido *et al.* (2007)⁷³ en su trabajo de análisis de diversidad genética en tomate utilizando AFLPs, reportó que encontró alta correlación de las matrices de similitud, con un índice de similitud de Jaccard de $r = 0,997$.

En la matriz de similaridad (Anexo 13) se evidencian relaciones muy cercanas entre las accesiones CCAQ-004 y CAAQ-005, CCAQ-004 y CCAQ-011, CCAQ-005 y CCAQ-011 que mostraron índices de similaridad de Jaccard de 0,97 cada par; por otra parte, se encuentran bajos valores de similaridad (0,13) al comparar las accesiones CCAQ-014 y PUNO-7 indicando que son las accesiones que difieren más genéticamente, dichas relaciones se observan en el agrupamiento mostrado en el dendrograma (Figura 4), en ella se puede observar que las accesiones más diferenciado está compuesto por las accesiones CCAQ-014 y PUNO-7 y los más relacionados son CCAQ-004 y CAAQ-005, CCAQ-004 y CCAQ-011, CCAQ-005 y CCAQ-011.

5.7. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

El dendrograma (Figura 4) agrupa a 29 accesiones de quinua, a una similitud de 0,81 unidades ultramétricas se observa la formación de siete grupos, de los cuales el Grupo I está constituido por 23 accesiones con 5 subgrupos a una similitud de 0,86 unidades ultramétricas, el primer subgrupo está conformado por una sola accesión, el segundo subgrupo lo conforman dos accesiones, el tercero lo integran 19 accesiones, el cuarto y quinto subgrupo lo constituyen solo una accesión cada uno.

Los grupos II, III, IV, V, VI y VII están conformados cada uno por solo una accesión.

Si bien es cierto en las colecciones se muestra alta variabilidad, las accesiones del Grupo I se encuentran más relacionadas, esta congruencia puede ser favorecida a que dentro de este grupo se encuentran variedades importantes comercialmente, como son Blanca de Junín y Amarilla Marangani, lo que hace que éstas accesiones tengan características agronómicas semejantes incrementando su relación genética, favoreciendo así su disseminación y cultivo en distintos distritos, entre ellas zonas importantes productivamente como Chiara, lo cual se evidencia en el dendrograma (Figura 4).

También se puede apreciar en el dendrograma una alta diferenciación genética entre seis accesiones pertenecientes a los grupos II, III, IV, V y VI, el cual podría deberse a la poca comercialización de éstas, ya que al no ser materiales importantes comercialmente, no ha sufrido ciclos de selección por parte de los agricultores y ha mantenido su estructura genética. Además podrían ser accesiones con distinto origen histórico, identidad y quizá con ausencia de mejoramiento adaptadas a los sistemas agrícolas locales por un tiempo indefinido⁷⁴, siendo accesiones que presentan alelos diferentes incrementando así la diversidad en las muestras estudiadas.

Se puede observar que algunas accesiones se agruparon por su origen geográfico, por ejemplo todas las accesiones que fueron colectadas en Quinua se encuentran en el grupo I, del mismo modo todas las accesiones colectadas en Vinchos, Chiara y San Juan Bautista se encuentran en éste grupo (Figura 4).

También se puede observar agrupamiento de acuerdo al color de grano, por ejemplo las accesiones que presentan color de grano amarillo, se encuentran en el grupo I. Además dos accesiones (Pampa del Arco y Puno 7) pertenecientes a

los grupos IV y VII respectivamente, presentan en común semillas color plomo y se presentan a mayor distancia que el grupo I (Figura 4).

Para apreciar visualmente las distancias genéticas entre accesiones de quinua, se realizó un análisis de Coordenadas Principales (PCO), el cual se muestra en la Figura 5 con un diagrama en dos dimensiones. El análisis de PCO, método de ordenamiento que centra a los genotipos en una nube de puntos preservando las relaciones de similitud establecidas entre ellos, permitió obtener un gráfico en dos dimensiones que reflejó un agrupamiento similar al que mostró el dendrograma del análisis realizado previamente. El análisis de PCO, a diferencia del análisis de agrupamiento, otorga más libertad en la expresión gráfica de las relaciones genéticas establecidas en la matriz de similitud. Las relaciones entre los genotipos están determinadas por la posición en que se disponen en un espacio reducido.⁷⁵ La coincidencia observada en los resultados logrados con ambas metodologías de análisis multivariado valida el agrupamiento obtenido para los 29 genotipos analizados e indica, tal como sugiere Jhonson (2000)⁷⁶, que dicho agrupamiento es el que existe naturalmente entre estos genotipos.

Las dos coordenadas explican al 38,92% de la variación total observada, de ella la primera coordenada explica el 29,27% de la variación, la segunda coordenada explica el 9,65 % de la variación, en dicha figura se puede corroborar las agrupaciones mostrados en el dendrograma (Figura 4).

El Banco de Germoplasma del INIA-Ayacucho mantiene 140 accesiones de las *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" y actualmente realiza colectas con el fin de ampliar la colección.

Este tipo de estudios sobre los recursos fitogenéticos en general son importantes porque documentan la diversidad presente en la colección y que tan diferentes son unas accesiones de otras para evitar tener duplicados, en la caracterización molecular de las accesiones de quinua del Banco de Germoplasma del INIA, no se detectó duplicados dentro de las accesiones evaluadas. Esto es importante para el manejo eficiente de un Banco de Germoplasma al dar un alcance de la diversidad genética. Esta información es importante para la formación de colecciones núcleo que son un sub-grupo de la colección original que alberga la mayor diversidad posible con el menor número de accesiones y de esta manera establecer prioridades sobre el gasto de recursos para mantener colecciones extensas.⁷⁷

Al respecto Jain *et al.* (2010)⁷⁷ menciona que tener una colección caracterizada permite un manejo eficiente y facilita la elección de accesiones con características particulares para trabajos de fitomejoramiento.

VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó alto grado de variabilidad genética en las 29 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA. Los marcadores AFLPs muestran ser de gran utilidad para el análisis del nivel de variabilidad genética de quinua en las accesiones estudiadas.
2. La metodología de Doyle y Doyle (1990) modificado, para el aislamiento de ADN genómico a partir de tejido foliar de quinua fue óptima, ya que se obtuvo como resultado un DNA con buen grado de pureza y en concentraciones suficientes (100 – 400 ng/μl) para su amplificación mediante la técnica AFLP.
3. La estandarización de la técnica AFLP mostraron fragmentos amplificados con alta resolución y reproducibilidad, permitieron generar un gran número de *loci* con un rango de tamaño de 100 – 2000 pb. determinándose que a concentraciones entre 100 y 200 ng/μl fueron las concentraciones adecuadas de ADN digerido que permitieron continuar de manera eficiente la técnica de AFLP, además se determinó que diluciones 1:4 fueron los que mostraron perfiles de amplificados mucho más claros e intensos.
4. La variación genética promedio fue 0,306 y el índice de Shannon fue 0,463. Por lo tanto se evidencia que existe un alto grado de variabilidad genética en las accesiones analizadas.

VII. RECOMENDACIONES

1. Los resultados de esta tesis podrían complementarse más adelante con un análisis con otros marcadores genéticos para futuros estudios en las accesiones de quinua mantenidas en el Banco de Germoplasma del INIA- Ayacucho, para lograr obtener mayor información sobre el estado de la diversidad genética.
2. A medida que se incremente el número de accesiones de la colección de *Chenopodium quinoa* Willd. sería recomendable hacer estudios moleculares relacionados con estudios morfológicos de varios individuos por accesión. De esta manera se podría determinar qué accesiones contienen una mayor diversidad genética y serían posibles entradas para una posterior colección núcleo.
3. Es recomendable, evaluar una mayor cantidad de combinaciones de iniciadores AFLP para incrementar el número de marcadores polimórficos y conseguir representatividad en los procesos de caracterización molecular y obtener resultados más concluyentes en nuevos estudios de diversidad genética.
4. Es muy importante contar con un herbario de las muestras de quinua ya que constituye una valiosa fuente de información del organismo que ha sido evaluado.
5. Es necesario establecer vínculos de trabajo con el INIA- Ayacucho, para realizar investigaciones encaminadas a la conservación y uso sostenible de los recursos genéticos que dispone nuestra región.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peiretti P.G, Gai, F. & Tassone, S. Fatty acid profile nutritive value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds and plants at different growth stages. *Animal Feed Science and Technology* [Internet] 2013[citado 2 de enero de 2015]; 183:56-61. Recuperado a partir de: [http://www.animalfeedscience.com/article/S03778401\(13\)00093X/abstract?cc=y=](http://www.animalfeedscience.com/article/S03778401(13)00093X/abstract?cc=y=)
2. Esteban R. Brenes, F. Crespo y K. Madrigal. Proyecto andino de competitividad. [Internet] 2001. [citado 4 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.cid.harvard.edu/archive/andes/documents/working_papers/microfoundations/agrotech/bolivia/diagnostico_cluster_quinoa_bolivia_incae.pdf
3. Saldaña GA, Salazar EG. Aislamiento de ADN de calidad para la amplificación al azar de ADN polimórfico de mango. *Agron Trop.* [Internet] 2007 [citado 4 de enero de 2015]; 57(4):281-6. Recuperado a partir de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2793369>
4. Veramendi S, Bonifacio A, Cadima X, Rojas W. Caracterización de la diversidad genética de la colección boliviana de quinua, utilizando microsatélites. 2013; Congreso Científico de la Quinoa (Memorias). La Paz, Bolivia. [Internet] 2013, [citado 6 de enero de 2015]; 682 p.; 21,5 cm. Recuperado a partir de: <http://balcon.magap.gob.ec/mag01/magapaldia/2013/IV%20Congreso%20Mundial%20de%20la%20Quinoa/CD%20congreso%20quinua/.pdf>
5. Nolasco O, Cruz W, Santa Cruz C, Gutierrez A. Evaluación del polimorfismo de ADN de seis variedades de *Chenopodium quinoa* Willd, utilizando AFLP. *The Biologist.* [Internet] 2013 [citado 10 de enero de 2015]; 11(2):277-86. Recuperado a partir de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologist/v11_n2/pdf/a9v11n2.pdf
6. Tamayo H. Caracterización molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (quinua) mediante la técnica de ISSR. [Tesis MSc]. Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2010.
7. Costa S, Manifiesto M, Bertero H. Caracterización genética de *Chenopodium quinoa* nativa del Noroeste Argentino y su relación con germoplasma de Sudamérica. Instituto de Recursos Biológicos CIRN-INTA. [Internet] 2010; [citado 1 de febrero de 2015]; Recuperado a partir de: http://www.researchgate.net/publication/260834206_Caracterizacion_genetica_de_Chenopodium_quinoa_nativa_del_Noroeste_Argentino_y_su_relacion_con_germoplasma_de_Sudamerica.
8. Jiménez J. Biodiversity traditional propagated crop cultivated peruvian highland. [Tesis para optar el grado de PhD]. Facultad de Biología y Protección Ambiental, Universidad de Silesia. Polonia. 2006.
9. Anabalón L, Thomet M. Comparative analysis of genetic and morphologic diversity among quinoa accessions (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the South of Chile and highland accessions. *Academic journals.* [Internet]. 2009 [citado 2 de febrero de 2015]. 1(5) pp.210-216. Recuperado a partir de: <http://www.academicjournals.org/jpbcs>
10. Cardenas M. Descripción preliminar de las variedades de *Chenopodium quinoa* de Bolivia. *Revista de Agricultura.* Universidad Mayor San Simón de Cochabamba (Bol.) Vol. 2, No. 2, pp 13-26. 1944.

11. Bukasov S. Las plantas cultivadas en México, Guatemala y Colombia. Publicación miscelánea. [Internet]. 1965 [citado 10 de febrero de 2015]. Nro 20. 261 p. Recuperado a partir de: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6874e/A6874e.pdf>
12. Gandarillas H, Tapia M, Alandía S, Cardozo A, Mujica A. Quinoa y Kañiwa, cultivos andinos. Bogota, Colombia, CIID, Oficina Regional para América Latina. [Internet]. 1979. [citado 11 de febrero de 2015]. pp 45-64. Recuperado a partir de: <https://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/4118/1/49767.pdf>
13. Heisser C.B. y D.C. Nelson. On the origin of the cultivated chenopods (*Chenopodium*). *Symposium on Origin of Cultivated Plants: XI11 International Congress of Genetics* [Internet]. 1974 [citado 15 de febrero de 2015]. 78: 503-505. Recuperado a partir de: <http://www.genetics.org/content/78/1/503.full.pdf>
14. Jacobsen S. E. The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Reviews International* [Internet]. 2003 [citado 15 de febrero de 2015]. 19:167-177. Recuperado a partir de: <http://quinua.pe/wp-content/uploads/2013/02/sven-erik.pdf>
15. Mujica A. Granos y leguminosas andinas. In: J. Hernandez, J. Bermejo y J. Leon (eds). *Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492*. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, Roma. 1992pp 129-146
16. Lescano J.L. Genética y mejoramiento de cultivos altoandinos: quinua, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. Programa Interinstitucional de Waru Waru [Internet]. 1994. [citado 20 de febrero de 2015] 459 p. Recuperado a partir de: <http://www.worldcat.org/title/genetica-y-mejoramiento-de-cultivos-altoandinos-quinua-kanihua-tarwi-kiwicha-papa-amarga-olluco-ashua-y-oca/oclc/72443463>
17. Rojas W. Análisis de la diversidad genética del germoplasma de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de Bolivia, mediante métodos multivariados. [Tesis M.Sc], Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia – Chile; 1998.
18. Cronquist, A. *Botánica Básica*. Cuarta reimpression. México D.F. 1995.
19. Mujica A., Jacobsen D., Bertero, D. & Gonzalez, J. Un recorrido por el Noroeste Argentino buscando quínoa. Informe: primer taller internacional sobre quinoa: recursos genéticos y sistemas de producción. Lima, Perú; 1999.
20. Tapia M. La quinua y la kañiwa, cultivos andinos. IICA [Internet].1979. [citado 22 de febrero de 2015]. 227 pp. Recuperado a partir de: <http://quinua.pe/quinua-y-kaniwa-cultivos-andinos/>
21. Risi J, Galwey N.W. The *Chenopodium* grains of the Andes: Inca crops for modern agriculture. *Advances in Applied Biology*. Academic Press, London, 1984.
22. Hunziquer, A.T. Las especies alimenticias de *Amaranthus* y *Chenopodium* cultivadas por los indios de América. *Revista Argentina de Agronomía* 30: 297-353; 1943.
23. Gandarillas H. Botánica; Genética y origen. En: *La quinua y la kañiwa, cultivos andinos*. IICA, Bogotá, 227 pp. 1979.
24. SIEA. Sistema Integrado de Estadística Agraria. Ministerio de Agricultura, Oficina de estudios Económicos y Estadísticos. [sede Web] Perú Diciembre-2014. [acceso 25 de febrero de 2015]. Disponible en

- <http://siea.minag.gob.pe/siea/?q=noticias/minagri-emite-bolet%C3%ADn-integrado-de-las-estad%C3%ADsticas-agraria-diciembre-2014>
25. Gomez L, Eguiluz A. Catálogo del Banco de Germoplasma de Quinoa. UNALM [Internet]. 2011. [citado 26 de febrero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://sinia.minam.gob.pe/modsinia/index.php?accion=verElemento&idElementoInformacion=1266&idformula=>
 26. Repo-Carrasco, R. Andean Crops and Infant Nourishment. University of Helsinki. Institute of Development Studies. 25. Finland 1992. Report B
 27. Mahoney A.W, Lopez J.G., Heendricks D.G. An evaluation of the protein quality of quinoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975. pp. 23.
 28. Marroquín A.S. Dos cultivos olvidados, de importancia agroindustrial. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 1983; pp. 23.
 29. Romero J.A. Evaluación de las características físicas, químicas y biológicas de ocho variedades de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). [Tesis Ms]. Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala; 1981.
 30. Lásztity R. The chemistry of cereal proteins. CRC Press Inc., Boca Ratón, FL, USA. In: Quinoa, hacia su cultivo comercial. Wahli, C; 1984. pp. 139 - 173.
 31. Sosulski, F.W. Legume protein concentration by air classification. In: *Developments in food proteins*, B.J.F. Hudson (ed). Applied Science Publishers, London. UK. 1983; pp. 173 - 213.
 32. Mahoney A.W, Lopez, J.G, Heendricks, D.G. An evaluation of the protein quality of quinoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1975; pp. 23: 190 - 193.
 33. Lescano J. L. Avances sobre los recursos fitogenéticos altoandinos. In: Curso: "Cultivos altoandinos". Potosi, Bolivia. 17 - 21 de abril de 1989. 1989; pp 19-35.
 34. Tapia M. Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación, FAO. Santiago, Chile, 1997; pp 29-51.
 35. Wilson H.D. Crop weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd. And *C. berlandieri* Moq. *Theor. Appl. Genet.* 1999; 86:642-648.
 36. Nelson, D. C. Taxonomy and origins of *Chenopodium quinoa* and *Chenopodium nuttalliae*. PhD. dissertation, Indiana University. Bloomington, Indiana. 1968.
 37. IICA, GTZ, INIAP, ERPE. Manual de producción de quinoa de calidad en el Ecuador [internet]. 2015 [citado 4 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.ecuarural.gov.ec/ecuagro/paginas/PRODUCTOS/MANUALES>.
 38. Querol D. Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado. [internet] 1988. [citado 4 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=103856&indexSearch=ID>
 39. Sevilla PR, Holle S.M. Recursos Genéticos Vegetales. Lima, Ediciones Torre Azul SAC. 2004; p. 445.
 40. Sneath PHA, Sokal RR. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Freeman W.H & Co, San Francisco. [internet]. 1973 [citado 4 de enero de 2015]; p. 573. Recuperado a partir de: http://www.brclasssoc.org.uk/books/Sneath/title_contents.pdf

41. Rocha P. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. Palmas. [internet]. 2002 [citado 10 de marzo de 2015]; 23(3): 9-17. Recuperado a partir de: http://www.researchgate.net/publication/236516615_Teora_y_prctica_para_la_extraccin_y_purificacin_del_ADN_en_palma_de_aceite_Theory_and_practice_for_the_extraction_and_purification_of_the_oil_palm_DNA
42. Rogers SO, Bendich AJ. Extraction of DNA from plant tissues. In Gelvin, SB; Schilperoort, RA. eds. Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht/Boston/London. 1988; A6: 1-10.
43. Ferreira M; Grattapaglia D. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia-Brasil; 1998.
44. Valadez E, Kahl G. Huellas de AND en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Mundi-prensa México, S.A. de C. V. 2000.
45. Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat. Genet. [internet]. 1999. [citado 15 de marzo de 2015]; 21: 33-37. Recuperado a partir de: http://brownlab.stanford.edu/Pat_Brown_Lab_Home_Page/Papers_files/Brown_PO_Nat_Genet_1999.pdf
46. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van De Lee T, Hornes M. AFLP: a new technique ADN fingerprinting. Nucleic acids research. [internet]. 1995. [citado 20 de marzo de 2015]; 23: 44407-4414. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307397/>
47. Lombard V, Baril CP, Dubreuil P, Blouet F, Zhang D. Genetic relationships and figerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: Consequences for varietal Registration. Crop Science. [internet]. 2000 [citado 1 de abril de 2015]; 40; 1417-1425. Recuperado a partir de: <https://www.agronomy.org/publications/cs/abstracts/40/5/1417?access=0&view=pdf>
48. Hillis D, Moritz C. Molecular systematics: context and controversies. En Hillis DM, Moritz C (Eds.) *Molecular Systematics*. Sinauer. Sunderland, EEUU. [internet]. 1990 [citado 15 de junio de 2015]; pp. 1-11. Recuperado a partir de: <http://www.sinauer.com/media/wysiwyg/tocs/MolecularSystematics2.pdf>
49. Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1987. 155:335-350.
50. Mullis K B, Ferré F, Gibbs R. The polymerase chain reaction. Boston, Birkhauser.1994. p. 550.
51. Velasco R. Marcadores moleculares y la extracción de ADN. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias-Universidad del Cauca. 2005; 3(1):14-18.
52. Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. 2da. Edic. Edit: INTA. Buenos Aires. Argentina. 2010.
53. González F, Pita J. Conservación y caracterización de Recursos Filogenéticos. Publicaciones I.N.E.A. Valladolid. España; 2001.
54. Crisci J, López M. Introducción a la teoría de la taxonomía numérica serie biológica Nro. 26. Programa regional de desarrollo científico y tecnológica. [internet]. 1983. [citado 13 de mayo de 2015]; 132p. Recuperado a partir de: http://www.researchgate.net/publication/50326234_Introduccion_a_la_teora_y_prctica_de_la_taxonoma_numrica
55. García J, Duque M, Tohme J, Xu S, Levy M. Un programa S.A.S para análisis de clasificación. Colombia, CIAT; 1994. p. 17.

56. Everitt BS. Cluster analysis. Halsted Press, 3ra edición; 1993.
57. Doyle JJ; Doyle JL. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. 1990; Focus 12:13-15.
58. Centro Internacional de la Papa (CIP). Molecular Markers Protocols Curso-Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad. 1ra. Edic. Edit: CIP. Lima, Perú. 2002.
59. Invitrogen Manual Kit AFLP [internet]. 2003 [citado 15 de mayo de 2015]. Recuperado a partir de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/aflpi_man.pdf
60. Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van Bocktaele E, Depicke A, De Loose M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium* spp.). Mol. Breed. 2000; 6:125-134.
61. De Riek J, Calsyn E, Everaert I, De Loose M. AFLP based alternatives for the assesment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. Tag Theoretical and Applied Genetics. 2000; 103(8):1.254-1.265.
62. Ghislain M, Dapeng Z, Fajardo D, Huaman Z, Hijmans RJ. Marker assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 1999; 46: 547-555.
63. Jaccard P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 1908; 44:223-270.
64. González S. Estudio de flujo de genes en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en campo de agricultores mediante el uso de marcadores microsatélites. [Tesis]. Sangolquí. Escuela Politécnica del Ejército; 2009.
65. Córdor R. Análisis de la variabilidad genética del olluco (*Ullucus tuberosus* caldas) de tres comunidades campesinas de Cusco y dos comunidades campesinas de Huánuco” [Tesis MSc]. Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2013.
66. Zhu J, M. Gale, S. Quarrie, M. Jackson, G. Bryan. AFLP markers for study of rice biodiversity. Theoretical and Applied Genetics. [internet]. 1998 [citado 16 d mayo de 2015]; 96, 602-611. Recuperado a partir de: http://www.researchgate.net/profile/Steve_Quarrie/publication/226114848_AFLP_markers_for_the_study_of_rice_biodiversity/links/0deec519eb5e9a3c42000000.pdf
67. Wolfe A, Liston A. Contributions of PCR-Based methods to plant systematics and evolutionary biology En Soltis, D. E., P. M. Soltis y J. J. Doyle (eds.). Molecular systematics of alants II DNA sequencing. New York. Kluwer Academic Publishers. [internet]. 1998. [citado 13 de abril de 2015]; 43-86. Recuperado a partir de: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5419-6_2
68. Mueller G, Wolfenbarger L. AFLP genotyping and fingerprinting. [internet]. 1999 [citado 21 de mayo de 2015]; 10, 389-394. Recuperado a partir de: https://www.ufpe.br/biolmol/Artigos_Doutorado_2003_Jan/AFLPgenotyping-g-review.pdf
69. Christensen D, B Pratt, C. Pratt , P. T. Nelson, M. R. Stevens, E. N. Jellen, C. E. Coleman, D. J. Fairbanks, A. Bonifacio³ and P. J. Maughan. Review agronomy and horticulture. Young university, CIP. Department of plant and animal. Crop sciences. 2007; Vol. 12:12-16

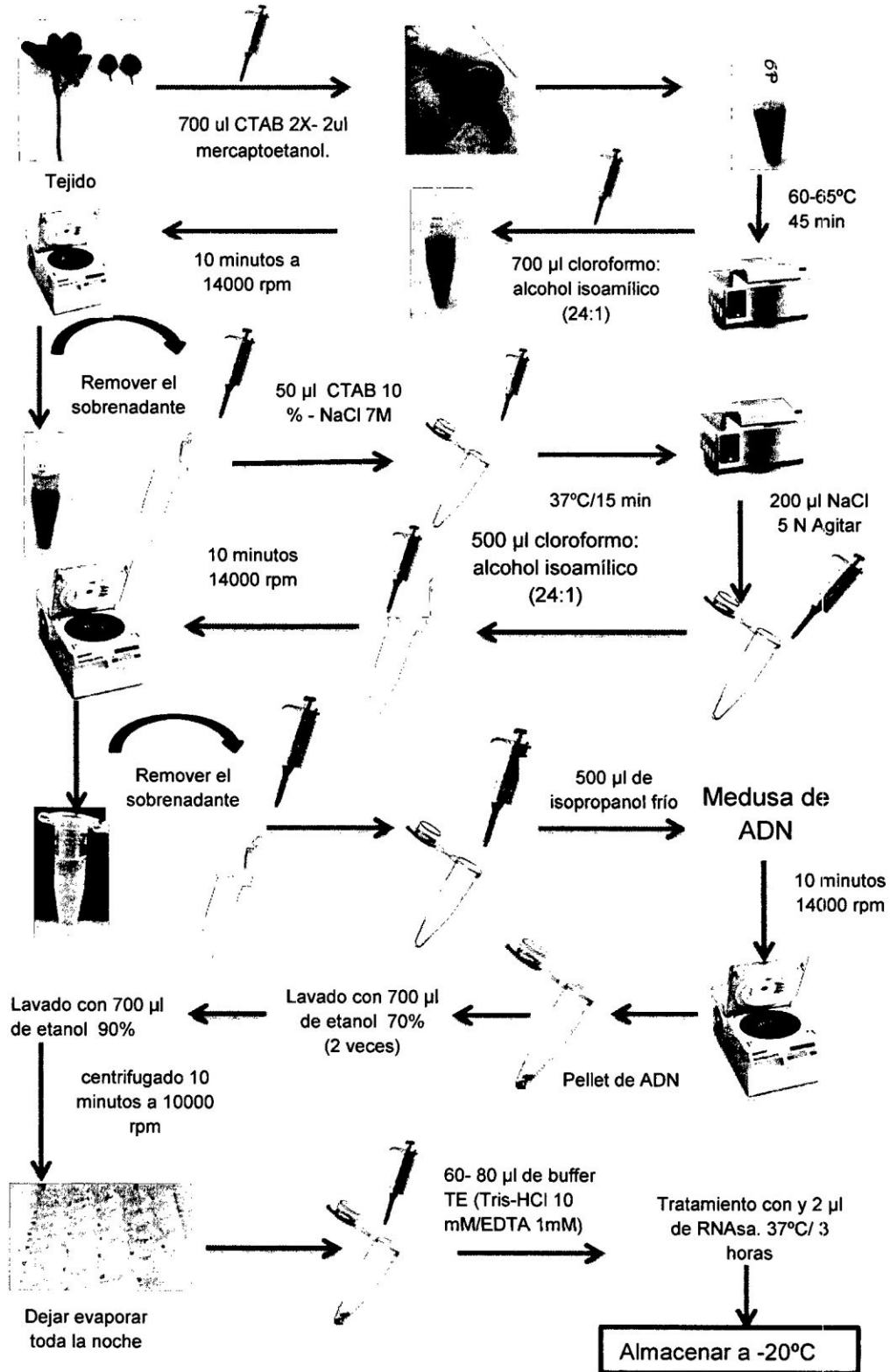
70. Koskinen M.T., H. Hirnoven, P.A. Landry, C. Primmer. The benefits of increasing the number of microsatellites used in genetic population studies: an empirical perspectiva. *Hereditas*. 2004; 141:61-67.
71. Cardozo C, Rodríguez P, Cotes JM, Marín M. Variabilidad genética de la bacteria *Ralstonia solanacearum* (Burkholderiales: Burkholderiaceae) en la zona bananera de Urabá (Colombia) [internet]. 2009 [citado 3 de junio de 2015]; Vol. 58 (1): 31-44, Recuperado a partir de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44918951003>
72. Solano, G. Caracterización molecular de clones de *Gmelina arborea* mediante el uso de marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Colombia. [internet] 2010. [citado 9 de julio de 2015]; Recuperado a partir de: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/830/1/cien31.pdf>
73. Florido M, Arencibia A, Plana D. Análisis de la diversidad genética en tomate (*Solanum L.* Sección *Lycopersicon* Sub especie *Lycopersicon*) utilizando AFLP. Cultivos Tropicales Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). La Habana, Cuba. [internet]. 2007 [citado 15 de marzo de 2015]; Vol. 28, núm. 3, 2007, pp. 83-87. Recuperado a partir de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215844013>
74. Camacho Villa T.C., Maxted N, Scholten, M. & Ford-Lloyd, B. Defining and identifying crop landraces. 2005. *Plant Genetic Resources* 3: 373-384.
75. Bonámico N, Aiassa J, Ibañez M, Di Renzo M, Díaz D, Salerno J. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores *ssrRIA*. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* [internet]. 2004 [citado 16 de abril 2015] Recuperado a partir de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86433209> ISSN 0325-8718
76. Johnson D.E. *Métodos Multivariados Aplicados al Análisis Estadístico México*. Ed. International Thomson Editores. 2000, p. 327.
77. Jain SM, Brar DS. *Molecular techniques in crop improvement*. 2 ed. Springer. Londres, UK [internet]. 2010. [citado 29 de mayo de 2015]; 772p. Recuperado a partir de: <http://www.springer.com/us/book/9789048129669>

ANEXOS

ANEXO 1. Datos pasaporte de *Chenopodium quinia* Willd. "quinua" INIA. Ayacucho 2014.

N°	Especie	Accesión	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud	Color de grano
2	Quinua	CCAQ-002	Ayacucho	Huanta	Huamanguilla	Huamanguilla	-13,01093	-74,17378	3200	Blanco
3	Quinua	CCAQ-003	Ayacucho	Huamanga	Ayacucho	Pampa del arco	-13,15989	-74,22395	2600	Amarillo
4	Quinua	CCAQ-004	Ayacucho	Huamanga	Vinchos	Anchaccawasi	-13,29628	-74,34123	3479	Blanco
5	Quinua	CCAQ-005	Ayacucho	Huamanga	Quinua	Moya	-13,02847	-74,13707	3330	Blanco
7	Quinua	CCAQ-007	Ayacucho	Huamanga	San Juan Bautista	Canaan	-13,16481	-74,20603	2770	Rosado
10	Quinua	CCAQ-009	Ayacucho	Huamanga	Chiara	Chiara	-13,27338	-74,20598	3300	Amarillo
11	Quinua	CCAQ-010	Ayacucho	Huamanga	Chiara	Chiara	-13,27338	-74,20598	3400	Morado
12	Quinua	CCAQ-011	Ayacucho	Huamanga	Chiara	Inyalla baja	-13,30249	-74,21375	3500	Blanco
13	Quinua	CCAQ-012	Ayacucho	Huamanga	Chiara	Inyalla alta	-13,30249	-74,21375	3600	Naranja
14	Quinua	CCAQ-013	Ayacucho	Huamanga	San Juan Bautista	Yanama	-15,01341	-73,16302	3200	Amarillo
15	Quinua	CCAQ-014	Ayacucho	Huamanga	Carmen alto	Lambrashuayqo	-13,23854	-74,25537	3300	Blanco (crema)
17	Quinua	CCAQ-016	Ayacucho	Huanta	Huamanguilla	Sin datos	-13,01093	-74,17378	3400	Blanco (crema)
18	Quinua	CCAQ-017	Ayacucho	Huanta	Huamanguilla	Sin datos	-13,01093	-74,17378	2500	Blanco (crema)
19	Quinua	CCAQ-018	Ayacucho	Huamanga	Quinua	Chihuampampa	-13,08031	-74,1466	2800	Blanco (crema)
23	Quinua	CCAQ-023	Ayacucho	Huamanga	Socos	Chunyacc	-13,23333	-74,28938	3400	Naranja
24	Quinua	CCAQ-024	Ayacucho	Huamanga	Socos	Socos	-13,21434	-74,2899	3350	Morado
26	Quinua	CCAQ-026	Ayacucho	Huamanga	Socos	Larampuquio	-13,22214	-74,31151	3450	Blanco (crema)
27	Quinua	ROSADA DE JUNIN	Ayacucho	Huamanga	Socos	Luyanta	-13,17872	-74,30654	3200	Blanco (crema)
29	Quinua	CCAQ-029	Ayacucho	Huamanga	Vinchos	San lucas	-13,31218	-74,34281	3300	Amarillo
30	Quinua	MANTARO	Junin	Jauja	El mantaro	Mantaro	-11,8216	-75,39154	3187	Rosado

ANEXO 2. Flujograma extracción de ADN de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua". Ayacucho 2014.



ANEXO 3. Composición del Buffer de extracción CTAB 2X. Ayacucho 2014.

Reactivos	1L
CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio)	20 g
NaCl	81,81 g
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,5 M (pH 8,0)	40 ml
Tris: HCl 1 M (pH 8,0)	100 ml
PVP (Polivinilpirrolidona)	10 g

Se agrega en caliente (CTAB y PVP) luego enrazar a 1L. Autoclavar

ANEXO 4. Composición del Buffer de extracción CTAB 10X. Ayacucho 2014.

Reactivos	1L
CTAB	100 g
NaCl	41 g
EDTA 1 M (pH 8,0)	100 ml

El CTAB se agrega en caliente más o menos a 80 °C, enrazar a 1 L. Autoclavar

ANEXO 5. Composición del Buffer TBE 10 X. Ayacucho 2014.

Reactivos	1 L
Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	40 ml

Diluir a 800 ml, enrazar a 1 L y autoclavar.

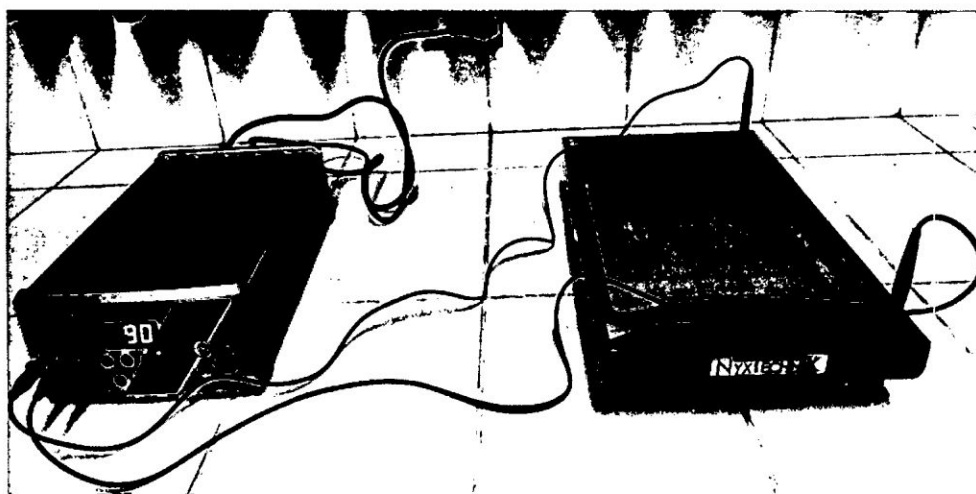
ANEXO 6. Componentes del Tampón T₁₀E₁. Ayacucho 2014.

Reactivos	1 L
Tris HCl 1 M, pH 8,0	8 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	1,6 ml
Agua Milli Q	100 ml

ANEXO 7. Preparación del gel agarosa 1%. Ayacucho 2014.

1. Se pesó 1 g de agarosa.
2. Se llevó a un Erlenmeyer y agregó 100 ml de Buffer TBE 1X.
3. Se procedió a calentar en un horno microondas por 2 minutos.
4. Se verificó si la agarosa se ha disuelto completamente, sino calentar nuevamente por 1 minuto.
5. Se agitó y dejó que empiece a ebulir.
6. Se dejó enfriar un poco y se añadió bromuro de etidio, se vertió en la bandeja con el peine y los extremos sellados en una mesa nivelada.
7. Se dejó solidificar el gel.
8. Luego de 30 minutos está listo para usar.
9. Se retiró con cuidado el peine y se sumergió la bandeja en la cámara de electroforesis conteniendo buffer TBE 1X.

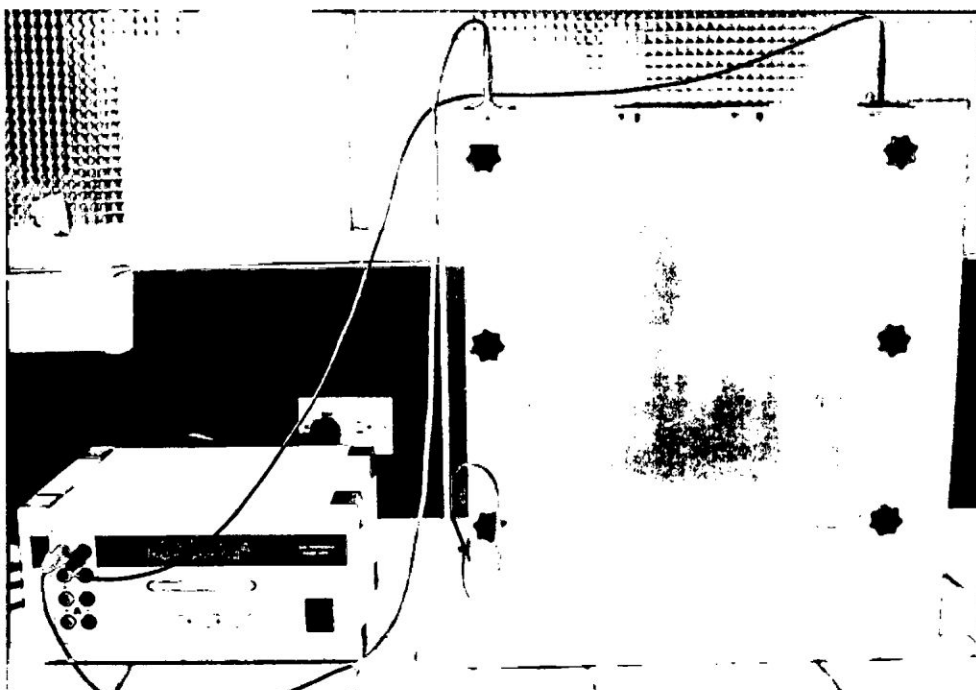
ANEXO 8. Equipo de electroforesis Electronyx Maxi Model EH20 (Nyxtechnik).
Ayacucho 2014.



ANEXO 9. Termociclador Applied Biosystems Veriti™ Thermal Cycler. Ayacucho 2014.



ANEXO 10. Cleaver Scientific, model CSQ20. Ayacucho 2014.



ANEXO 11. Preparación de la solución de poliacrilamida al 6 %. Ayacucho 2014.

1. Se limpió los vidrios de la cámara de electroforesis tres veces con etanol absoluto.
2. Se trató uno de los vidrios con una solución adherente preparada con los siguientes componentes: 5 µl de Bind Silane, 5 µl de solución de ácido acético glacial y 1 ml de etanol absoluto; para que el gel se adhiriera al vidrio.
3. Se trató el otro vidrio con 350 µl de Repel Silane, para que el gel no se adhiriera a este vidrio.
4. Una vez armado el equipo de electroforesis se adicionó la solución de poliacrilamida al 6 %, 600 µl de persulfato de amonio y 120 µl de Temed, dejando polimerizar por dos horas.
5. Se realizó la corrida del gel durante 30 minutos. Terminada la precorrida, se añadió 6 µl de cada muestra de ADN en cada uno de los pozos de carga formados en el gel de poliacrilamida.
6. Se realizó la corrida electroforética con corriente constante a 400 voltios. El tanque superior del equipo de electroforesis contenía TBE 0,5X y el tanque inferior contenía TBE 1X. Se suspendió la corrida cuando el xileno cianol se localizó a dos cm del límite inferior del gel.

ANEXO 12. Protocolo de tinción de geles con nitrato de plata. Ayacucho 2014.

Paso	Componente
Fijación	Etanol al 10%, Ácido acético al 0,5%
	Mantener en agitación constante por 30 minutos
Tinción	Etanol al 10%, Ácido acético al 0,5%, nitrato de plata al 0,2%
	Mantener en agitación constante por 30 minutos
Enjuague	Agua destilada
	Realizar el enjuague por 30 segundos
Revelado	Hidróxido de sodio al 1,5%, 2,5 ml/l formaldehído al 37%
	Mantener en agitación constante hasta aparición de bandas.
Fijación	Etanol al 10%, Ácido acético al 0,5%
	Mantener en agitación constante por 10 minutos
Enjuague	Agua de caño
	Enjuagar con agua corriente de caño por 2 minutos.

ANEXO 13. Matriz de Similitud de 29 accesiones de *Chenopodium quinoa* Willd. "quinua" Ayacucho 2014.

	CCAQ-002	CCAQ-003	CCAQ-004	CCAQ-005	CCAQ-007	CCAQ-009	CCAQ-010	CCAQ-011	CCAQ-012	CCAQ-013
CCAQ-002	1									
CCAQ-003	0,82	1								
CCAQ-004	0,88	0,91	1							
CCAQ-005	0,87	0,91	0,97	1						
CCAQ-007	0,9	0,88	0,95	0,96	1					
CCAQ-009	0,85	0,89	0,94	0,93	0,95	1				
CCAQ-010	0,84	0,89	0,92	0,94	0,94	0,92	1			
CCAQ-011	0,85	0,89	0,97	0,97	0,93	0,92	0,93	1		
CCAQ-012	0,83	0,88	0,93	0,93	0,92	0,92	0,95	0,95	1	
CCAQ-013	0,87	0,89	0,93	0,92	0,93	0,92	0,92	0,91	0,92	1
CCAQ-014	0,34	0,35	0,38	0,38	0,37	0,38	0,39	0,39	0,4	0,37
CCAQ-016	0,73	0,76	0,81	0,81	0,81	0,81	0,79	0,82	0,82	0,79
CCAQ-017	0,84	0,84	0,9	0,89	0,91	0,94	0,88	0,88	0,9	0,9
CCAQ-018	0,79	0,82	0,89	0,89	0,88	0,88	0,91	0,89	0,91	0,89
CCAQ-023	0,51	0,55	0,58	0,58	0,56	0,56	0,55	0,59	0,56	0,55
CCAQ-024	0,82	0,83	0,88	0,88	0,89	0,88	0,86	0,87	0,88	0,87
CCAQ-026	0,71	0,77	0,78	0,78	0,77	0,77	0,76	0,78	0,76	0,77
ROSADA DE JUNIN	0,81	0,86	0,92	0,93	0,9	0,89	0,94	0,94	0,93	0,88
CCAQ-029	0,85	0,88	0,94	0,93	0,94	0,92	0,9	0,94	0,92	0,92
MANTARO	0,82	0,86	0,91	0,92	0,91	0,89	0,91	0,92	0,93	0,9
ACOSTAMBO	0,8	0,82	0,91	0,9	0,89	0,88	0,9	0,92	0,9	0,87
CHEWECA	0,8	0,89	0,86	0,87	0,86	0,86	0,85	0,86	0,85	0,84
BLANCA DE JUNIN	0,81	0,84	0,92	0,91	0,92	0,92	0,91	0,93	0,94	0,89
IRIBAMBA	0,84	0,86	0,91	0,94	0,93	0,9	0,94	0,93	0,92	0,87
PAMPA DEL ARCO	0,65	0,66	0,73	0,72	0,71	0,72	0,71	0,74	0,72	0,68
PUNO-7	0,26	0,28	0,28	0,29	0,3	0,28	0,28	0,29	0,29	0,28
BLANCA LOCAL	0,79	0,84	0,89	0,91	0,87	0,87	0,86	0,9	0,87	0,85
AYACUCHO										
AMARILLA										
MARANGANI	0,82	0,86	0,92	0,93	0,91	0,89	0,9	0,93	0,91	0,9
NARIÑO	0,78	0,81	0,88	0,86	0,85	0,84	0,86	0,88	0,87	0,84

BIBLIOTECA E INFORMACION
CULTURAL
U.N.S.C.H.

...continuación

CCAQ-014	CCAQ-016	CCAQ-017	CCAQ-018	CCAQ-023	CCAQ-024	CCAQ-026	ROSADA DE JUNIN	CCAQ-029	MANTARO
1									
0,38	1								
0,39	0,78	1							
0,4	0,78	0,89	1						
0,3	0,53	0,54	0,53	1					
0,41	0,78	0,86	0,85	0,57	1				
0,33	0,68	0,74	0,75	0,55	0,77	1			
0,39	0,79	0,85	0,88	0,58	0,84	0,75	1		
0,39	0,81	0,91	0,89	0,57	0,87	0,79	0,92	1	
0,4	0,79	0,87	0,85	0,58	0,84	0,74	0,9	0,91	1
0,39	0,79	0,87	0,88	0,56	0,82	0,74	0,91	0,92	0,9
0,35	0,73	0,85	0,82	0,55	0,81	0,79	0,86	0,88	0,85
0,37	0,78	0,91	0,9	0,5	0,83	0,73	0,92	0,95	0,91
0,39	0,79	0,86	0,88	0,57	0,84	0,74	0,95	0,91	0,89
0,34	0,69	0,7	0,69	0,54	0,71	0,63	0,74	0,73	0,72
0,33	0,27	0,28	0,28	0,22	0,3	0,27	0,28	0,28	0,28
0,38	0,76	0,83	0,83	0,57	0,84	0,74	0,88	0,88	0,87
0,38	0,8	0,88	0,88	0,6	0,85	0,77	0,94	0,92	0,92
0,38	0,77	0,81	0,83	0,56	0,82	0,72	0,88	0,87	0,85

...continuación

ACOSTAM BO	CHEWE CA	BLANCA DE JUNIN	IRIBAM BA	PAMPA DEL ARCO	PUNO- 7	BLANCA LOCAL AYACUCHO	AMARILLA MARANGANI	NARIÑO
1								
0,84	1							
0,91	0,85	1						
0,9	0,84	0,91	1					
0,71	0,67	0,74	0,74	1				
0,29	0,28	0,29	0,28	0,25	1			
0,86	0,82	0,86	0,88	0,71	0,26	1		
0,92	0,86	0,93	0,92	0,72	0,29	0,9	1	
0,84	0,79	0,88	0,86	0,69	0,26	0,84	0,89	1

ANEXO 14. Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>Variabilidad genética de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. del Banco de Germoplasma del INIA mediante marcadores AFLP - Ayacucho 2014.</p>	<p>• General ¿Cuál será la variabilidad genética entre las accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA, mediante marcadores AFLP - Ayacucho 2014?</p>	<p>• General Determinar la variabilidad genética de accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA, mediante marcadores AFLP - Ayacucho 2014.</p> <p>• Específicos -Estandarizar el protocolo de extracción de ADN en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua". -Estandarizar el protocolo de marcadores AFLP en <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua". -Interpretar la variabilidad genética de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua" mediante marcadores AFLP.</p>	<p>Antecedentes Revisión de la literatura -<i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua". - Clasificación taxonómica. -Descripción botánica. -Germoplasma Vegetal -Diversidad y variabilidad genética. - Marcadores Moleculares. - Análisis de diversidad genéticas mediante AFLP.</p>	<p>Los marcadores AFLP permiten determinar la variabilidad genética de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA. - Germoplasma del INIA - Ayacucho 2014.</p>	<p>-Variable Principal: Variabilidad genética de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA. Indicador: Coeficiente de similitud marcadores presentes en el ADN. -Variable Secundaria: Marcadores moleculares AFLP. Indicadores: -Tamaño de las bandas. -Número de bandas.</p>	<p>• Tipo de investigación Explicativo -descriptivo. • Población Todo el material vegetal de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd. "quinua" conservado en el Banco de Germoplasma del INIA. • Muestra Colección aleatoria de 29 accesiones de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd "quinua" del Banco de Germoplasma del INIA. • Metodología -Extracción del ADN genómico. - Determinación de calidad y concentración de ADN. - Digestión del ADN genómico. - Ligación de adaptadores. - Pre-amplificación de los fragmentos digeridos. - Amplificación selectiva de los fragmentos digeridos. - Corrida de electroforesis vertical. - Revelado de las bandas en el gel de poliacrilamida. - Escoreo de las bandas (presencia/ausencia) - Análisis de resultados.</p>

