

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 75 ACCESIONES DE
QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd) DEL DEPARTAMENTO DE
PUNO MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES”**

Presentada por:

Giuliana Victoria Donaire Tataje

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

LIMA – PERÚ

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 75 ACCESIONES DE
QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd) DEL DEPARTAMENTO DE PUNO
MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES”**

Presentada por:

Giuliana Victoria Donaire Tataje

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Mg Sc. Rosa Espejo Joya
PRESIDENTE

Mg. Sc. Roberto Mansilla Samaniego
MIEMBRO

Dra. Luz Gómez Pando
MIEMBRO

Mg. César López Bonilla
ASESOR

Ph. D. Carlos Gonzalo Merino Mendez
COASESOR

Dedicatoria

A Victoria Aglae, mi abuela entrañable

AGRADECIMIENTOS

A **mi familia**, por los cuidados, la guía, los valores y los sentimientos que me forman, especialmente a mis abuelos, a mis padres y mis hermanos; sin ellos no hubiera podido iniciar y menos imaginar completar este trabajo sin su máximo apoyo y cariño.

A **la Universidad Nacional Agraria La-Molina (UNALM)** por la formación académica, por los conocimientos adquiridos en las horas de estudio, por los inacabables trabajos encargados, por los cursos que parecían difíciles y las amanecidas de estudio. Gracias por los amigos encontrados y las horas de esparcimientos en sus áreas verdes.

Al **Mg.Sc. Cesar López Bonilla**, gran docente e investigador de la UNALM, por su asesoría especializada en genética de poblaciones.

Al **Laboratorio de Genómica** por abrir sus puertas en mi búsqueda de complementación académica. Debo extender mis agradecimientos al **Dr. Carlos Merino** y al **Mg. Sc. Edgar Neyra** por la confianza y el apoyo depositado para la realización de este proyecto. A mis compañeros de laboratorio: a **Jose y Lorena** porque fueron mis guías durante mis primeros días de practicante. A **Diana, Maria Julia, Patricia, César y Hans** por estar siempre apoyándome y trabajando tan duro en sus investigaciones.

A **Emily, Emi y Francisco**, gracias por los consejos, las asesorías y las réplicas, por su orientación en los aspectos genéticos de este trabajo, por sus críticas oportunas y sobre todo por ser una fuente de inspiración y ejemplo incansable de amor por el estudio y el trabajo.

A mis compañeros molineros **Carmen, Rosmery y Renato** a quienes no conocí durante el pregrado en la UNALM pero que la vida me los presentó luego en Cayetano para alentarnos en la culminación de nuestras tesis.

A mis compañeros de investigación en el cultivo de quinua; **Romina y Jhonatan** por ser parte de la aventura y culminar con éxito los objetivos trazados, por las ideas que han aportado para enriquecer el trabajo y sobre todo por su apoyo solidario y su amistad.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Clasificación taxonómica de la quinua.....	3
2.2. Características botánicas.....	4
2.3. Características genéticas de la quinua.....	9
2.4. Aspectos evolutivos de la quinua.....	9
2.5. Distribución geográfica del cultivo y migración a otros continentes.....	15
2.6. Distribución y ecotipos de la quinua en Perú.....	17
2.7. Uso de marcadores moleculares en estudios de caracterización y diversidad genética vegetal.....	21
2.8. Variabilidad y diversidad genética de la quinua estudiada con recursos de genética molecular.....	24
2.9. Métodos para el análisis de la diversidad genética.....	29
2.10. Estructuración y diferenciación genética poblacional.....	32
2.11. Métodos multivariados.....	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
3.1. Hipótesis.....	41
3.2. Objetivos.....	41
3.3. Material Vegetal.....	42
3.4. Estrategia de muestreo del ADN (<i>bulk DNA sampling</i>).....	42
3.5. Reactivos y enzimas.....	42
3.6. Extracción de ADN.....	43
3.7. Electroforesis en geles de agarosa.....	44
3.8. Cuantificación de la concentración del ADN extraído de las muestras.....	44

3.9.	Dilución de la concentración de ADN de las muestras.....	45
3.10.	Loci SSR utilizados.....	45
3.11.	Amplificación de las regiones microsátélites	47
3.12.	Información Complementaria (Base de datos)	50
3.13.	Análisis estadístico.....	51
3.14.	Programas Computacionales (<i>Software</i>).....	55
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
4.1.	Caracterización molecular de 75 accesiones de quinua de Puno con 25 marcadores microsátélites	58
4.2.	Análisis de la diversidad alélica en el departamento de Puno	65
4.3.	Diferenciación genética entre las accesiones del departamento de Puno.....	70
4.4.	Diversidad alélica entre las accesiones del altiplano (Puno) y de Valles interandinos (Cuzco, Ayacucho, Ancash, Huancavelica).....	75
4.5.	Agrupamiento mediante métodos multivariados entre las accesiones del altiplano (Puno) y accesiones de valles interandinos.....	79
4.6.	Diferenciación genética entre las accesiones del ecotipo altiplano y de valles interandinos.....	80
V.	CONCLUSIONES	85
VI.	RECOMENDACIONES.....	87
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
VIII.	ANEXOS	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Bancos de accesiones de Germoplasma de quinua en Latinoamérica.....	23
Tabla 2: Set de Loci microsatélites seleccionados, motivo repetido y secuencia de los iniciadores en cada loci SSR	46
Tabla 3: Componentes del mix de PCR.....	48
Tabla 4: Set de marcadores, indicando el nombre del loci, el motivo repetido, la ubicación de marcadores seleccionados en los grupos de los mapas de ligamiento y la temperatura de alineamiento Ta (°C) en la PCR	49
Tabla 5: Programa de amplificación para 25 marcadores SSRs.....	50
Tabla 6: Polimorfismo genético en Puno. Tamaño y número de alelos amplificados con 25 marcadores microsatélites.....	60
Tabla 7: Loci microsatélite, motivo, rango y distribución de la diversidad alélica evaluada en quinuas del departamento de Puno	68
Tabla 8: Comparación de la riqueza alélica en diferentes estudios usando marcadores microsatélites	69
Tabla 9: Cálculo de las distancias genéticas de Nei entre las provincias del departamento de Puno	72
Tabla 10: Cálculo del estadístico F_{ST} por pares entre las provincias del departamento de Puno	73
Tabla 11: Resultados comparados de la diversidad genética entre accesiones de valles interandinos (V) y accesiones del altiplano (A) con 22 marcadores microsatélites.....	77
Tabla 12: Matriz de Distancia Genética de Nei por pares entre los departamentos de valles interandinos y de altiplano	80
Tabla 13: Estadístico F_{ST} entre los ecotipos altiplano y valles interandinos	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diversidad de formas, colores y características en quinuas peruanas.....	3
Figura 2: Tipos de ramificación en las inflorescencias de quinua: intermedia, compacta y laxa (De izquierda a derecha).....	3
Figura 3: Diversidad de colores en los granos de quinua en accesiones peruanas.....	3
Figura 4: Posibles patrones de movimiento del germoplasma de quinua antiguo y moderno en la región de Bolivia-Argentina-Chile	9
Figura 5: Hipótesis de la evolución de la quinua y sus parientes silvestres	10
Figura 6: Distribución mundial del cultivo de quinua.....	16
Figura 7: Mapa de la distribución de las accesiones de quinua conservadas por el INIA estudiadas en el presente trabajo	20
Figura 8: Electroforesis del ADN extraído de 19 accesiones de quinua	44
Figura 9: Perfil molecular del locus QAAT062	61
Figura 10: Perfil molecular del locus QAAT076	61
Figura 11: Perfil molecular del locus QCA120.....	62
Figura 12: Perfil molecular del locus KGA20.....	62
Figura 13: Perfil molecular del locus QGAA001	63
Figura 14: Perfil molecular del locus KAAT007	63
Figura 15: Perfil molecular del locus KCAA106	64
Figura 16: PCA entre las accesiones de diferentes provincias del departamento de Puno	70
Figura 17: Distribución de las accesiones evaluadas en el departamento de Puno	74
Figura 18: Patrones alélicos entre las accesiones de los departamentos de Puno, Cusco, Ayacucho, Ancash y Huancavelica	78
Figura 19: Análisis de PCA entre las accesiones de diferentes provincias de los ecotipos Altiplano (Puno) y Valles interandino (Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho)	79
Figura 20: DPCA entre las accesiones de diferentes provincias de los ecotipos Altiplano (Puno) y Valles interandino (Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho)	83
Figura 21: Análisis de la diferenciación poblacional con modelamiento Bayesiano	84

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Datos pasaporte de las accesiones evaluadas en el departamento de Puno.....	97
Anexo 2: Resultados de amplificación de los loci SSR estudiados.....	101
Anexo 3: Resultados de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg utilizando el test de chi-cuadrado en cada loci microsatélite.....	109

RESUMEN

El objetivo principal fue determinar la diversidad y la diferenciación genética poblacional del germoplasma de quinua peruana, perteneciente a la Colección Nacional del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Para ello, se caracterizó de forma inicial 25 loci microsatélites en 75 accesiones de quinua del departamento de Puno que corresponden al ecotipo altiplano. Una vez culminado este paso se comparó la diversidad genética del altiplano con 75 accesiones provenientes de los valles interandinos (departamentos de Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho) mediante la caracterización de 22 loci microsatélites. Una vez caracterizada cada accesión se determinó la riqueza alélica, la heterocigosidad (como medida de diversidad), el porcentaje de loci polimórficos (%P) y el número de alelos privados. Acorde con uno de los objetivos principales del estudio para lograr estimar el valor de la diferenciación genética poblacional entre los ecotipos de los valles interandinos y del altiplano se calculó las distancias genéticas entre los ecotipos expuestos y para ello se usó el estadístico F_{ST} de Wright. Asimismo, fue de gran ayuda el uso de los métodos de análisis multivariados tales como, los algoritmos de análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de componentes principales (DPCA) para representar la distribución esta diversidad presente en las accesiones. El análisis adicional basado en el modelamiento Bayesiano también evaluó el grado de diferenciación entre estos ecotipos, revelando que ambos ecotipos comparten un acervo en común, pero presentan una diferenciación significativa estimada por el porcentaje (%) de alelos privados y por el grado de pertenencia de cada accesión a un agrupamiento o ecotipo. En este trabajo se ha demostrado que 25 marcadores microsatélites resultan ser altamente polimórficos en la población de 75 accesiones de quinua del departamento de Puno con un número total de alelos encontrados $n=296$. Este número de alelos varía según el loci marcador en un rango de 2 (QCA14) a 40 (QGAA001). El promedio de alelos fue de $n=11.8$ alelos por marcador en las accesiones del departamento de Puno, mientras que el promedio de alelos en las accesiones de valles interandinos fue $n=12$. Se determinó que existe una diferenciación y agrupamiento en dos cluster correspondiente a los ecotipos de los valles interandinos y del altiplano. Sin embargo, dentro del altiplano (Puno) no se evidenció un agrupamiento genético basado en las distancias geográficas, o debido a la cercanía de las provincias estudiadas. Se demuestra que la mayor diferenciación de la quinua peruana presente en la Colección Nacional del INIA puede estar influenciada en gran medida por el ambiente y la variabilidad y distribución de las poblaciones modificada por las condiciones

agroecológicas presentes en las regiones. Finalmente, gracias a la caracterización con 22 marcadores moleculares microsatélites se determina un grado de diferenciación poblacional moderada igual a F_{ST} 0.066 para los ecotipos del altiplano y de los valles interandinos.

Palabras claves: *Chenopodium quinoa* Willd, microsatélites, diversidad genética, diferenciación genética, riqueza alélica.

ABSTRACT

The aim was to determine the diversity and population genetic differentiation germplasm Peruvian quinoa belongs to the National Collection at National Institute Agrarian Innovation (INIA). Thus initially, 75 accessions of quinoa Puno department (highlands ecotype) were characterized with 25 loci microsatellite. Once this step is completed, the diversity found in highlands (Puno) was compared with 75 other accessions from interandean valley (departments of Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho) through the characterization 22 loci microsatellite. Then, once each accession was characterized, the allelic richness, the heterozygosity (as a measure of diversity), the percentage of polymorphic loci (% P) and the number of private alleles were determined. In agreement with one of the main objectives of the study to estimate the population genetic differentiation value between the interandean valley and highland ecotypes, the genetic distances between ecotypes was calculated by using Wright F_{ST} statistic. Also, was very helpful the use of multivariate analysis methods which included algorithms principal component analysis (PCA) and discriminant analysis principal component (DPCA) to represent distribution of genetic diversity and differentiation present in accessions. The additional analysis based on Bayesian modeling also evaluated the degree of differentiation between these ecotypes, revealing that both ecotypes shared an estimate in the percentage, but presented a significant differentiation for the percentage of membership of each access to a grouping or ecotype. In this work it has been demonstrated that 25 microsatellite markers are highly polymorphic in the population of 75 quinoa accessions from Puno department of with a total number of alleles found $n = 296$. This number of alleles varies according to the marker loci in a range of 2 (QCA14) to 40 (QGAA001). The average of alleles was $n = 11.8$ alleles per marker in the accessions of department Puno, while the average of alleles in the accessions of inter-Andean valleys was $n = 12$. It was determined that there is a differentiation and grouping in two clusters corresponding to the ecotypes of the interandean and highland valleys. However, within the altiplano (Puno) there was no evidence of a genetic grouping based on geographical distances, or due to the proximity of the provinces studied. It is shown that the greater differentiation of Peruvian quinoa present in the National Collection of INIA can be influenced to a large extent by the environment and the variability and distribution of the populations modified by the agroecological conditions present in the regions. Finally, the characterization with 22 microsatellite molecular markers determined a degree of moderate

population differentiation equal to F_{ST} 0.066 for the ecotypes of the altiplano and the interandean valleys

Keywords: *Chenopodium quinoa* Willd, microsatellites, genetic diversity, genetic differentiation, allelic richness.

I. INTRODUCCIÓN

La quinua es una especie de gran importancia económica en el altiplano andino de Sudamérica debido a su valor nutricional. Posee un excelente balance de carbohidratos, lípidos y proteínas, también posee los 20 aminoácidos esenciales en la dieta humana, oligoelementos y vitaminas (Vega-Gálvez *et. al.*, 2010). Su cultivo en Sudamérica comprende parte de Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Argentina y Chile (Ruas *et. al.*, 1999). No obstante, debido a la gran diversidad genética existente está logrando una exitosa introducción en Norteamérica, Europa y Australia (Bazile, 2013; Rojas *et al.*, 2013). La quinua muestra características adaptativas en condiciones extremas de clima, suelo y resistencia a estrés biótico (Gómez, 2012; Tapia, 2013).

La diversidad genética de la quinua se evidencia en la morfología de la planta, en sus colores, formas y adaptaciones a diferentes condiciones ambientales y edafológicas (Gómez, 2012). *“La conservación y protección de la enorme diversidad genética de la quinua debe agradecerse a los campesinos indígenas de los pueblos andinos quienes desde hace miles de años con sus conocimientos tradicionales, sus prácticas agronómicas sustentables y su labor en armonía con la naturaleza han permitido que el cultivo sea aprovechado por las actuales y futuras generaciones”* (FAO, 2011). Actualmente, los bancos de germoplasma son los reservorios de esta biodiversidad y deben utilizarse como fuentes de genes para el mejoramiento de los cultivos (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Los bancos de germoplasma preservan la diversidad genética requerida para procesos futuros de fitomejoramiento. Pero, sin el conocimiento de los rasgos mantenidos en los bancos de germoplasma, éstos sólo se convierten en museos de accesiones de plantas (Ortiz, 2013). La biología molecular ofrece como herramienta la caracterización molecular basada en marcadores de ADN. Su uso permite describir los rasgos o variaciones de las accesiones de

los bancos de germoplasma en términos de características de alta heredabilidad, evitando que la información sea influenciada por el medio ambiente. Debido a la importancia de mejorar el conocimiento con respecto al origen de las colecciones de quinua, en Sudamérica, ya existen importantes colecciones que vienen siendo caracterizadas molecularmente con resultados esclarecedores (Castillo *et al.*, 2007; Christensen, *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2008, Costa *et al.*, 2014). En el Perú, se están realizando esfuerzos para caracterizar molecularmente la diversidad genética dentro de la *Colección Nacional de quinua* mantenida en el banco del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

El Perú está llamado a la puesta en valor de este recurso impulsando y fortaleciendo la investigación sobre el conocimiento de la biodiversidad de quinua. En el pasado, la diversidad genética de quinuas de origen peruano fue estudiada usando descriptores morfológicos y agronómicos cualitativos y cuantitativos (Rissi y Galwey, 1989b; Ortiz *et al.*, 1998). A pesar de ello, estas características muestran desventajas en la evaluación de la diversidad genética, ya que son limitadas en número y usualmente están influenciadas por el ambiente. Sin embargo, la anterior limitación puede ser superada mediante el uso de marcadores moleculares de ADN para la caracterización (Gupta y Varshney, 2000; Banerjee, *et al.*, 2012).

Los marcadores moleculares de ADN son usados para estudiar la diversidad genética en numerosos cultivos (Mohammadi y Prasanna, 2003). Los más utilizados son los RAPDs (Polimorfismo amplificado al azar), AFLPs (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) y SSR (Secuencias simples repetidas o microsatélites). Los microsatélites al mostrar un mayor polimorfismo, presentar codominancia, ser multialélicos, reproducibles y económicamente más rentables, son los ideales para estudios de diversidad genética.

Este trabajo tiene como objetivo caracterizar molecularmente 75 accesiones de quinua del departamento de Puno (ecotipo altiplano) que pertenecen a la Colección Nacional de quinua del INIA usando 25 marcadores microsatélites. A su vez, busca comparar la diversidad encontrada con la diversidad de otras 75 accesiones del ecotipo de valles interandinos para dilucidar la distribución de la diferenciación genética presente en las quinuas peruanas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Clasificación taxonómica de la quinua

La quinua pertenece a la familia Amaranthaceae (Kadereit *et al.*, 2003) y al género *Chenopodium*. Este género se caracteriza por poseer un número básico de cromosomas igual a $x=9$ y ser poco estudiadas, en su mayoría son especies no cultivadas de amplia distribución mundial. El género agrupa más de 120 especies clasificadas en 16 secciones (Allen y Just, 1929) siendo *Chenopodium quinoa* Willd. (quinua) la especie más importante desde el punto de vista económico. Los posibles parientes silvestres de la quinua son *Chenopodium carnosolum*, *C. petiolare*, *C. pallidicaule*, *C. hircinum*, *C. quinoa subsp. melanospermum* y *C. ambrosoides incisum* (Mujica y Jacobsen, 2006). Recientemente, se encontró que *C. album*, *C. ficifolium*, *C. standleyanum* también son grandes aportantes al genoma de la quinua (Kolano *et al.*, 2011).

Según ITIS, (2011) la clasificación taxonómica de la quinua es:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Streptophyta

División: Tracheophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Infradivisión: Angiospermae

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Caryophyllanae

Orden: Caryophyllales

Familia: Amaranthaceae

Género: *Chenopodium*

Especie: *Chenopodium quinoa* Willd.

2.2. Características botánicas

Se reproduce por vía sexual mediante semilla botánica y es una especie principalmente autógena. Las investigaciones de Gandarillas, (1979) para cultivos de quinua en el altiplano han reportado que los porcentajes de cruzamiento natural varían de 1.5% hasta 9.9% con distancias de separación entre plantas de 20 m y 1 m respectivamente. Asimismo, Lescano, (1994) encontró 5.7% de alogamia y 94.3% de autogamia, mientras que otras investigaciones señalan una tasa de hibridación natural de 10-17% (Spehar y Santos, 2005). Se comprueba que la condición de autogamia depende de las características en la morfología, de la floración, de aspectos genéticos, de la influencia del ambiente y de la presencia de vectores de polinización (Risi y Galwey, 1984; Spehar y Santos, 2005).

La descripción morfológica de la quinua peruana es una fuente importante de información. Se han descrito diferentes colores de planta, tamaños y formas características que permiten asociarlas con ecotipos. Por ello Gómez, (2012) estudió la morfología y señaló que las quinuas peruanas varían ampliamente existiendo una gran diversidad de genotipos.

2.2.1. Raíz

La raíz es pivotante y vigorosa. Puede llegar a medir 0.5m de profundidad o más dependiendo del genotipo, profundidad del suelo y la altura de planta.

2.2.2. Tallo

El tallo es cilíndrico a la altura del cuello de la planta y angular a la altura donde nacen las primeras hojas y ramas, pueden existir dos tipos: a) ramificado (ramificaciones laterales de igual o mayor tamaño al principal), b) sencillo (sólo con tallo principal donde destaca claramente la inflorescencia), el color del tallo puede ser verde con axilas coloreadas de púrpura o rojo desde la base (Figura 1a).

2.2.3. Hojas

Las hojas son polimorfas en la misma planta, las hojas inferiores tienen forma triangular o romboidal y las superiores son lanceoladas o triangulares y más pequeñas. Pueden estar cubiertas de una pubescencia rica en oxalato de calcio de color rojo púrpura o blanco (Figura 1b).

2.2.4. Inflorescencias

La inflorescencia de la quinua es una panoja. En función a la posición de los glomérulos se consideran tres tipos: amarantiforme, glomerulada e intermedia. Pueden variar de 15-90 cm en longitud y ser de color verde, amarillo, naranja, rosado, rojo, granate, lila y negro (Figura 2).

2.2.5. Flores

Las flores pueden ser hermafroditas o pistiladas. Las hermafroditas en el glomérulo además de ser apicales, sobresalen frente a las pistiladas que se encuentran en la parte inferior. De acuerdo al genotipo la proporción de distribución de flores hermafroditas y pistiladas en una panoja es variable, razón por la cual la polinización cruzada puede ocurrir con mayor o menor frecuencia (Figura 1c).

2.2.6. Fruto

El fruto es un aquenio cubierto por el perigonio. El color del fruto está dado por el perigonio y se asocia frecuentemente con el color de la planta pudiendo ser verde, púrpura o rojo. El pericarpio del fruto que está pegado a la semilla, presenta alvéolos y en algunas variedades se puede separar fácilmente. En esta parte se encuentra la saponina pudiendo ser eliminada con cierta facilidad.

2.2.7. Semilla

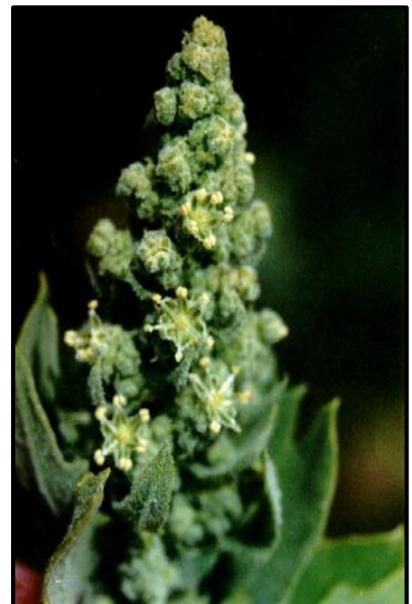
La semilla está envuelta por el episperma en forma de una membrana delgada. El embrión está formado por los cotiledones y la radícula que constituyen la mayor parte de la semilla que envuelve al perisperma como un anillo. El perisperma es almidonoso y normalmente de color blanco. Existen tres formas de granos: cónicos, cilíndricos y elipsoidales. Pueden tener los bordes afilados o redondeados. Las quinuas cultivadas casi siempre tienen el borde afilado, mientras que las silvestres los tienen redondeados (Figura 3).



a) El color del tallo puede ser verde, amarillo, rojo, púrpura, naranja o verde con estrías verticales de otra coloración.



b) Las hojas son alternas y están formadas de peciolo y lámina. Los peciolo son más largos y acanalados en hojas del tallo principal. Las hojas tienen tres venas principales que se originan del peciolo.



c) La quinua es ginomonoica (con flores hermafroditas y pistiladas en la misma inflorescencia). Las flores se agrupan en glomérulos y están conformadas por un perigonio sepaloide, gineceo con ovario elipsoidal. El tamaño de las flores varía dependiendo del tipo de flor.

Figura 1: Diversidad de formas, colores y características en quinuas peruanas

FUENTE: Gómez y Eguiluz, 2011.



Figura 2: Tipos de ramificación en las inflorescencias de quinua: intermedia, compacta y laxa (De izquierda a derecha)

FUENTE: Gómez y Eguiluz, 2011.



Figura 3: Diversidad de colores en los granos de quinua en accesiones peruanas

FUENTE: Gómez y Eguiluz, 2011.

2.3. Características genéticas de la quinua

Genéticamente, la quinua es una especie alotetraploide ($2n=4x=36$) que pertenece a un complejo de taxones que incluye formas silvestres, invasivas y domesticadas de toda la región de América en zonas templadas y subtropicales. La quinua muestra un patrón de herencia disómica (Gandarillas, 1968; Simmonds, 1971; Risi y Galwey, 1984; Bonifacio, 1990; Ward, 2000, 2001; Maughan *et al.*, 2004, Palomino *et al.*, 2008), pero en casos menos frecuentes también se reportó herencia tetrasómica (Ward, 2000). Por otro lado, la quinua presenta un genoma haploide relativamente pequeño de sólo 967 millones de pares de nucleótidos aproximadamente (Maughan *et al.*, 2004). Según informes recientes, se estima que la quinua tiene un tamaño de genoma haploide (valor 1C) de aproximadamente 1,48-1,62 pg. (Bhargava *et al.*, 2007; Palomino *et al.*, 2008; Kolano *et al.*, 2012), también se demostró una variación intraespecífica limitada del tamaño del genoma (5,9%).

2.4. Aspectos evolutivos de la quinua

Restos de quinua en Sudamérica se encontraron en centros arqueológicos que datan de hace más de 5,000 años antes de Cristo (A.C.) en Ayacucho (Uhle, 1919; Tapia, 1979; Dillehay *et al.*, 2007) y de 3000 A.C. en Chinchorro (Chile) (Núñez, 1970, Tapia, 1979). Asimismo, se conoce que la quinua fue cultivada en las culturas precolombinas; por los incas durante el Imperio Incaico, por los indígenas de la región de Araucaria entre Argentina y Chile y por los Chibcha en el norte de Colombia (Pulgar Vidal, 1954; Tapia, 1979). Sin embargo, Pearsall, (2008) documenta a través de investigaciones arqueológicas y arqueobotánicas que el cultivo de quinua pudo empezar más fehacientemente alrededor de 3000 A.C en los Andes centro-sur gracias a los estudios de datación radiocarbónica directa en la quinua arqueológica. Con ello se ha demostrado su cultivo y producción ancestral.

Resulta importante conocer que, el origen de la quinua fue inicialmente descrito en la región andina de Sudamérica entre Cuzco (Perú) y Potosí (Bolivia), pues se encontró un mayor número de variedades locales alrededor del lago Titicaca entre Perú y Bolivia (Grandarillas, 1968; Ruas *et al.*, 1999). Por ello, algunos autores han denominado a esta región como el centro de diversidad genética (Risi y Galwey, 1989; Ruas *et al.*, 1999; Christensen *et al.*,

2007). Sin embargo, recientes investigaciones sobre las bases genéticas permiten afirmar que la quinua existió como dos acervos génicos distintos: a) La quinua del altiplano andino con su complejo de malezas asociadas (*C. quinoa ssp. milleanum* Aellen, también conocida como *C. quinoa var. melanospermum* Hunziker) y b) quinua costera o de las tierras bajas del centro y sur de Chile (entre el pueblo mapuche que vive al sur del río Bio Bio), este último, al parecer representaría el segundo gran centro de diversidad de quinua (Fuentes *et al.*, 2008; Jellen *et al.*, 2011). Con estos resultados se evalúa la complejidad del manejo del cultivo en Sudamérica y se ha establecido hipótesis acerca de cómo fue el intercambio de semillas en las poblaciones antiguas (Figura 4).

Así como Jellen *et al.* (2011) describió un segundo centro de diversidad para la quinua en Chile; Costa Tártara *et al.* (2012) estudiando accesiones provenientes del noroeste de Argentina con marcadores microsatélites indicó que: “una cantidad de diversidad mucho mayor a la previamente conocida está presente en las quinuas de la precordillera y las tierras bajas subtropicales del este de Argentina que bordean las zonas de el Gran Chaco y la Pampa en Argentina”. Este estudio destaca nuevos posibles patrones de movimiento del germoplasma de quinua antiguo y moderno en la región de Bolivia-Argentina-Chile (Figura 4).

Una de las dudas científicas planteadas sobre la quinua fue identificar las especies que han aportado significativamente a su genoma. Ya que, este aporte confirió y definió su adaptación a diferentes condiciones agroclimáticas, su tolerancia a la salinidad o la resistencia a la sequía y al frío (González y Prado 1992; Espindola y Rodríguez 1988; Maughan *et al.*, 2009; Morales, *et al.*, 2011, Fuentes *et al.*, 2014). En la búsqueda de resolver esta inquietud, algunos grupos de investigación han tenido como objetivo principal identificar a los posibles ancestros diploides (Figura 5). Las investigaciones han mostrado a través de evidencias moleculares que los ancestros diploides de la quinua son *C. berlandieri* y *C. album* de Eurasia. Esta afirmación se basa en el secuenciamiento comparativo de genes para la síntesis de ARN ribosomal (Maughan *et al.*, 2006). Por otro lado, Kolano *et al.* (2011) demostró que *C. berlandieri* y *C. album* muestran gran homología

en la secuencia repetitiva específica 18-24J¹ analizada mediante la técnica de FISH² (FISH-Hibridización de regiones de minisatélites repetidos). Ambos estudios señalan que la quinua posee un genoma en común con *C. berlandieri* y *C. álbum*. Otros estudios recientes relacionados a la comparación de secuencias de los genes nucleares de bajo número de copias, tales como los genes *SOS1*³, *GLN-1*⁴, *GBSSI*⁵, *FTL2*⁶ y secuencias del genoma en el cloroplasto *trnH-psbA*⁷ indican que; los dos ancestros diploides de la quinua provendrían de América del Norte y Eurasia, siendo el donante de citoplasma el ancestro del Nuevo Mundo (Jellen *et al.*, 2014).

Por otro lado, la interrogante acerca de los eventos de erosión genética en la especie se resuelve a través de la evidencia molecular, sugiriendo que cuatro eventos de cuello de botella genéticos se generaron a lo largo del tiempo (Jellen *et al.*, 2011). El primer y más grave evento se produjo en el paso de la poliploidización inicial cuando los dos ancestros diploides de la quinua se hibridaron. El segundo evento ocurrió cuando la quinua fue domesticada a partir de sus parientes tetraploides silvestres a través de largos ciclos de intercambio de semillas y cultivo en nuevos territorios y climas. Posteriormente, el tercer evento se considera un cuello de botella sociológico, que comenzó hace más de 400 años durante la época de la conquista española, época donde la quinua fue estigmatizada culturalmente como alimento para las comunidades indígenas (Cusack, 1984). Finalmente, Fuentes *et al.* (2012) considera un cuarto evento de cuello de botella causado por la migración humana de las zonas rurales de los altos Andes a los centros urbanos y hacia las

¹ Secuencias repetitivas en los cromosomas de *Chenopodium quinoa*.

² FISH o hibridación fluorescente in situ. Técnica citogenética de marcaje de cromosomas o regiones que se requieran identificar y visualizar.

³ *SOS1* (del inglés Salt Overly Sensitive 1). Es un locus esencial para el mantenimiento de la homeostasis en el transporte de Na⁺/K⁺. La función del gen *SOS1* es regular la expresión en plantas frente a la respuesta de un estrés por NaCl.

⁴ *GLN-1* (Glutamine synthetase). Gen de la glutamina sintetasa, enzima clave para la asimilación y el reciclamiento de amonio en plantas.

⁵ *GBSSI* (Granule Bound Starch Synthase I). Gen que codifica una enzima clave de la síntesis de almidón y determina la acumulación de amilosa en los gránulos de almidón.

⁶ *FTL2* (Flowering LocusT like –FTL). Pertenece a una familia de genes cruciales para la regulación de la floración en angiospermas.

⁷ *trnH-psbA*. Es una región del cloroplasto que comprende un espaciador intergénico. Se ha utilizado en muchos estudios de código de barras de ADN y recientemente es una herramienta popular en estudios filogenéticos moleculares a bajo nivel taxonómico.

regiones de cultivo de coca de la pre cordillera oriental, dando lugar a campos de quinua abandonados y la pérdida de germoplasma de quinua.

Los resultados producto de las investigaciones esclarecen el largo proceso evolutivo y la adaptación sufrida por la especie. Actualmente, entendiendo estos fenómenos, se pretende realizar un mejor manejo genético y agronómico. Se busca conservar el germoplasma y aprovecharlo en post de garantizar la seguridad alimentaria.



Figura 4: Posibles patrones de movimiento del germoplasma de quinua antiguo y moderno en la región de Bolivia-Argentina-Chile

El conocimiento que hoy en día se tiene sobre la amplia diversidad de quinua adaptada a diferentes zonas geográficas y climas es gracias a los avances en el estudio de la diversidad genética. Los estudios en Perú, Bolivia, Chile y Argentina van consolidando la descripción de los procesos de domesticación, dispersión, flujo e intercambio de germoplasma de quinua. A su vez, van planteando nuevos retos para el mejoramiento de la quinua

FUENTE: Fuentes *et al.*, 2012.

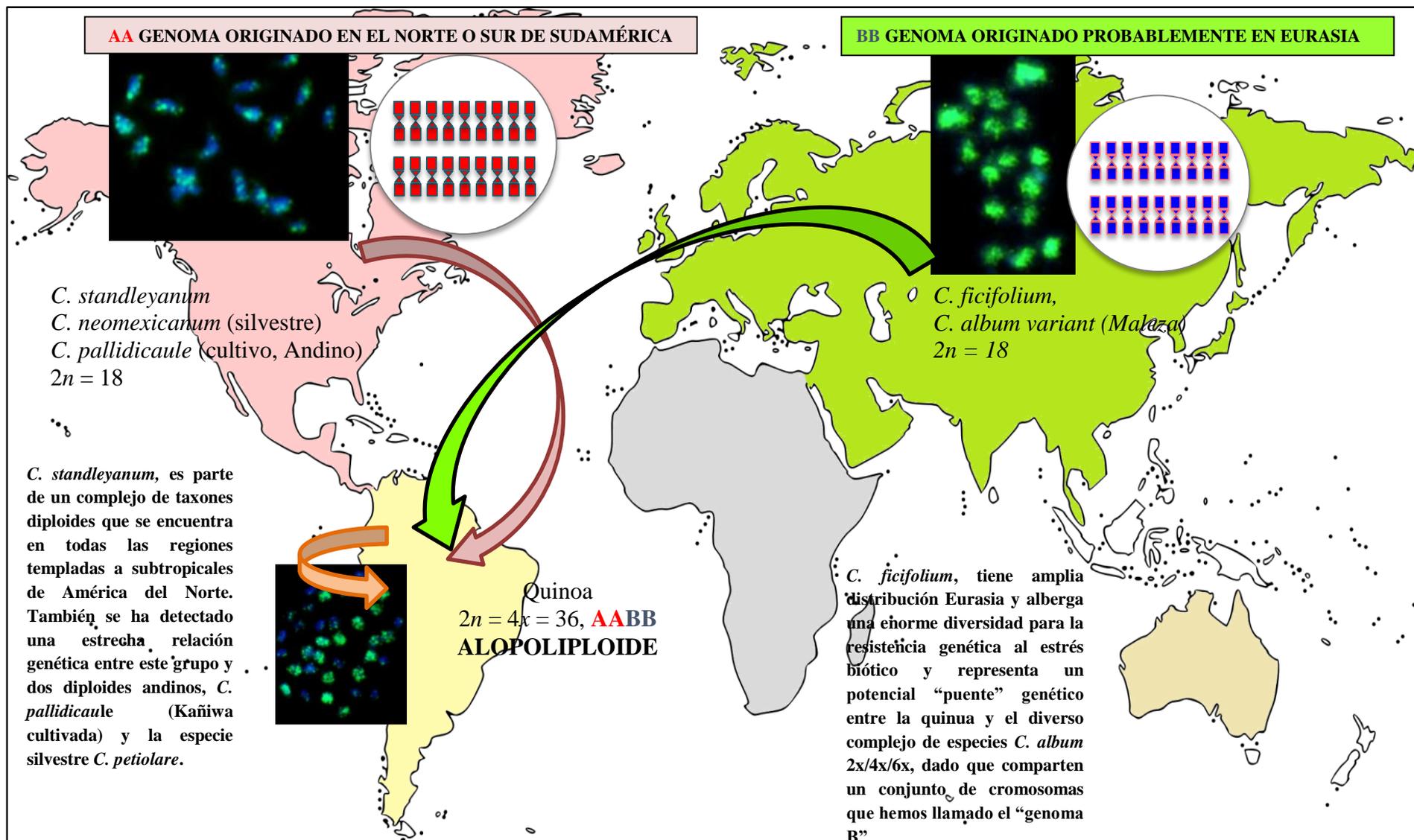


Figura 5: Hipótesis de la evolución de la quinoa y sus parientes silvestres

FUENTE: Kolano *et al.*, 2011.

2.5. Distribución geográfica del cultivo y migración a otros continentes

El cultivo de la quinua está en continua expansión y ya alcanza una producción en más de 70 países. En el 2009, se registraron 83,000 hectáreas de quinua a nivel mundial siendo los mayores productores Perú y Bolivia en la región andina, estos países representan más del 90% de la producción en el mundo. Luego, continúan en la lista, Estados Unidos, Ecuador, Argentina y Canadá que totalizan cerca del 8% de los volúmenes globales de producción. Para el 2011, la producción en la región andina fue de aproximadamente 80,000 toneladas (t) (FAO, 2013). Sin embargo, cerrando el año 2014, el Perú se convirtió en el primer productor de quinua con 114,300 t de producción superando a Bolivia. Este logro se alcanzó por la promoción de la gastronomía peruana y principalmente al incremento de tierras cultivadas que vienen generando mayores rendimientos (MINAGRI, 2015).

Internacionalmente, la trascendencia del cultivo de quinua alcanza países como Francia, Inglaterra, Suecia, Dinamarca, Holanda e Italia. En los Estados Unidos se produce en Colorado y Nevada, en Canadá se cultiva en las praderas de Ontario. Mientras que, en África, exactamente en Kenia, la semilla mostró altos rendimientos (4 t/ha). Asimismo, se comprueba que en el Himalaya y las planicies del norte de la India el cultivo puede desarrollarse con éxito y con un buen rendimiento, tal como se visualiza en la Figura 6 (FAO, 2013).

La difusión del cultivo de quinua ha estado apoyada por las fuertes relaciones entre instituciones de investigación que comparten su material genético y la comprensión del papel que juega su biodiversidad. Por otro lado, hay un claro reconocimiento que las variedades locales de quinua y la amplia diversidad descrita se ha mantenido por prácticas agroecológicas desarrolladas principalmente a través del manejo de una agricultura familiar en los pueblos de la región andina, estas prácticas deben valorarse y conservarse (Bazile, 2014). Por ello, el desarrollo del cultivo de quinua en territorios de todo el mundo plantea la posibilidad para convertirlo en una garantía en la seguridad alimentaria mundial sin menoscabar la agrobiodiversidad existente.



Figura 6: Distribución mundial del cultivo de quinua

Principales países que conservan colecciones de germoplasma de quinua ex-situ dentro y fuera de la región andina, señalando que Perú y Bolivia mantienen el mayor número de colectas almacenadas.

FUENTE: FAO, 2011.

2.6. Distribución y ecotipos de la quinua en Perú

En el Perú, para el año 2014 se registraron 68,037 ha de quinua con una producción dedicada al autoconsumo y a la exportación (MINAGRI, 2015). Actualmente, el cultivo se extiende en departamentos altoandinos, de costa y de selva. Los principales departamentos dedicados al cultivo con gran éxito son: Amazonas, Ancash, Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Huánuco, Junín, La libertad, Lima, Piura, Puno y Tacna. En la Figura 7 se muestra la distribución de quinuas estudiadas en este trabajo y que son mantenidas por el INIA. Gracias a la extensión del cultivo, el Perú logró posicionarse como el primer productor a nivel mundial en el 2014 con 114,300 t de producción, registrando un incremento de 114% frente al año 2013, cuya producción fue de 52,100 t (MINAGRI, 2015).

Como señalan las cifras estadísticas, se ha observado un elevado incremento de las áreas cosechadas y de la producción del cultivo, fruto del boom en los mercados internacionales y del impulso durante el “Año Internacional de la Quinua, 2013”. El Perú cuenta con una gran diversidad de genotipos que han respondido al éxito del posicionamiento de este cultivo. Una de las instituciones encargadas de mantener la Colección Nacional de Quinua es el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) quien conserva las accesiones representativas y las viene caracterizando a nivel morfológico y molecular (INIA, 2014).

Convencionalmente, existe una clasificación de quinuas de acuerdo a la distribución geográfica y la adaptación a diferentes ambientes realizada por Tapia, (1979). Este autor las clasificó en los ecotipos: quinuas de valles interandinos, del altiplano, de los salares, del nivel del mar y de las yungas. En Perú se encuentran los ecotipos valles interandinos y del altiplano. Se ha demostrado que las condiciones ecológicas diferentes permitieron la evolución y la dotación de caracteres propios a estos grupos de accesiones. A continuación, la descripción de los ecotipos de quinua de Perú.

2.6.1. Quinuas de Valles Interandinos

Son plantas adaptadas desde los 2500 a 3500 msnm, se caracterizan por un desarrollo de altura de planta hasta 2,5 m o más y con muchas ramificaciones. La inflorescencia es laxa y normalmente presentan resistencia al mildiu (*Peronospora farinosa*). Este grupo de quinuas se cultivan en forma intercalada con maíz en 5 a 6 surcos transversales, como cultivo de bordes de otros cultivos, o en forma dispersa en el mismo campo (Tapia, 1979).

2.6.2. Quinuas de Altiplano

Estas plantas crecen y desarrollan entre los 3600 a 3800 msnm en la región que corresponde al altiplano Peruano-Boliviano. Se cultivan en áreas mayores como cultivos puros o únicos. En la región del altiplano se encuentra la mayor variabilidad del cultivo y se producen los granos de uso más especializados. Las plantas logran alcanzar una altura entre los 0,5 a 1,5 m con un tallo que termina en una panoja principal y por lo general compacta. En este grupo, se encuentra el mayor número de variedades mejoradas, y los materiales se comportan como susceptibles al mildiu cuando son sembrados en zonas de mayor humedad.

Otros autores como Risi y Galwey (1989b) también han reportado que accesiones colectadas alrededor del lago Titicaca eran distintas a las colectadas en valles interandinos. Similarmente, Wilson (1987) indicó que la variación entre poblaciones de quinuas de los Andes seguía una tendencia latitudinal, con relativamente altos niveles de variación en Bolivia y el Sur de Perú. Análisis morfológicos y datos electroforéticos también sugieren un enfoque por ecotipos para la clasificación de las variantes locales.

Eguiluz *et al.* (2012) caracterizó parámetros agronómicos y de calidad de los ecotipos de quinuas de valles interandinos y del altiplano peruano. Este estudio comprendió el análisis de 50 accesiones de valles y 35 accesiones del altiplano. Sus resultados mostraron variabilidad para los caracteres ciclo de vida, altura de planta, rendimiento, contenido de proteína, contenido de saponina y respuesta al mildiu. Se encontró que la mayor variación en el ecotipo de valles está dada por el ciclo de vida, altura de planta y respuesta frente al

ataque del mildiu. Mientras que, la mayor diferenciación entre los dos ecotipos está basada en la altura de planta y el ciclo de vida (floración).

Asimismo, en Puno los agricultores realizan prácticas agronómicas para evitar el daño causado por las granizadas e incrementar la tolerancia a los vientos durante las estaciones de crecimiento. Seleccionan variedades locales con suficiente área foliar para garantizar la fotosíntesis y con grandes inflorescencias para obtener semillas grandes. Por ello, las accesiones colectadas y cultivadas muestran alto rendimiento de grano, temprana floración, largas inflorescencias y una menor altura de plantas que accesiones colectadas de otros lugares. Al parecer existe una clara correlación entre la altitud y los principales descriptores morfológicos y agronómicos de carácter cuantitativo, que poseen un control poligénico, distinguiendo los patrones de adaptación, tanto en el altiplano como en los valles interandinos. Eguiluz *et al.* (2012).

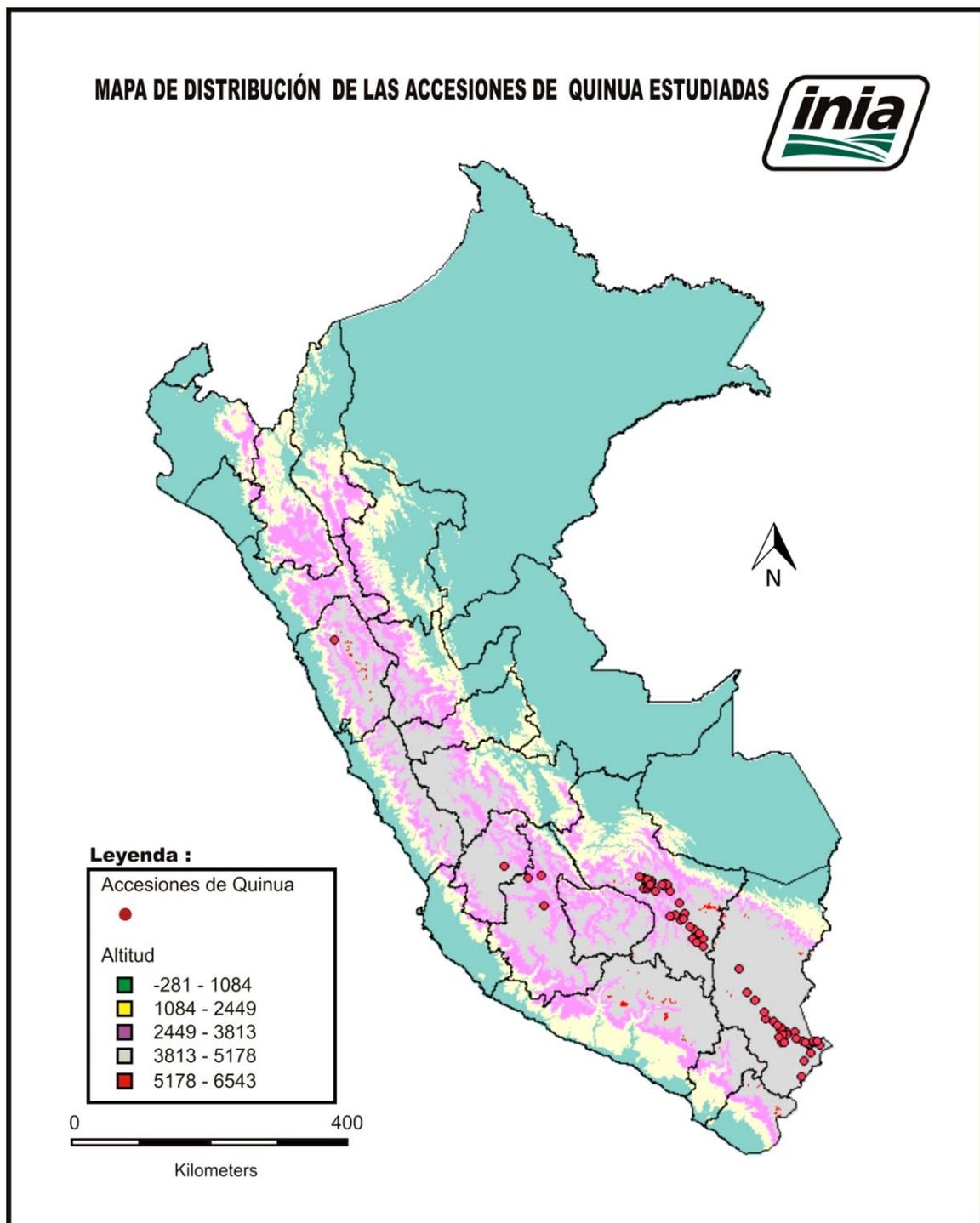


Figura 7: Mapa de la distribución de las accesiones de quinua conservadas por el INIA estudiadas en el presente trabajo

FUENTE: INIA, 2013.

2.7. Uso de marcadores moleculares en estudios de caracterización y diversidad genética vegetal

La biología molecular ha contribuido de manera significativa en el análisis de la diversidad genética de colecciones de germoplasma facilitando la clasificación exacta de accesiones y la generación de colecciones núcleo en numerosos cultivos como: trigo (*Triticum aestivum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), maíz (*Zea mays* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.) y soya (*Glycine max*) gracias a la posibilidad de determinar el polimorfismo con marcadores basados en ADN: RFLPs (Restriction Fragment Length Polimorphism), RAPDs (Random Amplified Polimorphism DNA), AFLPs (Amplified Fragment Length Polimorphism) SSRs (Simple Sequence Repeat) o microsatélites (Mohammadi y Prasanna, 2003). Estos marcadores moleculares no son influenciados por el ambiente y muestran ventajas frente a los descriptores morfológicos (Gupta y Varshney, 2000).

El polimorfismo de estos marcadores de ADN se define por las diferentes bandas o loci polimórficos. Los RFLPs y SSRs establecen estimaciones indirectas de la divergencia de nucleótidos debido a la fragmentación específica del ADN y su expresión codominante. Los RAPDs en cambio son marcadores dominantes. Se conoce que no existe un marcador ideal, pero se determinó que los marcadores SSR o microsatélites son uno de los más robustos y polimórficos (Hajeer *et al.*, 2000).

Los SSR o microsatélites son regiones del genoma constituidas por repeticiones en tándem de 1 a 6 pares de bases (pb) de un motivo de ADN, flanqueadas por secuencias de copia única. Su polimorfismo se basa en el número de repeticiones presentes que se traducen en diferencia de tamaño (pb) entre los fragmentos (alelos) amplificados. Los SSR se distribuyen a través de todo el genoma de un organismo tanto en regiones codificantes como no codificantes. Su uso muestra mayor reproducibilidad y bajo costo (Chawla, 2000; Ellegren, 2004).

Otra ventaja del uso de los microsatélites es que proveen información relevante en la identificación de unidades de conservación y en la investigación de procesos genéticos que tuvieron lugar en las poblaciones, tales como flujo de genes, la generación de grupos genéticos y la incidencia de la deriva génica mediante el análisis de diferentes parámetros (Oliveira *et al.*, 2006).

Los microsatélites son muy empleados en plantas silvestres y cultivadas por su naturaleza codominante y alto poder informativo. Éstos son capaces de detectar procesos micro evolutivos recientes y en curso (Knowles, 2009).

El empleo de marcadores moleculares para la caracterización del germoplasma vegetal así como la estimación de parámetros genéticos (grado de heterocigosis, flujo de genes y diferenciación genética de unidades taxonómicas) en poblaciones conservadas ha tomado un rol creciente en la evaluación y manejo de los recursos genéticos vegetales conservados en los Bancos de Germoplasma a nivel mundial (FAO, 2014). Luego de realizar la caracterización es posible la evaluación de la variabilidad genética buscando definir cuáles son las relaciones genéticas y las distancias entre los individuos que poseen el potencial para aprovecharse (Spooner *et al.*, 2005).

Carrera *et al.* (2004) y Ortiz, (2013) sostienen que la información generada por los marcadores resulta en una aplicación importante para conocer en primer lugar dónde debe colectarse, en segundo lugar qué intercambios realizar. Luego, qué accesiones conservar (identificar duplicados o reducir accesiones redundantes), en cuarto y último lugar cómo monitorear posibles cambios en la composición genética si ocurrieran durante la multiplicación o preservación en los bancos (Tabla 1). En resumen, el conocimiento del nivel de diversidad genética de la colección y la definición de una distribución eficiente posibilita dotar de mejores recursos genéticos a los agricultores.

Tabla 1: Bancos de accesiones de germoplasma de quinua en Latinoamérica

País	Conservado en:	Número de accesiones	Fuente
Bolivia	<ul style="list-style-type: none"> • Fundación PROINPA, Facultad de Agronomía de la Universidad de La Paz y Oruro 	más de 2,700	Castillo <i>et al.</i> , 2007
	<ul style="list-style-type: none"> • INIAF - Instituto Nacional de Innovación Agropecuaria y Forestal 	3.178 accesiones	FAO WIEWS, 2013
Chile	<ul style="list-style-type: none"> • Instituciones públicas y privadas 	más de 200	FAO WIEWS, 2013
Argentina	<ul style="list-style-type: none"> • Banco Base del INTA Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuaria, Argentina 	492 accesiones	FAO WIEWS, 2013
Ecuador	<ul style="list-style-type: none"> • Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología del INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Ecuador) 	673 accesiones	FAO WIEWS, 2013
Colombia	<ul style="list-style-type: none"> • Banco de germoplasma de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria en Tibaitatá 	28 accesiones	FAO WIEWS, 2013
Perú	<ul style="list-style-type: none"> • Universidad Nacional del Altiplano (UNAP) 	1,029 accesiones	Ortiz <i>et al.</i> , 1998
	<ul style="list-style-type: none"> • Universidad Nacional Agraria de la Molina (UNALM) 	2,800	Fuentes <i>et al.</i> , 2009b
	<ul style="list-style-type: none"> • Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) 	1,600	Catacora, 2013

FUENTE: Elaboración propia

Son 30 los países en el mundo que conservan quinua y sus parientes silvestres en 59 bancos de germoplasma de semillas. Estos son: 10 países en América (Argentina, Bolivia, Brasil, Canadá, Colombia, Chile, Ecuador, Estados Unidos, Perú y Uruguay), 11 en Europa (Alemania, Austria, Eslovaquia, España, Hungría, República Checa, Portugal, Reino Unido, Suecia, Turquía y Rumania), 5 en África (Etiopía, Kenia, Lesoto, Zambia y Sud África), 3 en Asia (India, Japón y Jordania) y Australia (Rojas *et al.*, 2013).

2.8. Variabilidad y diversidad genética de la quinua estudiada con recursos de genética molecular

Los trabajos de investigación realizados en los países andinos caracterizando los bancos de germoplasma de quinua se citan a continuación:

- Ruas *et al.* (1999) usó marcadores RAPDs para investigar la variabilidad genética entre especies de *Chenopodium*. Demostró que especies como *C. quinoa*, *C. nuttalliae*, *C. pallidicaule* comparten un bajo nivel de variación molecular.
- El primer paso hacia el desarrollo y uso de marcadores moleculares microsatélites en quinua fue la construcción de un mapa de ligamiento por Maughan *et al.* (2004). Se basó en 80 individuos F₂ producto del cruce de Ku-2 (ecotipo chileno costero) y 0654 (ecotipo altiplano). El mapa fue construido principalmente por 230 marcadores AFLPs, 19 SSR y 6 marcadores RAPD y cubre un estimado de 60% del genoma. Se predijo la longitud total del genoma en 1700 cM.
- Mason *et al.* (2005) desarrolló la primera colección de microsatélites (SSRs) para quinua mediante el secuenciamiento de librerías de ADN enriquecidas en secuencias repetidas de CA, ATT, y ATG. Encontraron 397 potenciales SSRs. Sin embargo, 208 SSRs resultaron altamente reproducibles e informativos. Caracterizaron un panel de 31 accesiones pertenecientes a dos grupos distintos de germoplasma de ecotipo costero y del altiplano que representan la mayor diversidad a nivel geográfico mundial. Por otro lado, estos marcadores fueron probados sobre tres diferentes especies de *Chenopodium* (*C. pallidicaule*, *C. giganteum* y *C. berlandieri ssp. nuttalliae*). Sesenta y siete por ciento (67%) de estos marcadores SSR amplificaron en todas las especies, mientras que 99.5% amplificó en *C. berlandieri ssp. nuttalliae* comprobando la cercana relación entre esta especie y la quinua.

- Castillo *et al.* (2007) investigó la estructura genética poblacional de quinua en tres distintas regiones del altiplano y una región en valles interandinos de Bolivia usando marcadores RAPDs. Su primer objetivo fue evaluar los niveles de diversidad genética en tres niveles jerárquicos individuos, poblaciones y eco regiones. En adición comparó la diversidad en especies silvestres y cultivadas. Se encontró que existe un bajo nivel de diferenciación entre las formas silvestres y cultivadas, siendo ello explicado por un significativo flujo de genes en los campos de cultivo. Asimismo, encontró una estructura poblacional de 3 zonas biogeográficas en Bolivia (zona norte y centro del altiplano, valles interandinos y una zona sur en los salares). Observó una mayor diversidad intra poblacional que la reportada y esperada.
- Christensen *et al.* (2007) reportó el uso de un grupo de marcadores SSRs marcados con fluorescencia para caracterizar la diversidad genética del germoplasma de quinua en 121 accesiones provenientes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), 22 accesiones del Centro Internacional de la Papa (CIP-FAO) y 8 accesiones que representan a los padres de poblaciones de mapeo genético. Se buscó encontrar el centro de diversidad genética con germoplasma correspondiente a países como Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina y Chile. El centro de diversidad genética identificado en este estudio es la zona del altiplano entre Perú y Bolivia. Germoplasmas de Ecuador y Argentina mostraron una diversidad limitada, indicando que el punto probable de introducción para las accesiones ecuatorianas fue el Altiplano (Perú-Bolivia), mientras que para Argentina la introducción original pudo ser desde el altiplano y/o zona sur de Chile. Sin embargo, es posible que estas mediciones de diversidad fueran afectados por el número limitado de muestras utilizadas, causando una reducción en la diversidad percibida entre el germoplasma de Ecuador y Argentina. Los resultados de este estudio sugieren que las accesiones de quinua (tanto los mantenidos por el USDA y de la colección CIP-FAO) representan potenciales líneas heterogéneas de genotipos mixtos que deben ser cuidados y estudiados para potencialmente usarse en programas de mejoramiento.

- Posteriormente, Jarvis *et al.* (2008) reportó el desarrollo de 216 nuevos SSR polimórficos para quinua a partir de librerías enriquecidas en repeticiones de GA, CAA y AAT. Se incrementó el número de marcadores SSR y se generó 6 marcadores SSR a partir de secuencias finales de cromosomas artificiales bacterianos (BES-SSR). Asimismo, construyeron el segundo mapa de ligamiento a partir de poblaciones de líneas recombinantes consanguíneas (RILs) basándose en 275 marcadores que incluyeron: 200 SSR, 70 AFLPs y otros marcadores adicionales: 2 loci 11S que están relacionados al almacenamiento de proteínas en semillas, un locus de la región organizadora del nucléolo (NOR) y un locus para color de betalaína. El mapa resultante se compone de 38 grupos de ligamiento (GL) cubriendo 913 cM, aproximadamente el 54% del predicho por Maughan *et al.* (2004).
- Fuentes *et al.* (2009a) evaluó y cuantificó la diversidad genética de 59 accesiones de quinua pertenecientes a las regiones norte y sur de Chile utilizando 7 grupos de marcadores microsatélites marcados con fluorescencia y amplificados mediante PCR múltiple. Se buscó acelerar el proceso de genotipificación. Se determinó que accesiones de quinoas del altiplano chileno muestran una diversidad reducida, mientras que el germoplasma costero de Chile es mucho más diverso genéticamente y está más relacionado al germoplasma del altiplano Boliviano.
- Costa *et al.* (2012) caracterizaron 35 accesiones de germoplasma de la región noroeste de Argentina mediante 22 marcadores microsatélites (SSR). Los resultados mostraron un gran nivel de diversidad genética. Todos los loci SSR analizados fueron altamente polimórficos detectando un total de 354 alelos entre toda la población, con un promedio de 16 alelos por locus. Asimismo, Costa, (2014) determinó la magnitud de la diversidad y la estructura genética del germoplasma de quinoa caracterizando los mismos 22 loci microsatélites en 80 accesiones de C. quinoa, tanto del noroeste Argentino (36 accesiones) y del resto de Sudamérica (44 accesiones).

- La estructura del germoplasma Argentino forma cuatro grandes grupos de poblaciones que corresponden a regiones agroecológicas diferentes: Puna, valles secos, valles húmedos y una zona de transición de altura. Encontró además que la diversidad genética molecular es mayor en sitios de mayor antigüedad de uso del cultivo, evidenciando un patrón característico de una especie que evolucionó como cultivo, post-domesticación. De la caracterización morfológica sobre el germoplasma encontró que los caracteres fenotípicos más influyentes en la diferenciación de las poblaciones son los relacionados con la fenología, la morfometría de hoja y el diámetro del tallo. Las accesiones de valles interandinos argentinos (secos y húmedos) se caracterizaron por presentar mayor altura de planta, un ciclo de madurez intermedio o tardío, mayor diámetro de tallo y hojas de mayor superficie mientras que las accesiones del altiplano (Puna) presentaron menor altura, un ciclo más corto y hojas más pequeñas. Las accesiones de la zona de transición se diferenciaron del resto por presentar menor diámetro de grano (Costa, 2014).
- Uno de los trabajos de investigación más completos en la caracterización de colecciones de germoplasma fue realizado en Bolivia con Veramendi *et al.* (2013). Analizaron 2,515 accesiones de la colección de germoplasma de quinua Boliviano compuesta por materiales provenientes del altiplano boliviano (centro con 827, norte con 138 y sur con 434 accesiones), de los valles (325 accesiones), del Perú (562 accesiones), de materiales silvestres (133 accesiones) y una fracción proveniente de otros países (96 accesiones). Este material vegetal fue seleccionado para la caracterización molecular, empleando 8 marcadores microsatélites (QCA-006, QATG-019, QAAT-051, QCA-058, QAAT-050, QAAT-074, QAAT- 076 y QAAT-022). El dendrograma generado a partir de la información obtenida con los 8 microsatélites utilizando el método de agrupamiento de UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard les permitió la formación de grupos con accesiones en su mayoría de la misma región de colecta. Pudieron identificar la presencia de accesiones duplicadas y contribuyeron en la conformación de una colección núcleo de quinua con 189 accesiones representativas de la colección total.

- Morillo y González, (2009) trabajaron en el monitoreo de la integridad genética de quinua (*Chenopodium quinua* W.) de la variedad INIAP Tunkahúan de materiales provenientes de las principales zonas productoras de la sierra ecuatoriana a través de marcadores moleculares microsatélites. Encontraron una diversidad promedio de alelos $n=10.5$ con 8 marcadores microsatélites de motivos repetidos de dinucleótidos. A nivel de diversidad alélica, el loci que presentó mayor variabilidad fue el QCA26 con 18 alelos. Los autores encontraron una clara estructuración genética entre los dos acervos genéticos estudiados (cultivado y silvestre), determinado por los siguientes parámetros: a) la presencia de alelos exclusivos de cada grupo genético, b) distinción a nivel de análisis de agrupamiento y multivariado, donde observaron una clara separación entre las dos poblaciones cultivada y silvestre, mientras que el grupo maleza es distribuido entre los tres grupos cultivado, maleza y silvestre resultados que fueron similares con el test de asignación genética, c) un moderado y significativo valor del F_{st} entre las tres poblaciones. Todos sus resultados les sugieren que las quinuas cultivadas están en continua hibridación con las poblaciones silvestres que coexisten con ellas en campo, segregando las quinuas malezas. Sus resultados coincidieron con la observación en los sitios de colecta, el tipo maleza se encuentra en abundancia con los cultivos de quinua de la serranía ecuatoriana.
- En el Perú, Tamayo (2010) evaluó la variabilidad genética inter e intra genotípica de 16 accesiones de quinua peruanas a través de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Identificó el coeficiente de similitud entre las accesiones de quinua. Como resultado del empleo de estos marcadores se obtuvo que las accesiones de Cajamarca, Puno y Cusco fueron similares con un coeficiente de 0.86, en cambio las accesiones de Ancash y Arequipa presentaron un nivel de similitud menor a 0.86. Por otro lado, la procedencias de las accesiones de Puno, Cusco y Arequipa indicarían que existe una mayor variabilidad genética y un intercambio de genes constante entre y dentro de los cultivares de quinua en esta región. Asimismo, el rango de variación estuvo entre 16% y 54% de polimorfismo, lo cual se relacionaría con el grado de polinización cruzada identificado en otras investigaciones.

Con la información anterior se sabe que los países andinos llevan a cabo una gran labor de investigación, tanto en caracterización como en la determinación de la distribución de la variabilidad genética. Esto está permitiendo dilucidar el centro de diversidad del cultivo y estimar la diversidad presente. Parte de la información se utiliza en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, en el Perú aún se tiene mucho por trabajar para determinar la diversidad del cultivo evaluando las colecciones nacionales.

2.9. Métodos para el análisis de la diversidad genética

La diversidad genética es el grado en el cual, el material hereditario diferencia internamente a una colección de plantas. El material hereditario de las plantas abarca el ADN genómico y citoplasmático y puede diferenciarse en el nivel de las secuencias del ADN (alelos) y en el nivel de las combinaciones de alelos (genotipos). Asimismo, la diversidad genética tiene una estructura multidimensional compleja y se basa en la semejanza entre pares de individuos valorada a través de caracteres que son compartidos (similitud genética). Al estudiar la diversidad genética se lleva a cabo un proceso de análisis mediante el uso de métodos o combinación de métodos para su evaluación. La descripción de esta diversidad puede realizarse con los siguientes indicadores:

2.9.1. Variabilidad genética

Es la suma de todos los individuos con sus respectivas variantes individuales en una especie. Permite a la especie adaptarse a los cambios presentados en su entorno. Posee fuentes de variabilidad evolutiva y geográfica. La primera es producida por procesos evolutivos de especiación durante etapas de aislamiento reproductivo y por la dinámica que la especie posee en condiciones naturales. Sin embargo, se debe considerar que los patrones de diversidad genética en las plantas cultivadas resultan de la interacción de adicionales factores, como la mutación, migración, recombinación, la selección (natural y artificial) y deriva génica (Hartl y Clark, 1997).

La mutación, migración y recombinación estimulan la producción de nueva variabilidad, mientras que la selección y la deriva genética pueden reducirla. En ésta interacción entra un papel relevante la biología reproductiva que desarrolle la especie (autógama o alógama). Se espera, por lo general, una mayor variabilidad en plantas alógamas que en autógamas (Camarena *et al.*, 2012). Por otro lado, la fuente de variabilidad geográfica en un buen número de especies cultivadas que tienen un amplio rango de distribución geográfica se debe a la dispersión natural que han sufrido, así como a la extensa dispersión artificial por acción del hombre (Franco y Hidalgo, 2003; Núñez y Escobedo, 2015).

2.9.2. Polimorfismo genético

Es el parámetro de la variabilidad genética poblacional definido como la existencia de dos o más alelos asociados a un locus en una población con una frecuencia relativa sustancial (generalmente mayor al 1%). Su generación se debe principalmente a mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, conversión génica y recombinación intra-alélica. Estas variaciones se han estabilizado en una población y región geográfica determinada (Nei y Kumar, 2000; Mohammadi y Prasanna, 2003).

2.9.3. Riqueza alélica

Estimador de la diversidad genética medido por el número total de alelos distintos que pueden pertenecer a diferentes locus de una muestra poblacional. Este estimador está influenciado por la cantidad de individuos en la muestra (Mohammadi y Prasanna, 2003; Aranguren *et al.*, 2005).

2.9.4. Diversidad alélica

Es la frecuencia relativa de un alelo en particular en una población. La frecuencia alélica es considerada un indicador fundamental en estudios evolutivos, porque un cambio genético en una población es usualmente descrito por un cambio en la frecuencia de sus alelos (Nei y Kumar, 2000). Esta medida depende mucho del número de individuos analizados, ya que

cuando el número es grande, mayor es la probabilidad de detectar alelos suplementarios (Stoddart y Taylor, 1988).

2.9.5. Porcentaje de loci polimórficos

Un locus se considera polimórfico si se detecta más de un alelo en una población. Generalmente el criterio utilizado es si el locus presenta el alelo más común con una frecuencia menor del 99% en la población bajo estudio (Aranguren *et al.*, 2005). Asimismo, este porcentaje es una estimación cruda de la variación genética y está sujeto a errores de muestreo. Esta estimación sólo es exacta cuando una gran cantidad de loci o marcadores son muestreados (Mohammadi y Prasanna, 2003).

2.9.6. Alelos privados

Los alelos privados son aquellos alelos que se encuentran sólo en una única población entre una colección más amplia de poblaciones. Estos alelos han demostrado ser informativos para diversos tipos de estudios en genética de poblaciones, en ecología molecular, genética de la conservación y en genética evolutiva (Szpiech y Rosenberg, 2011).

2.9.7. Heterocigosidad

Constituye la proporción de individuos heterocigotos en la población. Un valor de heterocigosidad elevado significa que existe una elevada diversidad alélica presente en la muestra analizada. Se tienen dos indicadores para medir la heterocigosidad: la esperada (H_e) y la observada (H_o). La H_e se define como la probabilidad que dos alelos escogidos al azar en una población sean diferentes, esta heterocigosidad es usada como una medida de diversidad genética que refleja el nivel de heterocigosidad que puede esperarse en una población que se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. La H_o es definida como la proporción de individuos heterocigotos observados del total analizado para un locus en particular (Weir, 1996).

Por otro lado, a la heterocigosidad o la diversidad de haplotipos (convenientemente, también conocida como H) es una medida del grado de variación en haplotipos encontrados para una población, y se calcula como:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^{m(k)} p_i^2$$

Donde p es la frecuencia del i -ésimo alelo encontrado y $m(k)$ es el número total de variantes.

La diversidad de haplotipos es una medida similar para el cálculo de heterocigosidad en un locus diploide, salvo que en este caso no hay heterocigotos propiamente. Se usa el término “haplotipos” y “alelos” de forma indistinta. Si se quiere calcular el estadístico F_{ST} (detallado más adelante) para un locus haploide, se debe sustituir la heterocigosidad (H_0) en términos con el equivalente H (diversidad de haplotipos) (Nei, 1978; Mason *et al.*, 2005).

2.10. Estructuración y diferenciación genética poblacional

Varios enfoques han sido propuestos para estimar el valor de la diferenciación genética entre poblaciones y en sub-divisiones de una población. Entre los parámetros para evaluar el grado de diferenciación entre grupos de individuos o poblaciones se tiene: (i) la estimación de las distancias genéticas, (ii) pruebas estadísticas basadas en el cálculo de las frecuencias alélicas, (iii) el uso de estadísticos F de Wright (Wright, 1951), (iv) el estadístico G_{ST} (Nei, 1973). Se cuenta también con (v) métodos de análisis multivariados que incluyen los algoritmos de: “Análisis de Componentes Principales (PCA)”, “Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)” y el “Análisis discriminante de componentes principales” (DPCA).

A continuación las características más destacadas de las metodologías estadísticas y algunas consideraciones importantes, específicamente, en relación con la diversidad genética de las plantas cultivadas a nivel intraespecífico (Mohammadi y Prasanna, 2003).

2.10.1. Distancias genéticas

La distancia genética entre dos poblaciones, son distancias estadísticas que se calculan sobre datos basados en frecuencias alélicas de diferentes loci. Ayudan a entender las relaciones evolutivas entre poblaciones y estudiar las diferencias entre poblaciones. En este sentido, la distancia genética mide el “grado de diferenciación” existente entre poblaciones de una misma especie, o entre especies. Adicionalmente, es necesario considerar en la estimación de las distancias entre poblaciones la variación genética intra-poblacional que pueda existir, pues variaciones altas dentro de la población podrán afectar la diferencia o la distancia genética entre poblaciones (Weir, 1996; Hartl y Clark, 1997).

De acuerdo a su aplicación, las medidas de distancia genética pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: (a) las usadas para la clasificación de las poblaciones y (b) las utilizadas con el objeto de estudiar patrones evolutivos.

En el primer grupo se incluyen las medidas de distancias geométricas que no muestran un patrón o tendencia en el tiempo, en términos de mecanismos evolutivos, tales como son las mutaciones o la deriva genética. Se tiene las distancias de: (Bhattacharyya, (1946), Cavalli-Sforza y Edwards, (1967), Rogers (1972), Prevosti (Wright, 1978)). Dentro de este grupo también están las distancias para datos cuantitativos como son la distancia de Manhattan, la de Mahalanobis o el coeficiente de Pearson, entre otras (Rafael, 2008).

En el segundo grupo se encuentran las medidas de distancias de: Nei (1972 y 1978), Hillis (1984), Swofford y Olsen (1990), los coeficientes de diferenciación genética, los índices de parentesco o los índices coancestrales, entre otros (Nei, 1987; Felsenstein, 1991; Weir, 1996; Nei y Kumar 2000). Estos coeficientes e índices se han estudiado en el contexto de modelos evolutivos específicos, de modo que es conocida su tendencia con el tiempo. Las definiciones y estimaciones de las distancias antes mencionadas se basan en diversas premisas y la mayoría están analíticamente relacionadas. Matemáticamente pueden ser bastante disímiles con respecto a relaciones entre las poblaciones, principalmente en el caso de poblaciones genéticamente cercanas. Por ello, las características estadísticas de tales

medidas de distancia vienen siendo exploradas con mayor rigurosidad en algunos estudios (Rafael, 2008).

La apropiada elección de la medida de distancia genética se debe basar en función del tipo de variable y la escala de medición, así como del marcador molecular usado (dominante o codominante) y del tipo de población a evaluar (híbridos, líneas puras, clones, accesiones de germoplasma o especies). Otro aspecto a considerar es el conocer la distribución del estadístico para calcular la varianza muestral y el intervalo de confianza. Para solucionar este problema la técnica de “*bootstrap*”⁸ es efectiva para estimar la varianza muestral (Mohammadi y Prasanna, 2003).

2.10.2. Estadístico F_{ST} para el análisis de la estructura poblacional

La estadística F o estadística de Wright mide la correlación entre diferentes niveles jerárquicos en una población sub-dividida. El índice de fijación F_{ST} es la medida más usada para describir la diferenciación genética en poblaciones debido a la deriva genética entre subpoblaciones, mide cuan diferentes genéticamente son dos poblaciones y refleja la proporción de la variabilidad genética. Los valores de F_{ST} pueden variar entre 0 y 1. Si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas iguales, el valor de F_{ST} es igual a 0. En contraste, si dos poblaciones presentan frecuencias alélicas totalmente diferentes, el valor de F_{ST} es igual a 1 (Wright, 1978). Asimismo, el autor anterior sugiere una guía para la interpretación cuantitativa de la diferenciación genética del estadístico: un rango de 0,0 hasta 0,05 indica poca diferenciación genética, el intervalo de 0,05 a 0,15 indica diferenciación genética moderada, un rango de 0,15 a 0,25 indica una gran diferenciación genética, mientras que valores de 0,25 indican gran diferenciación genética.

⁸ El bootstrap o bootstrapping es un método de re muestreo. Se utiliza para aproximar la distribución en el muestreo de un estadístico. Asimismo, aproxima el sesgo o la varianza de un análisis estadístico. También permite construir intervalos de confianza o realizar contrastes de hipótesis sobre parámetros de interés. La enorme potencia de cálculo de los ordenadores actuales facilita la aplicabilidad de este método computacionalmente tan costoso.

Es apropiado resaltar lo importante que es estimar F_{ST} usando tantos loci como sea posible. Cada locus es un ensayo aleatorio totalmente independiente. Entre un grupo de subpoblaciones, cada locus puede cambiar en frecuencia de manera muy diferente a otro locus. Como resultado, cada locus proporcionará una estimación diferente de F_{ST} , a veces muy radicalmente. El cálculo del promedio sobre muchos loci dará una mejor medida de la diferenciación entre las poblaciones que un cálculo a partir de un único locus (Wright, 1978).

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

Donde H_T y H_S son la Heterocigosidad total y de subpoblaciones respectivamente.

2.11. Métodos multivariados

El uso de algoritmos estadísticos multivariados es una importante estrategia para la clasificación del germoplasma, ordenando la variabilidad de un gran número de accesiones. Estos métodos analizan simultáneamente más de dos variables de un individuo. Su aplicación en la caracterización de material vegetal permite en primer lugar cuantificar las relaciones entre las Unidades Básicas de Caracterización (UBC)⁹, en segundo lugar representar geoméricamente las UBC y finalmente clasificarlas respecto a un conjunto de variables. Los métodos más utilizados son:

2.11.1. Análisis de clúster o conglomerados

Este es un método matemático utilizado para la formación de grupos de UBC con características similares a partir de las similitudes o disimilitudes que se presentan entre pares de estas unidades en las características evaluadas. Esta metodología es menos restrictiva en los supuestos (no exige linealidad, normalidad, permite variables categóricas),

⁹ La unidad básica de caracterización (UBC) puede estar constituida por un único individuo, de una accesión de germoplasma o de un conjunto de individuos que presentan características comunes (individuos de una población silvestres), también de una variedad cultivada o incluso una especie taxonómica completa. La UBC se determina de acuerdo con el objetivo específico de la caracterización y con el interés del investigador.

admite varios métodos de estimación de la matriz de distancias y no asume ninguna distribución específica para las variables. Las UBC con descripciones similares matemáticamente se reunirán en el mismo clúster exhibiendo alta homogeneidad y alta heterogeneidad externa (entre los clúster). Por tanto, si la clasificación es exitosa, los individuos dentro de un grupo se representan geoméricamente más cercanos y más separados cuando sean diferentes (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Existen dos tipos de métodos: Los métodos basados en distancias y los métodos basados en modelamiento.

A. Los métodos basados en distancias

En los cuales una matriz de distancia por pares es usada como entrada para el análisis y la agrupación específica con el algoritmo permite la representación geométrica. Pueden categorizarse en: jerárquico y no jerárquico. Metodologías *UPGMA*¹⁰ y *Ward's*¹¹ son los más empleados dentro de los modelos jerárquicos, pero también se tiene los métodos de *UPGMC*, *Single Linkage*, *Complete Linkage*, y *Median Linkage*. Todos ellos envuelven la construcción de dendogramas o árboles. En resumen, son idóneos para determinar el número óptimo de conglomerados existente en los datos y el contenido de los mismos. Mientras que, los no jerárquicos son referidos a agrupamientos por “K-means o K-medias”. El método de K-medias permite procesar un número limitado de casos, pero sólo permite utilizar un método de aglomeración y requiere que se proponga previamente el número de K conglomerados que se desea obtener. Principalmente se basan en enfoques tipos “*sequential threshold*”, “*parallel threshold*,” y “*optimizing*”¹² para la asignación de individuos a los

¹⁰ *UPGMA* (Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages) en español “Método de agrupamiento por pares no ponderado usando promedio aritmético)

¹¹ Método de *Ward's*: Propone que para evitar la pérdida de información producida al integrar los distintos individuos en clusters puede medirse a través de la suma total de los cuadrados de las desviaciones entre cada punto (individuo) y la media del cluster en el que se integra.

¹² *Sequential threshold* es un método donde una vez formados los conglomerados, los datos u objetos que caen dentro de una determinada distancia o grupo ya no se consideran para posteriores asignaciones. Mientras que *Parallel threshold* es similar al anterior pero se generan todas las agrupaciones al mismo tiempo y los umbrales mínimos de aceptación en cada grupo. Finalmente *optimizing* permite la reasignación de sujetos, objetos o datos a una agrupación.

clusters. Sin embargo, este grupo de métodos son raramente usados para análisis de diversidad genética intraespecífica en plantas cultivadas (Mohammadi y Prasanna, 2003).

B. Métodos basados en modelamiento

Con esta metodología cada cluster que se identifica está asumiendo una descripción al azar a partir de un modelo paramétrico. Las inferencias sobre los parámetros de cada grupo o cluster, así como la pertenencia de cada individuo al cluster se realiza utilizando conjuntamente métodos estadísticos estándar como de máxima verosimilitud (“*maximum-likelihood*”¹³) o métodos bayesianos (Pritchard *et al.*, 2000). El poder de este enfoque de asociación reside en un análisis eficaz de la estructura de la población, la agrupación precisa y la asignación de los individuos en sus adecuadas poblaciones, incluso con un mínimo número de marcadores disociados. Asimismo, permite la identificación de migrantes y de individuos mezclados.

2.11.2. Análisis factorial

El análisis factorial es usado para reducir la información contenida en una serie de variables originales hacia una serie más pequeña de dimensiones compuestas o valores teóricos nuevos (factores), considerando una pérdida mínima de información. Los más utilizados son el Análisis en Componentes principales (PCA¹⁴), el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA¹⁵) y el análisis factorial de correspondencias simple (AFC). Dependiendo de los datos a evaluar se restringe su uso (Mohammadi y Prasanna, 2003; Rafael, 2008).

El PCA es un procedimiento matemático que transforma un conjunto de variables de respuesta correlacionadas a partir de la matriz de correlación de las variables originales, o en su defecto, la matriz de varianzas-covarianzas, en un conjunto menor de variables no

¹³ *Maximum-likelihood*: Evaluar qué tan bien se ajusta el modelo a los datos observados. El “buen ajuste” a los datos se evalúa al encontrar los parámetros del modelo que mejor se ajustan a los datos.

¹⁴ PCA del inglés *Principal Component Analysis* (Análisis de componentes principales)

¹⁵ PCoA del inglés *Principal Coordinates Analysis* (Análisis de coordenadas principales)

correlacionadas llamadas componentes principales, que resultan tantos como variables evaluadas. Estos componentes acumulan una parte de la varianza total y tienen mayor importancia, a su vez una mayor varianza acumulada entre mayor sea su propio valor. El primer componente tiene más varianza acumulada y disminuye subsecuentemente. El PCA es utilizado principalmente para datos cuantitativos. No se usa para datos binomiales (Franco e Hidalgo, 2003; Rafael, 2008; Mohammadi y Prasanna, 2003, Ortiz *et al.*, 1998).

Por otra parte, el PCoA es una modalidad del análisis factorial usado exclusivamente para datos binomiales. Se trata de una transformación de un índice de similitud mediante la distancia de Gower en una matriz cuadrada, que hace a su vez de matriz de varianzas y covarianzas, se obtienen sus valores y sus vectores propios (eigenvalues y eigenvectors) y se usa únicamente para tener una representación bi o tridimensional de las UBC en un plano reducido para datos binomiales, principalmente de huellas genómicas de marcadores dominantes (Mohammadi y Prasanna, 2003). En esta investigación no se usará este método pero resulta importante señalar su diferencia respecto al PCA.

Todas estas técnicas multivariadas permiten representar los genotipos en gráficos con dimensionalidad reducida y ver el parecido de ellos de acuerdo con su cercanía en un plano dimensional o tridimensional. Asimismo, se pueden detectar las posibles características asociadas a cada genotipo, esto es muy útil para obtener características específicas que puedan servir para la identificación rápida de los genotipos comparados.

2.11.3. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DPCA)

La investigación de la diversidad genética utilizando este enfoque se basa en la búsqueda de la síntesis de variables construidas como combinaciones lineales de alelos. Esta metodología refleja la variación genética entre los individuos estudiados y los grupos de individuos dentro de una población. Por lo general, se inicia con el análisis de datos individuales para luego identificar poblaciones o grupos genéticos (clusters). Un problema que ocurre en los métodos tradicionales es que, se centran en la totalidad de la variación genética. La variabilidad

genética se puede descomponer utilizando un modelo ANOVA multivariado estándar como se señala a continuación:

$$\text{VAR}(X) = B(X) + W(X),$$

Varianza total = (varianza entre grupos) + (variación dentro de los grupos)

Donde X es la matriz de datos

Una característica del DPCA es que optimiza B(X) mientras se minimiza W(X): busca variables sintéticas que son las funciones discriminantes que muestran diferencias entre los grupos de la mejor manera posible y reducen al mínimo la variación dentro de los grupos (Jombart, 2010; 2014).

Los grupos genéticos son a menudo desconocidos o inciertos y hay una necesidad de identificar grupos genéticos antes de describirlos. Esto se puede lograr usando k-medias; que es un algoritmo de agrupamiento que encuentra un número dado, por ejemplo un número “k” de grupos al maximizar la variación entre los grupos B(X). Para identificar el número óptimo de cluster, el algoritmo se ejecuta secuencialmente con valores crecientes de k, luego diferentes soluciones de clustering se comparan con el Criterio de Información Bayesiano (BIC). Idealmente, la solución óptima de agrupación debe corresponder al BIC más bajo. En la práctica, el mejor BIC se indica a menudo por una inflexión en la curva de los valores de BIC como una función de k (Jombart, 2014).

Y para entender mejor este enfoque, cuando se realiza el análisis habrá que formular la pregunta ¿Cuántos poblaciones hay en los datos?. Para tal interrogante se puede responder que la agrupación generada con los algoritmos ayuda a visualizar un gráfico de una realidad compleja, que en la mayor parte del tiempo está lejos de seguir los modelos de genética de poblaciones conocidos. Por lo tanto, raramente se busca poblaciones panmícticas reales de donde provengan los individuos. Los grupos genéticos (poblaciones) pueden ser estructuras biológicamente significativas y reflejan procesos biológicos interesantes, pero no dejan de ser modelos. Una pregunta un poco diferente, pero probablemente más significativa es: "¿Cuántos grupos son útiles para describir los datos?". Un punto fundamental en esta

pregunta es que los *clusters* son herramientas que se utilizan para resumir y entender los datos. Ya no hay un "verdadero k", pero algunos valores de k son mejores resúmenes y más eficientes. Asimismo, el análisis por DAPC también ofrece las probabilidades de pertenencia de los individuos a los diferentes grupos identificados (Jombart, 2014).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Hipótesis

El análisis con marcadores microsatélites permite caracterizar molecularmente accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) de la Colección Nacional de Quinua del INIA.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Caracterizar accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) pertenecientes a la Colección Nacional de quinua del INIA mediante el análisis de 25 marcadores microsatélites.

3.2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la metodología de PCR y electroforesis de los marcadores SSRs más polimórficos.
- Estimar la diversidad genética de 75 accesiones de quinua de Puno de la Colección Nacional del INIA mediante 25 marcadores microsatélites.
- Comparar la diversidad genética de quinuas procedentes de distintas localidades dentro del departamento de Puno (ecotipo altiplano).
- Determinar la relación genética entre las 75 accesiones de quinua de Puno con 25 marcadores microsatélites mediante un análisis de agrupamiento.
- Analizar la distribución de la variabilidad genética de las 75 accesiones de Puno mediante 25 marcadores microsatélites.

- Comparar la diversidad genética de accesiones del departamento de Puno versus la caracterización de accesiones de valles interandinos.

3.3. Material Vegetal

Las semillas de 75 accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) de la Colección Nacional de quinua del INIA fueron sembradas en la Estación Experimental Illpa ubicado en el departamento de Puno.

3.4. Estrategia de muestreo del ADN (*bulk DNA sampling*)

Se colectaron hojas jóvenes de 5 individuos por accesión, y se conservaron en silica gel hasta el momento de la extracción de ADN. Cada bulk es la combinación de ADN extraído de las hojas de los diferentes individuos en cada accesión. Cada accesión representa una Unidad Básica de Caracterización. Esta estrategia es ampliamente utilizada para la caracterización de germoplasma (Reyes *et al.*, 2013).

3.5. Reactivos y enzimas

- Buffer de extracción (CTAB 2X, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM TrisHCl pH=8)
- Buffer de precipitación (CTAB 10X, 0.7M NaCl, 20mM EDTA, 100mM TrisHCl pH=8)
- Solución de polivinilpirrolidona (PVP) al 1%
- β -mercaptoetanol
- Cloroformo
- Alcohol isoamílico
- Isopropanol
- Etanol al 80% y 90%
- H₂O ultrapura (tipo I)
- RNAasa (10mg/ml)

- Agarosa al 1%
- Bromuro de etidio.
- Buffer de carga: 1X Orange Loading DYE solution.
- Marcador de peso molecular: GeneRuler 1Kb DNA ladder (0.5 ug/uL)
- Iniciadores o “*primers*” sintetizados por IDT Integrated DNA Technologies
- Agua libre de nucleasas (NFW)
- Dideoxinucleótidos (dNTPs)
- Cloruro de Magnesio MgCl₂
- Fluorógeno IRDye (700nm/800nm-LI-COR® IRDye®).
- Poliacrilamida 6% (Li-cor®)
- Fago lambda

3.6. Extracción de ADN

El ADN de cada accesión se extrajo con el método del CTAB elaborado por Murray y Thompson (1980) con las siguientes modificaciones:

- a) 100 mg de hojas frescas fueron molidas con nitrógeno líquido.
- b) Se adicionó 700ul de buffer de extracción (CTAB 2X, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM TrisHCl pH=8, PVP 1%) y 2 ul de mercaptoetanol.
- c) Se incubó a 65°C durante una hora.
- d) Se añadió 700 ul de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
- e) Se realizó una centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos.
- f) La parte acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadió 50 ul de buffer de precipitación (CTAB 10X, 0.7M NaCl, 20mM EDTA, 100mM TrisHCl pH=8) seguido de la adición del cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y una centrifugación a 14000 rpm por 5 minutos.
- g) A la nueva capa acuosa se le agregó un volumen de 500ul de isopropanol y se dejó a una temperatura de -20°C por 12 horas.
- h) Se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante.
- i) Se realizaron lavados con etanol al 80% y 90% con centrifugaciones de 14000 rpm por 10 minutos.

- j) El pellet de ADN se disolvió con 100ul de H₂O ultrapura (tipo I)
- k) Se agregó 2ul de RNAasa (10mg/ml) y se incubó a 37°C por 1 hora.

3.7. Electroforesis en geles de agarosa

Para la verificación de la calidad del ADN se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% y se tiñó con bromuro de etidio. Para cargar el ADN en cada pocillo del gel se mezcló aproximadamente 2uL de ADN y 4uL de 1X Orange Loading DYE solution. Se usó un marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA ladder (0.5 ug/uL) que dio un patrón de 14 bandas de ADN comprendidas entre 250-10000 pb. Las condiciones electroforéticas que se usaron fue de 95V por 50 minutos aproximadamente. Los resultados de la electroforesis se muestran en la Figura 8.

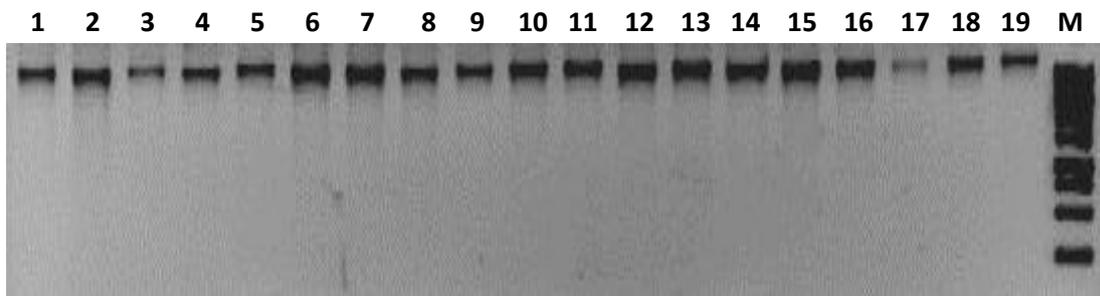


Figura 8: Electroforesis del ADN extraído de 19 accesiones de quinua

En los carriles 1-19 se observa la calidad del ADN extraído de 19 accesiones. “M” representa al marcador de peso molecular con 14 bandas de ADN (250-10000 pb).

FUENTE: Elaboración propia

3.8. Cuantificación de la concentración del ADN extraído de las muestras

Para determinar la concentración de ADN se usó el espectrofotómetro Nanodrop 1000 (NanoDrop 1000 Spectrophotometer®). La razón de la absorbancia en 260 y 280 nm se usó para medir la pureza de ADN y ARN. Una razón de ~1.8 es generalmente aceptada como pura para el ADN. Si la razón es apreciablemente más baja, quizá indique la presencia de

proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben fuertemente en o cercano a 280nm. La razón de la absorbancia en 260 y 230nm es una medida secundaria de la pureza de los ácidos nucleicos. Los valores 260/230 para un ADN puro están comúnmente en el rango de 1.8–2.2. Si la razón es apreciablemente más baja, quizá indique la presencia de contaminantes co purificados como polisacáridos. En promedio el rendimiento obtenido en la extracción fue de 750 ng/ul de ADN.

3.9. Dilución de la concentración de ADN de las muestras

Se preparó una placa de dilución de ADN a una concentración de 10 ng/ul para todas las muestras. Se corroboró que la dilución sea correcta realizando una electroforesis horizontal de las muestras diluidas y se cuantificando con concentraciones conocidas del fago lambda a 10, 30, 40, 60,70, 80,100, 120 ng/ul.

3.10. Loci SSR utilizados

Los loci SSR seleccionados se muestran en la Tabla 2 donde se detalla el motivo repetido y la secuencia de los iniciadores de cada loci. Representan una cantidad y distribución significativa del mapa de ligamiento descrito en Jarvis *et al.* (2008). Los SSRs para quinua se encuentran descritos y utilizados en Maughan *et al.* (2004); Mason *et al.* (2005); Jarvis *et al.* (2008); Fuentes *et al.* (2009a).

Tabla 2: Set de Loci microsatélites seleccionados, motivo repetido y secuencia de los iniciadores en cada loci SSR

SSR	Motivo repetido	Secuencia <i>Forward</i> del iniciador	Secuencia <i>Reverse</i> del iniciador
KAAT007	(AAT) ₃₀	AGGTACAGGCGCAAGGATAC	CGGTAGCATAGCACAGAACG
QAAT097	(AAT) ₁₈	AAATCATTTGACTTTGTAGGTTT	GATGTGATAAGGAATAATCCAA
QCA14	(GT) ₂₁ (GA) ₁₂	GCTTCTCCTGAGCTGATTTATCAAAGGAC	CCTCTTGCGAGATTTCTGCT
QGAA001	(GAA) ₆₅	TTGTATCTCGGCTTCCCCT	AACCAGAGAGATGAAGAACATGC
QGA17	(TG) ₈ AAG(GA) ₁₆	TTACGGTTCTCCCGGTCTC	TGCAAACAAGAGAAGCATGAAG
KGA16	(GA) ₂₂	CCCTGCTTAATCTCCGTGAA	GCTTCTCCGAACCAAGACTACGAAACA
QAAT022	(TTA) ₂₉	TGGTCGATATAGATGAACCCAAA	GGAGCCCAGATTGTATCTCA
QAAT051	(AAT) ₁₄	CCTTCGACAAGGTCCCATTA	CGTCCATAGTGGAGGCATTT
QAAT088	(ATT) ₃₀	TCCTAACTTCTTGACATTTTCTT	CCACGATCCCAGAACAATTT
QAAT071	(ATT) ₃₀	CATCACCCGCTGAATAGACAC	TACCTAATGCCACGATTCC
QAAT001	(AAT) ₅ AAC(AAT) ₅ ACT(AAT) ₄ ACT(AAT) ₁₃	ATATTGCATGTCGAGCACCA	TGGGACTTCCATAAGGCAAC
KGA20	(CT) ₂₂	GCTTCTTCACCTACCTCGGTAAAGGAAA	GGAGCAGATGATGAACATGG
KCAA011	(ATT) ₁₀ (GTT) ₇ GTA(GTT) ₁₅	TGAACCCGCTTCAACAATG	CCTTCTTCAAACCTCCGAATCC
QCA26	(TG) ₁₂	TTCCAATACAGCACCACCTC	TGCAAGCATAcataAAGACAGTCA
QAAT050	(AAT) ₁₇	GGCACGTGCTGCTACTCATA	ATGGCGAATGGTTAATTTGC
QCA120	(TG) ₄ CG(TG) ₈ (AG) ₆	GACGCACATAACGTGTAGAATTG	TCCTCATTCCTTCTCCATC
QAAT062	(TAA) ₂₇	CACAAGTGCGCATAGCAAAG	CCAGTACACGCACGAAGAAA
QAAT026	(TAT) ₁₇	ATTTACATAAATGCAACAACTTTT	CCAGATTGTATCTCGACTCC
QAAT087	(ATT) ₁₂	CGTGATGCTGCTCACATCTT	TTGCTCTAACTGAATTTGGTGTG
QAAT012	(AAT) ₁₀	TCAAGTGTGGGATGCTTGAA	CCGACAGACGAGGAGACAA
QATG001	(CAT) ₈	CATAACATCCTATAGAACCGTTGC	TGCTCCTACTTTACTCATTGACTCAT
QAAT076	(ATT) ₃₀	GCTTCATGTGTTATAAAATGCCAAT	TCTCGGCTTCCCCTAATTTT
QAAT011	(ATT) ₉ ATCATTGTT(ATT) ₁₆	AGGTCGTTACAATCCAATCCA	GAGGAGTGAGGGCTCATATTG
QGA028	(AG) ₇ AC(AG) ₂₀	ATAACCACTCCGATGGCAAA	CAGCCACCTGGCAGTTAGA
QAAT78	(AAT) ₂₂	AGCGAAGGAAATTTGGAAC	TAACGATACGCTCCAAGGAA

FUENTE: Elaboración propia

3.11. Amplificación de las regiones microsatélites

3.11.1. Protocolo de PCR

Se estandarizaron las reacciones de PCR para los iniciadores de los loci SSR seleccionados en las variables:

- Concentración de MgCl₂
- Concentración de ADN
- Concentración de los iniciadores

Los iniciadores de los loci fueron sintetizados por IDT Integrated DNA Technologies y llevan en el “forward” una secuencia adicional 5' - CACGACGTTGTAAAACGAC – 3', la cual es detectada por un marcador fluorógeno IRDye (700nm/800nm-LI-COR®IRDye®). Este marcador se incluyó en la reacción de PCR. Las concentraciones para preparar el mix de PCR se muestran en la Tabla 3.

Para hallar la temperatura de alineamiento “temperatura de *annealing*” (Ta en °C) de los iniciadores se usó un gradiente de temperatura en un termociclador Eppendorf AG 22331. Luego, se verificó la calidad de las bandas amplificadas con una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Se obtuvo mayor cantidad de iniciadores con una temperatura de *annealing*– Ta de: 60°C (16 loci microsatélites), 54°C (7 loci microsatélites) y 58.5°C (2 loci microsatélites). Los resultados detallados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3: Componentes del mix de PCR

Componente del mix de PCR	Concentración Final	Volumen en μL 1 reacción
H ₂ O	-	3.5
Buffer PCR	1X	2
MgCl ₂	2.5 mM	1
dNTPs	0.2mM	0.2
Iniciador " <i>forward</i> "	0.3 μ M	0.3
Iniciador " <i>reverse</i> "	0.3 μ M	0.3
M13-800/700	0.02	0.6
[Taq polimerasa]	0.05	0.1
ADN	10 ng/ μ L	2 μ l

El volumen final de una reacción de PCR fue de 10 μ l.

FUENTE: Elaboración propia

Tabla 4: Set de marcadores, indicando el nombre del loci, el motivo repetido, la ubicación de marcadores seleccionados en los grupos de los mapas de ligamiento y la temperatura de alineamiento Ta (°C) en la PCR

Locus	Motivo repetido	Ta (°C)	Grupo de ligamiento
KAAT007	(AAT) ₃₀	60°C	2 (a)
QAAT097	(AAT) ₁₈	60°C	1 (a)
QCA14	(GT) ₂₁ (GA) ₁₂	60°C	---
QGAA001	(GAA) ₆₅	60°C	---
QGA17	(TG) ₈ AAG(GA) ₁₆	60°C	---
KGA16	(GA) ₂₂	60°C	---
QAAT022	(TTA) ₂₉	60°C	23 (a)
QAAT051	(AAT) ₁₄	60°C	5 (a)
QAAT088	(ATT) ₃₀	60°C	7 (a)
QAAT071	(ATT) ₃₀	60°C	30 (a)
QAAT001	(AAT) ₅ AAC(AAT) ₅ ACT(AAT) ₄ ACT(AAT) ₁₃	60°C	---
KGA20	(CT) ₂₂	60°C	---
KCAA011	(ATT) ₁₀ (GTT) ₇ GTA(GTT) ₁₅	60°C	19 (a)
QCA26	(TG) ₁₂	58.5°C	---
QAAT050	(AAT) ₁₇	60°C	13 (a)
QCA120	(TG) ₄ CG(TG) ₈ (AG) ₆	60°C	14 (b)
QAAT062	(TAA) ₂₇	54°C	---
QAAT026	(TAT) ₁₇	54°C	8 (a)
QAAT087	(ATT) ₁₂	54°C	24 (a)
QAAT012	(AAT) ₁₀	54°C	6 (a)
QATG001	(CAT) ₈	54°C	---
QAAT076	(ATT) ₃₀	54°C	---
QAAT011	(ATT) ₉ ATCATTGTT(ATT) ₁₆	54°C	---
QAAT78	(AAT) ₂₂	58.5°C	12 (a)
QGA028	(AG) ₇ AC(AG) ₂₀	60°C	---

(a) Identificado en Jarvis *et al.*, 2008

(b) Identificado en Mason *et al.*, 2005

FUENTE: Elaboración propia

3.11.2. Programa de amplificación

El programa usado en el termociclador (Tabla 5) consistió de 1 ciclo de denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos que se detallan a continuación: un primer paso con una denaturación a 94°C por 45 segundos, un segundo paso de alineamiento “*annealing*” con una temperatura T_a (°C) dependiente del loci SSR por 30 segundos y un tercer paso de extensión a 72°C por 1 minuto. Finalmente, se somete a un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos.

Tabla 5: Programa de amplificación para 25 marcadores SSRs

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de Ciclos
Denaturación inicial	94°C	5 minutos	1
Denaturación	94°C	45 segundos	30
Annealing	54°C- 60°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

FUENTE: Elaboración propia

3.12. Información Complementaria (Base de datos)

Se usó una base de datos de la caracterización molecular de 75 accesiones de quinua de valles interandinos (Colección Nacional del INIA) correspondiente a 22 loci microsatélites (Alva, 2014). Estos datos permitieron realizar comparaciones de diversidad con el germoplasma de Puno.

3.13. Análisis estadístico

3.13.1. Prueba t de Student para diferencias de medias

Una prueba t de Student es aquella prueba de hipótesis estadística que sigue la distribución de Student en caso la hipótesis nula sea aprobada. Sirve para comparar la medida de tendencia central de dos grupos experimentales. En el presente estudio se trabajó con grupos con varianzas no homogéneas y tamaños distintos. Para ese caso el estadístico t se calcula de modo:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}$$

Donde:

$$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

Es el estimador imparcial de la varianza. S es la varianza; N es el número de individuos en la muestra; \bar{X} es el promedio estimado. Los grados de libertad (gl) se calcula de modo:

$$gl = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{(s_1^2/n_1)^2/(1 - n_1) + (s_2^2/n_2)^2/(1 - n_2)}$$

3.13.2. Prueba Wilcoxon rankeada con signo

La prueba de Wilcoxon es una prueba no paramétrica de comparación de grupos con prueba de significancia. Se utiliza en la comparación de dos grupos similares o emparentados para probar si los rangos de la media poblacional son diferentes. A diferencia de la pruebas paramétricas, esta tiene pocos supuestos: las muestras son pareadas y vienen de la misma población; cada par es escogido de manera aleatoria e independiente; puede usar información ordinal.

Para calcular el estadístico se siguen los siguientes pasos:

Sea N el número de datos pareados, el número de datos puntuales es entonces $2N$. Para $i = 1, 2, 3, \dots, N$ sea $x_{i,1}$ y $x_{i,2}$ los valores medidos. Entonces:

1. Para $i = 1, \dots, N$. calcúlese $|x_{1,i} - x_{2,i}|$ y luego $sgn(x_{1,i} - x_{2,i})$, donde $sgn(x)$ es la función signo:

$$sgn(x) = \begin{cases} -1 & \text{si } x < 0 \\ 0 & \text{si } x = 0 \\ 1 & \text{si } x > 0 \end{cases}$$

2. De todos los resultados obtenidos del primer paso retírese los que hayan dado como resultado 0. N_r es ahora el espacio reducido
3. Ordenar los pares restantes según el resultado obtenido en el primer paso menor a mayor
4. Rankear los pares a partir de 1 para el menor. Los empates reciben el promedio de los ranks sobre los cuales están dispuestos. Sea R_i el Rank
5. Calcular el estadístico W de modo:

$$W = \sum_{i=1}^{N_r} [sgn(x_{1,i} - x_{2,i})R_i]$$

Esta es la sumatoria de los ranks con signo

6. Comparar el resultado con una tabla de referencia
7. La prueba rechaza la H_0 si el valor absoluto de W es mayor o igual al valor crítico de la tabla.

3.13.3. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

La prueba de normalidad de Shapiro-Wilk es una prueba de hipótesis para normalidad. Se calcula de modo:

$$W = \frac{\left(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)}\right)^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$x_{(i)}$ es el valor i -gésimo en orden creciente del estadístico de orden

x_i es el valor de la i -ésima muestra

a_i es la una serie de constantes dados por:

$$(a_1, \dots, a_n) = \frac{m^T V^{-1}}{(m^T V^{-1} V^{-1} m)^{1/2}}$$

Donde:

$$m = (m_1, \dots, m_n)^T$$

Donde m_1, \dots, m_n son los valores esperados de los estadísticos de orden en una variable aleatoria e independiente tomada de una distribución normal y V es una matriz de covarianza de dichos estadísticos de orden.

3.13.4. Prueba de homogeneidad de varianzas de Barlett

La prueba de Bartlett permite comparar si k muestras independientes son de poblaciones con varianzas iguales. La H_0 es de igualdad de varianzas entre todas las k muestras; la alternativa es que por lo menos una muestra proviene de una población con varianza distinta.

$$X^2 = \frac{(N - k) \ln(S_p^2) - \sum_{i=1}^k (n_i - 1) \ln S_i^2}{1 + \frac{1}{3(k-1)} \left(\sum_{i=1}^k \left(\frac{1}{n_i - 1} \right) - \frac{1}{N - k} \right)}$$

Donde:

$$N = \sum_{i=1}^k n_i$$

Y S_p^2 es el estimador agrupado de la varianza

$$S_p^2 = \frac{1}{N - k} \sum_{i=1}^k (n_i - 1) S_i^2$$

3.13.5. Distancia genética de Nei

Según Nei (Nei, 1972): sea x_i e y_i , la frecuencia del alelo i , en una población X o Y respectivamente. La probabilidad de identidad es $j_X = \sum x_i^2$ en la población X y $j_Y = \sum y_i^2$ en la población Y . La probabilidad de identidad entre un locus en X e Y es $j_{XY} = \sum x_i y_i$. La identidad normalizada entre un gen de X e Y es:

$$I_j = j_{XY} / \sqrt{j_X j_Y}$$

Para todos los loci:

$$I = J_{XY} / \sqrt{J_X J_Y}$$

Donde J_{XY} , J_X y J_Y son las medias aritméticas de las frecuencias j_{XY} , j_X y j_Y respectivamente.

La distancia es definida entonces como:

$$D = -\ln I$$

3.13.6. Distancia euclidiana

La distancia euclidiana está definida tal como el largo de un segmento de línea que une dos puntos p y q (\overline{PQ}) en un espacio euclidiano. La distancia está definida en un espacio euclidiano n dimensional mediante la fórmula de Pitágoras:

$$d(p, q) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2}$$

Para el caso de 2 dimensiones:

$$d(p, q) = \sqrt{(p_i - q_i)^2 + (p_1 - q_1)^2}$$

3.13.7. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales es una transformación lineal ortogonal, que resulta en un set de datos en el cual la mayor variación recae en el eje principal y la segunda mayor variación recae en el segundo eje. Sirve como herramienta de reducción de dimensiones. El proceso general es:

- La normalización y escalamiento de la data
- La construcción de una matriz de covarianza

- El cálculo de los autovalores (*eigenvalues*) y autovectores (*eigenvectors*)
- La transformación de la data original con los autovectores retenidos
- El ploteo de la nueva data con dimensiones reducidas.

Este tipo de análisis tiene muchos usos pero genera información que es poco interpretable de manera tradicional. Es mejor ver el resultado como un agrupamiento de tendencias y comportamientos en conjunto de las variables. Usualmente es útil ver cada componente como una suma de las variables luego de ser multiplicados por algún coeficiente, esto permite tener todas las variables pero en menor medida que la data original.

3.14. Programas Computacionales (*Software*)

3.14.1. GenAlEx v. 6.5

GenAlEx versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012) está diseñado como un paquete de fácil uso para analizar una amplia gama de datos genéticos a nivel de poblaciones dentro del entorno del software Excel. Halla los patrones alélicos de las muestras calculando el número de alelos (N_a), el número efectivo de alelos (N_e), el índice información (I), la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), las frecuencias alélicas, el índice de fijación (F) y los estadísticos F_{is} , F_{st} y F_{it} , junto con el número de migrantes eficaces (N_m), además de las distancias genéticas de N_{ei} . Por otro lado, GenAlEx proporciona opciones para el cálculo de varios estimadores de afinidad y/o parentesco usados ampliamente en la literatura. Posee herramientas para localizar duplicados en las muestras de un conjunto de datos automatizando la detección de genotipos repetidos dado un perfil de ADN mediante probabilidades, finalmente permite realizar el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).

3.14.2. *Software R*

Asimismo, para el análisis de los resultados se usará el Software R. Este programa utiliza un lenguaje y entorno de programación para el análisis estadístico y gráfico. Proporciona una amplia variedad de técnicas estadísticas como el modelamiento lineal y no lineal, pruebas

estadísticas clásicas y modernas, clasificación, agrupamiento, entre otros. Es altamente extensible gracias al uso de paquetes “*packages*” (R Development Core Team, 2014).

Existen diversos paquetes para el análisis de la diversidad genética a nivel de datos moleculares, tales como “Adegenet”, “Polysat”, “poppr”, “mmod”, “ape” y “ade4”. Estos paquetes son colecciones de funciones R, datos y códigos compilados en un formato bien definido y predeterminado.

El paquete Polysat permite manejar datos de microsatélites en organismos aloploidos, autotetraploides o de cualquier nivel de ploidía (también en muestras con ploidía mixta). Asume que el número de copias del alelo es ambiguo en genotipos parcialmente heterocigotos. Este paquete calcula las distancias por pares entre los individuos utilizando un modelo de mutación gradual o de alelos infinitos para los microsatélites. Las distancias genéticas son utilizadas para el cálculo de los estadísticos de diversidad alélica. Finalmente, puede estimar la frecuencia de alelos en las poblaciones y calcular valores de F_{st} sobre la base de esas frecuencias (Clark y Jasieniuk, 2011). Las frecuencias alélicas pueden ser exportadas a paquetes como Adegenet.

“Adegenet” es un paquete dedicado al análisis exploratorio de los datos genéticos. Implementa un conjunto de herramientas que van desde métodos multivariantes hasta la genética espacial y el análisis de datos SNP del genoma (Jombart, 2008; 2014). El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de componentes principales (DPCA) son dos de las poderosas herramientas para la evaluación de los datos provenientes de la caracterización molecular con microsatélites.

“Poppr” proporciona herramientas para el análisis genético poblacional, incluye medidas de diversidad genotípica, distancias genéticas con bootstrap, la organización y manipulación jerárquica de poblaciones nativas y clonales (Kamvar *et al.*, 2014). Mientras que, “Mmod” es una biblioteca para el lenguaje de programación R que permite el cálculo de las medidas de diferenciación poblacional D (est), G (ST) y ϕ (ST). Este paquete se integra y complementa con las bibliotecas existentes de “adegenet” y “pegas”. Mmod extiende el poder de R como una plataforma de análisis en genética poblacional (Winter, 2012).

3.14.3. Software *Structure*

El Software *Structure* versión 2.3.4 es de uso libre y analiza datos de genotipos multi-locus investigando la estructura de las poblaciones. Sus usos incluyen la inferencia de distintas poblaciones, asignando los individuos a las poblaciones, asimismo, el estudio de zonas híbridas, la identificación de los migrantes y de los individuos mezclados, y finalmente la estimación de las frecuencias alélicas en las poblaciones dadas las situaciones de migración y/o hibridaciones. Se puede aplicar en la mayoría de los marcadores genéticos, incluyendo SNPs microsatélites, RFLPs y AFLPs.

En este trabajo la estructura se evaluó mediante el análisis de agrupamiento Bayesiano descrito por Pritchard *et al.* (2000) usando *Structure* 2.3.4. Se usó un pre-asignamiento del número de clusters (K) dentro del rango 1 a 10. Las corridas (runs) implicaron la generación de 500,000 cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), luego de un periodo de repeticiones de prueba (burn-in) de 50,000. El experimento se ejecutó bajo el modelo de hibridación, asumiendo el flujo génico ancestral entre las diversas subpoblaciones o ecotipos de quinua en el Perú.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización molecular de 75 accesiones de quinua de Puno con 25 marcadores microsatélites

4.1.1. Número de alelos amplificados por iniciador

Veinticinco (25) loci microsatélites resultaron ser polimórficos en una población de 75 accesiones de quinuas del departamento de Puno. El número de alelos total fue de 296. El número de alelos por marcador varió de 2 a 40 (QCA14 y QGAA001, respectivamente) con un promedio de 11.8 alelos por marcador para las accesiones analizadas en Puno.

Los marcadores basados en motivos repetidos de trinucleótidos amplificaron más alelos por locus (promedio=14.1, n=18 loci microsatélites) que los basados en dinucleótidos (promedio=6.14, n=7 loci microsatélites). La Tabla 6 detalla el tamaño de los alelos en pares de bases (pb) encontrados en cada loci microsatélite, así como el número total de alelos por marcador. De los 25 loci microsatélites listados en la Tabla 6, todos amplificaron un sólo locus bien definido. En las Figuras 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se muestran parte de los resultados revelados en la electroforesis para los loci QAAT062, QAAT076, QCA120, KGA20, QGAA001, KAAT007 respectivamente. El marcador QAAT084 resultó monomórfico para las accesiones evaluadas y KCAA106 amplificó 2 loci separados y de difícil análisis (Figura 15). Por tanto, los loci QAAT084 y KCAA106 fueron excluidos del análisis pero se reportan como referencia para futuros estudios.

En general la amplificación de los 25 microsatélites resultó ser de buena calidad, salvo algunas excepciones, por ejemplo: el marcador KAAT007 presentó manchas tipo barrido o “*smear*” en algunas muestras, pero se solucionó al repetir la electroforesis disminuyendo el

volumen de carga de ADN. En muestras donde hubo duda se repitió la PCR reduciendo la concentración de ADN polimerasa (Figura 14). Los marcadores QAAT026, QAAT071, QAAT062 y QAAT022 presentaron bandas espejos o “*stutter*”¹⁶ para la mayoría de alelos en los loci señalados.

¹⁶ En el análisis SSR, las “bandas stutters” hacen referencia a una serie de una o más bandas que aparecen tras la PCR y cuyo tamaño difiere en 1 unidad de repetición.

Tabla 6: Polimorfismo genético en Puno. Tamaño y número de alelos amplificados con 25 marcadores microsatélites

SSR	Tamaños de alelos en pb																				Total alelos
QGAA001	146	158	194	200	203	206	209	212	215	218	221	224	227	230	233	236	239	242	245	248	n=40
	251	257	260	266	269	272	275	278	281	287	290	293	299	308	311	320	323	332	335	350	
KAAT007	202	211	214	217	220	241	247	253	256	259	262	268	271	274	277	280	283	286	289	295	n=27
	304	307	316	322	323	325	367														
QAAT071	160	163	166	169	172	175	178	181	184	187	190	193	199	202	205	208	211				n=17
QAAT022	179	182	185	188	191	194	197	200	203	206	209	212	230	233	236	239					n=16
QAAT088	126	135	138	141	144	147	150	153	156	159	162	165	168	177	180	183					n=16
QAAT076	169	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202	205	208	211							n=14
QAAT011	189	192	195	198	201	204	207	210	213	216	219	222	225	228							n=14
QAAT001	183	186	198	201	210	216	219	222	225	228	231	234	237								n=13
QAAT012	194	197	200	203	206	215	218	221	224	227	230	233	239								n=13
QAAT026	193	196	199	202	205	208	211	214	217	220	223	226	229								n=13
QAAT062	162	166	169	175	178	181	184	187	190	193	196	199	202								n=13
QAAT087	187	193	196	202	208	214	217	220	223	226	232										n=11
QAAT097	179	188	191	194	197	200	203	206	209	212	230										n=11
KCAA011	213	228	231	234	246	249	252	255	258	261											n=10
KGA20	177	189	191	193	195	197	199	201	203												n=10
QAAT050	207	213	216	219	222	225	228	231	246												n=9
QAAT78	200	203	206	209	212	215	218	221													n=8
QGA028	190	192	194	196	206	212	214	216													n=8
KGA16	184	186	190	192	194	196	198	206													n=8
QCA120	206	208	210	212	214	216															n=6
QGA17	166	172	174	176	178	180															n=6
QAAT051	184	187	190	193																	n=4
QATG001	209	212	215	218																	n=4
QCA26	206	208	210																		n=3
QCA14	215	219																			n=2

FUENTE: Elaboración propia

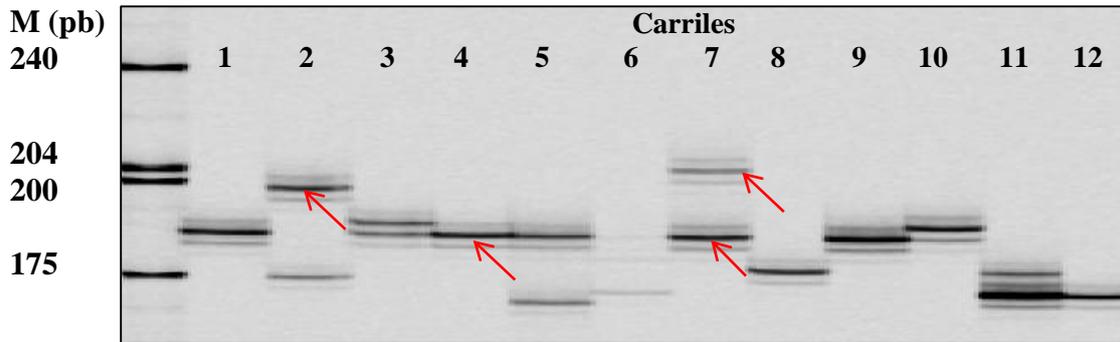


Figura 9: Perfil molecular del locus QAAT062

Patrón de bandas obtenido con el microsatélite QAAT062 en el sistema LI-COR 4300. Las flechas rojas señalan las bandas espejos o *stutters* que no se consideraron en el análisis.

M: marcador de peso molecular, carriles correspondientes a las muestras 1 al 12 (Anexo 1).

FUENTE: Elaboración propia

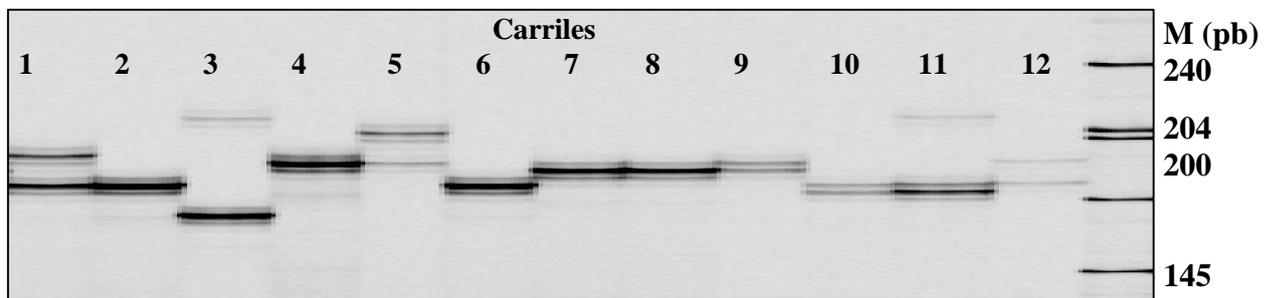


Figura 10: Perfil molecular del locus QAAT076

El marcador QAAT076 no mostró la presencia muchas bandas *stutters* siendo más sencillo la identificación de los alelos verdaderos. M: marcador de peso molecular, carriles: correspondientes a las muestras 1 al 12 (Anexo 1).

FUENTE: Elaboración propia

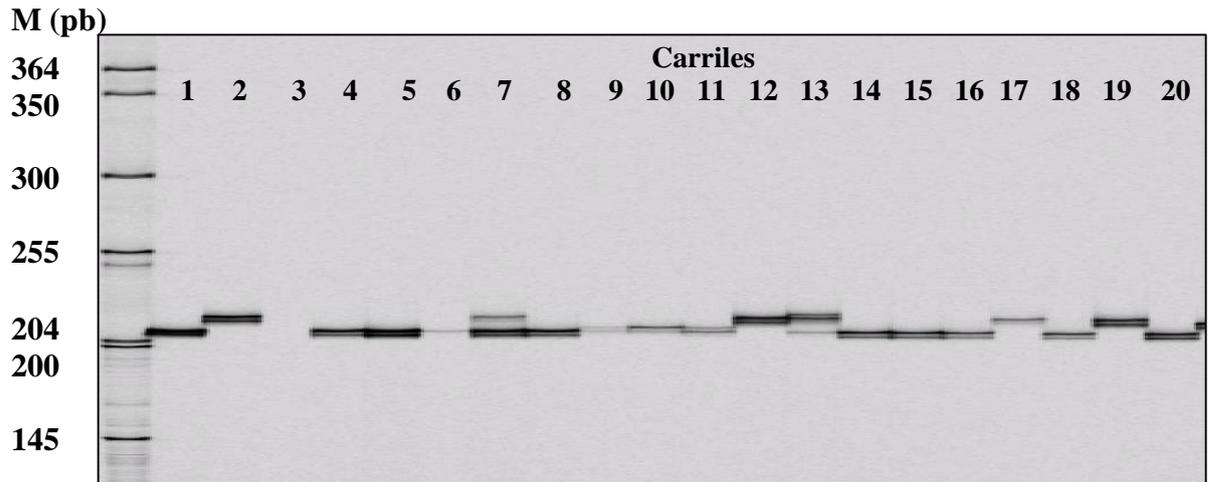


Figura 11: Perfil molecular del locus QCA120

El marcador QCA120 no mostró la presencia bandas espejos o “*stutters*”. Hay mayor cantidad de accesiones con una sólo banda. M: marcador de peso molecular, carriles correspondientes a las muestras 1 al 20 (Anexo 1).

FUENTE: Elaboración propia

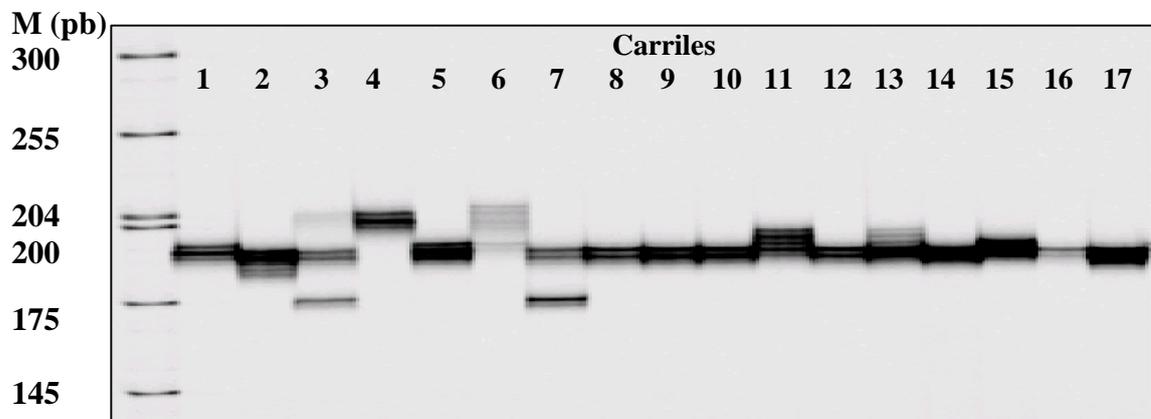


Figura 12: Perfil molecular del locus KGA20

El marcador KGA20 no mostró la presencia bandas espejos o “*stutters*”. Hay mayor cantidad de accesiones con una sólo banda. M: marcador de peso molecular, carriles correspondientes a las muestras 1 al 17 (Anexo 1).

FUENTE: Elaboración propia

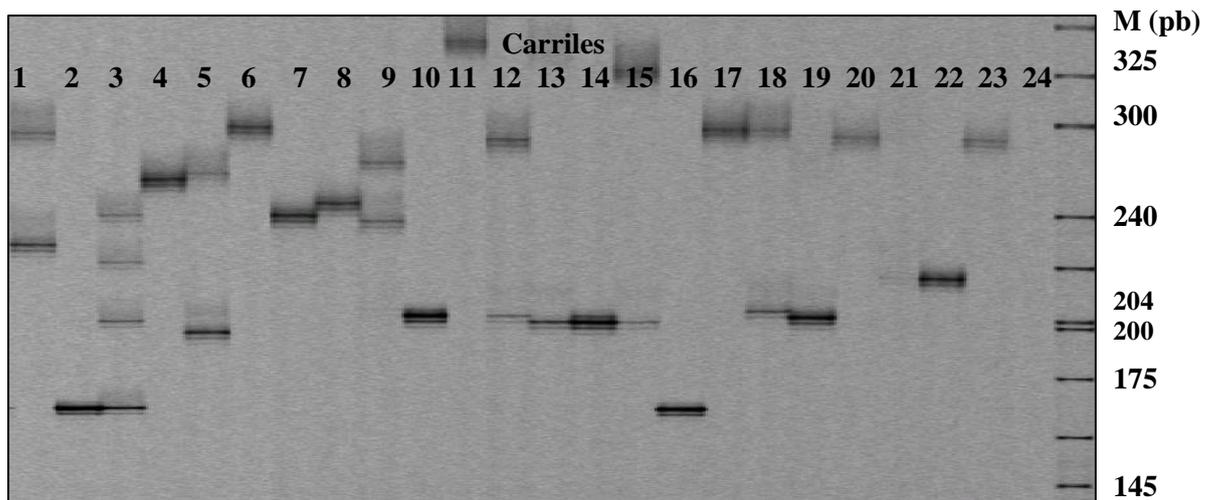


Figura 13: Perfil molecular del locus QGAA001

Este marcador revela la presencia de bandas espejos o “stutters”. Muestra un mayor rango de amplitud en los alelos amplificados. Se observa en el carril 3 una accesión con 4 alelos.

M: marcador de peso molecular, carriles correspondientes a las muestras 1 al 24 (Anexo 1).

FUENTE: Elaboración propia

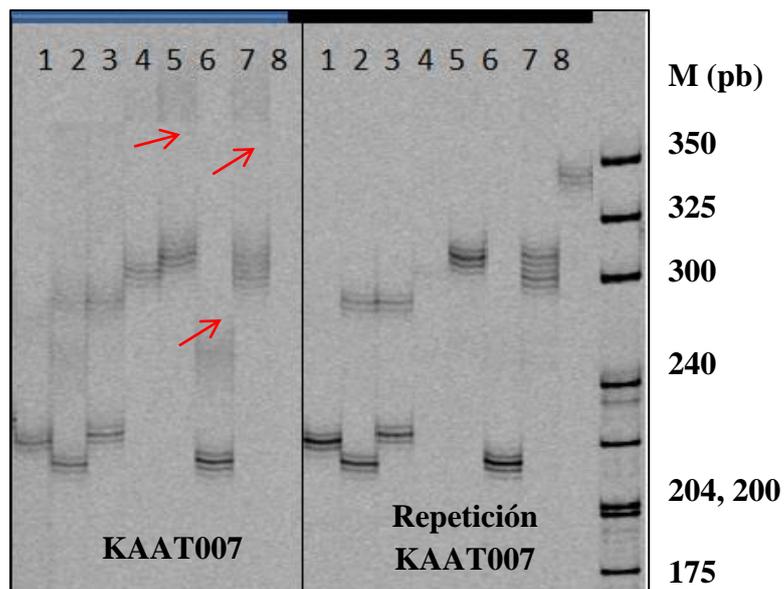


Figura 14: Perfil molecular del locus KAAT007

Patrón de bandas obtenido con el microsatélite KAAT007 en el sistema LI-COR 4300. M: marcador de peso molecular, carriles correspondientes a las muestras 1 al 8 (Anexo 1). En la imagen se aprecian manchas a modo de barrido o *smear* (izquierda, carriles 5, 6, 7) que desaparecen al reducir la mitad de la concentración de ADN. Esta modificación permitió mejorar la nitidez de las bandas.

FUENTE: Elaboración propia

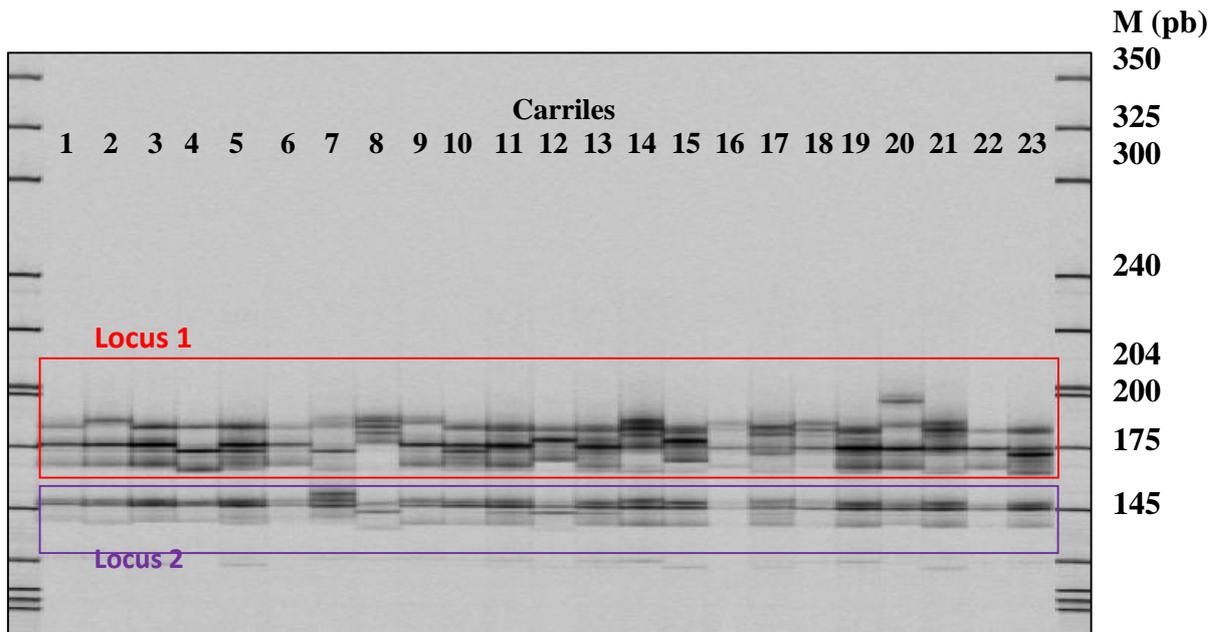


Figura 15: Perfil molecular del locus KCAA106

Patrón de bandas obtenido con el microsatélite KCAA106 en el sistema LI-COR 4300. Los marcadores de peso estándar o ladders “L” se ubican en los extremos. Se pueden apreciar dos loci diferenciados, siendo el locus 2 el más difuso por debajo del locus principal. Loci no incluido en el análisis. M: marcador de peso molecular, carriles correspondientes a las muestras 1 al 23 (Anexo 1).

FUENTE: Elaboración propia

En la presente tesis, los marcadores basados en motivos repetidos de trinucleótidos amplificaron más alelos por locus (promedio=14.1, n=18 loci microsatélites) que los basados en motivos de dinucleótidos (promedio=6.14, n=7 loci microsatélites). Una prueba de *t-student* confirmó la diferencia significativa para el polimorfismo entre los marcadores con motivos trinucleótidos y dinucleótidos (prueba t no pareada con varianzas distintas, $t = 3.55$, $gl = 23$, $p = 0.0016$). Corroborándose lo que fue demostrado por Mason *et al.* (2005); Fuentes *et al.* (2008); Fuentes *et al.* (2012).

En general, para los 25 SSRs estudiados, todos amplificaron bandas monomórficas (Maughan *et al.*, 2004 y Mason *et al.*, 2005) o con la presencia de 2 alelos reconociendo el tipo de herencia disómica señalado por Gandarillas, (1968); Simmonds, (1971); Risi y

Galwey, (1984); Bonifacio, (1990); Ward, (2000), (2001); Maughan *et al.* (2004); Palomino *et al.* (2008). En casos menos frecuentes y excepcionales se observó más de 2 bandas amplificadas. Bajo la situación anterior, las accesiones no fueron tomadas en cuenta para los respectivos análisis en el presente estudio. Sin embargo, se conoce que no siempre es conveniente dar por sentado que las variedades autógamas son homocigóticas en todos los loci, incluso en los loci SSR.

La heterocigosidad residual, la polinización cruzada o la mezcla física pueden dar lugar a heterogeneidad. Por este motivo, generalmente se recomienda analizar un número de semillas individuales, puesto que ello revelará cualquier posible heterocigosidad de este tipo. A pesar de ello, por las razones de costo se justifica el análisis de un muestreo en bloque de un número acordado de individuos (5-10 individuos por accesión) para representar el perfil de ADN de una accesión de quinua. Otra posible razón para observar más de dos o tres bandas de alelos de la misma intensidad es la herencia tetrasómica señalada por Ward, (2000) en quinua. Bajo cualquier explicación, la mejor solución para dilucidar las frecuencias alélicas y genotípicas siempre será realizar un análisis individual a un número determinado de individuos de una accesión o variedad (Costa *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2014).

4.2. Análisis de la diversidad alélica en el departamento de Puno

La riqueza alélica en 75 accesiones de Puno fue de 296 alelos evaluados con 25 marcadores microsatélites (100% de los loci SSR resultaron polimórficos), siendo el promedio de alelos por locus $n=11.8$. Los resultados se detallan en la Tabla 7 y se observa que el locus QCA14 es el que menor número de alelos reporta (2 alelos en un rango de 215-219 pb), mientras que QGAA001 señala 40 alelos encontrados en todo el departamento de Puno con un rango de amplificación 146-350 pb. A diferencia de Morillo y González, (2009) cuyo marcador QCA26 amplificó 18 alelos para quinuas ecuatorianas, en este trabajo se revelaron tan sólo 3 alelos para dicho marcador SSR.

Por otro lado, considerando las accesiones del departamento de Puno como una única población, se observa que la heterocigosidad observada (H_o) es menor a la heterocigosidad

esperada (H_e)¹⁷ en la mayoría de los locus analizados, siendo la H_o en promedio menor a la esperada (prueba Wilcoxon con signo, $V = 6$, $p\text{-value} = 2.69e-05$). Lo que indica una menor variabilidad en la población y una deficiencia de individuos heterocigotos. Sin embargo, para el locus QATG001 la H_o (0.924) fue mayor con respecto a la H_e (0.67) con la amplificación de sólo 4 alelos en un rango de 209-218 pb. Es el único locus SSR que muestra esta diferencia, revelando una mayor variabilidad.

Como se ha señalado, la quinua al ser una especie principalmente autógena y con una tasa de polinización cruzada (alagamia) de hasta 17% (Spehar y Santos, 2005) no cumpliría el supuesto de apareamiento al azar y no se encontraría en equilibrio bajo el modelo Hardy-Weinberg (H-W). Para confirmar el equilibrio H-W se calculó la heterocigosidad esperada y la heterocigosidad observada en cada loci microsatélite mediante el paquete “Adegenet” del programa R. Luego, se aplicó la prueba estadística Chi cuadrado *verificando la desviación del equilibrio* a un nivel de significancia $\alpha=0.05$ en los loci analizados (Anexo 3).

Los resultados de diversidad alélica encontrados en este trabajo son similares a los hallados por Christensen *et al.* (2007) con un promedio de alelos $n=11,7$ evaluando un amplio rango de accesiones de Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina. Sin embargo, Costa *et al.* (2012) y Costa *et al.* (2014) con tan sólo 35 accesiones y 22 SSRs logra encontrar 354 alelos y un promedio de alelos $n=16.1$.

Los resultados de Costa *et al.* (2012, 2014) son el producto de una metodología donde por cada accesión se evalúan 10 individuos de forma independiente. Siguiendo esta técnica se logra encontrar un mayor número de alelos que pueden no identificarse al caracterizar menos de 10 individuos o plantas por accesión. Además, la metodología le permitió una evaluación más exhaustiva de la estructura poblacional en las muestras de quinuas Argentinas.

¹⁷ Se optó por la prueba no paramétrica de Wilcoxon luego de revisar los supuestos de normalidad en ambos grupos mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($H_o: W = 0.94108$, $p\text{-value} = 0.1567$; $H_{Esp}: W = 0.85563$, $p\text{-value} = 0.002256$) y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Bartlett (Bartlett's $K^2 = 0.39999$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.5271$).

En esta tesis, así como en Christensen *et al.* (2007) y Fuentes *et al.* (2009a) se utilizó la estrategia de *bulks*, sin posibilidad de estimar la variabilidad intra-poblacional dado por el grado de alogamia de la especie (Gandarillas, 1979; Lescano, 1994; Spehar y Santos, 2005; Risi y Galwey, 1984). Por lo tanto, una excelente estrategia en trabajos futuros para la caracterización completa de la Colección Nacional de quinuas peruanas será seguir la metodología de Costa *et al.* (2012, 2014) y ampliar el número de individuos analizados por accesión de forma independiente, con ello, la estimación de las frecuencias alélicas será más exacto.

Cuando se compara la riqueza alélica entre las diferentes provincias del departamento de Puno (Tabla 7), se encuentra que la cantidad de alelos por marcador para Lampa (2 accesiones), San Román (1 accesión) y Yunguyo (2 accesiones) es mucho menor en comparación a las provincias de Puno (35 accesiones), Chucuito (18 accesiones) y El Collao (18 accesiones). Ello debido a la poca cantidad de muestras analizadas. Una mejor comprensión de la variabilidad dentro del departamento supondría incrementar el número de accesiones analizadas para estas provincias.

Las comparaciones con trabajos previos, señalados en la Tabla 8 permiten concluir que en el presente estudio se ha obtenido un número relativamente elevado de alelos por locus. Por tanto, se puede hablar de una gran riqueza genética presente en las accesiones evaluadas dentro de esta colección.

Tabla 7: Loci microsatélite, motivo, rango y distribución de la diversidad alélica evaluada en quinuas del departamento de Puno

(n=número de accesiones por provincia)

SSR	Motivo repetido	Rango de alelos (pb)	Número de alelos observados							Ho	He
			PUNO n=35	CHUCUITO n=18	LAMPA n=2	SAN ROMAN n=1	EL COLLAO n=18	YUNGUYO n=2	TOTAL		
QGAA001	(GAA) ₆₅	146-350	28	16	3	2	17	2	40	0.48	0.96
KAAT007	(AAT) ₃₀	202-367	23	10	2	1	13	2	27	0.17	0.91
QAAT071	(ATT) ₃₀	160-211	11	11	3	2	9	2	17	0.42	0.87
QAAT022	(TTA) ₂₉	179-239	11	11	3	2	13	4	16	0.60	0.88
QAAT088	(ATT) ₃₀	126-183	14	10	2	2	10	3	16	0.40	0.89
QAAT076	(ATT) ₃₀	169-211	11	10	4	2	11	4	14	0.58	0.87
QAAT011	(ATT) ₉ ATCATTGTT(ATT) ₁₆	189-228	10	11	1	3	8	1	14	0.55	0.85
QAAT001	(AAT) ₅ AAC(AAT) ₅ ACT(AAT) ₄ ACT(AAT) ₁₃	183-237	10	4	3	1	7	3	13	0.38	0.69
QAAT012	(AAT) ₁₀	194-239	10	7	2	2	8	3	13	0.37	0.80
QAAT026	(TAT) ₁₇	193-229	11	7	2	2	11	4	13	0.58	0.85
QAAT062	(TAA) ₂₇	162-202	12	9	2	2	8	3	13	0.54	0.84
QAAT087	(ATT) ₁₂	187-232	9	8	2	2	9	2	11	0.37	0.84
QAAT097	(AAT) ₁₈	179-230	8	6	2	2	10	3	11	0.61	0.84
KCAA011	(ATT) ₁₀ (GTT) ₇ GTA(GTT) ₁₅	213-261	9	5	3	1	8	1	10	0.46	0.81
KGA20	(CT) ₂₂	177-203	8	4	2	1	7	2	10	0.49	0.71
QAAT050	(AAT) ₁₇	207-246	7	5	1	2	7	3	9	0.36	0.79
QAAT78	(AAT) ₂₂	200-221	7	5	1	2	4	2	8	0.28	0.77
QGA028	(AG) ₇ AC(AG) ₂₀	190-216	7	6	2	1	5	2	8	0.47	0.75
KGA16	(GA) ₂₂	184-206	7	6	3	2	5	1	8	0.36	0.70
QCA120	(TG) ₄ CG(TG) ₈ (AG) ₆	206-216	6	6	2	1	6	2	6	0.47	0.62
QGA17	(TG) ₈ AAG(GA) ₁₆	166-180	6	5	1	2	4	3	6	0.55	0.59
QAAT051	(AAT) ₁₄	184-193	4	3	1	1	3	2	4	0.20	0.47
QATG001	(CAT) ₈	209-218	4	4	2	2	4	3	4	0.92	0.67
QCA26	(TG) ₁₂	206-210	2	3	2	1	3	1	3	0.02	0.45
QCA14	(GT) ₂₁ (GA) ₁₂	215-219	2	2	2	1	2	1	2	0.00	0.21
TOTAL			237	174	53	42	192	59	296		

FUENTE: Elaboración propia

Tabla 8: Comparación de la riqueza alélica en diferentes estudios usando marcadores microsatélites

Fuente	Localización de accesiones	N° ACC	N° SSRs	AE	Prom. AE	Rango de He
Christensen <i>et al.</i> (2007)	Ecuador, Perú, Bolivia, Chile y Argentina.	151	36	420	11.7	0.45–0.94
Jarvis <i>et al.</i> (2008)	Ecuador, Colombia Perú, Bolivia, Chile y Argentina	23	216	888	4.1	0.12–0.90
Fuentes <i>et al.</i> (2009a)	Chile	59	20	150	7.5	0.07–0.90
Morillo y González, (2009)	Ecuador	77	8	84	10.5	-----
Fuentes <i>et al.</i> (2012)	Ecuador, Colombia, Perú, Bolivia, Chile y Argentina	34	20	118	5.9	0.12–0.87
Costa <i>et al.</i> (2012)	Argentina	35	22	354	16.1	0.58–0.93
Veramendi <i>et al.</i> , (2013)	Bolivia, Perú y otros países	2,515	8	129	16.1	0.77-0.95
Alva, (2014)	Perú (Accesiones de Valles Interandino)	75	22	270	12.0	0.49-0.93
Presente estudio	Perú (Accesiones de Altiplano)	75	25	296	11.8	0.21-0.96

Heterocigosidad (He), Número de accesiones evaluadas (N° ACC), Alelos encontrados (AE), Promedio de alelos (Prom. AE).

FUENTE: Elaboración propia

4.3. Diferenciación genética entre las accesiones del departamento de Puno

4.3.1. Análisis de Componentes Principales

El análisis exploratorio de componentes principales (PCA) en las accesiones de Puno refleja una distribución compleja. Se observa que entre las provincias las accesiones no evidencian una clara separación o diferenciación entre ellas. Este análisis primario explora las diferencias entre las accesiones y es un primer paso para continuar con los estudios de estructura o diferenciación genética correlacionándolos con la variable de las distancias geográficas.

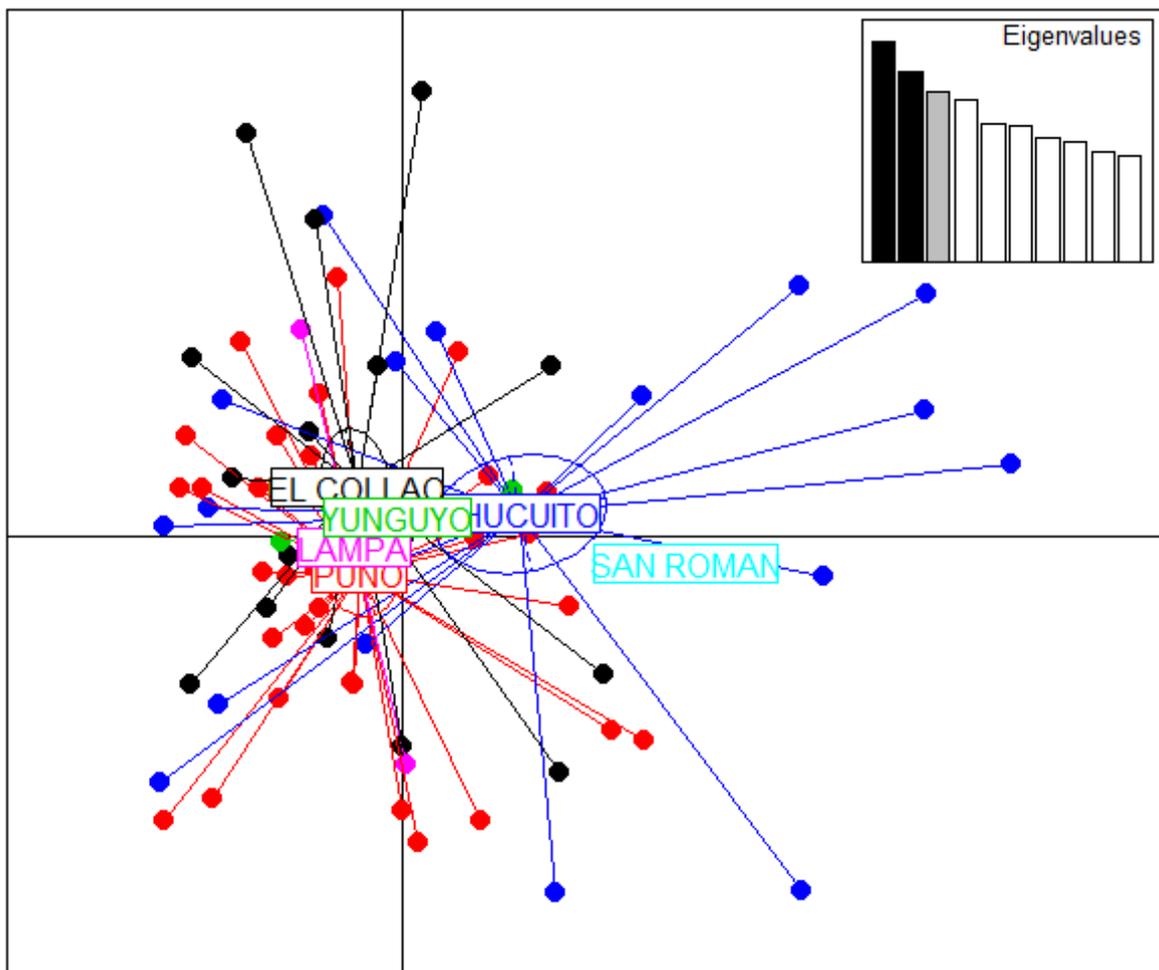


Figura 16: PCA entre las accesiones de diferentes provincias del departamento de Puno

FUENTE: Elaboración propia

Históricamente, el departamento de Puno es el mayor productor de quinua a nivel nacional y son las provincias de Puno (Acora, Capachica, Mañazo y Vilque), El Collao (Ilave); Chucuito (Juli, Pomata y Desaguadero), Yunguyo (norte de Puno), Azángaro (Arapa, Chupa, San José), Huancané (Taraco, Pusi), Lampa (Cabanilla, Pucara), Melgar (Ayaviri, Llalli, Nuñoa, Umachiri) y San Román (Cabana, Caracoto) las que han destacado en los niveles de producción del grano (MINCETUR, 2016). Geográficamente estas provincias se encuentran sobre un territorio de relieve plano con el aspecto de una inmensa planicie cubierta de pastos o pajonales, en cuyo horizonte emergen algunos nevados, con un clima frío y semi seco. Estas variables geográficas y climáticas logran que se mantenga como constante en estas accesiones el mostrar alto rendimiento de grano, temprana floración, largas inflorescencias y una menor altura de plantas. Mientras que, como características diferenciales el contenido de proteína, contenido de saponina y respuesta al mildiu, estas últimas principalmente asociadas al manejo agronómico realizado por los agricultores. Por ello, no ha de resultar extraño encontrar en este análisis exploratorio de PCA una distribución de accesiones sin una clara diferenciación genética que se vea apoyada por la ubicación geográfica de las colectas de accesiones.

En este trabajo se evidencia una gran riqueza genética entre las accesiones analizadas en el departamento de Puno. Se propone que esto es producto del gran intercambio de semillas por parte de los agricultores dentro de las provincias y por la cercanía geográfica entre los diferentes lugares de colecta. Por ello, al existir un mayor flujo comercial y estrategias de acopio de semillas técnicamente no bien desarrolladas y sin claro manejo de conservación de las accesiones que muestran características distintivas se habría promovido un flujo génico que mantuvo en constante cambio la diversidad ya existente. Entonces, es posible que un factor determinante como la cercanía entre las localidades, sumado al grado de alogamia de la especie promoviera la gran diversidad genética, pero sin una diferenciación significativa debido a un aislamiento geográfico o por distancias entre las localidades. Ortiz *et al.* (1999) señala que la gran diferenciación genética dentro de las colecciones de quinuas peruanas se revela entre los departamentos donde se cultiva la quinua.

4.3.2. Distancias genéticas entre las diferentes provincias del departamento de Puno

Las accesiones de las provincias de Puno, Chucuito, El Collao, Lampa y San Román muestran mayor distancia genética de Nei (Nei, 1972) con respecto a las accesiones de la provincia de Yunguyo (distancias genéticas superiores a 0.75), Tabla 9. La provincia de Yunguyo se ubica geográficamente en la península del lago Titicaca, mostrando también mayor lejanía o distancia geográfica de las demás provincias (Figura 17). Estos resultados podrían indicar que hay cierto grado de diferenciación debido a un aislamiento por distancia. Sin embargo, con respecto a lo anteriormente asumido se debe considerar que hay un sesgo debido al número limitado de accesiones para las provincias de Lampa (2 accesiones), San Román (1 accesión) y Yunguyo (2 accesiones) que tienden a incrementar los valores de las distancias genéticas.

Tabla 9: Cálculo de las distancias genéticas de Nei entre las provincias del departamento de Puno

Puno	Chucuito	El Collao	Lampa	San Román	Yunguyo	Provincias
0.000						Puno
0.112*	0.000					Chucuito
0.199*	0.204*	0.000				El Collao
0.490	0.550	0.395	0.000			Lampa
0.545	0.567	0.568	0.712	0.000		San Román
0.751	0.780	0.815	0.752	0.999	0.000	Yunguyo

* Las distancias genéticas de Nei por pares entre las provincias de Puno, Chucuito y Yunguyo son relativamente menores y dan indicios de poco diferenciación entre estos grupos de accesiones consideradas poblaciones en este análisis, corroborándose lo observado en el PCA.

FUENTE: Elaboración propia

4.3.3. Estadístico F_{ST} en el análisis de la diferenciación genética entre accesiones del departamento de Puno

La diferenciación genética basada en el estadístico F_{ST} señala que las accesiones de los pares (*) Puno-Chucuito, Puno-El Collao y Chucuito-El Collao muestran poca diferenciación genética (valores entre 0.0 - 0.05) (Tabla 10). Este resultado complementa lo demostrado en el PCA y las distancias genéticas anteriormente descritas.

Se puede señalar de forma general que el germoplasma del departamento de Puno no muestra una clara diferenciación genética basándonos en una diferenciación geográfica por provincias. Resulta importante señalar que la interrelación de las variables geográficas y climáticas de este territorio, sumado al grado de intercambio de las semillas de quinua por parte de los agricultores van configurando una única población a las accesiones del departamento de Puno con cierto grado de variación intraespecífica demostrado con la alta riqueza alélica.

Tabla 10: Cálculo del estadístico F_{ST} por pares entre las provincias del departamento de Puno

Puno	Chucuito	El Collao	Lampa	San Román	Yunguyo	Provincias
0.000						Puno
0.020*	0.000					Chucuito
0.037*	0.035*	0.000				El Collao
0.157	0.164	0.143	0.000			Lampa
0.223	0.224	0.224	0.395	0.000		San Román
0.204	0.204	0.215	0.321	0.453	0.000	Yunguyo

FUENTE: Elaboración propia

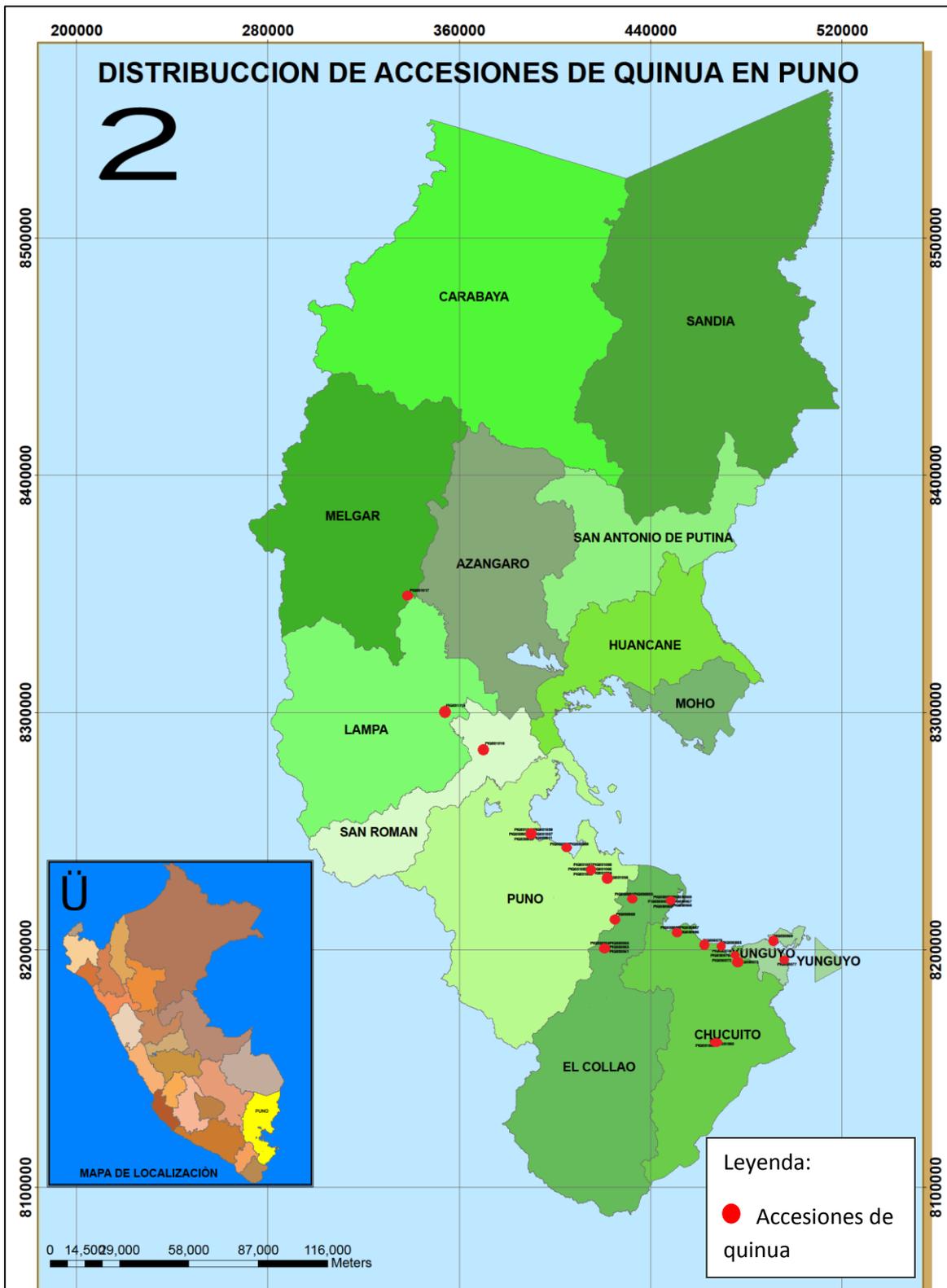


Figura 17: Distribución de las accesiones evaluadas en el departamento de Puno

FUENTE: Elaboración propia

4.4. Diversidad alélica entre las accesiones del altiplano (Puno) y de Valles interandinos (Cuzco, Ayacucho, Ancash, Huancavelica)

Uno de los objetivos de esta tesis comprende comparar la diversidad genética de las accesiones del altiplano (departamento de Puno), versus los resultados de caracterización en las accesiones de valles interandinos que comprenden los departamentos de Cuzco, Ayacucho, Ancash y Huancavelica. Para tal fin, Alva (2014) proporcionó la base de datos de la caracterización de 75 accesiones de quinuas de valles interandinos. Este conocimiento indicará la real riqueza de alelos y la diversidad genética en estos grupos de estudio (ecotipos). Los resultados se detallan en la Tabla 11, señalan que no hay diferencia significativa entre el número de los alelos encontrados entre las muestras de valles interandinos y del altiplano. Sin embargo, sí hay claras variaciones en el rango alélico y diferencias en la cantidad de alelos privados entre ambos ecotipos.

Los ecotipos valles interandinos y del altiplano han sido bien estudiados a través de la caracterización morfológica y reflejan una diferenciación genética. En los trabajos de Risi y Galwey, (1989a), (1989b) y de Eguiluz, (2012) se evidenció que difieren principalmente en los caracteres ciclo de vida, altura de planta, rendimiento, contenido de proteína, contenido de saponina y respuesta al mildiu, existiendo mayor variación en el ecotipo de valles interandinos para el ciclo de vida, altura de planta y respuesta al mildiu. Logran demostrar la existencia de los dos grupos de quinua peruanos: los ecotipos de valles interandinos y altiplano. Estos estudios resultan importantes porque ayudan a entender que caracteres morfológicos y agronómicos predominan ante determinada condición ambiental y geográfica. Con este previo conocimiento se puede buscar asociarlos a marcadores moleculares para entender la base genética de estas características contrastantes y ayuden en los programas de mejoramiento genético.

Del análisis de la diversidad alélica señalado en la Tabla 11 se observa que los alelos privados para valles interandinos representan el 17.06% del total de alelos encontrados (551 alelos con 22 marcadores SSRs), mientras que la cantidad de alelos privados para altiplano (Puno) es de 14.05%. Este resultado refleja que el ecotipo de valles interandinos va

almacenando un acervo genético propio y distintivo del ecotipo altiplano el cual se ha denominado el centro de origen y de diversidad de la especie por largo tiempo.

En la Figura 18 se presentan los resultados comparativos del número de alelos, número de alelos privados y heterocigosidad, siendo el departamento de Cuzco y Puno quienes presentan en promedio mayor número de alelos $n=11.56$ y $n=11.2$ alelos respectivamente. El departamento de Puno presenta un mayor número de alelos privados promedio $n=3.08$. La heterocigosidad para Cuzco es de $He=0.764$ ligeramente superior a Puno $He=0.716$.

Tabla 11: Resultados comparados de la diversidad genética entre accesiones de valles interandinos (V) y accesiones del altiplano (A) con 22 marcadores microsatélites

Locus	Heterocigosidad (He)		Alelos encontrados		Alelos privados		Rango Alélico (pb)		F _{ST}	
	V	A	V	A	V	A	V	A	V	A
KAAT007	0.93	0.91	26	27	12	12	178-316	202-367	0.025	0.027
KCAA011	0.79	0.81	12	10	5	3	207-255	213-261	0.062	0.056
KGA16	0.65	0.7	4	8	0	4	184-196	184-206	0.013	0.014
KGA20	0.74	0.71	9	9	4	3	173-201	177-203	0.130	0.130
QAAT001	0.86	0.69	14	13	5	4	183-234	183-237	0.071	0.068
QAAT012	0.83	0.8	12	13	3	4	200-239	194-239	0.063	0.060
QAAT022	0.93	0.88	20	16	5	0	179-248	179-239	0.018	0.020
QAAT026	0.82	0.85	13	13	1	1	196-232	193-229	0.022	0.024
QAAT051	0.59	0.47	4	4	2	2	178-187	184-193	0.274	0.290
QAAT071	0.89	0.87	15	17	3	5	157-229	160-211	0.037	0.037
QAAT78	0.88	0.77	14	8	7	0	200-239	200-221	0.063	0.06
QAAT087	0.85	0.84	13	11	4	2	187-235	187-232	0.029	0.026
QAAT088	0.84	0.89	15	16	3	4	132-189	126-183	0.022	0.026
QAATG001	0.49	0.67	4	4	0	0	209-218	209-218	0.031	0.025
QCA14	0.76	0.21	6	2	4	0	209-221	215-219	0.167	0.182
QCA26	0.64	0.45	4	3	2	1	202-208	206-210	0.194	0.209
QCA120	0.69	0.62	6	6	1	1	204-214	206-216	0.033	0.025
QGA17	0.72	0.59	6	6	2	2	170-182	166-180	0.154	0.147
QGA028	0.88	0.75	14	8	8	2	192-234	190-216	0.071	0.068
QGAA001	0.93	0.96	31	40	6	15	146-311	146-350	0.016	0.014
QAAT076	0.82	0.87	14	14	5	5	151-199	169-211	0.06	0.057
QAAT097	0.87	0.84	14	11	6	3	188-236	179-230	0.044	0.043
Total			270	281	94	78				
Promedio	0.79	0.74	12	11.7	3.9	3.25				

FUENTE: Elaboración propia

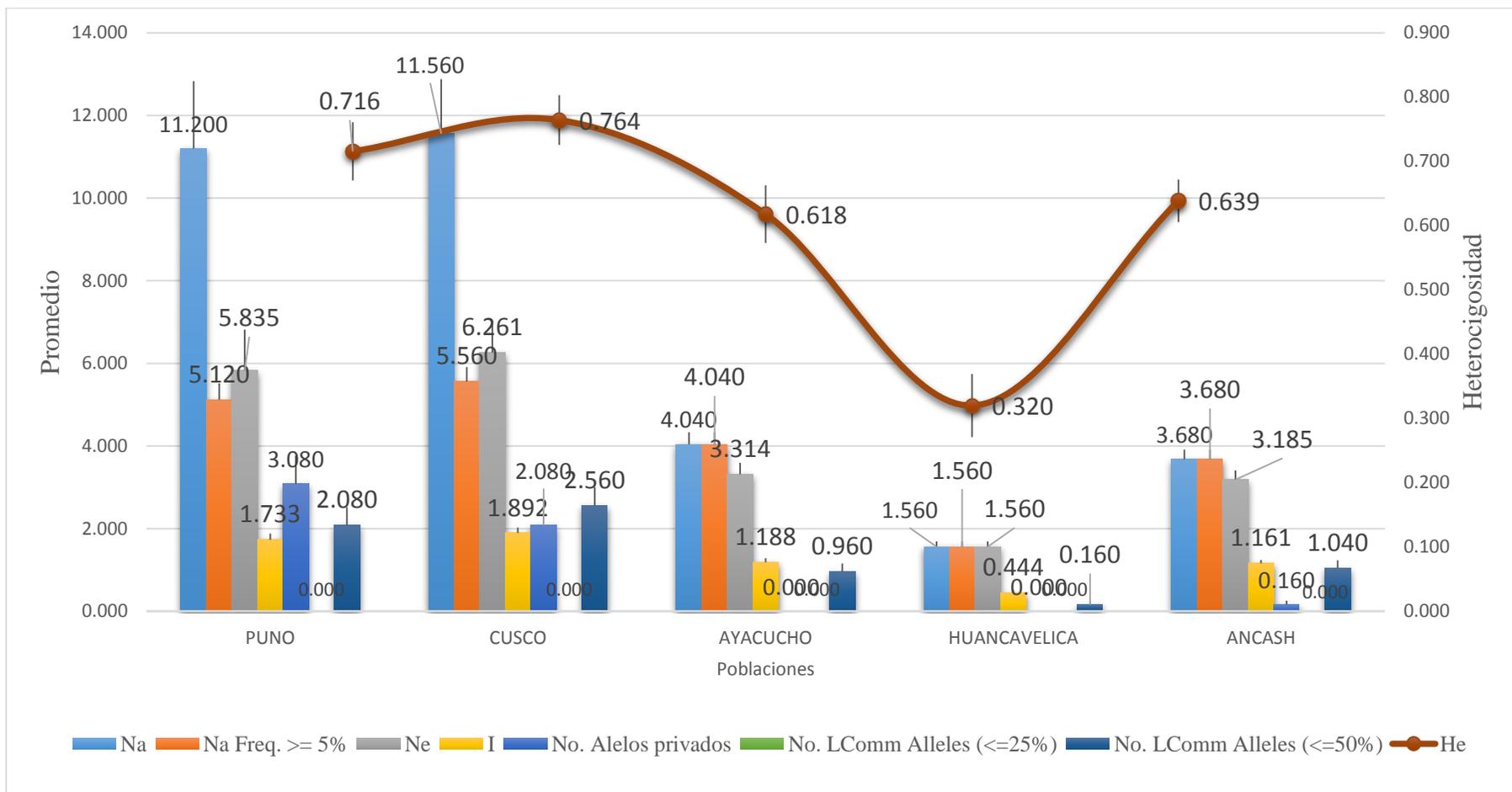


Figura 18: Patrones alélicos entre las accesiones de los departamentos de Puno, Cusco, Ayacucho, Ancash y Huancavelica

FUENTE: Elaboración propia

4.5. Agrupamiento mediante métodos multivariados entre las accesiones del altiplano (Puno) y accesiones de valles interandinos

4.5.1. Análisis de Componentes Principales (PCA) para accesiones de altiplano (Puno) y Valles Interandinos (Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho)

Una vez realizado el análisis PCA para las accesiones de Puno, también se amplió el estudio con las accesiones de valles interandinos. Se encontró que los ecotipos se separaban en dos grandes grupos correspondientes a sus ubicaciones geográficas. En la Figura 19 se observa cómo las accesiones de Puno claramente se agrupan diferenciándose de las accesiones de los departamentos de Ayacucho, Cusco, Ancash y Huancavelica.

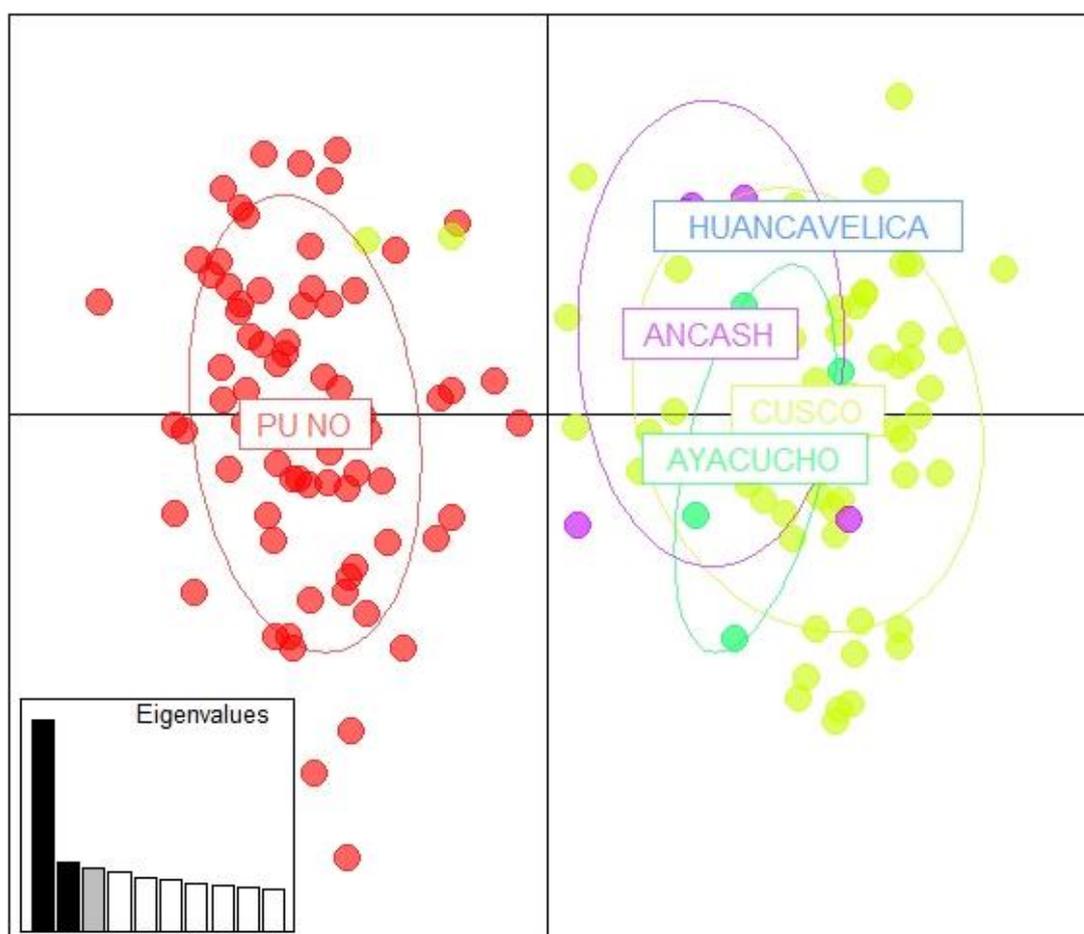


Figura 19: Análisis de PCA entre las accesiones de diferentes provincias de los ecotipos Altiplano (Puno) y Valles interandino (Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho)

FUENTE: Elaboración propia

4.6. Diferenciación genética entre las accesiones del ecotipo altiplano y de valles interandinos

4.6.1. Distancia genética y estadístico F_{ST} entre las accesiones del Altiplano y de valles interandinos

Según lo señalado por Ortiz *et al.* (1999) la gran diferenciación genética dentro de las colecciones de quinuas peruanas está entre los departamentos donde se cultiva. Los resultados por pares de las distancias genéticas de Nei entre los departamentos que comprenden los valles interandinos y el altiplano (Tabla 12) revelan la variación inter-poblacional corroborando lo anteriormente descrito por el autor.

Tabla 12: Matriz de Distancia Genética de Nei por pares entre los departamentos de valles interandinos y de altiplano

Puno n=75	Cusco n=60	Ayacucho n=4	Huancavelica n=1	Ancash n=5	Departamentos (número accesiones)
0.000					Puno
0.540	0.000				Cusco
0.675	0.312	0.000			Ayacucho
0.961	0.479	0.774	0.000		Huancavelica
0.620	0.373	0.667	0.823	0.000	Ancash

FUENTE: Elaboración propia

Asimismo, los resultados muestran una mayor distancia genética para los pares de departamentos Puno-Huancavelica (0.961) y Huancavelica-Ancash (0.823). Este último resultado se correlaciona muy bien a la distancia geográfica del lugar de colecta de las accesiones; tanto Ancash (hacia el norte del país) como Puno (ubicado al sur-este) difieren significativamente en distancia geográfica de Huancavelica (zona centro de Perú).

Para un mayor entendimiento de la diferenciación genética debido a una correlación geográfica se calculó el F_{ST} entre las accesiones del altiplano (Puno) y de valles interandinos (Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho). Se encontró un valor F_{ST} igual a 0.066 indicando una moderada diferenciación genética (Tabla 13).

Tabla 13: Estadístico F_{ST} entre los ecotipos altiplano y valles interandinos

Ecotipos	Altiplano (Puno)
Valles interandinos (Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho)	0.066**

** significa una moderada diferenciación genética.

FUENTE: Elaboración propia

4.6.2. Análisis de diferenciación estructural entre los ecotipos Altiplano y valles interandinos

A. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DPCA)

El Análisis de componentes principales (PCA) es un alcance para conocer el grado de diferenciación real entre las accesiones de los diferentes departamentos evaluados. Sin embargo, se amplió el análisis usando el algoritmo del DPCA. Este análisis nos señala el porcentaje de pertenencia de una accesión a su correspondiente ecotipo o cluster en contraste a su ubicación geográfica conocida. (Figura 20).

B. Análisis de Clusters con el programa STRUCTURE

El análisis se basó en el método de agrupamiento por modelamiento Bayesiano usando el Software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000). El programa utilizó algoritmos de agrupamiento Bayesianos con los métodos en cadena de Montecarlo MCMC (Markov Chain Monte Carlo) para la asignación de genotipos a un número predeterminado de poblaciones

o cluster (K). Los datos fueron introducidos a partir de la matriz de alelos generados a partir de los marcadores microsatélites.

Se consideró entre los parámetros un modelo de hibridación, ya que se asumió un flujo génico ancestral entre las diversas subpoblaciones o ecotipos. Esta opción genera valores más reales cuando una población no está claramente definida o predeterminada por el usuario (Pritchard *et al.*, 2000). Para asignar el periodo de burn-in (número de repeticiones sin toma de datos) se consideró el 10% de las MCMC (MCMC = 500 000 y burn-in = 50 000), con 10 iteraciones por cada k (Vargas *et al.*, 2010). En la figura 21 se muestran los resultados de dos agrupamientos definidos como accesiones de valles interandinos y altiplano, a partir de 150 accesiones de quinua con 22 marcadores microsatélites.

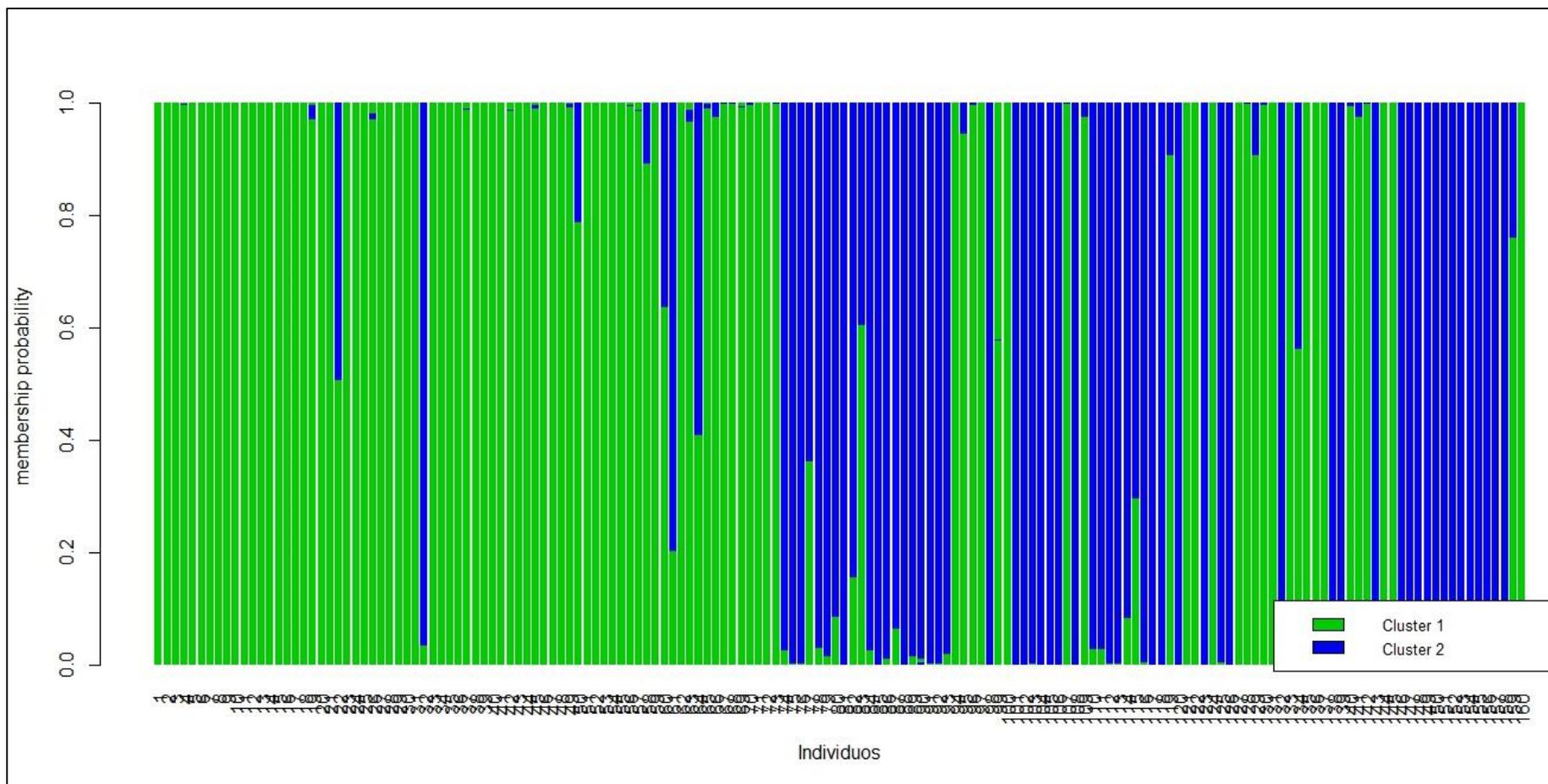


Figura 20: DPCA entre las accesiones de diferentes provincias de los ecotipos Altiplano (Puno) y Valles interandino (Huancavelica, Ancash, Cusco, Ayacucho)

Los resultados de esta imagen detallan el porcentaje de pertenencia de una accesión al cluster correspondiente del lugar de colecta y cultivo.

FUENTE: Elaboración propia

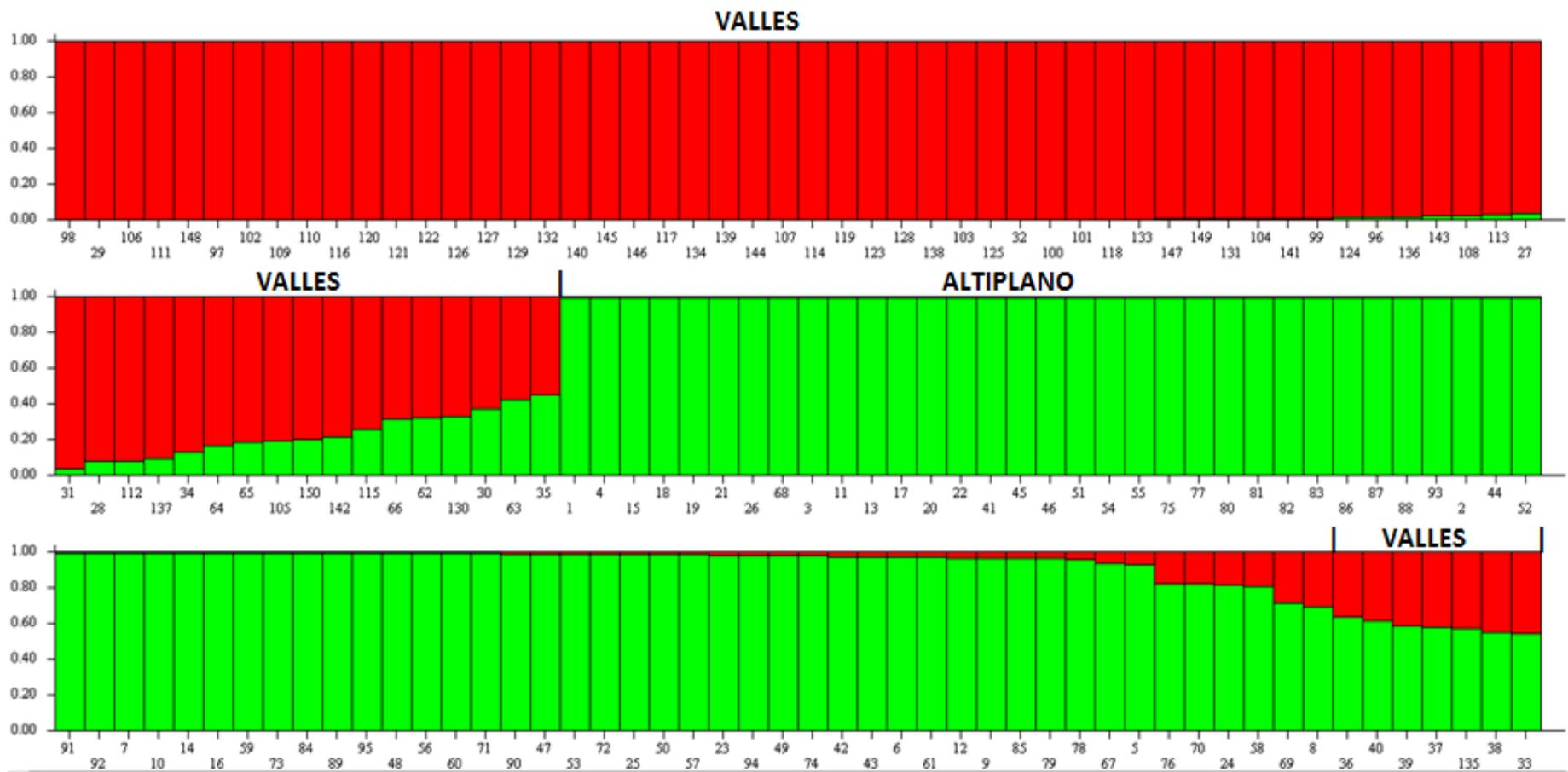


Figura 21: Análisis de la diferenciación poblacional con modelamiento Bayesiano

FUENTE: Elaboración propia

V. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó las condiciones de PCR y electroforesis de los loci SSRs empleados en el presente estudio y esto permitirá la caracterización completa de la Colección Nacional de quinua peruana.
2. La caracterización con 25 marcadores microsatélites empleados en las 75 accesiones del departamento de Puno (altiplano) resultaron en bandas que permiten discriminar la identidad de cada una de ellas, resultando polimórficas e informativas para la posterior evaluación de la Colección Nacional de quinua peruana. La estimación de la diversidad genética de 75 accesiones de quinua del departamento de Puno revela una gran riqueza de alelos, promedio de alelos por loci SSR= 11.8, éste valor es superior a importantes estudios de caracterización en colecciones de quinua en Latinoamérica.
3. Se comprobó que la comparación de la diversidad genética de quinuas procedentes de distintas provincias dentro del departamento de Puno (ecotipo altiplano) no fue significativa entre los pares.
4. Los análisis de agrupamiento para las accesiones del departamento de Puno no señalan diferenciación o variación inter poblacional significativa entre las localidades de colectas de quinua dentro del departamento de Puno (altiplano). Esta conclusión está apoyada por los valores bajos de distancias genéticas entre provincias del departamento y los valores del estadístico F_{ST} .
5. El estudio de la distribución de la variabilidad genética en 75 accesiones de quinua dentro del departamento de Puno (altiplano) no señala diferenciación genética basada en diferenciación geográfica por provincias. Se sugiere considerar a las accesiones del altiplano como una única población debido al alto grado de intercambio de semillas por parte de los agricultores y condiciones climáticas y geográficas similares.

6. Se evidencia una clara diferenciación genética entre los ecotipos de altiplano y valles interandinos con 22 marcadores microsatélites, confirmándose lo descrito en estudios de caracterización morfológica previos. Existe una moderada diferenciación genética ($F_{ST}=0.066$) entre las accesiones del ecotipo altiplano (departamento de Puno) y de valles interandinos (Cusco, Ayacucho, Ancash y Huancavelica).

VI. RECOMENDACIONES

- Para un mayor alcance de estudios en genética de poblaciones de las colecciones de quinua se sugiere el uso de una estrategia donde por cada accesión se evalúen de 10 a más individuos de forma independiente, pues se lograría encontrar un mayor número de alelos y evaluar exhaustivamente la estructura poblacional en las muestras de quinua. La estrategia de muestreo del ADN (*bulk DNA sampling*) presenta limitaciones para estudios de estructura poblacional en el cultivo de la quinua.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aellen, P., Just, T. 1929. Key and synopsis of the American species of the genus *Chenopodium* L. American Midland Natualist. no 30:47-67.
2. Alva, J. 2014. Caracterización Molecular de 75 accesiones de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) de Valles Interandinos del Banco de Germoplasma Nacional de Perú, mediante Marcadores Microsatélites. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Tesis de Licenciatura.
3. Aranguren, J., Román, R., Isea, W., Villasmil, Y, Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Arch. Latinoam. Prod. Anim. no 13(1): 1-6
4. Banerjee, S; Das, M; Rouf Mir, R; Pushpendra K, G. 2012. Assessment of Genetic Diversity and Population Structure in a Selected Germplasm Collection of 292 Jute Genotypes by Microsatellite (SSR) Markers. Molecular Plant Breeding. no 3(2): 11–25
5. Bazile D. 2014. Quinoa, a model crop to examine the dynamics of biodiversity within agricultural systems. Letter to the editor Contesting Blossoming Treasures of Biodiversity article 42: ‘quinoa – is the United Nation’s featured crop of 2013 bad for biodiversity?’ by Small, 2013– Biodiversity. no 15(1):3-4. En línea: <http://dx.doi.org/10.1080/14888386.2014.884469>.
6. Bazile, D. 2013. The high genetic diversity of *Chenopodium quinoa* Willd and its global expansion. International Quinoa Research Symposium August, 2013.
7. Bhargava, A., Shukla, S. y Ohri, D. 2007. Genome size variation in some cultivated and wild species of *Chenopodium* (Chenopodiaceae). Caryologia. no 60: 245-250.
8. Bonifacio, A. 1990. Caracteres hereditarios y ligamiento factorial en la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis Lic. Ing. Ag, Cochabamba, BO. Universidad Mayor de San Simón. 189 p

9. Bonifacio, A. 1995. Interspecific and Intergeneric Hybridization in Chenopod Species. Thesis M.Sc., Provo. US. Utah Brigham Young University. 150 p.
10. Camarena, M., Sevilla, P., Huaranga, J. 2012. .Simposio de Mejoramiento de los Cultivos Subutilizados. pp. 15-17.
11. Carrera, A., Tranquilli, G., Helguera, M. 2004. Aplicaciones de los marcadores. En: Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. (Eds.) Ediciones INTA. Argenbio. pp 149-160.
12. Castillo, C., Winkel, T., Mahy, G., Bizoux J. 2007. Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution. no 54 (4): 897-905.
13. Catacora, (2013). Comunicación persona con curador de Colección Nacional de quinua del INIA.
14. Chawla, H.S. 2000. Introduction to plant biotechnology. Science Publishers. pp 368.
15. Christensen, S., Pratt, D., Pratt, C., Nelson, P., Stevens, M., Jellen, E., Coleman, C., Fairbanks, D., Bonifacio, A., Maughan, P. 2007. Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. Plant Genetic Resources. no 5(2): 82-95.
16. Costa, S. 2014. Variabilidad genética de *Chenopodium quinoa* Willd. en el Noroeste Argentino y su relación con la dispersión de la especie. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
17. Costa, S., Manifiesto, M., Brammardi, S., Bertero, H. 2012. Genetic structure in cultivated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) a reflection of landscape structure in northwest Argentina. Conservation Genetics. no 13: 1027-1038.
18. Dillehay, T., Rossen, J., Andres, T., Williams, D. 2007. Pre-ceramic Adoption of Peanut, Squash, and Cotton in Northern Peru. Science. no 316:1890-1893.
19. Eguiluz, A., Maughan, P., Jellen, E., Gómez, L. 2012. Determinación de la diversidad fenotípica de accesiones de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) provenientes de valles interandinos y del altiplano peruano.
20. Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature reviews. no 5:435-445.
21. FAO WIEWS. 2013. Sistema Mundial de Información y Alerta sobre los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación. En línea: <http://apps3.fao.org/wiews>

22. FAO, Food and Agriculture Organization. 2014. Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Edición revisada. Roma.
23. FAO, Food and Agriculture Organization. 2011. La quinua: cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. Informe técnico Julio 2011.
24. Felsenstein, J. 1991. PHYLIP (Phylogeny inference package). University of Washington. Seattle. USA.
25. Franco, T. e Hidalgo, R. (eds.). 2003. Análisis Estadístico de datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
26. Fuentes, F., D. Bazile, A. Bhargava, and E. Martínez. 2012. Implications of Farmers' Seed Exchanges for on-Farm Conservation of Quinoa, as Revealed by Its Genetic Diversity in Chile. *The Journal of Agricultural Science*. 150(6):1–15.
27. Fuentes, F., Martínez, E., Hinrichsen, P., Jellen, E, Maughan, P. 2009a. Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. *Conservation Genetics* 10(2): 369–377.
28. Fuentes, F., Maughan, P., Jellen, E. 2009b. Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Revista Geográfica de Valparaíso*. no 42: 20–23.
29. Gandarillas, H. 1968. Razas de quinua. Bolivia, Ministerio de Agricultura. División de Investigaciones Agrícolas. Boletín Experimental N° 4. 53 p.
30. Gandarillas, H. 1979. Genética y origen. In: Tapia M. *et al.* (eds). Quinoa y kañihua, cultivos andinos. IICA, Bogotá, CO. p 45–64.
31. Gómez, L y Eguiluz, A. 2011. Catálogo del Banco de Germoplasma de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). Programa de Cereales y Granos Nativos de la Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina.
32. Gómez, L. 2012. Manual del cultivo de la quinua. Lima. PE. Programa de Investigación y Proyección Social de cereales y granos andinos. 47 p.
33. Gupta, PK., Varshney, RK. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*. no 113:163–185.
34. Hajeer, A.; Worthington, J. and John, S. 2000. SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis. En: *Biotechniques: Molecular laboratory methods series*.

- Eaton Publishing, Manchester, U.K. Jaccard, P. 1901 Bulletin del la Societe Vaudoise des Sciences Naturelles. no 37: 241-272.
35. ITIS (Integrate Taxonomic Information System). 2011 (en línea). US. Consultado el 12 abril de 2014. Disponible en: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt>
 36. Jarvis, D., Kopp, O., Jellen, E., Mallory, M., Pattee, J., Bonifacio A., Coleman, C., Stevens, M., Fairbanks, D., Maughan, P. 2008. Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Journal of genetics. 87(1): 39–51.
 37. Jellen, E., Kolano, B., Sederberg, M., Bonifacio, A., Maughan, P. 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Legume Crops and Forages. Chapter3: Chenopodium. Ed. Kole, C. Berlin Heidelberg. DE. Springer-Verlag. p 35-61.
 38. Jombart, T. 2014. A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 1.4-1. Imperial College London. Centre for Outbreak Analysis and Modelling
 39. Jombart, T., Devillard, S. y Balloux, F. 2010 Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. BMC Genetics no 11: 94
 40. Kadereit, G., Borsch, T., Weising, K., Freitag H. 2003. Phylogeny of Amaranthaceae and Chenopodiaceae and the Evolution of C4 Photosynthesis. International Journal Plant. no 164: 959-986.
 41. Kamvar, Z; Tabima, J; Grünwald, J. 2014. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. PeerJ 2: 281. En línea: <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.281>.
 42. Knowles, L.L. 2009. Statistical phylogeography. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics. no 40: 593–612.
 43. Kolano B., Siwinska D., Gomez-Pando L., Szymanowska-Pulka J. y Maluszynska J. 2012. Genome size variation in *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae). Plant Systematics and Evolution. no 298:251-255.
 44. Lescano, J. (1994). Genética y Mejoramiento de cultivos Altoandinos: quinua, kañihua, tarwi, kiwicha, papa amarga, olluco, mashua y oca. Programa Interinstitucional de Waru Waru, Convenio INADE/PELT - COTESU. Puno, PE. p 459.
 45. Mason, S., Stevens, M., Jellen, E., Bonifacio, A., Fairbanks, D., Coleman, C., McCarty, R., Rasmussen, G., Maughan, P. 2005. Development and Use of

- Microsatellite Markers for Germplasm Characterization in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science*. no 45(4): 1618-1630.
46. Maughan, J., Kolano, B., Maluszynska, J., Coles, N., Bonifacio, A., Coleman, C., Stevens, M., Fairbanks, D., Parkinson, S., Jellen, E. 2006. Molecular and cytological characterization of ribosomal DNAs in *Chenopodium quinoa* and *Chenopodium berlandieri*. *Genome*. no 49:825–839.
 47. Maughan, P., Bonifacio, A., Jellen, E., Stevens, M., Coleman, C., Ricks, M., Mason, S., Jarvis, D., Gardunia, B., Fairbanks, D. 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. *Theoretical and applied genetic*. no 109(6): 1188-1195.
 48. Maughan, P., Turner, T., Coleman, C., Elzinga, D., Jellen, E., Morales, J., Udall, J., Fairbanks, D. 2009. Characterization of Salt Overly Sensitive 1 (SOS1) gene homology in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Genome*. no 52: 647–657.
 49. MINAGRI, Ministerio de Agricultura y Riego. 2015. Quinoa Peruana: Situación Actual y Perspectivas en el Mercado Nacional e Internacional al 2015. Estudio técnico N°1-2015.
 50. MINCETUR, Ministerio de Comercio Exterior y Turismo, 2016. Análisis Integral de Logística en Perú Parte 2d: Resultados por productos: Quinoa.
 51. Mohammadi, SA, Prasanna, BM. 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants- Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Science* 43(4): 1235–1248.
 52. Morales, A., Bajgain, P., Garver, Z., Maughan, P., Udall, J. 2011. Physiological responses of *Chenopodium quinoa* to salt stress. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*. 3(13): 219-232.
 53. Morillo, E.; González, P. 2009. Monitoreo de la Homogeneidad Genética de la variedad de Quinoa INIAP-Tunkahuan en campo de agricultores. Informe anual 2008 de la Estación Experimental Santa Catalina. Quito. Ecuador. pp 16-22.
 54. Mujica, A. y Jacobsen, S. 2006. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. p 449-457.
 55. Nei, M y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. p. 333.
 56. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. no 106: 283-392.
 57. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *MultiProc Natl. Acad. Sci. (USA)*. no 70:3321–3323.

58. Nei, M. 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Japanese Journal of Human Genetics*. no 23: 341-369.
59. Núñez, L. 1970. *La Agricultura prehistórica en los Andes Meridionales*. Editorial Universidad del Norte. Chile.
60. Núñez-Colín, C., Escobedo, D. 2015. Characterization of plant germplasm: the cornerstone in the study of plant genetic resources. *Centro de Investigación Regional Centro. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Acta agrícola y pecuaria*. no 1(1): 1-6
61. Ortiz, R. 2013. Caracterización de la quinua: conservando recursos genéticos a través del conocimiento y uso de su biodiversidad. *Congreso científico Internacional de la quinua y granos andinos*.
62. Ortiz, R., Madsen, S., Ruiz-Tapia, E., Jacobsen, S., Mujica, A., Christiansen, J., Stolen, O. 1999. Validating a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Genetics Resources and Crop Evolution*. no 46:285-290.
63. Ortiz, R., Ruiz-Tapia, E., Mujica, A. 1998. Sampling strategy for a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Theoretical Applied Genetics*. no 96:475-483.
64. Palomino, G., Hernández L., Torres E. 2008. Nuclear genome size and chromosome analysis in *Chenopodium quinoa* and *C. berlandieri subsp nuttalliae*. *Euphytica*. no 164: 221-230.
65. Peakall, R. y Smouse P. 2012. GenA1Ex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539. En línea: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>
66. Pearsall, D. 2008. Plant Domestication and the Shift to Agriculture in the Andes. En H Silverman & WH Isbell (eds). *Handbook of South American Archaeology*, 105-120. Springer Science and Business media, LLC, New York.
67. Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. no 155: 945-959.
68. Pulgar Vidal, J. 1954. *La Quinoa o Suba en Colombia*. Bogotá, CO.
69. R Development Core Team. 2014. *R: A language and environment for statistical computing*.
70. Rafael, J. 2008. *Diversidad genética en bancos de germoplasma: Un enfoque biplot*. Tesis doctoral. Universidad de salamanca. España.

71. Reyes H., Santacruz A., Martínez O., Simpson J., Hayano C. 2013. Analysis and Optimization of Bulk DNA Sampling with Binary Scoring for Germplasm Characterization. PLoS ONE 8(11): e79936.
72. Risi J, Galwey N. 1989a. The pattern of genetic diversity in the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). I. Associations between characteristics. Euphytica. no 41:147–162.
73. Risi J, Galwey N. 1989b. The pattern of genetic diversity in the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). II. Multivariate methods. Euphytica. no 41:147–162.
74. Risi, J. y Galwey N. 1984. The *Chenopodium* grains of the Andes: Inca crops for modern agriculture. Adv. Appl. Biol. no10: 145-216.
75. Rojas, W., Pinto, M., Alanoca, C., Gómez, L., León, P., Alercia, A., Diulgheroff, S., Padulos, S., Bazile, D. 2013. Estado de la conservación ex situ de los recursos genéticos de quinua. Fundación para la Promoción e Investigación de Productos Andinos. PROINPA.
76. Ruas, P., Bonifacio, A, Ruas, C., Fairbanks, D., Anderson, W. 1999. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L. by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). Euphytica. no 105:25–32
77. Simmonds N. 1971. The breeding system of *Chenopodium quinoa*. I. Male sterility. Heredity. no 27: 73-82
78. Spehar C., Santos, R. 2005. Agronomic performance of Quinoa selected in the Brazilian Savanna. BR. Pesquisa Agropecuária Brasileira. no 40(6): 609-612.
79. Stoddart J, Taylor J, 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. Genetics. 118(4):705-711
80. Szpiecha, Z., Rosenberg, N. 2011. On the size distribution of private microsatellite alleles. Theoretical Population Biology. no 80:100–113
81. Tamayo, L. 2010. Caracterización Molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (quinua) mediante la técnica de ISSR. Tesis de grado *Magister Scientiae*. Lima-Perú.
82. Tapia, M., Gandarillas, H., Alandia, S., Cardozo A., Mujica, A., Ortiz, R., Otazu, V., Rea, J., Salas, B., Zanabria, E. 1979. Quinoa y Kañiwa, Cultivos Andinos. Bogotá, CO. Oficina Regional para la América Latina. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba. CO. p 11-19.

83. Uhle, M. 1919. La arqueología de Arica y Tocta. Boletín de la Sociedad Ecuatoriana de Estudios Históricos. Quito. EC. no 3(7-8):1-48
84. Vega-Gálvez, A; Miranda, M; Vergara, J; Uribe, E; Puente, L; Martínez, E. 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), an ancient Andean grain: a review. Journal of the science of food and agriculture. No 90(15): 2541–2547.
85. Veramendi, S., Bonifacio, A., Cadima, X., Rojas, W. 2013. Caracterización de la diversidad genética de la colección boliviana de quinua, utilizando microsatélites. Vargas, M. (Ed). 2013. Congreso Científico de la Quinoa (Memorias). Fundación PROINPA. La Paz, BO. p 43-53.
86. Ward, S. 2000. Allotetraploid segregation for single-gene morphological characters in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Euphytica. no 116:11-16.
87. Weir, B.S. (1996). *Genetic data analysis 2: Methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, 2nd edition. 445p.
88. Winter, D. 2012. MMOD: an R library for the calculation of population differentiation statistics. Mol Ecol Resour. no 12(6):1158-60.
89. Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Ann. Eugen. no 15: 323-354.
90. Wright, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations. Univ. of Chicago Press, Chicago.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Datos pasaportes de las accesiones evaluadas en el departamento de Puno

N°	Código Colección Nacional	Código de Acceso	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
1	PER004405	PIQ031032	PUNO	PUNO	ACORA	HUANCCONI	-15.97415	-69.79878	3827
2	PER004406	PIQ031033	PUNO	PUNO	ACORA	HUANCCONI	-15.97415	-69.79878	3827
3	PER004408	PIQ031035	PUNO	PUNO	ACORA	CARITAMAYA	-16.00981	-69.73471	3833
4	PER004410	PIQ031037	PUNO	PUNO	PUNO	TALLINA	-15.8392	-70.02917	3856
5	PER004411	PIQ031038	PUNO	PUNO	PUNO	TALLINA	-15.8392	-70.02917	3856
6	PER004412	PIQ031039	PUNO	PUNO	PUNO	TALLINA	-15.8392	-70.02917	3856
7	PER004414	PIQ031041	PUNO	PUNO	ACORA	MOROCCOLLO	-15.97415	-69.79878	3827
8	PER004416	PIQ031043	PUNO	PUNO	ACORA	CHALLA PATJJA	-15.97415	-69.79878	3827
9	PER004426	PIQ031053	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	JACHA JANCCO PUNC	-16.62864	-69.32256	3959
10	PER004428	PIQ031055	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	JACHA JANCCO PUNC	-16.62864	-69.32256	3959
11	PER004429	PIQ031056	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	SIN DATOS	-16.62864	-69.32256	3959
12	PER004432	PIQ031059	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	SIN DATOS	-16.62864	-69.32256	3959
13	PER004433	PIQ031060	PUNO	CHUCUITO	HUACULLANI	SIN DATOS	-16.62864	-69.32256	3959
14	PER004435	PIQ031062	PUNO	PUNO	ACORA	TITIJO	-15.97415	-69.79878	3827
15	PER004436	PIQ031063	PUNO	PUNO	ACORA	TITIJO	-15.97415	-69.79878	3827
16	PER004445	PIQ031072	PUNO	PUNO	ACORA	SILLANIAMAYA	-15.97415	-69.79878	3827
17	PER004452	PIQ031079	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
18	PER004453	PIQ031080	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
19	PER004454	PIQ031081	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
20	PER004455	PIQ031082	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
21	PER004456	PIQ031083	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
22	PER004457	PIQ031084	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827
23	PER004458	PIQ031085	PUNO	PUNO	ACORA	SIN DATOS	-15.97415	-69.79878	3827

Anexo 1: Continuación...

N°	Código Colección Nacional	Código de Acceso	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
24	PER004460	PIQ031087	PUNO	PUNO	ACORA	TUCANTANI	-15.97415	-69.79878	3827
25	PER004461	PIQ031088	PUNO	PUNO	ACORA	TUCANTANI	-15.97415	-69.79878	3827
26	PER004394	PIQ031018	PUNO	LAMPA	LAMPA	CHOCOROSI	-15.36517	-70.36686	3964
27	PER004393	PIQ031017	PUNO	LAMPA	PUCARA	PUCACHUPA	-14.9262	-70.50536	3910
28	PER004392	PIQ031016	PUNO	SAN ROMAN	JULIACA	YOCARA	-15.5102	-70.2156	3910
29	PER004391	PIQ030911	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
30	PER004389	PIQ030909	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
31	PER004387	PIQ030906	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
32	PER004384	PIQ030903	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
33	PER004383	PIQ030902	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
34	PER004382	PIQ030901	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
35	PER004381	PIQ030900	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
36	PER004380	PIQ030899	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
37	PER004379	PIQ030898	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
38	PER004378	PIQ030897	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
39	PER004377	PIQ030894	PUNO	PUNO	PUNO	PUNO	-15.8392	-70.02917	3827
40	PER004376	PIQ030893	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	ILAVE	-16.08591	-69.63811	3847
41	PER004374	PIQ030891	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	ILAVE	-16.08591	-69.63811	3847
42	PER004371	PIQ030883	PUNO	CHUCUITO	POMATA	POMATA	-16.27294	-69.29308	3915
43	PER004363	PIQ030869	PUNO	PUNO	CHUCUITO	CHUCUITO	-15.89422	-69.88971	3871
44	PER004362	PIQ030868	PUNO	PUNO	CHUCUITO	CHUCUITO	-15.89422	-69.88971	3871
45	PER004361	PIQ030867	PUNO	CHUCUITO	JULI	JULI	-16.2146	-69.4593	3869
46	PER004360	PIQ030866	PUNO	CHUCUITO	JULI	JULI	-16.2146	-69.4593	3869
47	PER004359	PIQ030865	PUNO	CHUCUITO	JULI	JULI	-16.2146	-69.4593	3869

Anexo 1: Continuación...

N°	Código Colección Nacional	Código de Acceso	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
48	PER004357	PIQ030859	PUNO	YUNGUYO	YUNGUYO	YUNGUYO	-16.24593	-69.09176	3826
49	PER004356	PIQ030858	PUNO	PUNO	ACORA	CHECCACHATA	-16.16325	-69.70816	3850
50	PER004239	PIQ030038	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	CHALLACOLLO	-16.09178	-69.67375	3849
51	PER004240	PIQ030040	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
52	PER004241	PIQ030043	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
53	PER004242	PIQ030044	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
54	PER004243	PIQ030045	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
55	PER004244	PIQ030046	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
56	PER004245	PIQ030047	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
57	PER004246	PIQ030048	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
58	PER004247	PIQ030049	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
59	PER004248	PIQ030050	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
60	PER004249	PIQ030051	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
61	PER004250	PIQ030053	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
62	PER004251	PIQ030054	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
63	PER004252	PIQ030055	PUNO	EL COLLAO	ILAVE	SIRAYA	-16.27207	-69.73343	3884
64	PER004253	PIQ030056	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
65	PER004254	PIQ030057	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
66	PER004255	PIQ030058	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
67	PER004256	PIQ030059	PUNO	EL COLLAO	PILCUYO	QUETY	-16.09748	-69.48694	3823
68	PER004257	PIQ030062	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
69	PER004258	PIQ030070	PUNO	CHUCUITO	POMATA	AMPATIRI	-16.30403	-69.24336	3833
70	PER004259	PIQ030071	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
71	PER004260	PIQ030072	PUNO	CHUCUITO	POMATA	AMPATIRI	-16.30403	-69.24336	3833

Anexo 1: Continuación...

N°	Código Colección Nacional	Código de Adquisición	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
72	PER004261	PIQ030073	PUNO	CHUCUITO	POMATA	BATALLA	-16.31742	-69.22594	3885
73	PER004262	PIQ030074	PUNO	CHUCUITO	POMATA	AMPATIRI	-16.30403	-69.24336	3833
74	PER004263	PIQ030077	PUNO	YUNGUYO	YUNGUYO	YANAPATA	-16.31749	-69.04295	3867
75	PER004264	PIQ030079	PUNO	CHUCUITO	JULI	CHALLA PAMPA	-16.263	-69.3452	3880

Anexo 2A: Resultados de amplificación de los loci SSR estudiados

CÓDIGO NACIONAL	KAAT007	KCAA011	KGA16	KGA20	QAAT001	QAAT012	QAAT022
PER004405	274/283	258/252	184/206	195/193	183/183	206/206	185/185
PER004406	280/280	252/252	184/196	193/191	186/186	203/203	200/200
PER004408	280/280	258/249	184/196	193/191	219/210	224/224	209/203
PER004410	280/280	261/261	196/196	203/203	183/183	203/203	200/200
PER004411	286/304	261/258	184/184	193/193	183/183	206/203	206/200
PER004412	202/202	258/255	184/192	195/195	183/183	203/203	197/194
PER004414	262/262	249/234	196/196	193/191	186/186	224/221	206/197
PER004416	316/316	255/255	196/196	193/191	183/183	233/233	209/209
PER004426	280/280	258/258	198/198	193/191	186/186	218/218	185/185
PER004428	280/283	258/258	184/192	193/191	183/183	203/203	206/185
PER004429	214/214	255/228	190/196	197/193	186/183	203/203	188/185
PER004432	280/280	258/252	184/190	193/191	183/183	203/203	194/194
PER004433	214/214	258/255	184/194	193/191	186/183	224/218	203/200
PER004435	214/214	255/252	186/194	193/191	186/183	206/203	206/206
PER004436	325/325	252/228	184/184	195/193	183/183	221/221	209/209
PER004445	220/274	258/255	196/196	193/193	NA/NA	NA/NA	188/179
PER004452	268/283	258/255	184/196	191/191	183/183	224/224	203/191
PER004453	259/259	261/258	184/196	193/193	183/183	230/200	206/206
PER004454	277/277	258/258	184/184	195/195	186/186	203/200	200/200
PER004455	217/217	249/249	198/196	199/199	186/186	218/218	209/185
PER004456	277/277	258/258	184/184	193/191	183/183	230/203	206/203
PER004457	280/280	258/258	196/196	203/203	NA/NA	NA/NA	200/200
PER004458	274/274	252/252	196/198	191/191	186/183	224/224	197/194
PER004460	322/322	NA/NA	184/184	NA/NA	NA/NA	NA/NA	194/194
PER004461	253/283	261/255	184/198	191/191	183/183	224/203	206/191
PER004394	286/286	249/231	194/196	199/199	201/219	218/218	212/191
PER004393	256/256	258/258	184/184	203/203	219/216	230/230	197/197
PER004392	202/202	255/255	190/192	191/191	186/186	233/203	233/197
PER004391	280/280	255/246	184/192	197/197	198/225	203/200	200/197
PER004389	280/280	258/252	184/184	193/191	183/219	239/203	206/194
PER004387	271/271	258/255	184/184	193/193	186/219	239/203	206/197
PER004384	274/274	255/255	184/184	197/195	186/183	224/224	206/191
PER004383	274/274	249/249	184/196	NA/NA	NA/NA	NA/NA	206/206
PER004382	323/323	261/261	184/184	193/191	183/210	224/224	200/200
PER004381	217/217	228/213	192/192	193/191	186/219	218/203	209/194
PER004380	241/280	261/258	184/184	193/191	183/219	224/203	200/197
PER004379	256/280	258/255	184/186	203/199	186/219	230/203	200/197
PER004378	211/211	258/258	196/196	193/191	219/219	221/221	194/194

Anexo 2A: Continuación...

CÓDIGO NACIONAL	KAAT007	KCAA011	KGA16	KGA20	QAAT001	QAAT012	QAAT022
PER004377	211/211	261/249	192/192	193/191	219/186	218/203	212/212
PER004376	274/274	249/231	194/194	193/191	183/183	224/224	206/206
PER004374	247/247	258/258	194/196	193/191	183/183	224/200	200/200
PER004371	307/307	258/258	184/190	193/191	183/183	203/203	191/191
PER004363	247/247	255/255	184/184	193/191	225/222	227/227	188/188
PER004362	280/280	258/258	192/192	193/191	234/234	203/203	188/188
PER004361	277/262	258/249	190/192	195/193	183/183	203/203	188/188
PER004360	211/211	255/249	184/184	191/191	183/183	203/203	206/200
PER004359	247/277	255/252	184/184	193/193	222/222	227/224	197/197
PER004357	271/271	255/249	184/184	195/193	186/183	203/203	191/188
PER004356	202/202	258/258	186/186	193/189	231/222	203/203	206/203
PER004239	367/367	231/231	196/196	193/193	183/183	203/203	200/197
PER004240	262/286	249/246	NA/NA	193/201	228/228	203/203	206/203
PER004241	277/277	252/249	184/196	195/195	183/183	233/224	197/194
PER004242	280/280	255/255	184/184	193/193	183/216	218/218	197/194
PER004243	280/280	249/249	184/184	193/193	183/225	215/203	194/191
PER004244	253/274	255/249	184/192	193/193	183/219	218/215	203/200
PER004245	286/286	258/258	184/184	197/195	225/222	200/200	203/194
PER004246	286/286	249/249	184/194	195/177	183/183	194/194	233/230
PER004247	289/289	228/213	190/190	195/195	183/183	203/203	185/182
PER004248	289/289	255/255	196/196	193/193	186/186	203/203	194/185
PER004249	289/289	249/249	196/196	203/203	186/186	NA/NA	203/200
PER004250	304/322	258/252	196/196	199/199	183/219	203/203	197/188
PER004251	316/316	252/252	184/184	195/195	216/216	218/218	197/197
PER004252	283/283	246/246	196/196	193/193	183/183	224/224	182/182
PER004253	202/202	252/252	184/184	193/193	183/183	233/233	197/197
PER004254	280/280	252/249	184/196	NA/NA	183/183	203/203	212/209
PER004255	307/307	252/252	184/184	NA/NA	183/183	221/221	197/194
PER004256	322/322	252/252	184/184	NA/NA	183/237	224/224	194/191
PER004257	280/280	249/249	184/184	NA/NA	183/183	224/224	200/197
PER004258	295/295	255/255	190/190	NA/NA	186/186	197/197	197/197
PER004259	202/202	252/252	190/190	NA/NA	186/186	230/227	197/197
PER004260	202/202	255/255	184/184	NA/NA	186/183	230/227	197/188
PER004261	280/280	255/255	184/184	NA/NA	186/186	230/227	197/197
PER004262	202/202	255/252	192/196	193/193	186/186	230/224	239/236
PER004263	280/280	249/249	184/184	193/193	216/186	224/221	197/194
PER004264	202/202	249/249	190/190	193/193	186/186	203/203	209/206

Anexo 2B:

CÓDIGO NACIONAL	QAAT026	QAAT050	QAAT051	QAAT062	QAAT071	QAAT78	QAAT087
PER004405	223/220	222/222	187/187	184/184	190/190	200/218	208/208
PER004406	220/214	213/213	190/190	196/162	178/178	209/209	214/214
PER004408	229/208	219/219	187/187	187/184	178/172	206/206	196/196
PER004410	211/211	219/219	187/187	184/184	178/172	209/209	196/196
PER004411	211/211	222/216	187/187	184/166	178/178	212/212	196/223
PER004412	208/208	225/216	187/187	169/169	NA/NA	209/200	214/214
PER004414	208/223	219/207	190/190	202/184	166/166	212/212	217/214
PER004416	220/220	222/222	190/190	175/175	187/166	206/206	214/214
PER004426	214/214	216/216	190/190	184/184	184/184	206/206	208/208
PER004428	217/208	219/219	187/190	187/184	211/211	206/209	214/196
PER004429	214/208	213/213	184/187	175/169	187/184	206/209	223/214
PER004432	217/217	225/222	187/190	169/169	184/181	203/203	214/214
PER004433	214/211	219/213	187/190	184/178	184/181	206/209	232/223
PER004435	214/211	225/219	190/193	193/175	184/181	212/212	217/208
PER004436	217/214	222/222	187/187	184/184	187/184	206/206	214/214
PER004445	NA/NA	216/213	NA/NA	NA/NA	166/166	206/212	NA/NA
PER004452	214/208	222/207	187/190	187/181	181/181	209/209	220/217
PER004453	217/217	225/213	190/190	184/175	178/178	206/209	220/220
PER004454	208/205	219/219	190/190	184/181	184/184	206/206	NA/NA
PER004455	214/196	219/213	190/190	184/166	187/187	212/212	208/208
PER004456	211/208	222/216	187/187	184/169	208/208	215/215	217/217
PER004457	NA/NA	228/228	NA/NA	NA/NA	178/175	200/200	NA/NA
PER004458	223/211	219/216	187/190	190/184	NA/NA	209/209	217/208
PER004460	NA/NA	219/219	NA/NA	NA/NA	166/166	206/206	NA/NA
PER004461	217/214	222/213	187/190	184/181	NA/NA	209/206	208/196
PER004394	214/211	222/222	187/187	181/181	187/184	209/209	214/214
PER004393	214/211	222/222	187/187	187/187	178/178	209/209	217/217
PER004392	214/202	219/216	187/187	187/184	190/187	212/215	223/196
PER004391	217/199	222/222	187/190	175/184	190/181	212/215	226/214
PER004389	229/217	225/219	187/190	175/162	181/172	206/215	202/196
PER004387	214/211	225/225	187/187	181/175	181/178	215/206	214/214
PER004384	220/211	213/213	187/187	181/181	178/178	212/200	220/220
PER004383	NA/NA	NA/NA	NA/NA	NA/NA	184/184	212/212	NA/NA
PER004382	217/214	219/207	187/187	184/169	178/178	200/206	214/196
PER004381	196/193	219/219	187/187	199/181	190/190	212/212	214/214
PER004380	211/211	213/213	187/190	190/187	193/193	209/209	214/232
PER004379	214/214	225/225	187/187	196/187	199/190	209/209	214/217
PER004378	211/211	222/213	187/187	181/181	172/172	206/206	196/196

Anexo 2B: Continuación...

CÓDIGO NACIONAL	QAAT026	QAAT050	QAAT051	QAAT062	QAAT071	QAAT78	QAAT087
PER004377	217/196	225/219	187/187	190/187	187/178	212/212	223/214
PER004376	217/214	225/225	187/187	187/175	178/178	209/209	223/196
PER004374	211/211	213/213	184/184	178/175	190/190	206/206	232/232
PER004371	226/226	222/222	184/184	178/169	163/163	203/203	214/214
PER004363	211/211	216/216	184/184	187/187	187/187	212/212	217/217
PER004362	211/211	219/219	187/187	169/169	187/172	209/209	223/223
PER004361	211/211	219/219	187/187	193/169	187/181	209/209	223/217
PER004360	217/217	225/213	NA/NA	190/184	172/172	209/209	193/193
PER004359	223/211	216/213	187/187	187/184	187/184	206/203	223/217
PER004357	217/199	225/222	187/190	181/178	175/175	206/206	214/214
PER004356	208/211	225/225	187/187	184/169	193/184	209/209	196/196
PER004239	208/208	228/228	187/187	184/184	175/175	209/209	214/214
PER004240	217/217	219/219	NA/NA	175/162	187/187	221/206	NA/NA
PER004241	217/214	225/219	187/187	NA/NA	190/175	209/212	NA/NA
PER004242	214/223	219/219	190/190	181/181	190/190	212/215	193/193
PER004243	217/214	225/225	190/190	169/169	202/175	209/200	187/187
PER004244	202/217	225/222	187/190	NA/NA	205/202	209/209	187/208
PER004245	193/193	225/225	187/187	181/181	178/178	209/209	187/187
PER004246	196/193	222/231	187/187	193/181	178/178	200/200	208/208
PER004247	223/220	246/246	187/187	178/178	181/181	206/206	214/214
PER004248	214/208	225/219	187/187	184/184	190/169	209/209	214/214
PER004249	220/220	222/222	187/187	184/184	175/175	209/209	214/214
PER004250	211/211	225/222	187/190	169/169	184/175	209/215	214/220
PER004251	226/226	225/225	187/187	169/169	178/163	215/215	193/193
PER004252	220/220	222/222	187/187	187/187	178/178	200/200	208/208
PER004253	229/214	228/228	190/190	169/169	190/190	209/209	223/223
PER004254	220/214	222/219	187/187	190/187	178/175	209/209	220/214
PER004255	229/229	219/219	187/187	169/169	178/178	200/200	223/223
PER004256	220/220	222/222	187/187	187/187	178/178	215/215	217/217
PER004257	226/226	222/222	187/187	169/169	187/187	206/206	193/193
PER004258	193/193	222/222	187/187	184/184	190/190	212/212	187/187
PER004259	214/211	222/222	187/187	184/184	190/178	212/212	223/214
PER004260	211/211	222/222	187/187	184/175	193/190	212/212	223/193
PER004261	214/211	222/222	187/187	184/184	190/190	212/212	193/193
PER004262	211/211	222/222	190/190	184/175	190/160	212/212	187/187
PER004263	229/223	219/219	187/187	196/196	190/190	200/206	214/193
PER004264	214/214	222/222	190/190	196/196	190/190	212/212	223/223

Anexo 2C:

CÓDIGO NACIONAL	QAAT088	QAATG001	QCA14	QCA26	QCA120	QGA17	QGA028
PER004405	165/144	209/215	215/215	210/210	208/208	176/176	192/190
PER004406	147/147	209/215	215/215	208/208	208/216	176/176	192/192
PER004408	165/153	209/212	215/215	208/208	216/216	176/176	214/194
PER004410	165/165	209/215	215/215	210/210	208/208	176/176	196/194
PER004411	162/135	209/212	215/215	208/208	208/208	176/172	196/194
PER004412	159/144	209/212	215/215	208/208	216/210	176/176	196/194
PER004414	156/144	209/212	215/215	208/208	208/216	178/178	194/192
PER004416	144/144	209/218	219/219	208/208	208/208	176/176	196/194
PER004426	159/159	209/218	215/215	210/210	208/208	178/178	194/192
PER004428	162/147	209/215	215/215	210/210	208/208	178/178	196/194
PER004429	144/144	209/215	215/215	208/208	208/208	176/166	196/194
PER004432	162/162	209/215	215/215	208/208	216/216	176/176	194/194
PER004433	144/144	209/212	219/219	208/208	214/208	176/166	192/192
PER004435	159/144	209/215	215/215	208/208	208/208	176/180	192/190
PER004436	150/150	209/218	215/215	208/208	208/208	176/174	192/190
PER004445	144/126	209/215	215/215	210/210	208/216	176/176	192/192
PER004452	156/153	209/218	215/215	208/208	208/216	176/166	192/192
PER004453	141/135	209/215	215/215	208/208	208/208	176/176	196/196
PER004454	126/126	209/215	215/215	208/208	208/208	166/166	194/216
PER004455	162/135	209/218	219/219	208/208	208/208	176/176	194/216
PER004456	177/162	209/212	215/215	208/208	208/208	176/176	196/194
PER004457	141/141	209/209	215/215	208/208	208/208	178/178	192/192
PER004458	153/153	209/212	215/215	208/208	208/208	176/176	196/194
PER004460	162/162	209/209	215/215	210/210	216/216	176/176	196/196
PER004461	150/144	209/212	219/219	208/208	208/216	176/176	196/212
PER004394	180/180	209/212	215/215	210/210	208/212	176/176	206/206
PER004393	153/153	209/212	219/219	208/208	208/208	176/176	194/194
PER004392	153/147	209/212	215/215	208/208	208/208	176/172	216/216
PER004391	150/147	209/215	215/215	208/208	210/216	176/178	194/192
PER004389	141/141	209/212	219/219	208/208	208/208	176/176	194/192
PER004387	138/138	209/215	215/215	210/210	208/208	176/176	194/192
PER004384	141/141	209/218	215/215	208/208	208/208	176/166	194/194
PER004383	141/141	209/209	215/215	208/208	208/208	176/176	216/216
PER004382	141/162	212/218	215/215	210/210	216/208	176/166	194/192
PER004381	141/168	209/212	215/215	210/210	216/216	176/174	194/194
PER004380	153/144	215/215	219/219	208/208	208/208	176/174	196/194
PER004379	153/153	209/212	215/215	208/208	208/208	176/174	196/194
PER004378	144/144	209/218	215/215	210/210	208/208	176/174	196/194

Anexo 2C: Continuación...

CÓDIGO NACIONAL	QAAT088	QAATG001	QCA14	QCA26	QCA120	QGA17	QGA028
PER004377	165/165	209/212	215/215	210/210	208/216	176/176	194/192
PER004376	183/183	209/212	215/215	210/210	216/216	176/174	192/192
PER004374	144/144	209/212	215/215	208/208	216/208	166/166	196/194
PER004371	141/141	209/218	215/215	208/208	216/208	166/176	194/192
PER004363	147/147	209/212	215/215	208/208	216/216	176/176	192/190
PER004362	147/147	215/215	215/215	208/208	216/216	174/174	194/192
PER004361	147/147	215/215	215/215	208/208	216/208	174/174	194/192
PER004360	147/156	209/212	219/219	206/206	208/208	176/172	216/216
PER004359	147/135	209/218	215/215	208/208	208/216	176/174	214/194
PER004357	141/180	209/215	215/215	208/208	216/216	176/166	194/194
PER004356	141/162	209/215	215/215	208/208	208/206	176/176	194/192
PER004239	162/162	209/212	215/215	208/208	214/214	176/174	194/192
PER004240	162/162	NA/NA	215/215	NA/NA	214/212	176/174	192/192
PER004241	153/150	209/218	215/215	208/208	208/206	176/166	192/192
PER004242	168/168	209/218	215/215	208/208	208/206	178/176	192/190
PER004243	153/150	215/218	215/215	210/210	208/208	178/176	194/192
PER004244	162/150	209/212	215/215	208/208	216/208	176/176	192/192
PER004245	141/141	209/215	215/215	208/208	208/206	166/166	192/192
PER004246	150/147	209/215	215/215	206/206	210/208	166/166	216/216
PER004247	144/144	209/212	219/219	208/208	210/210	176/174	192/192
PER004248	126/156	209/212	215/215	206/206	210/208	176/174	190/190
PER004249	147/147	209/215	215/215	208/208	214/212	176/174	190/190
PER004250	159/150	209/215	215/215	210/210	216/214	176/174	190/190
PER004251	141/141	209/218	215/215	206/206	208/206	176/174	190/190
PER004252	159/159	209/218	215/215	206/206	208/206	176/174	192/192
PER004253	159/159	209/218	215/215	206/206	208/206	176/174	192/192
PER004254	147/141	209/212	215/215	208/208	214/214	176/174	194/194
PER004255	141/141	209/218	215/215	208/208	208/208	176/174	196/196
PER004256	162/162	209/212	215/215	208/208	214/212	176/174	194/194
PER004257	141/141	209/218	215/215	208/208	208/206	176/178	192/192
PER004258	144/144	209/215	215/215	208/208	212/210	176/174	190/190
PER004259	144/144	209/218	215/215	208/208	208/208	176/174	190/190
PER004260	159/150	209/212	215/215	208/208	208/212	176/174	190/190
PER004261	150/150	209/218	215/215	208/208	208/206	176/174	190/190
PER004262	159/159	209/218	215/215	208/208	210/208	176/176	192/192
PER004263	138/138	209/212	215/215	208/208	208/208	176/174	192/192
PER004264	159/159	209/215	215/215	210/210	214/212	176/178	192/192

Anexo 2D:

CÓDIGO NACIONAL	QGAA001	QAAT076	QAAT097
PER004405	227/224	181/181	188/188
PER004406	215/215	181/178	197/194
PER004408	218/146	190/190	197/194
PER004410	335/332	202/202	203/203
PER004411	323/320	181/178	206/203
PER004412	260/209	193/193	206/197
PER004414	242/218	208/205	209/191
PER004416	221/227	196/196	206/206
PER004426	230/227	169/169	209/209
PER004428	230/227	184/181	209/206
PER004429	257/230	190/178	206/203
PER004432	224/221	181/181	206/206
PER004433	257/230	190/190	206/200
PER004435	260/257	184/178	200/197
PER004436	272/269	184/184	209/206
PER004445	215/215	NA/NA	203/203
PER004452	239/257	181/178	209/206
PER004453	239/239	NA/NA	209/197
PER004454	221/218	181/178	206/203
PER004455	227/227	169/169	209/188
PER004456	158/158	181/178	194/191
PER004457	269/269	NA/NA	203/203
PER004458	251/221	181/178	209/206
PER004460	212/212	NA/NA	NA/NA
PER004461	218/218	184/181	209/206
PER004394	221/281	211/208	203/200
PER004393	281/278	193/190	203/200
PER004392	260/299	196/193	203/197
PER004391	206/224	193/181	197/188
PER004389	221/221	193/190	206/203
PER004387	221/209	184/181	206/203
PER004384	311/308	181/181	209/197
PER004383	NA/NA	NA/NA	NA/NA
PER004382	239/239	178/178	203/197
PER004381	218/218	178/169	209/209
PER004380	245/245	178/181	191/191
PER004379	278/215	181/193	203/197

Anexo 2D: Continuación...

CÓDIGO NACIONAL	QGAA001	QAAT076	QAAT097
PER004378	245/245	181/181	200/197
PER004377	281/230	208/169	209/203
PER004376	215/215	190/190	212/209
PER004374	323/323	202/202	191/179
PER004371	218/218	181/181	206/206
PER004363	350/350	187/187	191/188
PER004362	215/215	187/187	200/200
PER004361	215/215	187/190	200/200
PER004360	251/212	181/178	NA/NA
PER004359	215/203	181/178	206/200
PER004357	206/206	190/181	206/188
PER004356	350/350	196/184	203/197
PER004239	233/233	181/178	197/197
PER004240	NA/NA	196/190	200/188
PER004241	NA/NA	175/169	206/206
PER004242	236/290	196/193	206/197
PER004243	158/158	NA/NA	206/203
PER004244	158/200	208/190	206/203
PER004245	266/266	178/178	203/203
PER004246	194/269	181/208	230/200
PER004247	293/293	199/199	194/194
PER004248	251/251	181/181	209/209
PER004249	257/257	187/187	197/197
PER004250	248/275	208/196	212/203
PER004251	203/203	178/178	206/206
PER004252	335/335	178/175	206/206
PER004253	203/287	178/178	197/197
PER004254	200/200	178/184	206/191
PER004255	200/200	178/175	206/206
PER004256	320/200	193/193	194/194
PER004257	158/158	178/178	191/191
PER004258	293/293	196/196	197/197
PER004259	293/203	196/190	197/197
PER004260	200/200	196/178	206/197
PER004261	287/287	196/196	206/197
PER004262	NA/NA	208/169	206/191
PER004263	218/218	208/196	209/209
PER004264	287/287	208/208	203/203

Anexo 3: Resultados de la prueba de equilibrio Hardy-Weinberg utilizando el test de Chi-cuadrado en cada loci microsatélite.

Loci microsatélite	Chi cuadrado	df	p-valor
KAAT007	1346.99	351	<2.20E-16
KCAA011	182.78	45	<2.20E-16
KGA16	101.97	28	=2.43E-10
KGA20	145.91	36	=3.54E-15
QAAT001	297.09	78	<2.20E-16
QAAT012	332.29	78	<2.20E-16
QAAT022	401.40	120	<2.20E-16
QAAT026	217.12	78	=4.71E-15
QAAT050	228.26	36	<2.20E-16
QAAT051	71.50	6	=2.01E-13
QAAT062	148.49	78	=2.65E-06
QAAT071	455.26	136	<2.20E-16
QAAT78	174.45	28	<2.20E-16
QAAT087	226.02	55	<2.20E-16
QAAT088	453.66	120	<2.20E-16
QAATG001	49.99	6	=4.73E-09
QCA14	66.72	1	=3.13E-16
QCA26	148.00	3	<2.20E-16
QCA120	63.70	15	=5.76E-08
QGA17	46.89	15	=3.83E-05
QGA028	196.51	28	<2.20E-16
QGAA001	1566.29	780	<2.20E-16
QAAT076	296.64	91	<2.20E-16
QAAT097	97.84	55	=0.0003356