

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA
DE 172 ACCESIONES DE LA COLECCIÓN
NACIONAL DE *Chenopodium quinoa* Willd. “QUINUA”
MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES**

Tesis para optar por el título profesional de: Licenciada en Biología

Bach. Romina Noelia Vía y Rada Fernández

Lima, Perú 2015

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi abuela Tita, quien me enseñó a ser valiente hasta el final. Te extraño en cada momento de mi vida.

Siempre juntas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera mencionar a mi familia, quienes siempre me impulsaron a cumplir mis sueños por más miedo que tenía; ustedes son mi sistema de apoyo, detrás de cada paso que doy alentando cada una de mis decisiones y consolando cada decepción. Sin duda alguna puedo decir que no lo habría logrado sin su apoyo. Una vez más se los digo, esto es para ustedes.

En segundo lugar, quisiera agradecer al personal del Instituto Nacional de Innovación Agraria que me brindó su apoyo en el desarrollo de esta tesis, principalmente a Fernando Serna, por confiar en mí y permitirme el desarrollo de esta investigación, así como a la Blga. Pilar, al Ing. Eudosio Veli y a todo el personal de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología. Asimismo, no puedo dejar de mencionar a Claudita, Vane, Ricardo, Romi, Evelyn, Gabrielito y Jen; ustedes hicieron que todo el proceso sea más divertido. ¡Qué lindo fue trabajar con amigos!.

En tercer lugar, quisiera agradecer a mi asesora, Lidia Cruz, por su paciencia, apoyo y orientación; y a mi jurado evaluador, por darme las críticas necesarias que me permitieron pulir este trabajo.

Asimismo, quisiera agradecer a mis ex compañeros del CIP, Ronald Robles y Rocío Alagón, por ayudarme y guiarme en el análisis estadístico. No hubiera logrado comprender R si no fuera por ti Ronald.

Finalmente, pero no menos importante, quisiera agradecer a mis amigos, familia y a todas las personas que me dieron palabras de aliento y seguridad, sobre todo a ti Vale, por ser una amiga incondicional, no tengo palabras para expresar lo que significa tu amistad; y a mi amigo y colega Juan Pablo, por estar siempre dispuesto a ayudar y por sus sugerencias en la revisión de esta tesis.

ABREVIATURAS

ADN	Desoxirribonucleid Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
AFLP	Amplified Fragment Lenght Polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados)
AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Análisis de Varianza Molecular)
APG	Angiosperm Phylogeny Group (Grupo para la filogenia de las angiospermas)
BIC	Bayesian Information Criterion (Criterio de Información Bayesiano)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albúmina Sérica Bovina)
CIP	International Potato Center (Centro Internacional de la Papa)
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio)
DAPC	Discriminal Analysis of Principal Components (Análisis Discriminante de Componentes Principales)
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates (Desoxirribonucléotidos trifosfato)
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
EEA	Estación Experimental Agraria
EHW	Equilibrio de Hardy-Weinberg
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
Fst	Índice de Fijación
He	Heterocigosidad esperada
Ho	Heterocigosidad observada
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats (Inter Secuencias Simples Repetidas)

	Ministerio de Agricultura y Riego
m.s.n.m	Metros Sobre el Nivel del Mar
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
NOA	Noroeste argentino
NOR	Nucleolar Organizer Region (Región Organizadora Nucleolar)
NPGS	National Plant Germplasm System (Sistema Nacional de Germoplasma de Plantas)
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
OD	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PCA	Principal Component Analysis (Análisis de Componentes Principales)
PCoA	Principal Coordinates Analysis (Análisis de Coordenadas Principales)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la polimerasa)
PIC	Polimorphic Information Content (Contenido de Información Polimórfica)
p/v	Porcentaje peso por volumen
PVP	Polivinilpirrolidona
RAPDs	Random Amplification of Polimorphic DNA (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SE	Standard Error (Error estándar)

SSR	Simple Sequence Repeats (Secuencias Simples Repetidas)
STR	Short Tandem Repeats (Repeticiones Cortas en Tándem)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismos de Nucleótido Simple)
t	Toneladas
t/ha	Toneladas por hectárea
TBE	Tris-Borato-EDTA
U	Unidades
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética)
UNAP	Universidad Nacional del Altiplano
UNALM	Universidad Agraria La Molina
UNCP	Universidad Nacional del Centro de Perú
UNSAAC	Universidad Nacional San Antonio de Abad de Cusco
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)
UNSCH	Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga
μL	Microlitros
uM	Micro Molar
UV	Ultravioleta
V	Voltios
v/v	Porcentaje volumen por volumen
°C	Grado Celsius

ÍNDICE

ÍNDICE	7
INDICE DE FIGURAS	9
INDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. OBJETIVOS	15
III. HIPÓTESIS	16
IV. ANTECEDENTES	17
4.1. Chenopodium quinoa	17
4.1.1. Clasificación taxonómica.....	17
4.1.2. Origen, domesticación y distribución geográfica.....	18
4.1.3. Diversidad genética del cultivo de quinua.....	19
4.1.4. Importancia de la quinua.....	20
4.1.5. Producción	21
4.2. Marcadores moleculares.....	22
4.2.1. Marcadores moleculares microsatélites (SSR)	23
4.2.2. Marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética de la quinua	25
4.3. Diversidad, variabilidad genética y variación genética.....	30
4.3.1. Riqueza alélica (A).....	31
4.3.2. Proporción de loci polimórficos	31
4.3.3. Heterocigosidad.....	32
4.3.4. Frecuencias alélicas.....	33
4.3.5. Distancias genéticas	33
4.3.6. Índice de fijación (Fst)	34
4.3.7. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC).....	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS	36

5.1.	Identificación de la diversidad genética de 172 accesiones de quinua	36
5.1.1.	Lugar de la investigación	36
5.1.2.	Material biológico	36
5.1.3.	Extracción de ADN genómico.....	36
5.1.4.	Determinación de la calidad y concentración de ADN	37
5.1.5.	Amplificación de SSR a partir de 25 cebadores con cola M13 mediante el método de PCR-multiplexing.....	37
5.1.6.	Genotipificación de fragmentos SSR.....	38
5.1.7.	Análisis de diversidad genética	39
5.1.8.	Agrupamiento mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)..	40
5.1.9.	Determinación del grado de diferenciación genética mediante el índice de fijación de Wright	40
5.1.10.	Identificación de clusters mediante un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC).....	41
VI.	RESULTADOS	42
6.1.	Identificación de la diversidad genética del germoplasma de quinua	42
6.2.	Agrupamiento multivariado mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y determinación del grado de diferenciación genética entre los grupos evaluados	44
VII.	DISCUSIÓN	46
VIII.	CONCLUSIONES.....	51
IX.	RECOMENDACIONES	52
	ANEXOS	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación geográfica de 171 accesiones de quinua evaluadas _____	62
Figura 2: Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular Invitrogen de 1 Kb. _____	70
Figura 3: Porcentaje de alelos exclusivos y compartidos en quinuas de valles interandinos y de altiplano. __	73
Figura 4: Diferencia de la heterocigosidad esperada y observada para cada locus. _____	73
Figura 5: Porcentaje de frecuencias de alelos en quinuas de Valles Interandinos. _____	74
Figura 6: Porcentaje de frecuencias de alelos en quinuas del Altiplano. _____	74
Figura 7: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de 171 accesiones de quinua procedentes de la valles interandinos y del altiplano. _____	75
Figura 8: Valor de BIC de 1 a 20 clusters DAPC. _____	76
Figura 9: Análisis discriminante de componentes principales. _____	77
Figura 10: Probabilidad de pertenencia de cada individuo a los 7 clusters genéticos inferidos en el DAPC. _	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos pasaporte de las accesiones evaluadas _____	63
Tabla 2: Microsatélites seleccionados para el análisis de diversidad genética en <i>Chenopodium quinoa</i> _____	69
Tabla 3: Grupos multiplex, rango de amplificación, temperatura de hibridación y fluoróforo utilizado para cada marcador. _____	71
Tabla 4: Riqueza alélica detectada para cada loci en quinuas de valles interandinos y de altiplano. _____	72

RESUMEN

El cultivo de *Chenopodium quinoa* "quinua" posee un alto potencial genético para contribuir con la seguridad alimentaria en países en vías de desarrollo, por esta razón se encuentra en proceso de revalorización. No obstante, la creciente demanda del cultivo ha centrado su interés en las variedades comerciales, descuidando las variedades nativas de la región andina, lo cual podría ocasionar la pérdida de diversidad. Por tal motivo, es necesaria la investigación de los ecotipos nativos así como su conservación en los bancos de germoplasma con la finalidad de describir la diversidad genética, elucidar la estructura de la población de quinua en nuestro país y dar a conocer el valor del germoplasma. En el presente trabajo se estimó la diversidad genética de los ecotipos de quinua procedentes de valles interandinos y altiplano mediante la genotipificación con 23 marcadores microsatélites mediante un sistema de PCR-Multiplex. Se detectaron 294 alelos en total con un promedio de 12.78 alelos por locus, siendo los ecotipos de valles interandinos los que presentaron un mayor número de alelos exclusivos (60 alelos), por lo tanto esta población presentó mayor riqueza alélica. Asimismo mediante un PCoA, se identificaron dos subpoblaciones de quinua con diferenciación genética moderada ($F_{st}=0.059$), las cuales guardaron relación con la procedencia de las muestras. Finalmente, se identificaron 10 marcadores altamente polimórficos los cuales permitirán la evaluación de la diversidad genética del germoplasma de quinua.

Palabras clave: *Chenopodium quinoa*, germoplasma, altiplano, valles interandinos, microsatélites, diversidad, F_{st} .

ABSTRACT

Chenopodium quinoa “quinoa” has a high genetic potential to contribute to food security in developing countries, therefore it is in a valorization process. However, the growing demand has focused his interest in the cultivation of commercial varieties, neglecting the native varieties of the Andean region, which could lead to loss of diversity. Therefore, it is necessary the research of native ecotypes and its conservation in genebanks in order to describe the genetic diversity also elucidate the structure of the population of quinoa in our country and publicize the value of its germplasm. In this study the genetic diversity andean valleys and highland quinoa ecotypes was determined by genotyping 23 microsatellite markers using a PCR-Multiplex system. A total of 294 alleles were detected with an average of 12.78 alleles per locus, where the valleys ecotypes showed a greater number of private alleles (60 alleles), i.e. a higher allelic richness. In addition, using PCoA, two subpopulations of quinoa with moderate genetic differentiation ($F_{st} = 0.059$) were observed which were related to the origin of the samples. Finally, 10 highly polymorphic loci were identified, which will allow the evaluation of the genetic diversity of quinoa germplasm.

Keywords: *Chenopodium quinoa*, germplasm, highland, Andean valleys, microsatellites, diversity, F_{st} .

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de “quinua” *Chenopodium quinoa* Willd. tiene como centro de origen y domesticación la región de los Andes, considerándose las orillas del Lago Titicaca como la zona de mayor diversidad y variación genética. El cultivo posee características intrínsecas sobresalientes como una amplia variabilidad y adaptabilidad, una excelente calidad nutritiva siendo el único alimento vegetal que posee todos los aminoácidos esenciales, además de poseer diversas formas de utilización y bajo costo de producción al ser un cultivo poco exigente. Por ende, el cultivo de quinua tiene un alto potencial para contribuir con la seguridad alimentaria en los países en vía de desarrollo que enfrentan problemas de desnutrición como es el caso de Perú.

La diversidad del cultivo de quinua ha logrado mantenerse gracias a las tradiciones y conocimientos ancestrales de las comunidades campesinas. Sin embargo, en los últimos años el incremento exponencial de la demanda del mercado ha ocasionado que los agricultores se centren en el cultivo de variedades comerciales, lo cual puede ocasionar pérdida de diversidad genética e incremento de homocigosis en las poblaciones originando una reducción en la capacidad de la población a adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Asimismo, hay una falta de conocimiento del potencial que presentan los ecotipos nativos.

En el Perú, el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) tiene a su cargo el banco de germoplasma *ex situ* de quinua en la Estación Experimental Illpa (Puno), la cual cuenta con 1952 accesiones, incluyendo una colección nacional de 1634 entradas procedentes de diferentes zonas del Perú. Una de las funciones principales del banco de germoplasma es conservar genotipos debidamente caracterizados mediante descriptores morfológicos y marcadores moleculares. No obstante, hasta la actualidad no se ha realizado la caracterización molecular del banco de germoplasma de INIA.

Por esta razón, es necesario establecer un grupo de marcadores moleculares que permitan la caracterización del germoplasma, y teniendo como base la caracterización morfológica, se pueda elaborar la colección núcleo del cultivo de quinua, la cual representará el acervo genético del cultivo incluyendo la diversidad genética de la especie cultivada y sus parientes silvestres.

En este contexto, el objetivo de esta investigación fue determinar la diversidad genética de 172 accesiones de la Colección Nacional de *Chenopodium quinoa* Willd. “quinua” mediante marcadores microsatélites.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar la diversidad genética de 172 accesiones de *Chenopodium quinoa* “quinua” mediante marcadores microsatélites.

Objetivos específicos

- Identificar la diversidad genética de 172 accesiones de quinua.
- Realizar un agrupamiento multivariado mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA).
- Determinar el grado de diferenciación genética entre los grupos identificados.

III. HIPÓTESIS

- Las 172 accesiones de la colección nacional de *Chenopodium quinoa* presentan variabilidad genética entre genotipos y se diferencian en subpoblaciones.

IV. ANTECEDENTES

4.1. *Chenopodium quinoa*

4.1.1. Clasificación taxonómica

El género *Chenopodium* posee más de 120 especies (Fuentes *et al.* 2009, citado de Aellen y Just, 1929), siendo *Chenopodium quinoa* la especie más importante desde el punto de vista económico. La quinua fue descrita por primera vez, en sus aspectos botánicos por Carl Ludwig Willdenow en 1778 y fue considerada como parte de la familia Chenopodiaceae. Sin embargo, de acuerdo al Sistema de Clasificación APG III (2009), por sus siglas en inglés *Angiosperm Phylogeny Group*, se clasificó a las Chenopodiaceae como subfamilia de la Familia Amaranthaceae en base a datos moleculares.

Clasificación taxonómica según NCBI, 2014:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliposida
Orden	:	Caryophyllales
Familia	:	Amaranthaceae
Subfamilia	:	Chenopodioideae
Género	:	<i>Chenopodium</i>
Especie	:	<i>Chenopodium quinoa Willd.</i>

Los nombres comunes de la quinua son: kinua, parca, quiuna (quechua); supha, jopa, jupha, jiura, aara, ccallapi y vocali (aymara); suba y pasca (chibcha); quingua (mapuche); quinoa, quinua dulce, dacha, dawé (araucana); jupa, jara, jupalukhi, candonga, licsa, quiñoa (Mujica & Jacobsen 2006).

4.1.2. Origen, domesticación y distribución geográfica

Chenopodium quinoa es una especie alotetraploide ($2n=4x=36$ cromosomas) la cual se originó a partir de dos especies diploides ($2n=18$ cromosomas) hasta el momento no identificadas. Sin embargo, mediante análisis moleculares se ha podido determinar que uno de los sub genomas proviene de América y el otro de Euroasia (Jellen, *et al.* data no publicada).

La quinua puede considerarse como una especie oligocéntrica, con centro de origen de amplia distribución y múltiple diversificación, siendo las orillas del lago Titicaca la zona de mayor diversidad y variación genética (Gandarillas, 1979; Mujica, 1992; Pearsal, 1992) por lo tanto esta región es considerada como el centro de origen de la quinua. Con aproximadamente 7.000 años de cultivo (Jacobsen, 2003) han sido partícipes en su domesticación y conservación, culturas como Tiahuanacota e Incaica (Bonifacio *et al.*, 2001). Parte de esta domesticación permitió el incremento del tamaño de la planta y semilla, la condensación de la inflorescencia en el extremo terminal, el cambio de pigmentación en la semilla, entre otras modificaciones morfológicas. Sin embargo, a pesar de ser una especie domesticada, los frutos todavía contienen saponina, por lo que es necesaria su eliminación antes de ser consumidos (Mujica, 1992; Heisser y Nelson, 1974).

En cuanto a la distribución geográfica de la quinua, según Lescano (1994), Rojas (1998) y Mujica & Jacobsen (2006) el cultivo se extiende desde los 5° Latitud Norte al sur de Colombia hasta los 43° Latitud Sur en la Décima

Región de Chile pudiendo encontrarse en Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina. La distribución altitudinal varía desde el nivel del mar en Chile hasta los 4000 m.s.n.m. en el altiplano de Perú y Bolivia. En la actualidad, el cultivo tiene distribución mundial y puede ser encontrado desde Norteamérica y Canadá, hasta Europa, Asia y África obteniendo resultados aceptables en cuanto a producción y adaptación. (Mujica *et al.*, 2001).

4.1.3. Diversidad genética del cultivo de quinua

El área de mayor diversidad del cultivo de quinua es el altiplano peruano- boliviano, principalmente en las aynokas, los cuales son sistemas ancestrales de organización campesina, conservación *in situ* y producción que contienen la mayor diversidad genética de la especie y de sus parientes silvestres (Mujica & Jacobsen, 2006). Sin embargo, en los últimos años su utilización ha ido disminuyendo (Ichuta y Artiaga, 1986), como consecuencia de la incorporación de nuevas tecnologías y variedades obtenidas y difundidas por los fitomejoradores e investigadores, las cuales son más rendidoras en condiciones óptimas de producción (Mujica *et al.*, 2001).

De acuerdo a Lescano (1989) y Tapia (1990) se pueden distinguir cinco grupos de quinuas según las condiciones agroecológicas en donde se desarrollan: quinuas de nivel de mar o costa (Chile), de valles interandinos (Colombia, Ecuador y Perú), de altiplano (Perú y Bolivia), salares (Bolivia, Chile y Argentina) y de las Yungas (Bolivia) en las cuales se observan características botánicas, agronómicas y de adaptación diferentes.

Dentro de las quinuas cultivadas existen gran variabilidad genética y fenotípica que puede ser reconocida fácilmente por la pigmentación de la planta, inflorescencia, grano, diversidad de precocidad, contenido de aminoácidos, ácidos grasos, saponina, betacianina en las hojas, tamaño de grano, resistencia a factores adversos como sequía, heladas, exceso de humedad, salinidad, enfermedades entre otros. Esta variabilidad le confiere a la especie una amplia adaptación a diferentes condiciones agroecológicas. La sobrevivencia de los cultivos andinos ha sido posible por las comunidades campesinas que habitan la zona, quienes en base a sus tradiciones y conocimientos ancestrales sobre el manejo y utilización de estas especies, han logrado evitar su pérdida definitiva (FAO, 2011). Sin embargo, la erosión genética y pérdida irreversible de genotipos es un problema crítico al cual nos enfrentamos debido a la difusión de variedades mejoradas, falta de apoyo gubernamental, así como por el agobio de la pobreza y migración característica del páramo altiplánico (Mujica *et al.*, 2001).

Por tal motivo, una de las metodologías para proteger esta diversidad genética es la conservación *ex situ* en bancos de germoplasma. En América Latina desde la década de 1960, se han formado bancos de germoplasma *ex situ* de quinua, con la finalidad de conservar, caracterizar, documentar y utilizar los recursos genéticos, apoyado por instituciones nacionales e internacionales (Fairbanks 2007, Fuentes 2006).

Christensen *et al.* (2007) estimaron que existen aproximadamente 5000 variedades domesticadas de quinua mantenidas en colecciones alrededor del mundo, incluyendo 2700 en Bolivia, 1029 en Perú, 232 en el NPGS del USDA, y un grupo de accesiones no documentadas en Chile, Argentina, Ecuador y Colombia.

En el Perú existen diferentes bancos de germoplasma en las EEA del INIA como Illpa (Puno), K'ayra y Andenes (Cusco), Canáan (Ayacucho), Mantaro y Santa Ana (Huancayo) y Baños del Inca (Cajamarca) dentro de las cuales, la EEA Illpa que cuenta con 1952 accesiones y una colección nacional con 1634 accesiones, es considerada como la colección más importante del país. Asimismo, algunas universidades como la Universidad Nacional Agraria La Molina de Lima (UNALM), Universidad Nacional del Centro de Perú en Junín (UNCP), Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga de Ayacucho (UNSCH), Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), y Universidad Nacional del Altiplano de Puno (UNAP) (Mujica,1992; Bonifacio *et al.*, 2004) también conservan germoplasma de quinua.

4.1.4. Importancia de la quinua

Chenopodium quinoa es una planta anual, dicotiledónea, considerada como un cultivo promisorio frente al cambio climático ya que se adapta fácilmente a condiciones agroecológicas adversas como climas desérticos, calurosos y secos, suelos con elevada concentración de sales o baja disponibilidad de agua tolerando temperaturas desde -4°C hasta 38°C (Christensen, *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2008; Bioversity International, FAO, PROINPA, INIAF y FIDA, 2013). Asimismo, uno de los aspectos más importantes y reconocidos de esta especie es la calidad nutritiva del grano, hojas e inflorescencias, ya que

es considerado como el único alimento de origen vegetal que contiene un balance adecuado de todos los aminoácidos esenciales para el hombre (FAO, 2011). Al respecto, Risi (1991) señala que el balance de los aminoácidos esenciales de la proteína de la quinua es superior al trigo, cebada y soya, comparándose favorablemente con la proteína de la leche. Adicionalmente, la especie cuenta con una proporción adecuada de minerales, ácidos grasos, vitaminas y no contiene gluten, por lo que es un alimento ideal para las personas celíacas (FAO, 2011; Zurita-Silva *et al.*, 2014). Otro aspecto importante es el contenido de pigmentos como la betalaína, la cual confiere a la planta la coloración característica, y puede ser utilizada como tinte natural; también es importante mencionar la presencia de saponinas, las cuales pueden ser utilizadas en la fabricación de champú y detergentes, así como en la industria farmacéutica contra el colesterol (Jacobsen & Mujica, 2001). Debido a las características sobresalientes del cultivo, la quinua es considerada por la FAO como un cultivo valioso para garantizar la seguridad alimentaria de la población y así permitir que ésta tenga acceso a alimentos de buena calidad. Finalmente, debido a la importancia de este cultivo en la última década ha incrementado el interés entre agricultores, empresas agroindustriales e instituciones (Mujica & Jacobsen, 2006; FAO, 2011).

4.1.5. Producción

Los países con mayor producción de quinua son Bolivia, Perú y Ecuador. Sin embargo, debido a la creciente demanda por sus cualidades extraordinarias, la producción de quinua se encuentra en proceso de expansión hacia diferentes países del mundo (FAO, 2011).

En el Perú, destacan como zonas productoras Cajamarca, el Callejón de Huaylas, el Valle del Mantaro, Andahuaylas, Cusco y Puno (Rojas *et al.*, 2010). Durante el 2012, Puno concentró alrededor del 68% de la producción nacional de quinua, seguido de un 27 % por Ayacucho, Cusco, Apurímac, Junín y Arequipa, de los cuales los dos últimos presentaron los más altos rendimientos de t/ha. En cuanto a Puno, siendo éste el principal productor, el 15% del total de quinua es destinada para consumo, el 35% para el mercado local y el 50% para el mercado externo (Estrada, 2012 citado de MINAG).

Los principales países productores de quinua en la región Andina y en el mundo son Perú y Bolivia, los cuales hasta el año 2008 representaban el 90% de la quinua producida en el mundo (FAO, 2011 citado de Suca Apaza & Suca Apaza, 2008). En tercer lugar se encuentra Estados Unidos seguido por Ecuador y Canadá con alrededor del 10% de los volúmenes globales de producción. En el 2009 la producción de la región Andina se acercó a las 70.000 t, con casi 40.000 t producidas por el Perú (FAO, 2011). Asimismo, en nuestro país, según el MINAG entre los años 2003 y 2012 la producción de quinua se incrementó de 30 a 44 mil toneladas (46.3%), esto debido al aumento del área cosechada y a una mayor productividad en respuesta a la creciente demanda nacional e internacional. Por otro lado, Bolivia es el primer exportador de quinua a nivel mundial seguido por Perú y Ecuador. En el 2007, Perú exportó aproximadamente 400 t de quinua en grano con valores equivalentes a US\$ 552 mil. El principal destino de la quinua peruana es Estados Unidos, seguido por Alemania, Canadá, Israel, Ecuador, Japón, Australia, Nueva Zelanda, Suecia y Francia (Estrada, 2012).

4.2. Marcadores moleculares

Existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares (Azofeita, 2006 citado de Tanksley, 1983). En la actualidad, como parte de las metodologías empleadas en la conservación de germoplasma, la identificación y clasificación de individuos se realiza con marcadores morfológicos, también llamados descriptores (Bioversity International, FAO, PROINPA, INIAF y FIDA, 2013; Martínez, *et al.*, 2010).

Éstos permiten un muestreo taxonómico mucho más cuidadoso y son de importancia en revisiones sistemáticas, estudios de evolución del carácter y valoración filogenética (Rentarúa, 2007). Sin embargo, su utilización tiene algunas desventajas importantes a considerar ya que su expresión puede verse influenciada por factores ambientales, y es necesario evaluar a los individuos durante todo su ciclo vegetativo, lo cual puede tomar un tiempo considerable (Azofeita, 2006; Veramendi, 2006). En contraste, los marcadores moleculares ya sean marcadores bioquímicos (principalmente basados en isoenzimas) o de

ADN, son fenotípicamente neutros y presentan mayor polimorfismo que los marcadores morfológicos lo cual permite discriminar genotipos estrechamente emparentados. Además éstos pueden ser evaluados en cualquier estado de la planta, a partir de cualquier material vegetal y se encuentran libres de los efectos epistáticos (Azofeita, 2006, Martínez *et al.*, 2010).

Los marcadores moleculares son utilizados para la estimación de la diversidad genética, formación de colecciones núcleo, verificación de identidad genética y monitoreo de cambios naturales y artificiales dentro de las colecciones, estudios de relaciones filogenéticas entre el germoplasma y especies silvestres relacionadas, estudios de parentesco, identificación de cultivares, detección de genes ligados a una característica de interés, y en la construcción de mapas genéticos (Aranguren *et al.*, 2004; Rentarúa, 2007, Christensen, *et al.*, 2007). Dentro de los marcadores moleculares de ADN existen distintos tipos, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998). Un marcador molecular de ADN ideal deberá tener una amplia distribución en el genoma, además permitirá evidenciar un alto grado de polimorfismo utilizando mínimas concentraciones de ADN, la metodología deberá ser rápida, práctica, de bajo costo y reproducible con fiabilidad entre laboratorios (Aranguren *et al.*, 2004).

Finalmente, es importante considerar ambas metodologías para el manejo de germoplasma y así potenciar las estrategias en la conservación. (Ortiz, 2002; Tamayo, 2010).

4.2.1. Marcadores moleculares microsatélites (SSR)

Los microsatélites, también llamados SSR o STR son secuencias de ADN constituidas por motivos repetidos que pueden ser de 1 a 6 pares de bases y con una extensión de 5 hasta 30 repeticiones en tándem (Litt & Luty, 1989; Buschiazzo, 2008 citado de Hancock, 1999). Estas repeticiones pueden ser mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, y hexanucleótidas (Ellegren, 2004). Adicionalmente, de acuerdo al patrón de las repeticiones, Weber (1990) clasificó a los microsatélites como:

- **Simple perfecto:** El mismo motivo repetido “n” veces. Ej: [AGG]_n
- **Simple imperfecto:** El motivo repetido es interrumpido por diferentes nucleótidos que no se repiten. Ej: [AGG]_n[ACT][AGG]_{n+12}
- **Compuestos perfectos:** Dos o más motivos repetidos en tandem. Ej: [AGG]_n[AATC]_{n+1}
- **Compuestos imperfectos:** Los motivos repetidos en tandem son interrumpidos por diferentes nucleótidos. Ej: [GGAT]_n[ACT][GTAA]_{n+1}

Los microsatélites se encuentran distribuidos en todo el genoma, mayormente en regiones no codificantes (Aranguren *et al.*, 2004 citado de Goldstein & Schlotterer, 1999). Algunas de sus funciones están relacionadas con la organización de la cromatina, el control de algunos procesos metabólicos como la replicación del ADN y la regulación de la actividad de algunos genes (Li *et al.*, 2002). Asimismo, son de naturaleza codominante rigiéndose bajo las leyes de herencia mendeliana, lo cual permite la distinción de genotipos homocigotos y heterocigotos (Aranguren *et al.*, 2004; Rentarúa, 2007). Además, debido a su elevada tasa de mutación son altamente polimórficos (Ellegren, 2004). A pesar de este elevado polimorfismo, las regiones flanqueantes, las cuales se ubican a cada extremo del microsatélite, son altamente conservadas y permiten la amplificación específica de los alelos en una misma especie o en especies emparentadas, con aproximadamente 76% de transferibilidad dentro del mismo género y cerca de 90% dentro del mismo subgénero (Frankham *et al.*, 2002; Rentarúa, 2007; Pfeiffer, *et al.*, 2011). Su detección se basa en la amplificación por PCR empleando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes (Frankham *et al.*, 2002). No obstante, una de las mayores desventajas es la necesidad de conocer el genoma de la especie a evaluar, lo cual involucra técnicas complejas y costosas (Frankham *et al.*, 2002; Mason *et al.*, 2005 citado de Maughan *et al.*, 1995, Pfeiffer, *et al.*, 2011). Asimismo, en la mayoría de los casos es necesario utilizar metodologías de alta resolución (geles de secuenciamiento) para la separación de fragmentos, lo cual puede incrementar el presupuesto necesario para el ensayo (Frankham *et al.*, 2002; Gonzáles, 2009 citado de Powell, *et al.*, 1996). Por otro lado, puede haber homoplasia de alelos en donde éstos presentan el mismo tamaño de fragmento pero con diferencias en las

secuencias debido a inserciones y/o deleciones, cambios de bases o variaciones en la región flanqueante, lo cual hace que el investigador considere que se trata del mismo alelo. La solución a este inconveniente involucraría la utilización de HRM o el secuenciamiento de los alelos, pero esto convertiría el uso de SSRs en una metodología no rentable para el laboratorio (Frankham *et al.*, 2002; Aranguren *et al.*, 2004 citado de Primmer y Ellergren, 1998; Robinson & Harris, 1999).

4.2.2. Marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética de la quinua

Una de las primeras investigaciones en quinua fue realizada por Wilson (1988) al construir el primer árbol filogenético de especies del género *Chenopodium* basado en datos morfológicos y 6 loci de isoenzimas con las cuales evaluó 98 accesiones. Su investigación sugirió que el centro de la diversidad de la quinua se encuentra en el sur del altiplano andino. Asimismo, las accesiones de quinua evaluadas se separaron en dos grupos principales: quinuas del altiplano y costeras. Finalmente, reportó que el origen de domesticación de la quinua se ubicaba posiblemente entre la región peruano-boliviana con las consiguientes dispersiones hacia el norte y sur.

Posteriormente, Ruas *et al.* (1999) fueron los primeros en utilizar marcadores moleculares en quinua al utilizar RAPDs con el objetivo de detectar polimorfismos de ADN en 19 accesiones de 6 especies del género *Chenopodium* incluyendo a *C. quinoa*. En base a los resultados de 399 marcadores construyeron un dendograma que tuvo 5 grupos principales, donde el segundo grupo incluyó a 8 cultivares y 2 variedades silvestres de *C. quinoa*. Asimismo, determinaron un bajo nivel de variación intraespecífica entre *C. quinoa* y las especies silvestres *C. nuttalliae* y *C. pallidicaule*.

Años después, Maughan *et al.* (2004) desarrollaron el primer mapa de ligamiento genético, basando en 80 individuos F2 del cruce entre 4 progenitores representando dos grandes ecotipos: ecotipo Chileno (accesión “Ku-2” y “NL-6”) y ecotipo del Altiplano (incluyendo

la accesión de Perú “0654” y “Chupacapa”). Para la construcción del mapa se utilizaron 230 marcadores AFLP, 6 RAPDs y 19 SSR, estos últimos de importancia para futuras investigaciones a nivel molecular en quinua.

En el 2005, Mason *et al.* identificaron 208 SSR polimórficos en 31 accesiones de quinua de los ecotipos altiplano y costero. Inicialmente secuenciaron un total de 1276 clones a partir de 3 librerías enriquecidas con microsatélites (CA, AAT y ATG) de los cuales un 36% de éstos presentaron SSR únicos. Asimismo, diseñaron 397 cebadores para loci de SSR los cuales fueron analizados con un panel de accesiones de *C. quinoa* y una accesión *C. berlandieri* de los cuales un 52% fueron polimórficos dentro de las accesiones de *C. quinoa*. Sin embargo, al incluir a *C. berlandieri* en el análisis, un 6% adicional de los cebadores se mostró polimórfico. Por otro lado, el número de alelos observados fue de 2 a 13 alelos por locus con un total de 818 alelos detectados, mientras que los valores de heterocigosidad se encontraron entre 0.20 a 0.90 donde un 32% fue altamente polimórfico ($H \geq 0.70$). Asimismo, identificaron que las repeticiones más vistas además de CA, AAT y ATG fueron GA y CAA. Sin embargo, indican que la repetición AAT es más prevalente en el genoma de quinua que CA o ATG. Finalmente reportan la cercana relación de *C. quinoa* y *C. berlandieri nuttaliae*, debido a que un 99.5% de los cebadores amplificaron productos específicos en *C. berlandieri nuttaliae*.

A partir de esta investigación Christensen *et al.* (2007) utilizaron 32 de los SSR identificados por Mason *et al.* (2005) y 4 SSR por Maughan *et al.* (datos no publicados) para evaluar la diversidad genética de 152 accesiones de las colecciones de USDA y CIP-FAO quienes desarrollaron un set de microsatélites marcados con fluorescencia los cuales podrían ser utilizados para caracterizar la diversidad genética dentro del germoplasma de quinua. A partir de la caracterización se detectaron 420 alelos, con un rango de 3 a 27 alelos por locus y con un promedio de 11 alelos por locus. Por otro lado, reportaron una heterogeneidad genética en el 32% de las accesiones en un locus dado lo cual sugiere que muchas de estas accesiones representan lotes heterogéneos de semillas o variedades nativas.

A partir de un análisis UPGMA y análisis de componentes principales se dividió a las accesiones en dos grandes grupos. El primer grupo consistió en las accesiones del altiplano de Perú, Bolivia, Ecuador, Argentina, y del noreste de Chile. Mientras que el otro grupo

incluyó a las accesiones de la zona costera de Chile y las accesiones de las cuales no se contaba con información de procedencia.

Paralelamente, Del Castillo *et al.* (2007) mediante RAPDs cuantificaron la estructura jerárquica de la variación genética presente en 8 poblaciones *in situ* de quinua incluyendo las formas cultivadas y silvestres, representando el altiplano y los valles interandinos de Bolivia. Los resultados mostraron una fuerte estructura poblacional y una alta variación intrapoblacional. Esta estructuración genética observada se debe probablemente al aislamiento de las poblaciones no solo por la distancia geográfica sino debido a barreras climáticas y orográficas presentes en la zona estudiada. Además esto es reforzado por el limitado intercambio de semillas entre los agricultores. Asimismo, determinaron que la estructura genética está formada por tres grandes zonas biogeográficas: el norte y centro de altiplano, los valles interandinos y el sur salar. Por otro lado, determinaron que no había una diferencia significativa entre la diversidad genética de las formas silvestres y cultivadas de quinua con índices $He=0.288$ y 0.311 respectivamente. Adicionalmente, tampoco observaron una diferencia significativa entre las ecorregiones. Además, en base a sus resultados, afirman que las actuales colecciones de germoplasma no serían representativas de la variación genética de la quinua y que es necesario un mayor muestreo para la conservación de quinuas *ex situ*.

Posteriormente, Jarvis *et al.* (2008) reportó el desarrollo de 216 nuevos SSR y un nuevo mapa de ligamiento basado en una población consanguínea recombinante utilizando SSRs, AFLPs, la región de almacenamiento de proteína en semilla (11S) y la región organizadora nucleolar (NOR). Se secuenciaron un total de 1172 clones donde el 37% (436) contenían SSR únicos, dentro de los cuales 402 eran adecuados para el diseño de cebadores. Al igual que Mason *et al.* (2005) las repeticiones más comunes fueron GA, CAA y AAT. Por otro lado, de los 402 SSR, 216 se mostraron polimórficos en siete accesiones de quinua, mientras que al incluir a *C. berlandieri* se observó un 4.7% adicional de polimorfismo. Los valores de He para estos marcadores se encontraron entre 0.12 y 0.90.

En el 2008, Fuentes *et al.* utilizaron 20 SSR di o trinucleótidos reportados previamente por Mason *et al.* (2005) y Jarvis (no publicado) con los cuales desarrollaron 7 sets de marcadores SSR fluorescentes para un sistema multiplex, los cuales permitieron el análisis

de la diversidad genética de 59 accesiones del germoplasma chileno de quinua. La selección de los 20 SSR se basó en los niveles de heretocigosidad, reproducibilidad y calidad de amplificación. El estudio dio como resultado 150 alelos con rango de 2 a 20 alelos por locus. Mediante un análisis de componentes principales y de cluster, se determinó que dentro de los dos grandes grupos de accesiones, las quinuas costeras presentan mayor diversidad que las de altiplano, observándose un 28.6% de alelos únicos en las accesiones del altiplano y en las costeras un 50%. Mientras que ambos grupos compartieron un 21.3% de alelos, por lo que pudieron concluir una reducida diversidad en las quinuas del norte de Chile.

Posteriormente, Gonzáles, S. (2009) analizó el flujo de genes entre quinuas cultivadas, quinuas maleza y quinuas silvestres con 8 marcadores SSR utilizando el método de cola M13. En la mayoría de loci se observaron alelos compartidos entre los tres grupos. Sin embargo, el polimorfismo SSR mostró una clara diferenciación genética entre las poblaciones silvestres y cultivadas, y una gran afinidad entre las quinuas mallas (malezas) y silvestres. Estos resultados demostraron que la diversidad genética de la quinua es dinámica, confirmando la hipótesis de flujo genético espontáneo en campo de agricultores.

Por otro lado, Tamayo, L. (2010) realizó la caracterización inter e intragenotípica de 16 accesiones de quinua con 10 marcadores ISSR. Mediante el método de UPGMA identificó la agrupación de las muestras en 3 clusters con un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.79. El primer grupo incluyó 12 accesiones de Puno, Cusco, Cajamarca y Arequipa. El segundo, incluyó 2 accesiones de Ancash y el tercero incluyó 2 accesiones de Puno y Arequipa. Los resultados de este estudio sugieren que las accesiones de quinua provenientes de los departamentos de Puno, Cusco y Arequipa, presentarían mayor disimilitud genética, amplia variabilidad y probablemente heterogeneidad. En cuanto a la caracterización intragenotípica, los departamentos que presentaron menor polimorfismo fueron: Ancash (23.34%) y Cajamarca (22.03%) lo cual según indica el autor podría significar que los individuos pertenecientes a una misma accesión no son iguales genéticamente, probablemente debido a una mayor polinización cruzada, intercambio de genes o mezcla de semillas. Finalmente, las accesiones de los departamentos de Puno, Arequipa y Cusco presentaron un polimorfismo promedio de 35.30%, 33.89% y

31.90% respectivamente. Esto indicaría que existe una mayor variabilidad genética y un intercambio de genes constante entre y dentro de los cultivares de quinua en esta región.

Más adelante, en el año 2012 Maughan *et al.* reportaron 14.178 SNPs de los cuales identificaron 511 SNPs funcionales y desarrollaron el primer mapa de ligamiento en base a estos marcadores. Con la finalidad de evaluar la informatividad y utilidad de los SNPs, analizaron 113 accesiones de quinua pertenecientes al CIP, USDA así como 8 accesiones adicionales representando al género *Chenopodium*. Asimismo, mediante un PCoA confirmaron la agrupación de las accesiones en los dos ecotipos evaluados: quinuas de la costa chilena y ecotipos de la región andina. Finalmente reportaron que los SNPs identificados podrían ser una herramienta importante para los programas emergentes de mejoramiento genético en quinua.

Paralelamente, Costa *et. al* (2012) caracterizaron molecularmente 51 poblaciones de quinua, de las cuales 34 fueron nativas del noroeste argentino (NOA), y 17 constituyeron poblaciones extranjeras incluyendo quinuas del sur de Chile, costa del Lago Titicaca, altiplano de Perú y Bolivia, valles de Ecuador y el ecotipo Real del sur de Bolivia. La finalidad fue determinar la magnitud y distribución de la variabilidad genética actual de la quinua en la región del NOA, además de las relaciones genéticas entre las poblaciones evaluadas. En el estudio, detectaron 283 alelos entre los 11 loci analizados con un PIC promedio de 0.88 resultando todos los marcadores altamente polimórficos y con un promedio de 22 alelos por locus. Además observaron una alta diversidad genética ($H_e=0.355$, $SE=0.034$) en las quinuas del NOA. Sin embargo el valor de diversidad entre las poblaciones extranjeras fue más alto ($H_e= 0.410$, $SE= 0.057$). Adicionalmente realizaron un AMOVA separando las poblaciones según su procedencia y el resultado mostró una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones ($F_{st}=0.594$) y de las mismas dentro de las regiones ($F_{st}=0.497$). Mediante un agrupamiento UPGMA, determinaron que la distancia genética promedio fue 0.86 agrupando a las poblaciones en cinco clusters según su ambiente de procedencia. Cabe resaltar que las quinuas de las orillas del lago Titicaca, altiplano norte del Perú, Ecuador y las de la zona de transición entre el valle y la quebrada del NOA se concentraron en dos clusters.

4.3. Diversidad, variabilidad genética y variación genética

La diversidad genética se puede definir como la variedad de alelos y genotipos presentes en una población, una especie o un grupo de especies (Frankham *et al.*, 2002). Esta diversidad toma en consideración a la variabilidad que existe, siendo ésta el potencial que tiene una especie para experimentar variación genética en sus individuos (Gorgonio, 2012; Ponce, 2013). Asimismo, la variación genética puede definirse como la presencia de diferencias en los individuos pertenecientes a una población, lo cual provee la base para que ocurra selección natural y permite que una población se adapte a los cambios en su entorno (Bader, 1998; Frankham *et al.*, 2002). Para que la selección natural pueda actuar sobre un carácter, este debe ser lo suficientemente variable de tal modo que se elija al más adecuado (Ponce, 2013). Esta variación se origina principalmente por medio de mutaciones puntuales, inserciones o deleciones, y debido a la recombinación producida en la meiosis, a partir de lo cual las frecuencias de los alelos van a cambiar debido a la migración, selección y deriva genética (Frankham, *et al.*, 2002; Gorgonio, 2012). Por tal motivo, se considera que la variación genética y la variabilidad son la base para que los organismos presenten diversidad genética lo cual contribuye a que exista una diversidad de especies (Gorgonio, 2012).

La diversidad genética puede ser medida utilizando una serie de métodos moleculares y cuantitativos, y es típicamente descrita utilizando polimorfismos, heterocigosidad promedio y diversidad alélica (Frankham *et al.*, 2002).

El conocimiento y entendimiento de las variaciones en la diversidad genética es utilizado para evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies frente a los cambios ambientales naturales o provocados por actividades antropogénicas; además, permiten evaluar los riesgos de la pérdida de especies y/o poblaciones y conocer la riqueza genética y su distribución en un área geográfica en particular (Piñero, *et al.*, 2008). La pérdida de diversidad con el paso del tiempo es señal de que está ocurriendo un proceso de endogamia en la población, y ésta puede estar perdiendo su potencial evolutivo (Frankham *et al.*, 2002). Por tal motivo, el estudio de la diversidad genética permite plantear estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones y especies, así como comprender las

causas, forma y velocidad de la pérdida de variabilidad genética, como también evaluar los riesgos de introducción de plagas, enfermedades y especies mejoradas genéticamente sobre las poblaciones y especies nativas (Piñero, *et al.*, 2008).

4.3.1. Riqueza alélica (A)

La riqueza alélica o también llamada diversidad alélica, es una medida fundamental de variación genética y es utilizada para identificar que poblaciones conservar (Kalinowski, 2004). La estimación de la riqueza alélica proporciona información de la diversidad de una población mediante la identificación de alelos exclusivos o privados y compartidos entre las poblaciones (González, 2011). Cuando hay más de un locus, la diversidad alélica es el número de alelos promedio en todos los loci (Frankham *et al.*, 2002). Asimismo, Marshall y Brown (1975) sugieren que se puede reconocer cuatro clases de alelos: a) comunes, ampliamente distribuidos, b) comunes, localmente distribuidos, c) raros, ampliamente distribuidos, d) raros, localmente distribuidos.

4.3.2. Proporción de loci polimórficos

Un locus es considerado polimórfico en una población dada, si éste presenta más de un alelo, teniendo el alelo más común una frecuencia menor a 0.99 o menor a 0.95. Por lo tanto, un locus será monomórfico si solo tiene un alelo presente en la población (Frankham, *et al.*, 2002). La proporción de loci polimórficos se calculará mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\text{número de loci polimórficos}}{\text{número de loci evaluados}}$$

4.3.3. Heterocigosidad

Constituye la proporción de individuos heterocigotos en una población (Ponce, 2013). Un valor de heterocigosidad alto significa que existe una elevada diversidad alélica presente en la muestra analizada (Butler, 2005). Puede ser dividida en los siguientes indicadores (Ponce, 2013):

- **Heterocigosidad observada (Ho)**: Es la proporción de individuos heterocigotos observados entre el total de individuos evaluados en un locus determinado (Frankham *et al.*, 2002; González, 2011).
- **Heterocigosidad esperada (He)**: También conocida como diversidad genética de Nei (1973). Es la probabilidad de que en un locus único, cualquier par de alelos elegidos al azar, sean diferentes entre sí; y es estimada a partir de la sumatoria de las frecuencias obtenidas para cada uno de los alelos bajo la suposición de estar en equilibrio de Hardy- Weinberg (Gorgonio, 2012). Generalmente la He es reportada para describir la diversidad genética de un locus, ya que ésta se ve menos influenciada por el tamaño de muestra que la Ho (Frankham *et al.*, 2002).

La heterocigosidad se calcula según el número de alelos presentes en un locus de la siguiente manera:

-Para un locus con dos alelos:

$$He = 1 - p^2 - q^2$$

Donde: p y q corresponden a las frecuencias alélicas elevadas al cuadrado.

-Para un locus con más de dos alelos:

$$He = 1 - \sum_{i=1}^{No. \text{ de alelos}} p_i^2$$

Donde: p_i es la frecuencia del i-ésimo alelo.

4.3.4. Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas pueden ser definidas como la frecuencia de un alelo en una población dada (Frankham *et al.*, 2002). Generalmente las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones de una misma especie van a ser diferentes debido a las fuerzas evolutivas a lo largo del tiempo (Eguiarte *et al.* 2010). Estas diferencias constituyen la estructura genética de una especie, y pueden ser descritas mediante las frecuencias alélicas, el número de alelos y la heterocigosidad (Frankham *et al.*, 2002). Cuando se habla de una especie con alta estructura genética quiere decir que se puede identificar una diferencia en las frecuencias alélicas entre las poblaciones que la integran mientras que una especie con baja estructura genética nos indica que las poblaciones que la constituyen son casi idénticas con nulas o muy pocas diferencias en sus frecuencias alélicas (Eguiarte *et al.* 2010). En especies diploides, la frecuencia de alelos codominantes puede ser obtenida por recuento de los diferentes genotipos, sin necesidad de asumir que en la población hay un apareamiento al azar, entre otras condiciones. En contraste, en especies poliploides, la presencia de más de dos alelos por individuo y el patrón complejo de herencia que presentan, otorga diferentes problemas al estimar las frecuencias alélicas, por lo que es necesario aplicar algoritmos para que éstas puedan ser inferidas (De Silva, *et al.*, 2005).

4.3.5. Distancias genéticas

La distancia genética mide el grado de diferenciación entre poblaciones de una misma especie o entre especies, pudiendo cuantificar esa diferencia mediante índices de distancias (Eguiarte, *et al.*, 2010; Ponce, 2013). Asimismo, éstas pueden ser visualizadas gráficamente mediante análisis multivariados como el PCA (Beovides, *et al.*, 2006; González, *et al.*, 2011). Las distancias genéticas nos dan una estimación relativa del tiempo que ha transcurrido desde que las poblaciones se han establecido; donde bajas estimaciones de distancia pueden indicar una subestructura de la población, o que las poblaciones se separaron desde un corto período de tiempo (Basantes, 2012). Asimismo, cuando dos poblaciones están genéticamente aisladas, la mutación y la deriva genética contribuyen a la

diferenciación de las frecuencias alélicas en locus selectivamente neutros; a medida que aumenta el tiempo de divergencia entre dos poblaciones, la diferencia en las frecuencias alélicas también aumenta (Eguiarte, *et al.*, 2010; Basantes, 2012).

Los métodos basados en distancias asignan el individuo a la población genéticamente más cercana o próxima; para ello se requiere definir una distancia entre el individuo y la población (Basantes, 2012). Esta estimación debe ser basada en numerosos loci polimórficos para proveer resultados confiables (Nei & Takezaki, 1994). Cuando una especie presenta una amplia distribución, se espera que las poblaciones geográficamente más cercanas también sean las más cercanas genéticamente; lo cual es conocido como “aislamiento por distancia” y nos dice que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría que ocurra al azar (Eguiarte, *et al.*, 2010 citado de Wright, 1951).

4.3.6. Índice de fijación (Fst)

La teoría de los índices de fijación o estadísticos F fue concebida inicialmente por Sewall Wright en 1969; y mide la probabilidad que dos alelos tomados aleatoriamente de una subpoblación (ya sea de individuos diferentes o del mismo individuo) sean idénticos por descendencia. Si hay flujo génico, es decir si hay una transferencia de alelos dentro de las subpoblaciones, esta probabilidad es baja; mientras que si hay una baja tasa de flujo génico, las poblaciones divergen, ocurre mayor endogamia y el Fst incrementa (Frankham *et al.*, 2002). Por tal motivo, podemos utilizar el Fst para medir la diferenciación genética entre subpoblaciones (Eguiarte, *et al.*, 2010; Ponce, 2013). Si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas iguales, el valor de Fst es igual a 0. En contraste, si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas totalmente diferentes, el valor de Fst es igual a 1 (Eguiarte, *et al.*, 2010). Dentro de este rango, Wright propuso la siguiente valoración: 0 – 0.05 poca diferenciación, de 0.05 – 0.15 moderada, de 0.15 – 0.25 grande y > 0.25 muy grande. El Fst puede ser estimado de la siguiente manera (Gorgonio, 2012):

$$F_{st} = 1 - \frac{H_s}{H_t}$$

Donde: H_s es la heterocigosidad esperada promedio de todas las subpoblaciones y H_t es la heterocigosidad esperada para la población total.

4.3.7. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC)

El DAPC corresponde a un análisis multivariado que pretende identificar y describir cluster genéticos. En contraste con el Análisis de Componentes Principales (PCA), el cual se enfoca en la varianza total de los datos, es decir describen la diversidad global en donde probablemente se ignoren ciertas diferencias entre los grupos obtenidos; el DAPC optimiza la varianza entre los grupos identificados y minimiza la varianza dentro de éstos, con la finalidad de evidenciar su relación. Provee una descripción eficiente de clusters genéticos usando variables sintéticas las cuales son construidas como combinaciones lineales de variables originales, en este caso alelos, los cuales tienen mayor varianza entre grupos que dentro de éstos (Jombart, 2013).

Inicialmente para realizar un DAPC se requiere definir grupos. En la mayoría de los casos estos no son conocidos, por lo que se utilizan las *k-medias*; un algoritmo que permite identificar un número de clusters maximizando la variación entre éstos. Primero se establece el número óptimo de clusters, para lo cual se corre un número ascendente de k , y éstos son comparados utilizando el Criterio de Información Bayesiano (BIC) en donde el menor número de BIC corresponderá al número de clusters ideal. Los clusters genéticos pueden ser estructuras biológicamente significativas y reflejar procesos biológicos interesantes, sin embargo, siguen siendo modelos que permiten resumir y comprender la complejidad de la relación entre individuos; asimismo, no hay un k estrictamente verdadero, pero si algunos valores de k que resumen mejor los datos que otros. Por otro lado, el DAPC establece probabilidades de pertenencia de cada individuo a los diferentes grupos o clusters obtenidos. Estas probabilidades nos dan una evidencia de que tan definidos son estos clusters genéticos (Jombart, 2013).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Identificación de la diversidad genética de 172 accesiones de quinua

5.1.1. Lugar de la investigación

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología del INIA, Lima, Perú.

5.1.2. Material biológico

Se evaluaron 172 accesiones nativas de los departamentos de Ancash (5), Ayacucho (4), Huancavelica (1), Cusco (64), Puno (97) y una accesión sin información de procedencia (Fig. 1 y Tabla 1) las cuales fueron proporcionadas por la EAA Illpa (Puno) bajo la solicitud de la Subdirección de Biotecnología del INIA.

Las semillas fueron germinadas en condiciones de invernadero; transcurridas 1 a 2 semanas se colectaron las plántulas de acuerdo a su desarrollo y se trasladaron al laboratorio donde fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

5.1.3. Extracción de ADN genómico

La extracción se realizó a partir de hojas y tallos tomando como base el método de CTAB descrito por Doyle & Doyle (1987) realizando algunas modificaciones en cuanto a las concentraciones de los componentes del buffer de extracción, entre otras.

5.1.4. Determinación de la calidad y concentración de ADN

Se determinó la calidad del ADN extraído mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml); se cargaron 3 μ L de la muestra y 7 μ L del buffer de carga SALB 2x (azul de bromofenol, naranja, sucrosa, xilen cianol y TBE 10% (v/v)) en cada pocillo del gel sumergido en TBE 1% (v/v), y se corrieron las muestras a 120 V durante 25 minutos. Posteriormente, se realizó la visualización de las bandas mediante exposición con luz UV utilizando el fotodocumentador ChemicDoc™ XRS de Biorad. Asimismo, se cuantificó y determinó la pureza del ADN mediante el espectrofotómetro Epoch Micro-Volume (BioTek, USA) en el cual se realizó la lectura de las muestras a DO_{260} nm y DO_{280} nm y se consideró como ADN puro cuando la relación DO_{260}/DO_{280} fue de 1.8. Finalmente, de acuerdo a la concentración de ADN obtenida, se realizó la dilución de trabajo a 15 ng/ μ L.

5.1.5. Amplificación de SSR a partir de 25 cebadores con cola M13 mediante el método de PCR-multiplexing

Se seleccionaron los cebadores de los trabajos realizados por Mason *et al.* (2005), Christensen *et al.* (2007) y Jarvis *et al.* (2008) (Tabla 2). Se realizó la estandarización de las condiciones de amplificación haciendo una gradiente de temperatura en un rango de 41°C a 62°C con la finalidad de establecer la temperatura de hibridación más adecuada, y en la cual no se observaran productos de amplificación inespecíficos. Después, se estableció la concentración de cloruro de magnesio al probar un rango de 1.5 mM a 3 mM por reacción. Finalmente, se ajustó la concentración de los cebadores para obtener un mayor producto de amplificación. Una vez establecidos estos parámetros y concentraciones, se agrupó a los cebadores de acuerdo a su temperatura de hibridación y según el tamaño de amplificación reportado, lo cual permitió la amplificación simultánea de diferentes regiones SSR (Tabla 3).

Posteriormente, se procedió a la amplificación de todos los loci en un volumen de 10 μL conteniendo 1 μL de ADN a 15 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 2 μL del buffer KAPA de PCR 5x, 2 mM de MgCl_2 , 0.2 mM del mix de dNTPs, 1 μM de cada cebador (directo y reverso), 1 μM del cebador M13, 0.4 mg/mL de BSA y 0.35U de enzima KAPA Taq HotStart.

5.1.6. Genotipificación de fragmentos SSR

La separación de los SSR se realizó mediante una electroforesis capilar automatizada utilizando el analizador genético 3130*xl* lo que permitió separar a los fragmentos de acuerdo a su tamaño (pb) y por fluoróforos. Esto fue posible debido a que cada secuencia directo de los cebadores contó con la secuencia 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3' de 19 nucleótidos conocida como "cola M13". Durante el PCR se amplificó la región de interés más los 19 nucleótidos de la cola M13. Posteriormente, se realizaron 8 ciclos de amplificación con una temperatura de hibridación de 53°C en donde otro cebador con una secuencia complementaria a la cola M13 y marcado con fluorescencia, actuó como secuencia directo y se pegó al fragmento SSR que tenía los 19 nucleótidos de la cola M13, permitiendo así la detección de los fragmentos marcados con fluorescencia por el equipo. Los fluoróforos utilizados fueron fueron 6-FAM (azul), VIC (verde), NED (amarillo) y PET (rojo).

Una vez finalizada la amplificación de cada grupo multiplex, se preparó la placa de corrida para el analizador genético en la cual se añadieron 10 μL de la mezcla de formamida desionizada y el estándar de tamaño LIZ600. Seguidamente, a cada pocillo de la placa se le añadieron de 0.5-1 μL de cada producto de PCR, pudiendo tener hasta 4 fluoróforos distintos por pocillo. Luego, la placa fue sometida a 95°C por 3 minutos para denaturar el ADN e inmediatamente ésta fue sometida a -20°C por 5 minutos. Finalmente se colocó la placa en el equipo y se dio inicio a la corrida electroforética.

Durante la migración de los fragmentos SSR y antes de que lleguen al electrodo positivo, un láser incidió en éstos, causando que los fluoróforos adheridos emitan fluorescencia. Estas señales fueron separadas por un sistema de difracción y fueron detectadas por una

cámara CCD. Debido a que cada fluoróforo emite fluorescencia en diferentes longitudes de onda, todos los fluoróforos y por lo tanto todos los fragmentos añadidos pudieron ser detectados en una sola inyección capilar. Esta señal de fluorescencia fue convertida a formato digital, el cual fue visualizado en forma de picos mediante un electroferograma utilizando el programa GeneMapper versión 4.0. Posteriormente, con el programa se establecieron los bins para cada marcador y se realizó el análisis de los alelos observados. Finalmente los datos fueron exportados a un documento de Excel para luego ser ordenados en una matriz.

5.1.7. Análisis de diversidad genética

Los análisis fueron realizados a partir de la matriz de alelos obtenida mediante la genotipificación de fragmentos SSR.

5.1.7.1. Riqueza alélica (A)

Se determinó el número total de alelos observados por locus, el número alelos exclusivos y compartidos, el número promedio de alelos por locus así como el porcentaje de loci polimórficos. Los cálculos fueron realizados mediante el programa R versión 3.0.3 con el paquete estadístico Polysat versión 1.3-2 (2013).

5.1.7.2. Heterocigosidad

Se calculó la H_e y H_o mediante el programa R versión 3.0.3 con el paquete estadístico Adegenet versión 1.4-1 (2014). La heterocigosidad esperada (H_e) se estimó bajo la suposición que la población evaluada se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW).

Asimismo, se estimó si la diferencia entre la H_e y H_o fue estadísticamente significativa mediante el Test de homogeneidad de varianzas Barlett.

5.1.7.3. Cálculo de las distancias genéticas

Las distancias genéticas entre los individuos fueron estimadas mediante el programa R con el paquete estadístico Polysat 1.3-2 (2013) utilizando la distancia de Lynch (1990), la cual fue seleccionada debido a ésta que no se ve afectada por la ploidía de los individuos ni por la presencia de heterocigotos parciales como es el caso de especies alotetraploides, ni por las frecuencias alélicas.

5.1.8. Agrupamiento mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

A partir de la matriz de disimilitud obtenida mediante el programa R con el paquete estadístico Polysat versión 1.3-2 (2013) se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con la finalidad de reducir la cantidad de datos y facilitar la interpretación. Este análisis permitió revelar las relaciones entre los individuos a partir de las distancias genéticas.

5.1.9. Determinación del grado de diferenciación genética mediante el índice de fijación de Wright

Una vez determinada la agrupación de los individuos en subpoblaciones, se calculó el F_{st} con el paquete estadístico Polysat de R versión 1.3-2 (2013) con la finalidad de determinar el grado de diferenciación genética entre los grupos identificados.

5.1.10. Identificación de clusters mediante un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC)

Posteriormente se realizó un DAPC mediante el programa R versión 3.0.3 con el paquete estadístico Adegenet versión 1.4-1 (2014) con el cual se establecieron clusters genéticos basados en la varianza entre grupos. Además se estableció la probabilidad de pertenencia de cada individuo a cada uno de estos grupos.

VI. RESULTADOS

6.1. Identificación de la diversidad genética del germoplasma de quinua

Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987) el cual permitió obtener una relación de DO_{260}/DO_{280} entre 1.8-1.9; asimismo se obtuvo una concentración promedio de 600 ng/ μ L (Fig. 2).

La estandarización de los cebadores permitió determinar la temperatura óptima de hibridación, a partir de la cual se establecieron los grupos multiplex lo que facilitó la amplificación de los SSR (Tabla 3). Sin embargo, los cebadores QCA069 y QCA037 fueron excluidos del análisis ya que no mostraron una buena calidad de amplificación. Como resultado de la amplificación, se detectaron un total de 294 alelos con un promedio de 12.78 alelos por locus (Tabla 4). El marcador QAAT100 presentó el mayor número de alelos (44 alelos); mientras que el marcador KCAA065 presentó un único alelo, siendo éste por lo tanto, un locus monomórfico en la población evaluada. De acuerdo a la definición de Ott (1992) la cual considera a un marcador como polimórfico si la H es ≥ 0.1 y altamente polimórfico si la H es ≥ 0.7 ; se determinó que 22 de los marcadores utilizados en el presente trabajo fueron polimórficos, mientras que 10 de ellos fueron altamente polimórficos, siendo éstos últimos de gran utilidad para establecer un panel de marcadores SSR que permitan la discriminación de individuos de quinua estrechamente emparentados. Por otro lado, el 20% de los alelos detectados fue exclusivo de quinuas de valles interandinos, el 15% fue exclusivo de quinuas del altiplano y un 65% del total de alelos fue compartido por ambos grupos (Fig. 3).

Finalmente, el rango de diferencia entre los alelos detectados fue de 2 a 12 pb, lo cual demuestra las diferentes tasas de mutación de los loci evaluados.

Asimismo, del total de muestras evaluadas, se determinó que las accesiones procedentes de los departamentos de Ancash, Ayacucho, Cusco y Huancavelica consideradas como ecotipos de valles interandinos, presentan mayor riqueza alélica, ya que éstas evidenciaron un mayor número de alelos exclusivos en comparación con las quinuas procedentes de Puno, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Sin embargo, es importante resaltar que la estimación de la diversidad genética basada en la riqueza alélica tiene como desventaja principal, estar directamente relacionada con el tamaño de la muestra. No obstante, a pesar de haber evaluado un menor número de muestras de valles interandinos, se pudo determinar una mayor diversidad genética.

Por otra parte, se determinó la diferencia entre la H_e y H_o para cada marcador, obteniendo una H_e promedio de 0.60 y una H_o promedio de 0.14 (Fig. 4), siendo ésta una gran diferencia, podemos inferir teóricamente que existe un déficit de heterocigotos en la población. Por tal motivo, esta diferencia fue analizada mediante el Test de homogeneidad de varianzas de Barlett, a partir del cual se determinó que es estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Este resultado podría ser explicado por el efecto Wahlund, el cual indica que la H_e en una población es mayor que la H_o a causa de la subdivisión poblacional, por lo que habría un exceso de homocigotos. A diferencia de la endogamia, la cual afecta de igual manera a todos los loci, el efecto Wahlund depende de las diferencias entre las frecuencias alélicas en cada locus. Otro de los factores que podrían estar afectando a la población está relacionado con el tipo de reproducción que presenta el cultivo, ya que ésta puede tener altos porcentajes de autofecundación, en donde por cada generación, va incrementar el número de homocigotos a expensas de los heterocigotos.

Por otro lado, se determinó que el 86% de las frecuencias de los alelos en los ecotipos de valles interandinos y el 87% de las frecuencias en los ecotipos del altiplano fueron menor o igual a 0.1, mientras que el 14% de las frecuencias de valles interandinos y el 13% de las del altiplano fueron mayor a 0.1 (Fig. 4 y Fig. 5). Estos resultados podrían atribuirse a la metodología empleada para el cálculo de éstas mediante el paquete estadístico Polysat, ya que éste tiene una tendencia a subestimar la frecuencia de los alelos más comunes y sobreestimar la frecuencia de los alelos raros. Asimismo, como es reportado por Slatkin (1989), debemos considerar que los alelos con frecuencias mayores a 0.1 tienen una

tendencia a fijarse en la población a través de las generaciones, lo cual podría causar divergencia entre las subpoblaciones.

6.2. Agrupamiento multivariado mediante un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y determinación del grado de diferenciación genética entre los grupos evaluados

Asimismo, se realizó un PCoA en donde se observó la división poblacional de las accesiones de altiplano (representado en color verde) y valles interandinos (representado en color morado) en dos subpoblaciones, las cuales guardaron relación con la procedencia de las muestras (Fig.7). En base a este resultado, se estimó el grado de diferenciación genética entre ambos grupos mediante el F_{st} , obteniendo un valor de 0.059, lo cual indica un grado de diferenciación genética moderada entre las quinuas del altiplano y de valles interandinos; este resultado podría explicar la presencia de deriva genética, lo cual haría que las poblaciones diverjan paulatinamente. Por otro lado, se puede inferir la presencia flujo genético entre ellas, ya que como se mencionó anteriormente, ambas poblaciones comparten el 65% de los alelos. Este resultado puede ser positivo para la población, ya que le va a conferir un mayor potencial adaptativo debido al eventual flujo genético, y va a evitar que exista endogamia y pérdida de variación dentro de la población. Esto es reforzado por el tipo de reproducción sexual del cultivo, el cual es principalmente por autogamia alternando con hasta un 10% de alogamia. No obstante, se observó que algunas accesiones de valles interandinos presentan mayor similitud genética con las accesiones de altiplano y viceversa, lo cual podría sugerir errores en la documentación de las accesiones, por lo que sería necesario revisar la clasificación de éstas.

Con la finalidad de analizar la diversidad presente entre los grupos, se realizó un DAPC, mediante el cual se determinó el número de clusters genéticos a partir del menor valor de BIC, el cual fue $k=7$ (Fig. 8). Se utilizaron los dos primeros componentes principales ya

que éstos explicaron la mayor varianza de los datos (Fig. 9). A diferencia de lo observado en el PCoA, en el DAPC se obtuvieron 7 clusters genéticos, los cuales no siempre guardaron relación con la procedencia de las muestras; como es el caso del cluster 1 (representado en color azul) el cual está constituido de 34 accesiones, de las cuales 33 proceden de valles interandinos y una del altiplano; mientras que los clusters 3 (representado en color anaranjado) y 4 (representado en color celeste) solo agrupan a accesiones procedentes del altiplano. Finalmente, podemos inferir que no hay relación entre la procedencia de las muestras con la agrupación realizada por el DAPC. Igualmente, se determinó la probabilidad de pertenencia de cada individuo a los siete clusters (Fig. 10) y de acuerdo a los resultados obtenidos, se observó que existe una contribución de más de un grupo genético en cada individuo, ya que 159 del total de muestras presentan probabilidad de pertenencia a más de un cluster, lo cual indicaría que éstos no están estrictamente definidos; y por lo tanto no existiría una estructuración genética definida entre y dentro de los grupos inferidos por el DAPC.

VII. DISCUSIÓN

Los microsatélites son los marcadores de elección en numerosos estudios de genética de poblaciones ya que permiten elucidar la estructura de una población y determinar la diversidad genética presente. Sin embargo, cuando se trabaja con especies poliploides puede ser complicado determinar el dosaje alélico para cada individuo. En tetraploides como la quinua, los genotipos sólo pueden ser identificados en caso se presenten uno o cuatro alelos, sin embargo, cuando son detectados dos o tres alelos en un mismo locus, es casi imposible descifrar cuál de ellos se encuentra en doble copia, por lo que se define a los genotipos como heterocigotos parciales. Por lo tanto, al no contar con los genotipos completos, estimar las frecuencias alélicas en una población poliploide puede resultar muy complejo y generalmente se tienen que realizar algunas asunciones, como que la población de encuentra en EHW (De Silva *et al.*, 2005) pudiendo no ser la situación real de la población. Existen algunas metodologías que permiten inferir el dosaje alélico; sin embargo, éstas pueden no ser las más adecuadas. Una de ellas consiste en analizar los datos codominantes de los SSR como datos dominantes utilizando una matriz binaria (Beovides *et al.*, 2006); esta metodología ha sido utilizada en numerosos estudios de paternidad, diversidad genética y estructura poblacional. No obstante, involucra una pérdida inherente de información en cuanto a la heterocigosidad (Markwith *et al.*, 2006 citado de Mengoni *et al.*, 2000; Rodzen *et al.*, 2004 y Hanson *et al.*, 2008). Otra alternativa más drástica es trabajar los datos como si se tratara de un organismo diploide considerando un máximo de dos alelos por locus y asumiendo que ambos se encuentran en doble copia. No obstante se corre el riesgo de obtener resultados sesgados (Markwith *et al.*, 2006 citado de Saltonstall, 2003). Esselink *et al.* (2004) propusieron un método para determinar el número de copias de los alelos basándose en la intensidad relativa de fluorescencia de los fragmentos amplificados; sin embargo, este método requiere una alta calidad en los datos visualizados. En contraste, Markwith *et al.* (2006) explicaron que debido a que los microsatélites están basados en la técnica del PCR de tiempo final, un proceso de amplificación exponencial no cuantitativa, éstos resultados (intensidades de bandas o altura de picos) no son de confianza para determinar el número de copias de alelos en un locus. Además, la discriminación de

alelos con bajo número de copias es usualmente obstaculizada por los artefactos producidos durante el PCR (Preiffer *et al.*, 2011). En base a estos argumentos, en el presente trabajo se registró únicamente los alelos observados, sin inferir el número de copias para cada genotipo. Por tal motivo, se eligió el paquete estadístico Polysat el cual permite realizar los análisis utilizando datos de heterocigotos parciales. Esta metodología permite estimar las frecuencias alélicas en loci con ambigüedad en el dosaje alélico, asumiendo que todos los alelos tienen la misma probabilidad de estar presentes en múltiples copias. No obstante, cabe resaltar que bajo esta estimación, hay una tendencia a subestimar la frecuencia de los alelos más comunes y sobreestimar la frecuencia de los alelos raros, resultando en una subestimación del F_{st} (Clark & Jasieniuk, 2011).

La amplificación de los SSR permitió determinar que de los 23 marcadores evaluados, 22 fueron polimórficos, mientras que 10 de éstos fueron altamente polimórficos; obteniendo una H_e promedio de 0.6. Sin embargo los valores de H_e obtenidos para algunos de los marcadores utilizados en el presente trabajo tales como QAAT100, QAAT024, QAAT70, QAAT74, y QGA024, difieren de los observados por Mason (2005), Christensen *et al.* (2007) y Jarvis *et al.* (2008) lo cual puede atribuirse a que éstos últimos utilizaron quinuas nativas de Bolivia, Chile, Ecuador, Argentina, además de especies silvestres como *Chenopodium berlandieri nuttaliae*, *Chenopodium giganteum*, entre otras, lo cual influyó en la diversidad genética detectada en la población.

Los marcadores utilizados en el presente trabajo mostraron diferente número de alelos en comparación con otros autores; como es el caso del marcador QAAT100 el cual presentó 44 alelos en el total de la población, sin embargo, Mason *et al.* (2005) reportó para el mismo marcador 6 alelos en una población de $n=31$ incluyendo 10 accesiones de Perú. En contraste, en el presente trabajo, el marcador KCAA065 presentó un único alelo en la población evaluada, a diferencia de Jarvis *et al.* (2008), quienes reportaron 8 alelos observados y una $H=0.80$ en una población de $n=22$ accesiones incluyendo 5 procedentes de Perú, además de la variedad comercial Salcedo-INIA. Estas diferencias demuestran la variabilidad presente en la especie según su procedencia. Asimismo, el número de alelos detectados se encontró en un rango de 1-44 alelos, lo cual puede explicarse por lo reportado por Vigouroux *et al.* (2002) citado de Di Rienzo *et al.* (2008), Harr *et al.* (1998), Primmer

et al. (1996) y Brinjmman *et al.* (1998) los cuales mencionan que las tasas de mutación de los SSR varían ampliamente entre los loci de una misma especie y que esta tasa incrementa con el largo del microsatélite. Debido a que el marcador QAAT100 tiene un motivo de gran extensión, es posible que éste tenga una tasa de mutación más elevada y esto sea evidenciado con un mayor número de alelos. En este contexto, Arauguren (2004) citado de Schlotterer y Tautz (1992) reportan que los SSR dinucleótidos presentan tasas de mutación más elevadas que los trinucleótidos, y sabiendo que generalmente las mutaciones están involucradas por la ganancia o pérdida de una simple unidad de repetición (Weber y Wong, 1993), este tipo de SSR podría evidenciar un mayor número de alelos.

Sin embargo, en el presente trabajo al igual que Christensen *et al.* (2007) los marcadores trinucleótidos amplificaron un mayor número de alelos que los dinucleótidos. No obstante, el marcador QGA024, de naturaleza di-nucleotídica, amplificó 20 alelos probablemente debido al modelo de mutación en el cual se encuentra sometido este locus. En especies poliploides es común identificar un mayor número de alelos, y debido a esta característica, el poder discriminativo de un locus es potencialmente mayor, incluso cuando solo se cuenta con heterocigotos parciales y no con genotipos completos (Preiffer *et al.*, 2011). Por tal motivo, al caracterizar especies poliploides se requiere menos loci que para evaluar especies diploides, en las cuales se debería utilizar un mínimo 8 a 12 loci para obtener una alta precisión (Preiffer *et al.*, 2011 citado de Arnaud- Haund *et al.*, 2005; Eusemann *et al.*, 2009; Koskinen *et al.*, 2004). En el presente trabajo se identificaron 10 marcadores altamente polimórficos, los cuales facilitarán la caracterización molecular del germoplasma de quinua.

De acuerdo a la riqueza alélica observada en las accesiones de valles interandinos y del altiplano, se determinó que las accesiones de valles interandinos presentan mayor diversidad genética. Este resultado difiere de obtenido por Tamayo (2010) el cual identificó una mayor variabilidad genética en quinuas de Puno, Arequipa y Cusco, a diferencia de Ancash y Cajamarca. Sin embargo, es importante resaltar que el autor utilizó en total 16 accesiones, por lo cual posiblemente no se haya evaluado la diversidad genética representativa de cada región. Por otro lado, el resultado observado en el presente trabajo coincide con Fuentes *et al.* (2008) los cuales determinaron una baja diversidad genética en

las accesiones del altiplano chileno en comparación con quinuas de la costa, ya que éstas contaron con una mayor cantidad de alelos privados (50%). Sin embargo, Christensen *et al.* (2007) sugirieron un bajo nivel de diversidad genética dentro de los ecotipos de costa al identificar que la frecuencia promedio de alelos compartidos fue de 61% en contraste con el 53% observado en las quinuas de altiplano.

La delimitación de la estructura de una población, usualmente solo es posible utilizando datos genéticos (Frankham *et al.*, 2002). Con la finalidad de determinar la presencia de grupos genéticos en la población evaluada, se realizó un análisis de coordenadas principales y se identificó la presencia de dos subpoblaciones de quinua, las cuales agrupan a las quinuas de valles interandinos y de altiplano. Este resultado coincide con el obtenido por Eguiluz *et al.*, en el cual mediante un análisis fenotípico en 85 accesiones de quinua comprobaron la existencia de dos grupos de quinua peruanos: los ecotipos de valle interandinos y de altiplano. Asimismo este resultado coincide con lo observado por Del Castillo *et al.* (2006) los cuales evaluaron quinuas silvestres y cultivadas de Bolivia, y determinaron éstas se agrupaban no por su estado de domesticación como era esperado, sino por el grupo ecoregional del cual provenían. Por otro lado, al realizar un DAPC, se determinó que no hay una estructura genética definida entre las subpoblaciones. Esto se corroboró mediante la probabilidad de pertenencia de cada individuo a los clusters inferidos, donde más de un grupo tiene influencia sobre cada individuo. Este resultado fue observado también por Del Castillo *et al.* (2007) quienes reportaron una alta variación intrapoblacional en quinuas de Bolivia. Sin embargo, de acuerdo a los resultados observados en el presente trabajo, es necesario analizar un mayor número de muestras de quinuas de valles interandinos para confirmar estos hallazgos. Finalmente el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones definidas se obtuvo mediante el F_{st} , el cual típicamente por encima de 0.15 es considerado como un indicador de diferenciación significativa entre las subpoblaciones (Frankham *et al.*, 2002). En el presente trabajo se determinó un F_{st} de 0.059, lo cual indicaría un grado de diferenciación moderada. Este resultado podría explicar la presencia de flujo genético entre las dos subpoblaciones, pero también la presencia de deriva genética con la fijación de alelos. Por otro lado, debe considerarse que debido a que la quinua presenta aproximadamente un 90% de autogamia, existe en los ecotipos la multiplicación de individuos altamente adaptados a un mismo

nicho ecológico, lo cual podría contribuir a la diferenciación genética entre poblaciones. Sin embargo, cabe resaltar que este resultado podría verse influenciado por la metodología empleada para el cálculo de las frecuencias alélicas, la cual según Clark & Jasieniuk (2011), podría subestimar el F_{st} .

Finalmente, Markwith *et al.* (2006) exponen que la heterocigosidad esperada obtenida de loci tetraploides no debe ser utilizada para hacer inferencias relativas a patrones de reproducción como la endogamia. Por lo cual, la posibilidad de que la población de quinua evaluada se encuentre bajo el efecto Wahlund, debe ser tomada con precaución, ya que llevaría a inferir que existe un exceso de homocigotos.

VIII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir que:

- Los marcadores altamente polimórficos KGA3, QAAT106, QAAT24, QAAT50, QAAT70, KAAT037, QGA024, QAAT76, QAAT74 y QAAT100 permitirán la evaluación de la diversidad genética del germoplasma de quinua cuyas accesiones son conservadas en el INIA.
- El número de alelos detectado se encontró entre 1 y 44 probablemente por la elevada tasa de mutación que presentan los SSR.
- Las accesiones evaluadas procedentes de valles interandinos (Ancash, Ayacucho, Cusco y Huancavelica) presentan mayor diversidad genética debido a la presencia de un mayor número de alelos privados (20%).
- Mediante el PCoA se identificaron dos subpoblaciones de quinua, las cuales guardan relación con el origen geográfico de las muestras.
- La diferenciación genética moderada ($F_{st}=0.059$) entre las dos subpoblaciones, indicaría la presencia de deriva genética y flujo genético lo cual confiere a los individuos que las constituyen, un potencial de adaptación frente a su entorno.
- La población de quinua evaluada podría estar bajo el efecto Wahlund debido a la subdivisión poblacional ya que presentan una diferencia entre H_e y H_o estadísticamente significativa.

IX. RECOMENDACIONES

- Repetir el muestreo y genotipificación con SSR en las muestras de valles interandinos que presentaron mayor similitud genética con las muestras de altiplano y viceversa; así como realizar la caracterización fenotípica de éstas con indicadores agronómicos, con el fin de verificar la clasificación correcta en el banco de germoplasma.
- Realizar la caracterización molecular de la quinua con accesiones representativas de todas las zonas de Perú incluyendo accesiones de Cajamarca, Junín, La Libertad así como del Amazonas con el propósito de establecer la estructura genética poblacional de la quinua en el Perú.
- Seleccionar marcadores SSR que permitan formar multiplex de 5 a más cebadores con la finalidad de reducir el costo y tiempo de análisis en la genotipificación.
- Establecer una metodología para determinar el dosaje alélico en especies poliploides y así identificar las accesiones duplicadas conservadas en el banco de germoplasma lo que permitirá reducir el presupuesto necesario para el mantenimiento de éste.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aranguren, J.; Román, R.; Isea, W.; Villasmil, Y.; Jordana, J. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. 2004. Facultad de Ciencias Veterinarias, La Universidad del Zulia. Venezuela.
- Basantes Lasso, Maria Gabriela. Caracterización Molecular de la Colección Nacional de Camote (*Ipomoea spp.*) del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP mediante Marcadores Microsatélites. [Tesis]. 2012. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador. 152 p.
- Beovides, Y.; Fregene, M.; Alves, A.; *et al.* Análisis de diversidad genética mediante microsatélites (SSR) en cultivares del germoplasma cubano de yuca. *Biotecnología Vegetal* 2006. Vol. 6, No. 1: 9 – 14.
- Bioversity International, FAO, PROINPA, INIAF y FIDA. Descriptores para quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. 2013. Bioversity International, Roma, Italia; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia; Fundación PROINPA, La Paz, Bolivia; Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal, La Paz, Bolivia; Fondo Internacional de Desarrollo Agrícola, Roma, Italia.
- Bonifacio, A. Estudios de herencia y ligamiento genético en la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). [Tesis]. 1990. Facultad de Agronomía, UMSS. Cochabamba, Bolivia. 123 p.
- Bonifacio, A. Recursos genéticos, etnobotánica y distribución geográfica. En: Mujica A., Jacobsen S.E., Izquierdo J. & Marathee J.P., eds. Primer taller internacional sobre quinua. 2001. Cultivos Andinos. [CD-ROM]. Santiago: FAO, UNA-Puno, CIP.

- Bonifacio, A. Genetic variation in cultivated and wild *Chenopodium* species for quinoa breeding. 2004. Ph.D. Dissertation, Brigham Young University, Provo, UT, USA.
- Buschiazzo, E. Conservation and Evolution of Microsatellites in Vertebrates Genomes. 2008. Ph.D. Dissertation, University of Canterbury, Nueva Zelanda.
- Christensen, S.; Pratt, D.; Pratt, C.; *et al.*. Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. 2007. Plant Genet Resources: CharactUtil 5:82–95.
- Clark, L. & Jasieniuk, M. Polysat: un R package for polyploid microsatellite analysis. 2011. Molecular Ecology Resources 11, 562–566.
- Costa Tártara, S. M.; Manifesto, M. M.; Bramardi, S. J.; Bertero H.D. Genetic structure in cultivated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), a reflection of landscape structure in Northwest Argentina. 2012. Conserv Genet. 13:1027-1038.
- Del Castillo, C.; Winkel, T.; Mahy, G.; Bizoux, J. Genetic Structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. 2007. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 897– 905.
- De Silva, H.; Hall, A.; Rikkerink, E.; McNeilage, M.; Fraser, L. Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. 2005. Heredity 95, 327–334.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. 1987. Phytochem Bull 19:11–15.
- Eguiarte, L.; Aguirre, E.; Sheinvar, E.; Gonzáles, A.; Souza, V. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. 2010. Universidad Autónoma de México.

- Eguiluz, A.; Maughan, P.; Jellen, E.; Gómez, L. Determinación de la diversidad fenotípica de accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) provenientes de valles interandinos y del altiplano peruano. Universidad Agraria La Molina.
- Ellegren, Hans. Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. 2004. Genetics. Nature Reviews. Vol. 5: 435-445.
- Estévez, C. Estudio sobre la caracterización genética de las razas caprinas, mallorquina e ibicenca. [Tesis]. 2009. Universidad de Córdoba, Argentina.
- Estrada, R. Videoconferencia: Importancia del cultivo de quinua hacia el año internacional 2013. Cusco 25 de octubre de 2012. Instituto Nacional de Innovación Agraria.
- Esselink, G.; Nybom, H.; Vosman, B.. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (Microsatellite DNA allele counting- peak ratios method. 2004. Theor Appl Genet 109: 402–408.
- Fairbanks, D.; Bonifacio, A.; and Maughan, PJ. Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. 2007. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 5: 82 - 95.
- FAO. La quinua: Cultivo Milenario para Contribuir a la Seguridad Alimentaria Mundial. 2011.
- Frankham, R.; Ballou, J.; Briscoe, D. Introduction to Conservation Genetics. 2002. Cambridge University Press. UK.
- Fuentes, F.; Martínez, E.; Delatorre, J.; Hinrichsen, P.; Jellen, E. y Maughan, J. Diversidad genética de germoplasma chileno de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) usando marcadores de microsatélites. En:
- A. Estrella, M. Batallas, E. Peralta y N. Mazón (eds). Resúmenes XII Congreso Internacional de Cultivos Andinos. 24 al 27 de julio de 2006. Quito, Ecuador.

- Fuentes, F.; Martínez, E.; Hinrichsen, P. et al. Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. 2008. *Conserv Genet* 10:369–377.
- Fuentes, F.; Maughan, P; Jellen, E. Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). 2009. *Rev. geogr. Valpo.* N° 42 / 2009. ISSN 0718 – 9877. P. 20-33.
- Gandarillas, H. 1979b. Genética y origen. En: M. Tapia (ed). *Quinoa y Kañiwa, cultivos andinos*. Bogota, Colombia, CIID, Oficina Regional para América Latina. pp 45-64.
- Gonzáles Marín, Sandra Paola. Estudio de flujo de genes en quinua (*Chenopodium quinoa*) en campo de agricultores mediante el uso de marcadores microsatélites. [Tesis]. 2009. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Gonzáles Gonzáles, Edna Amada. Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex Perado* spp. *Lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene Noctolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus area* (Rosaceae). [Tesis doctoral]. 2011. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Gorgonio Ramírez, Montserrat. Variabilidad y Estructura Genética de *Quercus eduardii* (Fagaceae) en Sierra Fría, Aguascalientes. 2012. Universidad de la Sierra Juárez.
- Ichuta, F. y E. Artiaga. Relación de géneros en la producción y en la Organización Social en Comunidades de Apharuni, Totoruma, Yauricani- Ilave. Informe para optar el grado de Bachiller en Trabajo Social. 1986. Puno, Perú. pp. 15-17.
- Jacobsen, S. y Mujica, A. El potencial de la quinua en la alimentación global. IV Simposio Internacional Desarrollo Sustentable en Los Andes. 2001. Venezuela.
- Jacobsen, S. The worldwide potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). 2003. *Food Rev. Int.* 19(1-2):167-177.

- Jarvis, D.; Kopp, O.; Jellen, E.; *et al.* Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). 2008. *J Genet* 87:39–51.
- Jombart, T. A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using Adegnet 1.3-6. 2013.
- Kalinowski S. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. 2004. *Conservation Genetics* 5: 539-543.
- Karp, A. & Edwards, K. Techniques for the analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. En: *Molecular Genetic techniques for plant genetic resources. Report of IPGRI workshop 9-11.* W.G.Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat & V.R. Rao, (Eds). October 1995. Rome, Italy. p: 3-22.
- Lescano, J. Recursos fitogenéticos altoandinos y bancos de germoplasma. Curso: “Cultivos altoandinos”. Potosí, Bolivia. 17 - 21 de abril de 1989. pp 1-18.
- Lescano, J. Genética y mejoramiento de cultivos altoandinos: quinua, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. 1994. Programa Interinstitucional de WaruWaru, Convenio INADE/PELT - COTESU. 459 p.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, A. Beiles, y E. Nevo. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. 2002. *Mol. Ecol.* 11:2453–2465.
- Litt, M. & Luty, J. A hipervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. 1989. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- Markwith, S.; Steward, D.; Dyer, L. Tetrasat: a program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. 2006. *Molecular Ecology Notes* 6, 586–589.
- Martínez, M.; Helguera, M.; Carrera A. Marcadores Moleculares. En: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mrongiski, L.; editores. *Biología y*

Mejoramiento Vegetal II. 2 edición. Argentina: Instituto Nacional de Tencología Agropecuaria; 2010. p. 70-85.

- Mason, S.; Stevens, M.; Jellen, E. ; *et al.* Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). 2005. *Crop Sci* 45:1618–1630.
- Maughan, P.; Bonifacio A.; Jellen E.; *et al.* A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. 2004. *TheorApplGenet* 109:1188–1195.
- Maughan, P.; Smith, S.; Rojas-Beltrán, J.; Elzinga, D.; Raney, J.; Jellen, E.; Bonifacio, A.; Udall, J.; Fairbanks, D. Single nucleotide polymorphisms identification, characterization and linkage mapping in *Chenopodium quinoa*. *The Plant Genome*. 2012 Sep;5(3):1-7.
- Mujica, A. Granos y leguminosas andinas. En: J. Hernández, J. Bermejo y J. Leon (eds). *Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492*. 1992. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO, Roma. pp 129-146.
- Mujica, A.; Jacobsen, E. Biodiversidad un desafío en la región centro oeste de Sudamérica en agricultura andina. 2001. Puno. Perú.
- Mujica, A.; Jacobsen, S. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 2006. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. Pp 449-457.
- Nei, M & Takezaki, N. Estimation of genetic distance's and phylogenetic trees from DNA analysis. 1994. *Proc. 5th World Congr. Genet. Appl. Livestock Prod.* 21, 405-412.
- Ortiz, R. Genebanks: Not just seed repositories!. *Gene Conserve*. Vol 1. Issue 1. 2002: 21-24. ISSN 1808-1878.

- Ott, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. 1992. *Am. J. Hum. Genet.* 51:283-290.
- Pearsall, D.M. The origins of plant cultivation in South America. 1992. En: Cowan CW, Watson PJ (eds). *The origins of agriculture*. Smithsonian Institution Press, Washington, USA, pp 173–205.
- Piñero, D. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. 2008a México, 437-494 pp.
- Pfeiffer, T.; Roschanski, A.; Pannell, J.; Korbecka, G. & Schnittler, M. Characterization of Microsatellite Loci and Reliable Genotyping in a Polyploid Plant, *Mercurialis oerennis* (Euphorbiaceae). 2011. *Journal of Heredity*.
- R Development Core Team.. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011. ISBN 3-900051-07-0.
- Rentarúa, M. Breve Revisión de los Marcadores Moleculares. En: Eguiarte, L.; Souza, V.; Aguirre, X., compiladores. *Ecología Molecular*. 1ª edición. México: Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 2007. p. 541-562.
- Risi, J. La Investigación de la quinua en Puno. En: L. Arguelles y R. Estrada (eds) *Perspectivas de la investigación agropecuaria para el Altiplano*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Proyecto de Investigación en Sistemas Agropecuarios Andinos. Convenio ACDI-CIID-INIAA. 1991. Lima, Perú. pp 209-258.
- Robinson, J. & Harris, S. Amplified fragment length polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. Chapter 12 en: *Which DNA marker for which purpose? Final compendium of the research project development*,

optimization and validation of molecular tools assessment of biodiversity in forest trees. 1999. Gillet, E. M. (eds), URL.

- Rojas, W.; Pinto, M.; y Soto, J. Distribución geográfica y variabilidad genética de los granos andinos. En: W. Rojas, M. Pinto, JL. Soto, M. Jagger y S. Padulosi (eds). Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. 2010. Bioersivity International, Roma, Italia. pp 11-23.
- Rojas, W. Análisis de la diversidad genética del germoplasma de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de Bolivia, mediante métodos multivariados. [Tesis M.Sc.]. 1998. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia - Chile. 209 p.
- Rojas, W. Multivariate analysis of genetic diversity of Bolivian quinoa germplasm. 2003. Food Rev. Int., 19: 9–23.
- Rojas, W. El informe técnico “La quinua, cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial”. 2011. PROINPA. 37ava Conferencia de la FAO.
- Ruas, M.; Bonifacio, A.; Ruas, C.; Fairbanks, D.; Andersen, W. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by Random Amplified Polymorphic DNA fragments (RAPD). 1999. Euphytica 105:25–32
- Slatkin, M. & Barton, NH. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. 1989. Evolution, 43, 1.
- Tamayo, H. Caracterización molecular inter e intragenotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (quinua) mediante la técnica de ISSR. [Tesis magister scientiae]. 2010. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Tapia, M. Cultivos andinos sub explotados y su aporte a la alimentación. 1990. ONU/FAO. Santiago, Chile.
- Veramendi, S. Estudio de la Diversidad Genética de la Colección Boliviana de Quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) correspondiente al Altiplano sur utilizando

Tres Marcadores Microsatélite QAAT-074, QAAT- 076, QAAT-022. [Tesis magister scientiae]. 2006. Universidad Mayor de San Simón.

- Vigouroux, Y.; Jaqueth, J.; Matsuoka, Y.; *et al.* Rate and pattern of Mutation at Microsatellite Loci in Maize. 2002. *Mol. Biol. Evol.* 19(8):1251–1260.
- Weber, J. Informativeness of Human (dC-dA)_n. (dG-dT)_n Polymorphisms. *GENOMICS* 7, 524-530 (1990).
- Weber, J. & Wong, C. Mutation of human short tandem repeats. 1993. *Human Molecular Genetics*. 2: 1123-1128.
- Wilson, H. Allozyme variation and morphological relationships of *Chenopodium hircinum* (s.l.). 1988. *Syst Bot* 13:215–228.
- Zurita-Silva, A.; Fuente, F.; Zamora, P.; Jacobsen, S.; Schwember, A. Breeding quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): potential and perspectives. 2014. *Mol Breeding*. Springer. <DOI 10.1007/s11032-014-0023-5>.

ANEXOS

Figura 1: Ubicación geográfica de 171 accesiones de quinua evaluadas

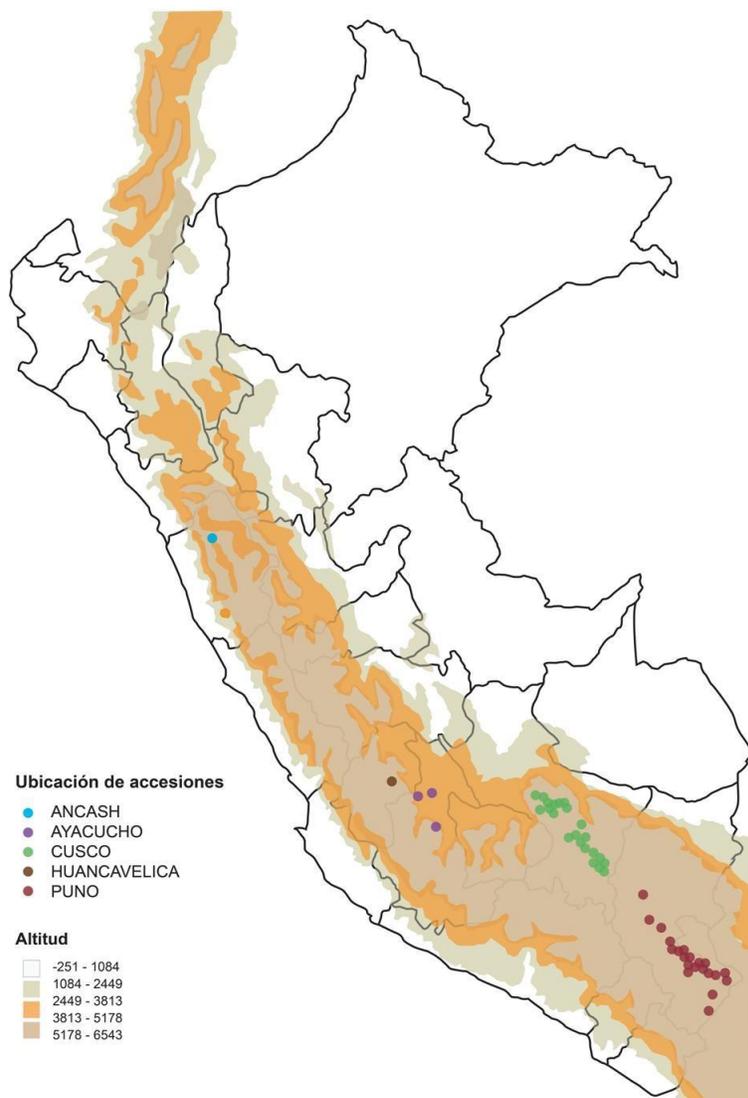


Tabla 1: Datos pasaporte de las accesiones evaluadas

	CÓDIGO NACIONAL INIA	ECOTIPO	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
1	PER003320	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ACOMAYO	ACOMAYO	HUASCAR	-13.92790	-71.67960	3207
2	PER003321	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ACOMAYO	ACOMAYO	HUASCAR	-13.92790	-71.67960	3207
3	PER003322	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ACOMAYO	ACOMAYO	HUASCAR	-13.92790	-71.67960	3207
4	PER003324	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ACOMAYO	ACOS	ACOS	-13.94980	-71.73880	3085
5	PER003326	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ACOMAYO	ACOS	ACOS	-13.94980	-71.73880	3085
6	PER003328	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CALCA	PISAC	AMARU	-13.37634	-71.81904	2972
7	PER003330	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	OLLANTAYTAMBO	OLLANTAYTAMBO	-13.25590	-72.26290	2846
8	PER003331	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	URUBAMBA	YANAHUARA	-13.27167	-72.17935	2846
9	PER003334	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	OLLANTAYTAMBO	PACHAR	-13.27390	-72.22370	2846
10	PER003335	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	URUBAMBA	YANAHUARA	-13.27167	-72.17935	2846
11	PER003339	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ACOMAYO	ACOMAYO	ACOMAYO	-13.91830	-71.68250	3207
12	PER003343	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ACOMAYO	POMACANCHI	POMACANCHI	-14.03600	-71.57080	3979
13	PER003345	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	URUBAMBA	CHULLPE	-13.30550	-72.11580	2871
14	PER003347	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CALCA	SAN SALVADOR	SAN SALVADOR	-13.49310	-71.77750	2995
15	PER003351	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	PILLIRAY	-13.34090	-72.11020	3487
16	PER003353	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	PILLIRAY	-13.34090	-72.11020	3487
17	PER003356	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	MULLACCAS	-13.35975	-72.19801	3487
18	PER003359	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	MAHUAYPAMPA	-13.38917	-72.15941	3632
19	PER003361	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	MAHUAYPAMPA	-13.38917	-72.15941	3632
20	PER003363	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	URUBAMBA	YANAHUARA	-13.27167	-72.17935	2846
21	PER003364	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	URUBAMBA	YANAHUARA	-13.27167	-72.17935	2846
22	PER003365	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	URUBAMBA	YANAHUARA	-13.27167	-72.17935	2846
23	PER003366	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CALCA	COYA	BELLA VISTA	-13.38550	-71.88830	2951
24	PER003367	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ANTA	HUAROCONDO	HUAROCONDO	-13.41390	-72.20860	3331

	CÓDIGO NACIONAL INIA	ECOTIPO	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
25	PER003368	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CUSCO	POROY	POROY	-13.49530	-72.04410	3442
26	PER003369	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CUSCO	POROY	POROY	-13.49530	-72.04410	3442
27	PER003371	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CALCA	LAMAY	LAMAY	-13.36380	-71.92020	2941
28	PER003372	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CALCA	LAMAY	HUAMA	-13.34200	-71.86870	2941
29	PER003375	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CALCA	PISAC	AMARU	-13.37634	-71.81904	2972
30	PER003376	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ANTA	ZURITE	ZURITE	-13.45720	-72.25720	3391
31	PER003377	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ANTA	ZURITE	ZURITE	-13.45720	-72.25720	3391
32	PER003378	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	SAN PEDRO	SAN PEDRO	-14.18620	-71.34290	3485
33	PER003379	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	SAN PEDRO	SAN PEDRO	-14.18620	-71.34290	3485
34	PER003380	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	SAN PEDRO	SAN PEDRO	-14.18620	-71.34290	3485
35	PER003381	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	TINTA	TINTA	-14.14560	-71.40760	3446
36	PER003382	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	TINTA	TINTA	-14.14560	-71.40760	3446
37	PER003383	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	TINTA	TINTA	-14.14560	-71.40760	3446
38	PER003384	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANAS	LANGUI	LANGUI	-14.43200	-71.27290	3969
39	PER003388	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	MARANGANI	MARANGANI	-14.35790	-71.16830	3709
40	PER003389	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	MARANGANI	MARANGANI	-14.35790	-71.16830	3709
41	PER003390	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	MARANGANI	MARANGANI	-14.35790	-71.16830	3709
42	PER003392	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CALCA	LAMAY	LAMAY	-13.36380	-71.92020	2941
43	PER003399	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	ANTA	ANTA	MARCKU	-13.44610	-72.18720	3331
44	PER003402	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	OLLANTAYTAMBO	PACHAR	-13.27390	-72.22370	2846
45	PER003405	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	URUBAMBA	YANAHUARA	-13.27167	-72.17935	2846
46	PER003423	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	OLLANTAYTAMBO	CHILLCA	-13.22080	-72.33040	2846
47	PER003427	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	PARURO	PILLPINTO	PILLPINTO	-13.95380	-71.76170	2853
48	PER003428	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	PARURO	PILLPINTO	PILLPINTO	-13.95380	-71.76170	2853
49	PER003430	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	SICUANI	SICUANI	-14.27031	-71.22559	3554

	CÓDIGO NACIONAL INIA	ECOTIPO	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
50	PER003431	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	CANCHIS	SICUANI	SICUANI	-14.27031	-71.22559	3554
51	PER003433	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	QUISPICANCHI	URCOS	PAMPACHULLA	-13.70830	-71.59050	3550
52	PER003435	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	QUISPICANCHI	CUSIPATA	CUSIPATA	-13.90850	-71.49930	3310
53	PER003441	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	MAHUAYPAMPA	-13.38917	-72.15941	3632
54	PER003443	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	MAHUAYPAMPA	-13.38917	-72.15941	3785
55	PER003444	VALLES INTERANDINOS	CUSCO	URUBAMBA	MARAS	CHEQUEREC	-13.37730	-72.12180	3762
56	PER004239	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	CHALLACOLLO	-16.09178	-69.67375	3849
57	PER004240	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
58	PER004241	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
59	PER004242	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
60	PER004243	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
61	PER004244	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
62	PER004245	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
63	PER004246	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
64	PER004247	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
65	PER004248	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
66	PER004249	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
67	PER004250	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
68	PER004251	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
69	PER004252	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
70	PER004253	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
71	PER004254	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
72	PER004255	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
73	PER004256	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
74	PER004257	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
75	PER004258	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	AMPATIRI	-16.30403	-69.24336	3833
76	PER004259	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
77	PER004260	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	AMPATIRI	-16.30403	-69.24336	3833
78	PER004261	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
79	PER004262	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	AMPATIRI	-16.30403	-69.24336	3833
80	PER004263	ALTIPLANO	PUNO	YUNGUYO	YUNGUYO	YANAPATA	-16.31749	-69.04295	3867
81	PER004264	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	JULI	CHALLA PAMPA	-16.26300	-69.34520	3880
82	PER004270	ALTIPLANO	PUNO	YUNGUYO	YUNGUYO	ACCARI	-16.27747	-69.14182	3865

	CÓDIGO NACIONAL INIA	ECOTIPO	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
83	PER004271	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	JULI	CHALLA PAMPA	-16.26300	-69.14180	3880
84	PER004274	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	UNTA - PUNO	-15.83920	-70.02917	3856
85	PER004294	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	UNTA - PUNO	-15.83920	-70.02917	3856
86	PER004332	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	UNTA - PUNO	-15.83920	-70.02917	3856
87	PER004337	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	UNTA - PUNO	-15.83920	-70.02917	3856
88	PER004345	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	CULTA	-16.03937	-69.74828	3841
89	PER004356	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	CHECCACHATA	-16.16325	-69.70816	3850
90	PER004357	ALTIPLANO	PUNO	YUNGUYO	YUNGUYO	YUNGUYO	-16.24593	-69.09176	3826
91	PER004359	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	JULI	JULI	-16.21460	-69.45930	3869
92	PER004360	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	JULI	JULI	-16.21460	-69.45930	3869
93	PER004361	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	JULI	JULI	-16.21460	-69.45930	3869
94	PER004362	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	CHUCUITO	CHUCUITO	-15.89422	-69.88971	3871
95	PER004363	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	CHUCUITO	CHUCUITO	-15.89422	-69.88971	3871
96	PER004371	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	POMATA	POMATA	-16.27294	-69.29308	3915
97	PER004373	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	ILAVE	-16.08591	-69.63811	3847
98	PER004374	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	ILAVE	-16.08591	-69.63811	3847
99	PER004376	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	ILAVE	-16.08591	-69.63811	3847
100	PER004377	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
101	PER004378	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
102	PER004379	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
103	PER004380	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
104	PER004381	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
105	PER004382	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
106	PER004383	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
107	PER004384	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
108	PER004386	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
109	PER004387	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
110	PER004389	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
111	PER004391	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.83920	-70.02917	3827
112	PER004392	ALTIPLANO	PUNO	SAN ROMAN	JULIACA	YOCARA	-15.51020	-70.21560	3910
113	PER004393	ALTIPLANO	PUNO	LAMPA	PUCARA	PUCACHUPA	-14.92620	-70.50536	3910
114	PER004394	ALTIPLANO	PUNO	LAMPA	LAMPA	CHOCOROSI	-15.36517	-70.36686	3964
115	PER004405	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	HUANCCONI	-15.97415	-69.79878	3827
116	PER004406	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	HUANCCONI	-15.97415	-69.79878	3827
117	PER004407	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	HUANCCONI	-15.97415	-69.79878	3827

	CÓDIGO NACIONAL INIA	ECOTIPO	DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD
118	PER004408	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	CARITAMAYA	-16.00981	-69.73471	3833
119	PER004410	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	TALLINA	-15.83920	-70.02917	3856
120	PER004411	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	TALLINA	-15.83920	-70.02917	3856
121	PER004412	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PUNO	TALLINA	-15.83920	-70.02917	3856
122	PER004414	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	MOROCCOLLO	-15.97415	-69.79878	3827
123	PER004416	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	CHALLA PATJJA	-15.97415	-69.79878	3827
124	PER004418	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	CHALLA PATJJA	-15.97415	-69.79878	3827
125	PER004423	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	QUITARRANI PATJJA	-16.62864	-69.32256	3959
126	PER004425	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	HUAJAHUI	-16.62864	-69.32256	3959
127	PER004426	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	JACHA JANCCO PUNC	-16.62864	-69.32256	3959
128	PER004428	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	JACHA JANCCO PUNC	-16.62864	-69.32256	3959
129	PER004429	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	SIN DATOS	-16.62864	-69.32256	3959
130	PER004432	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	SIN DATOS	-16.62864	-69.32256	3959
131	PER004433	ALTIPLANO	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	SIN DATOS	-16.62864	-69.32256	3959
132	PER004435	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	TITIJO	-15.97415	-69.79878	3827
133	PER004436	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	TITIJO	-15.97415	-69.79878	3827
134	PER004452	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
135	PER004453	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
136	PER004454	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
137	PER004455	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
138	PER004456	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
139	PER004457	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
140	PER004458	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
141	PER004460	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	TUCANTANI	-15.97415	-69.79878	3827
142	PER004461	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	TUCANTANI	-15.97415	-69.79878	3827
143	PER004484	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	PAUCARCOLLA	CANCHARANI	-15.71631	-70.05612	3820
144	PER004489	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	COMUNIDAD CAMPESINA LACOTUYO	-16.14097	-69.63931	3861
145	PER004490	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	CARRETERA ILAVE - TACNA	-16.27000	-69.69000	3907
146	PER004498	ALTIPLANO	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	CARRETERA ILAVE - TACNA	-16.27000	-69.69000	3907
147	PER004520	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	QUENAFAJA	-16.12620	-69.70290	3856
148	PER004521	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	TOTORANI	-16.17987	-69.77238	3983
149	PER004523	ALTIPLANO	PUNO	PUNO	ACORA	CANCHON	-15.97415	-69.79878	3827

Tabla 2: Microsatélites seleccionados para el análisis de diversidad genética en *Chenopodium quinoa*

	SSR	Motivo principal	Secuencia directo	Secuencia reverso	Referencia
1	KAAT006	(ATT)10(GTT)7(ATT)3	tctgcaggatcgtaacctt	ttgatctcggcttcccact	D. E. Jarvis 2008
2	KAAT037	(TAA)19	tcaacctccgaatcctatcaa	ggatgctgattggtggataaa	D. E. Jarvis 2008
3	KCAA057	(CAA)6(CAT)3(CAA)2CAG(CAA)2	tgtgctaccaactgctctgg	ttggtctccatcaggctct	D. E. Jarvis 2008
4	KCAA065	(CAA)5AGC(AAC)2CACACCGAC(AAC)3	gccatcctagttggcgttt	tctgtccattacaacttcacca	D. E. Jarvis 2008
5	KGA03	(GA)16	attgccgacaatgaacgaat	gcttctatgtaaatggcatgtcccaac	S. A. Christensen 2007
6	QAAT027	(TATT)5(ATT)13	aatgaggaggcaatgcaaaag	cggctccctaccaatttctt	S.L. Mason 2005
7	QAAT100	(ACTACC)8ACTGTT(ATTGTT)23(ATT)5GTT(ATT)2(ACT)11	ggcatccagaggtcagtctt	gcaattctcttaataacaacaacia	S.L. Mason 2005
8	QAAT106	(TAA)9	tcagtaa gataataccatcagtaag	aaaatcccctataattacca	S.L. Mason 2005
9	QAAT112	(ATT)13	cccgatccaccataaga gaa	tgaagtgtagattggaagaatgaca	S.L. Mason 2005
10	QAAT024	(ATT)10	gcttctgaaccttaataggctctgtaccaaatc	aagaaatgtcacaagcaagca	S.L. Mason 2005
11	QAAT50	(AAT)17	ggcacgtgctgactactata	atggc gaatggtaatttgc	S.L. Mason 2005
12	QAAT70	(AAT)15	tgaacaggatcgtc atag tcaa	gcttctcgtcatctgtaccaat	S.L. Mason 2005
13	QAAT74	(ATT)14	gcttctatggaacccatcc gataa	atgcctatcctcctcctca	S. A. Christensen 2007
14	QAAT76	(ATT)13	cccgatccaccataaga gaa	tgaagtgtagattggaagaatgaca	S. A. Christensen 2007
15	QATG86	(AAT)30	gcttcatgtgtataaaatgccaat	gcttctctcggcttcccactaatttt	S. A. Christensen 2007
16	QCA069	(CA)4	tgcgtcacaccagagacta	gtgttgtgcatgcttgc	S.L. Mason 2005
17	QCA24	(CT)13TT(CT)12CA(CT)7(CA)17	agatgagcttgaatcattacatc	gcttctacatactgtaaatcatgcaaaa	S. A. Christensen 2007
18	QCA037	(CA)13CT(CA)16	ccgttctcca gaccaattc	tcatgaccacttcatacag	S.L. Mason 2005
19	QCA38	(CAA)6(CAT)3(CAA)2CAG(CAA)2	gcttctcatttcccaaatgcatgaat	tgcctcacagtcacacctaca	S. A. Christensen 2007
20	QCA57	(CA)22(TA)5	gcttcttgcaggaaaccttcttgg	tgcctcacagtcacacctaca	S. A. Christensen 2007
21	QCA88	(CA)4	gcttcttctggctgttccacctaat	cagtccc ggaatc gtaactc	S. A. Christensen 2007
22	QGA021	(CT)21	cacgaaaccaactcctctca	caccacaatcaccaccttgg	S.L. Mason 2005
23	QGA024	(CT)21	aatccccgaaagcatattaacca	aggaatggtctcttggcaca	S.L. Mason 2005
24	QGA032	(AG)21	ggatgaattcgaatggcaaaag	tggcagttggatccactataaa	S.L. Mason 2005
25	QGA002	(AG)25	gaaccttataaggctgtaccaaatc	aagaaatgtcacaagcaagca	S.L. Mason 2005

Figura 2: Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio. M: Marcador de peso molecular Invitrogen de 1 Kb.

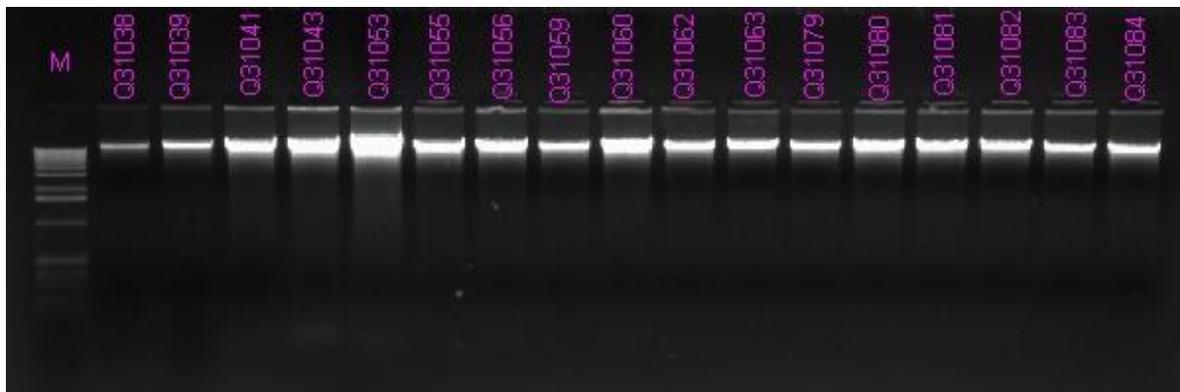


Tabla 3: Grupos multiplex, rango de amplificación, temperatura de hibridación y fluoróforo utilizado para cada marcador.

	Marcador	Rango de amplificación (pb)*	Temperatura de hibridación (°C)	Fluoróforo
PRIMER GRUPO	QGA021	141-161	59	6FAM
	QGA024	166-221	59	
	QAAT027	140-176	59	
	QAAT112	176-221	59	VIC
	QGA032	151-206	59	
	QCA24	221-251	59	NED
	KCAA065	275	60	
	QATG86	171-196	60	PET
SEGUNDO GRUPO	QGA002	171-231	58	6FAM
	QAAT106	251-341	58	
	KGA03	141-171	58	VIC
	QCA38	181-211	58	
	QCA88	181-216	60	NED
	QCA57	141-181	60	
	KAAT006	171-206	54	PET
	SIMPLEX	QAAT024	186-241	54
QAAT70		146-191	57	VIC
QAAT74		151-241	55	NED
KCAA057		161-191	62	PET
QAAT50		181-251	53	6FAM
QAAT76		131-216	62	VIC
KAAT037		191-331	53	NED
QAAT100		281-441	61	PET

*El rango de amplificación desde el alelo de menor tamaño detectado hasta el de mayor tamaño. Sin los 19 nucleótidos de la cola M13.

Tabla 4: Riqueza alélica detectada para cada loci en quinuas de valles interandinos y de altiplano.

Locus SSR	Rango (pb)	Número de alelos exclusivos			Alelos compartidos	He	Ho
		Total	Valles Interandinos (Cusco, Ayacucho, Ancash y Huancavelica)	Altiplano (Puno)			
KAAT006	171-206	9	1	1	7	0.34	0.24
KAAT037	191-331	31	12	9	10	0.85	0.40
KCAA057	161-191	2	0	0	2	0.37	0.00
KCAA065	275	1	0	0	1	0.00	0.00
KGA3	141-171	10	2	1	7	0.74	0.07
QAAT027	140-176	10	1	0	9	0.65	0.00
QAAT100	281-441	44	13	12	19	0.96	0.39
QAAT106	251-341	17	8	1	8	0.79	0.22
QAAT112	176-221	13	3	1	9	0.68	0.17
QAAT24	186-241	13	1	0	12	0.80	0.39
QAAT50	181-251	19	4	1	14	0.83	0.29
QAAT70	146-191	12	1	1	10	0.84	0.36
QAAT74	151-241	18	0	2	16	0.88	0.37
QAAT76	131-216	25	4	7	14	0.87	0.26
QATG86	171-196	5	0	1	4	0.59	0.00
QCA24	221-251	5	0	0	5	0.10	0.00
QCA38	181-211	4	1	0	3	0.54	0.00
QCA57	141-181	6	0	1	5	0.28	0.02
QCA88	181-216	3	0	0	3	0.31	0.00
QGA021	141-161	9	2	1	6	0.58	0.00
QGA024	166-221	20	5	2	13	0.87	0.06
QGA032	151-206	11	2	2	7	0.59	0.02
QGA2	171-231	7	0	0	7	0.34	0.03
	TOTAL	294	60	43	191		

Figura 3: Porcentaje de alelos exclusivos y compartidos en quinuas de valles interandinos y de altiplano.

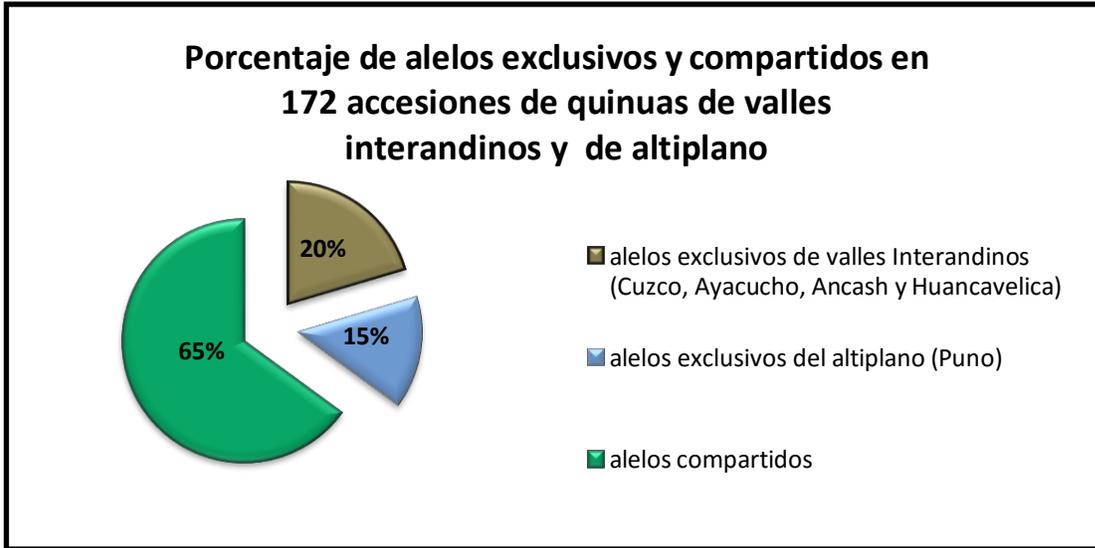


Figura 4: Diferencia de la heterocigosidad esperada y observada para cada locus.

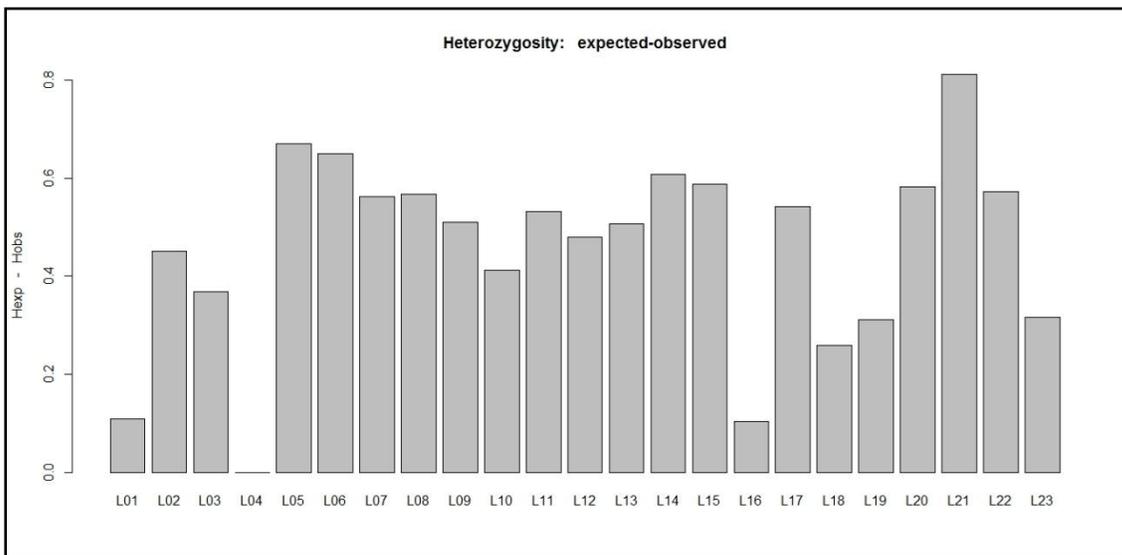


Figura 5: Porcentaje de frecuencias de alelos en quinuas de Valles Interandinos.

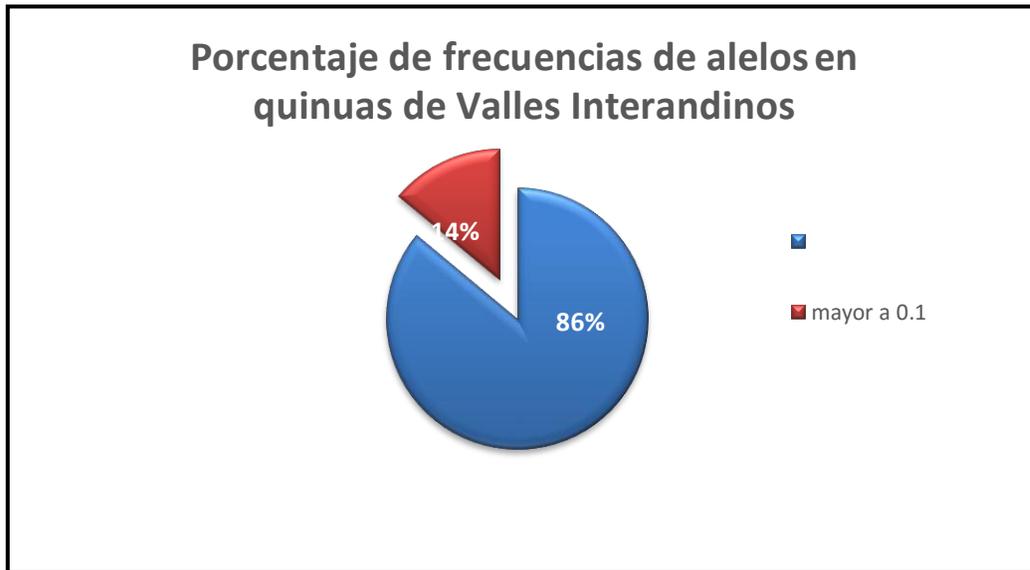


Figura 6: Porcentaje de frecuencias de alelos en quinuas del Altiplano.

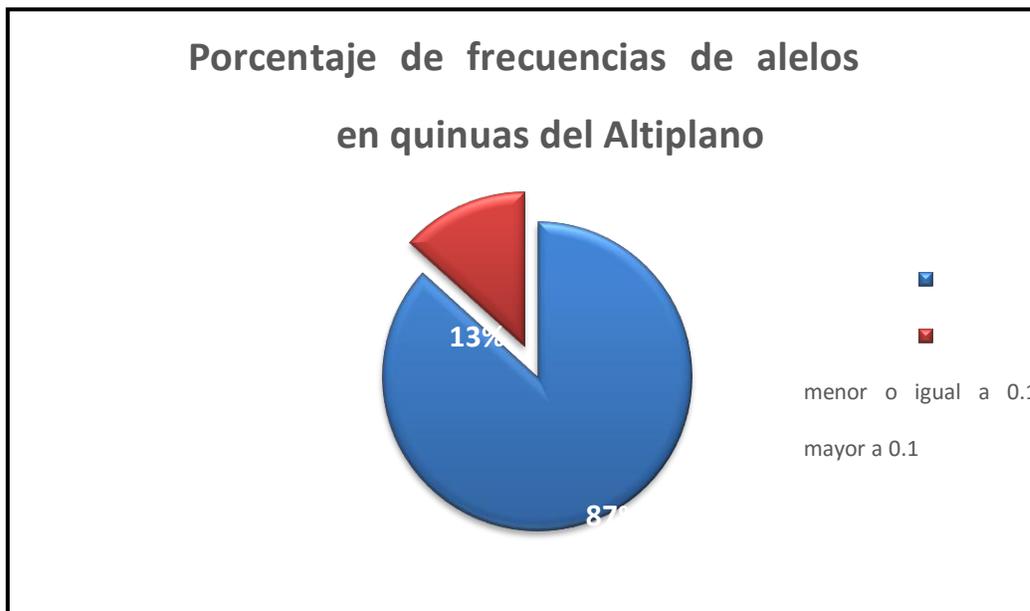


Figura 7: Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de 171 accesiones de quinua procedentes de la valles interandinos y del altiplano.

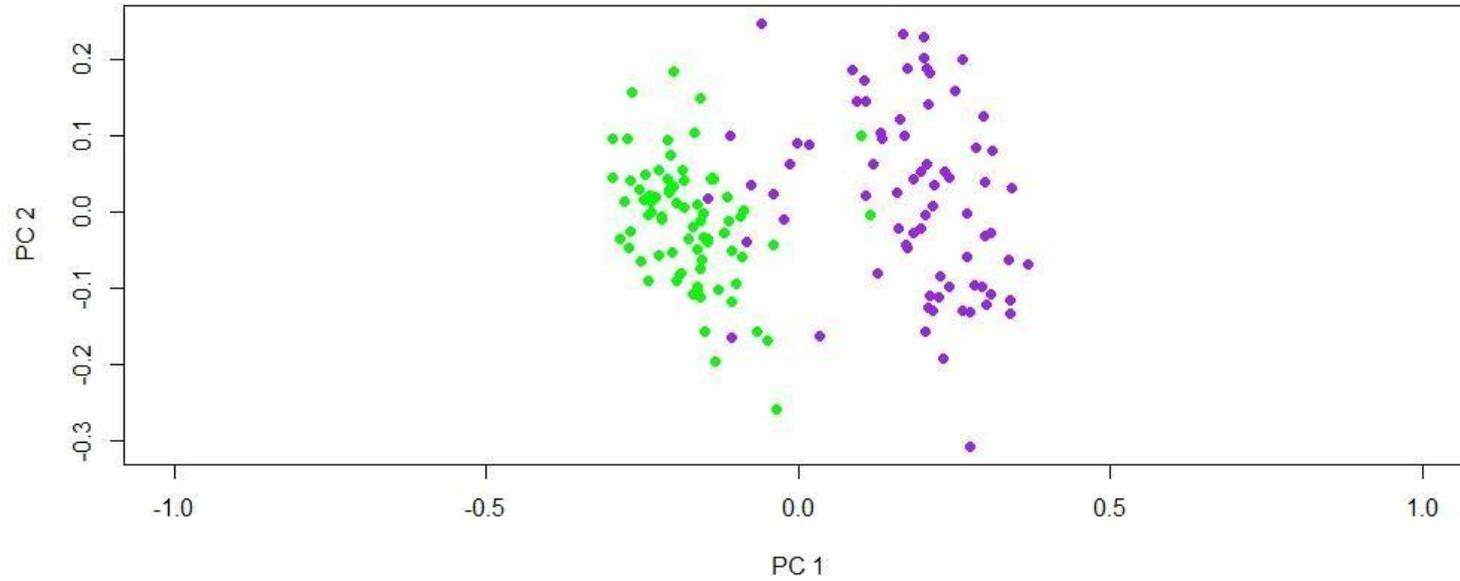


Figura 8: Valor de BIC de 1 a 20 clusters DAPC.

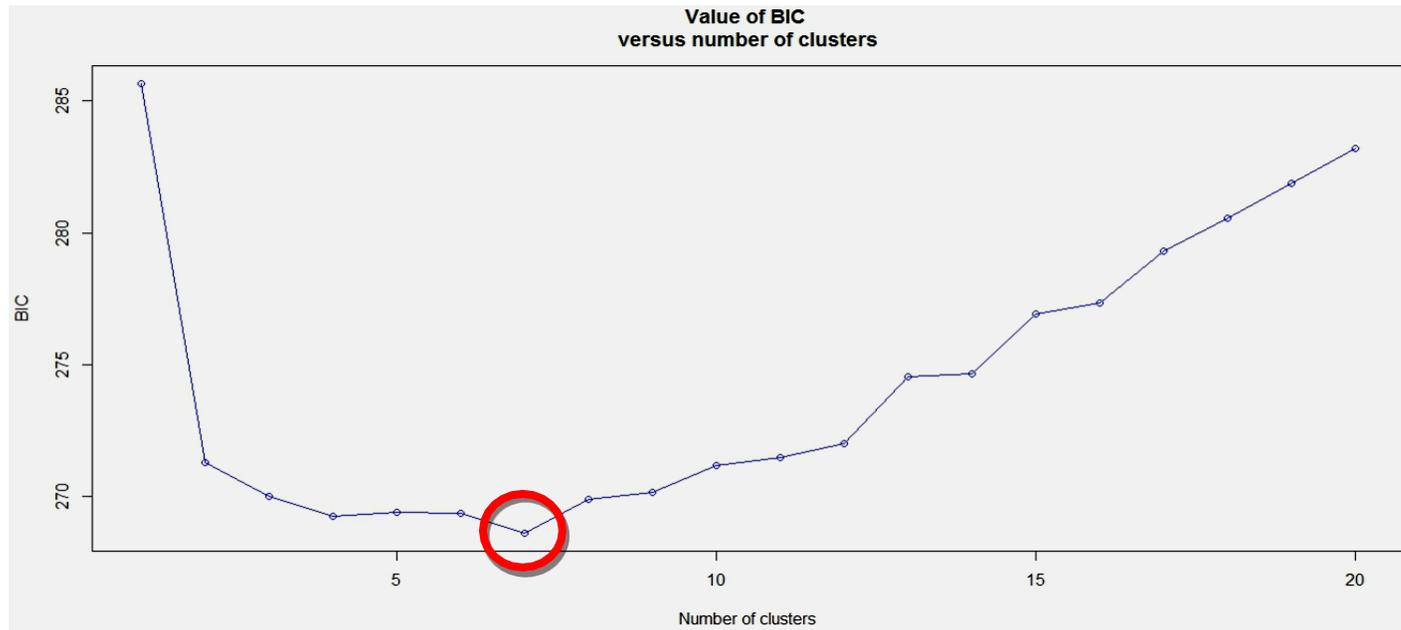


Figura 9: Análisis discriminante de componentes principales.

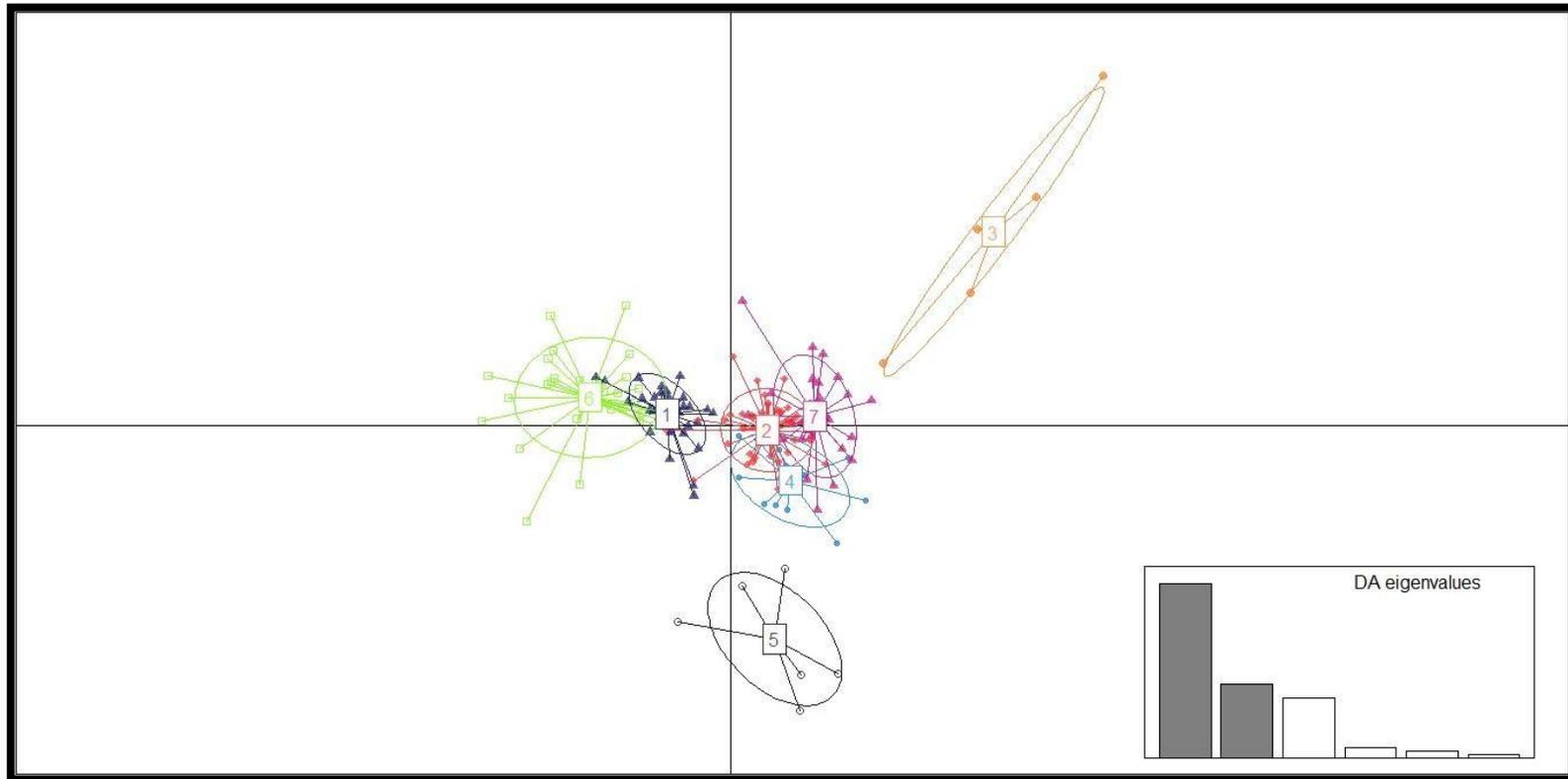
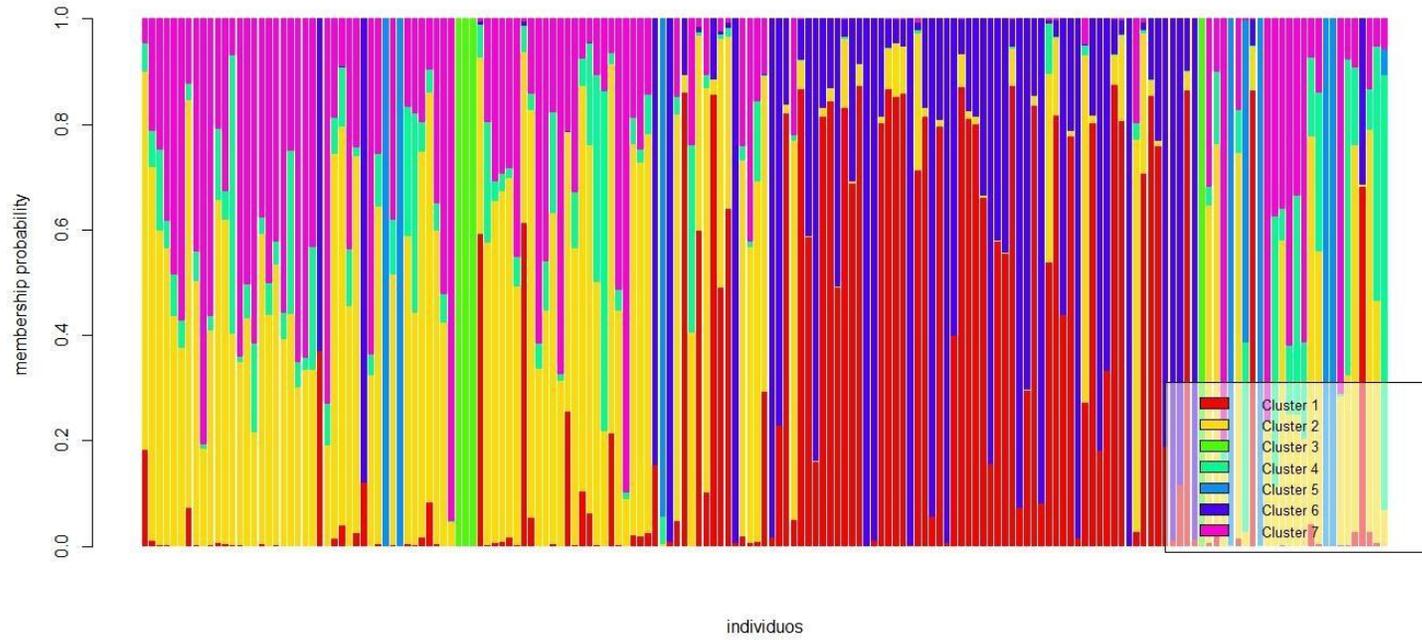


Figura 10: Probabilidad de pertenencia de cada individuo a los 7 clusters genéticos inferidos en el DAPC.



Anexo I: Protocolo de extracción de ADN en *Chenopodium quinoa*

1. Se introdujo el material vegetal en una bolsa plástica gruesa de 10 cm de alto x 13 cm de ancho y se añadieron 1000 μ l del buffer de extracción CTAB 2% y 2.85 μ l de β -mercaptoetanol.
2. Con la ayuda de la base de un tubo de ensayo se realizó la trituración del material vegetal en forma mecánica.
3. Seguidamente se incubaron las muestras a 65 °C durante 45 minutos en constante agitación.
4. Posteriormente se agregaron 900 μ l de la solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos.
5. Luego se transfirió el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga de 2 mL y se adicionaron 60 μ l de CTAB 10%, se agitó suavemente y se incubó a 65 °C por 5 minutos.
6. Se repitió el paso de 4 y se retiró el sobrenadante a otro tubo para microcentrífuga de 1.5 mL.
7. Luego se adicionó isopropanol frío en el mismo volumen que el sobrenadante obtenido (400-600 μ l) y se colocaron las muestras a -20 °C por 30 minutos.
8. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm durante 20 minutos, se decantó el sobrenadante y se invirtieron los tubos sobre papel toalla durante 1 minuto.
9. Seguidamente se realizó un lavado con etanol a 70% y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos.
10. A continuación se añadieron 300 μ l de acetato de potasio 5 M frío y se incubó a -20 °C por 10 minutos.

11. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se continuó con el lavado de etanol a 90%.
12. Finalmente se eliminó el etanol y se invirtieron los tubos sobre un papel toalla.
13. Una vez seco el pellet de ácidos nucleicos, se adicionaron 100 μ l de agua libre de nucleasas y se dejó disolver a 4 °C.
14. Posteriormente se adicionaron 3 μ l de RNAsa 2% y se incubó a 37°C por 1 hora.

Anexo II: Preparación de soluciones utilizadas en la extracción de ADN

Tampón de extracción CTAB 2x

Stock	Final	100 mL
Tris-HCl pH 8.0 1 M	100 mM	10 mL
CTAB	2 %	2 g
NaCl	1.4 M	8.12 g
EDTA pH 8.0 0.7 M	28 mM	4 mL
PVP	2.5 %	2.5 g
H ₂ O miliQ		completar a 100 mL

Tampón de extracción CTAB 10x

Stock	Final	100 mL
Tris-HCl pH 8.0 1 M	100 mM	10 mL
CTAB	10 %	10 g
NaCl	0.7 M	2 g
EDTA pH 8.0 0.5 M	10 mM	2 mL
H ₂ O miliQ	-	completar a 100 mL

Anexo III: Protocolo de amplificación para los cebadores seleccionados

Protocolo PCR simple para marcadores: QAAT24, QAAT70, QAAT74, KAAT006, KCAA057, QAAT50, QAAT76, QAAT100, KAAT037

Reactivo	Stock	Final
NFW	-	-
5x KAPA Buffer	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	2 mM
dNTPs	5 mM	0.2 mM
Fw	1 μM	0.06 μM
Rw	1 μM	0.04 μM
M13	1 μM	0.06 μM
BSA	10 mg/ml	0.4 mg/ml
Taq Kapa	500U	3.5 U
DNA	-	15 ng/μL
Volumen final	-	10 μL

Protocolo PCR dúplex I para marcadores: KCAA065, QATG86, QCA88, QCA57, KGA3, QCA38, QGA2, QAAT106

Reactivo	Stock	Final
NFW	-	-
5x KAPA Buffer	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	2 mM
dNTPs	5 mM	0.2 mM
Fw1	1 μM	0.06 μM
Rw1	1 μM	0.04 μM
Fw2	1 μM	0.06 μM
Rw2	1 μM	0.04 μM
M13	1 μM	0.06 μM
BSA	10 mg/ml	0.4 mg/ml
Taq Kapa	500 U	3.5 U
DNA	-	15 ng/μL
Volumen final	-	10 μL

Protocolo PCR dúplex II para marcadores: QGA032, QCA24, QAAT112, QAAT027

Reactivo	Stock	Final
NFW	-	-
5x KAPA Buffer	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	2 mM
dNTPs	5 mM	0.2 mM
Fw1(QGA032)/(QAAT112)	1 µM	0.1 µM
Rw1 (QGA032)/(QAAT112)	1 µM	0.1 µM
Fw2 (QCA24)/(QAAT027)	1 µM	0.1 µM
Rw2 (QCA24)/(QAAT027)	1 µM	0.1 µM
M13	1 µM	0.08 µM
BSA	10 mg/ml	0.4 mg/ml
Taq Kapa	500 U	3.5 U
DNA	-	15 ng/µL
Volumen final	-	10 µL

Protocolo PCR dúplex III para marcadores: QGA021, QGA024

Reactivo	Stock	Final
NFW	-	-
5x KAPA Buffer	5x	1x
MgCl ₂	25 mM	2 mM
dNTPs	5 mM	0.2 mM
Fw1 (QGA021)	1 µM	0.08 µM
Rw1 (QGA021)	1 µM	0.06 µM
Fw2 (QGA024)	1 µM	0.06 µM
Rw2 (QGA024)	1 µM	0.04 µM
M13	1 µM	0.06 µM
BSA	10 mg/ml	0.4 mg/ml
Taq Kapa	500 U	3.5 U
DNA	-	15 ng/µL
Volumen final	-	10 µL

Condiciones de amplificación:

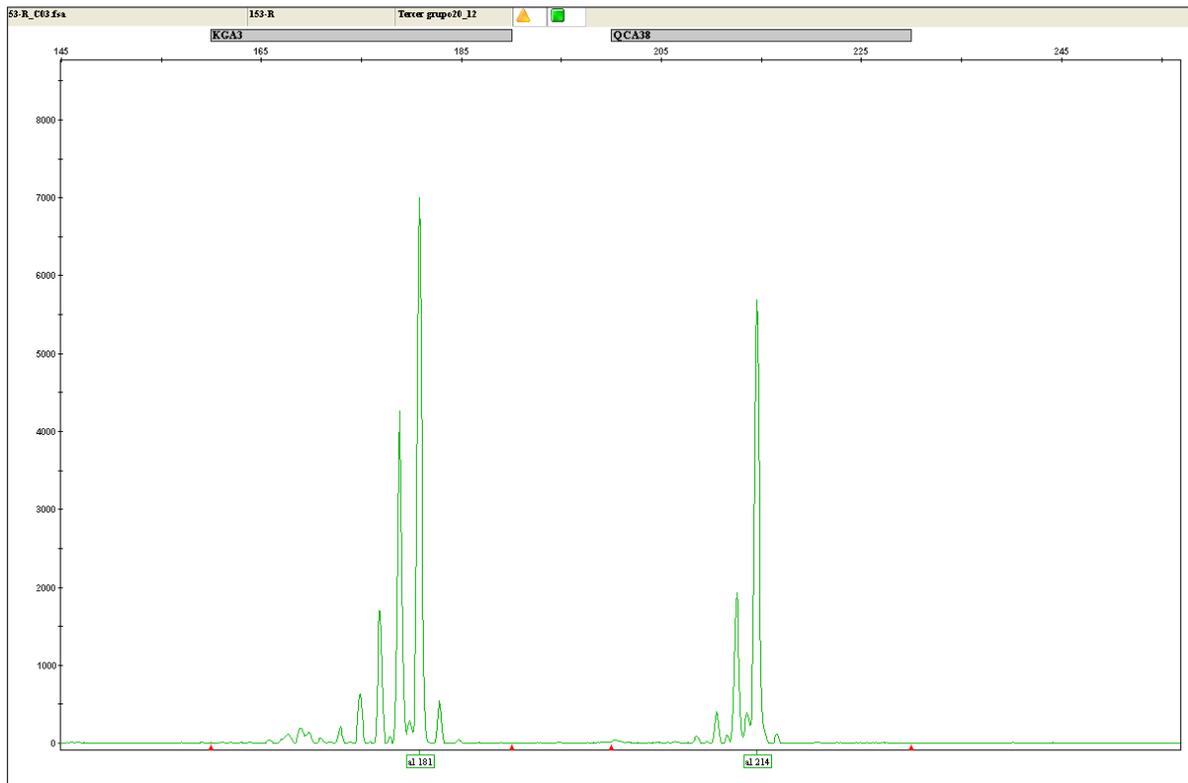
Denaturación inicial 94 °C por 3'	
Denaturación 94 °C por 1'	30 ciclos
Hibridación * °C por 1'	
Extensión 72 °C por 1'	
Denaturación 94 °C por 30"	8 ciclos
Hibridación 53 °C por 30"	
Extensión 72 °C por 30"	
Extensión final 72°C por 10'	

*La temperatura de hibridación fue diferente para los cebadores utilizados (anexo 9).

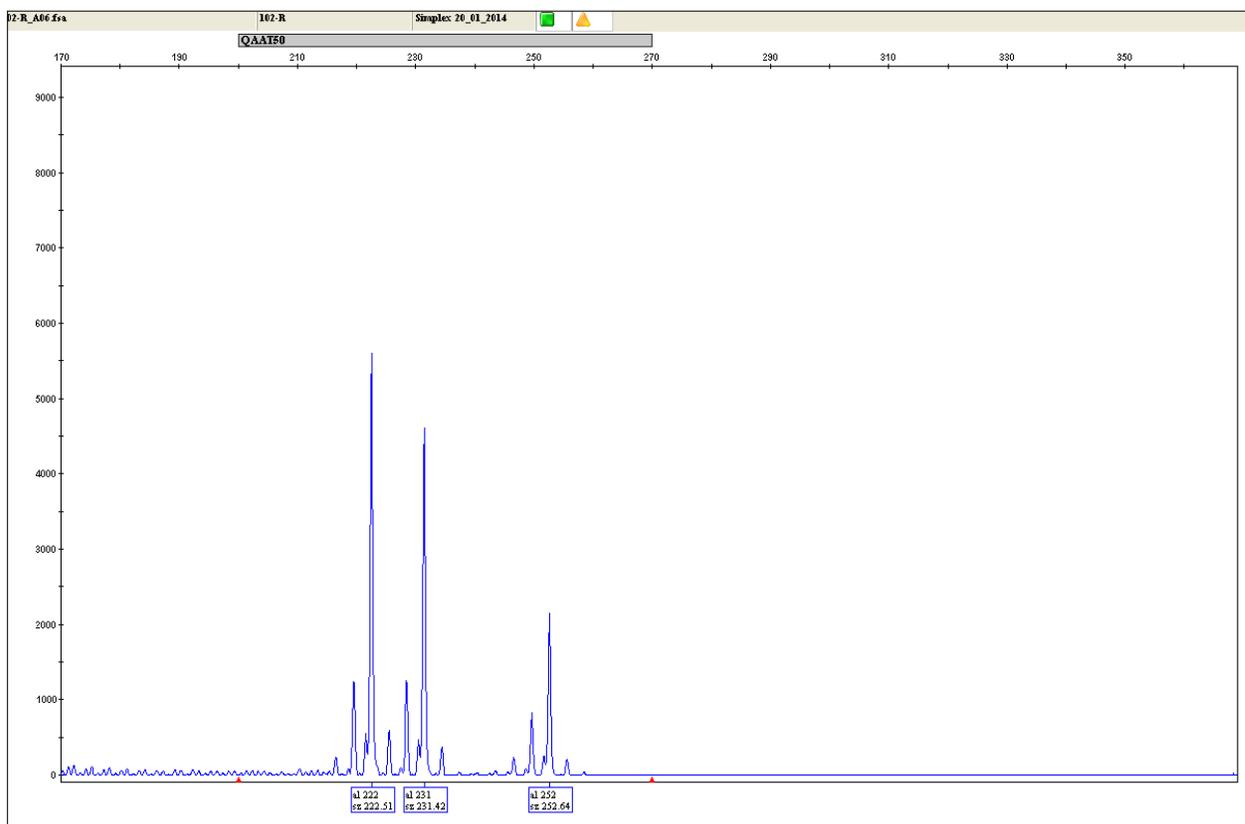
Anexo IV: Condiciones de corrida electroforética capilar mediante el ABI 3130xl

Temperatura de horno	60 °C
Voltaje de pre-corrida	15.0 °C
Tiempo de pre-corrida	180 segundos
Voltaje de la inyección	1.2 Kvoltios
Tiempo de la inyección	50 segundos
Voltaje de corrida	15.0 Kvoltios
Tiempo de corrida por inyección	1140 segundos

Anexo V: Electroferograma de los marcadores KGA3 y QCA38.



Anexo VI: Electroferograma del marcador QAAT50.



Anexo VII: Clusters genéticos asignados para cada individuo mediante DPCA

	ACCESIÓN	DEPARTAMENTO	DISTRITO	CLUSTER ASIGNADO POR DAPC
1	PER004405	PUNO	ACORA	2
2	PER004406	PUNO	ACORA	2
3	PER004408	PUNO	ACORA	2
4	PER004410	PUNO	PUNO	2
5	PER004411	PUNO	PUNO	2
6	PER004412	PUNO	PUNO	7
7	PER004414	PUNO	ACORA	7
8	PER004416	PUNO	ACORA	2
9	PER004426	PUNO	HUACULLANI	7
10	PER004428	PUNO	HUACULLANI	2
11	PER004429	PUNO	HUACULLANI	4
12	PER004432	PUNO	HUACULLANI	2
13	PER004433	PUNO	HUACULLANI	4
14	PER004435	PUNO	ACORA	7
15	PER004436	PUNO	ACORA	7
16	PER004452	PUNO	ACORA	4
17	PER004453	PUNO	ACORA	2
18	PER004454	PUNO	ACORA	7
19	PER004455	PUNO	ACORA	2
20	PER004456	PUNO	ACORA	7
21	PER004457	PUNO	ACORA	4
22	PER004458	PUNO	ACORA	7
23	PER004460	PUNO	ACORA	7
24	PER004461	PUNO	ACORA	2
25	PER004394	PUNO	LAMPA	6
26	PER004393	PUNO	PUCARA	7
27	PER004392	PUNO	JULIACA	2
28	PER004391	PUNO	PUNO	2
29	PER004389	PUNO	PUNO	2
30	PER004387	PUNO	PUNO	2
31	PER004384	PUNO	PUNO	6
32	PER004383	PUNO	PUNO	7

	ACCESIÓN	DEPARTAMENTO	DISTRITO	CLUSTER ASIGNADO POR DAPC
33	PER004382	PUNO	PUNO	7
34	PER004381	PUNO	PUNO	5
35	PER004380	PUNO	PUNO	7
36	PER004379	PUNO	PUNO	5
37	PER004378	PUNO	PUNO	2
38	PER004377	PUNO	PUNO	2
39	PER004376	PUNO	ILAVE	2
40	PER004374	PUNO	ILAVE	2
41	PER004371	PUNO	POMATA	2
42	PER004363	PUNO	CHUCUITO	2
43	PER004362	PUNO	CHUCUITO	3
44	PER004361	PUNO	JULI	3
45	PER004360	PUNO	JULI	3
46	PER004359	PUNO	JULI	3
47	PER004357	PUNO	YUNGUYO	1
48	PER004356	PUNO	ACORA	4
49	PER004423	PUNO	HUACULLANI	2
50	PER004425	PUNO	HUACULLANI	2
51	PER004520	PUNO	ACORA	7
52	PER004521	PUNO	ACORA	7
53	PER004523	PUNO	ACORA	2
54	PER004526	PUNO	ACORA	2
55	PER004489	PUNO	ILAVE	7
56	PER004490	PUNO	ILAVE	7
57	PER004498	PUNO	ILAVE	2
58	PER004294	PUNO	PUNO	7
59	PER004270	PUNO	YUNGUYO	7
60	PER004271	PUNO	JULI	2
61	PER004274	PUNO	PUNO	4
62	PER004332	PUNO	PUNO	4
63	PER004337	PUNO	PUNO	2
64	PER004345	PUNO	ACORA	7
65	PER004373	PUNO	ILAVE	2
66	PER004386	PUNO	PUNO	7
67	PER004407	PUNO	ACORA	7

	ACCESIÓN	DEPARTAMENTO	DISTRITO	CLUSTER ASIGNADO POR DAPC
68	PER004418	PUNO	ACORA	2
69	PER004484	PUNO	PAUCARCOLLA	2
70	PER004549	PUNO	POMATA	2
71	PER004577	PUNO	PISACOMA	6
72	PER004679	CUSCO	LANGUI	5
73	PER004680	CUSCO	LANGUI	6
74	PER004683	CUSCO	LANGUI	2
75	PER004687	CUSCO	LAYO	1
76	PER004688	CUSCO	SANGARARA	7
77	PER004662	AYACUCHO	HUANCAPI	1
78	PER004664	AYACUCHO	VINCHOS	2
79	PER004666	AYACUCHO	VINCHOS	1
80	PER004669	AYACUCHO	TAMBILLO	1
81	PER004691	HUANCAVELICA	LIRCAY	1
82	PER004677	CUSCO	SICUANI	6
83	PER004684	CUSCO	LANGUI	2
84	PER004685	CUSCO	LANGUI	2
85	PER004686	CUSCO	LANGUI	2
86	PER004602	ANCASH	HUAYLAS	2
87	PER004598	ANCASH	HUAYLAS	6
88	PER004609	ANCASH	HUAYLAS	6
89	PER004634	ANCASH	HUAYLAS	6
90	PER004612	ANCASH	HUAYLAS	2
91	PER003320	CUSCO	ACOMAYO	1
92	PER003321	CUSCO	ACOMAYO	6
93	PER003322	CUSCO	ACOMAYO	6
94	PER003324	CUSCO	ACOS	1
95	PER003326	CUSCO	ACOS	1
96	PER003328	CUSCO	PISAC	1
97	PER003330	CUSCO	OLLANTAYTAMBO	1
98	PER003331	CUSCO	URUBAMBA	6
99	PER003334	CUSCO	OLLANTAYTAMBO	2
100	PER003335	CUSCO	URUBAMBA	6
101	PER003339	CUSCO	ACOMAYO	6
102	PER003343	CUSCO	POMACANCHI	1

	ACCESIÓN	DEPARTAMENTO	DISTRITO	CLUSTER ASIGNADO POR DAPC
103	PER003345	CUSCO	URUBAMBA	1
104	PER003347	CUSCO	SAN SALVADOR	1
105	PER003351	CUSCO	MARAS	1
106	PER003353	CUSCO	MARAS	6
107	PER003356	CUSCO	MARAS	1
108	PER003359	CUSCO	MARAS	1
109	PER003361	CUSCO	MARAS	6
110	PER003363	CUSCO	URUBAMBA	1
111	PER003364	CUSCO	URUBAMBA	6
112	PER003365	CUSCO	URUBAMBA	6
113	PER003366	CUSCO	COYA	1
114	PER003367	CUSCO	HUAROCONDO	6
115	PER003368	CUSCO	POROY	1
116	PER003369	CUSCO	POROY	1
117	PER003371	CUSCO	LAMAY	6
118	PER003372	CUSCO	LAMAY	6
119	PER003375	CUSCO	PISAC	1
120	PER003376	CUSCO	ZURITE	1
121	PER003377	CUSCO	ZURITE	6
122	PER003378	CUSCO	SAN PEDRO	6
123	PER003379	CUSCO	SAN PEDRO	1
124	PER003380	CUSCO	SAN PEDRO	6
125	PER003381	CUSCO	TINTA	1
126	PER003382	CUSCO	TINTA	1
127	PER003383	CUSCO	TINTA	6
128	PER003384	CUSCO	LANGUI	1
129	PER003388	CUSCO	MARANGANI	6
130	PER003389	CUSCO	MARANGANI	2
131	PER003390	CUSCO	MARANGANI	6
132	PER003392	CUSCO	LAMAY	1
133	PER003399	CUSCO	ANTA	6
134	PER003402	CUSCO	OLLANTAYTAMBO	1
135	PER003405	CUSCO	URUBAMBA	1
136	PER003423	CUSCO	OLLANTAYTAMBO	6
137	PER003427	CUSCO	PILLPINTO	2

	ACCESIÓN	DEPARTAMENTO	DISTRITO	CLUSTER ASIGNADO POR DAPC
138	PER003428	CUSCO	PILLPINTO	2
139	PER003430	CUSCO	SICUANI	1
140	PER003431	CUSCO	SICUANI	1
141	PER003433	CUSCO	URCOS	6
142	PER003435	CUSCO	CUSIPATA	6
143	PER003441	CUSCO	MARAS	1
144	PER003443	CUSCO	MARAS	1
145	PER003444	CUSCO	MARAS	6
146	PER004239	PUNO	ILAVE	3
147	PER004240	PUNO	PILCUYO	2
148	PER004241	PUNO	POMATA	2
149	PER004242	PUNO	POMATA	7
150	PER004243	PUNO	PILCUYO	5
151	PER004244	PUNO	PILCUYO	2
152	PER004245	PUNO	PILCUYO	5
153	PER004246	PUNO	PILCUYO	6
154	PER004247	PUNO	PILCUYO	5
155	PER004248	PUNO	PILCUYO	7
156	PER004249	PUNO	ILAVE	4
157	PER004250	PUNO	ILAVE	7
158	PER004251	PUNO	ILAVE	7
159	PER004252	PUNO	ILAVE	7
160	PER004253	PUNO	PILCUYO	7
161	PER004254	PUNO	PILCUYO	2
162	PER004255	PUNO	PILCUYO	2
163	PER004256	PUNO	PILCUYO	5
164	PER004257	PUNO	POMATA	5
165	PER004258	PUNO	POMATA	7
166	PER004259	PUNO	POMATA	4
167	PER004260	PUNO	POMATA	2
168	PER004261	PUNO	POMATA	6
169	PER004262	PUNO	POMATA	4
170	PER004263	PUNO	YUNGUYO	4
171	PER004264	PUNO	JULI	4