



**Variabilidad genética de *Chenopodium quinoa* Willd. en el
Noroeste Argentino y su relación con la dispersión de la
especie.**

Tesis Doctoral

Doctorando: **Ing Agr Sabrina M. Costa Tártara**

Director: **Dra María Marcela Manifesto**

Co – director: **Dr Sergio Bramardi**

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

La Plata, 11 de diciembre de 2014

RESÚMEN

Variabilidad genética de *Chenopodium quinoa* Willd. en el Noroeste Argentino y su relación con la dispersión de la especie.

Chenopodium quinoa Willd. es una especie originaria de la región Andina de Sudamérica perteneciente a la familia Chenopodiaceae. Sus semillas poseen un elevado nivel de proteínas de buena calidad ya que contiene altos niveles y un buen balance de aminoácidos esenciales como la lisina y metionina. Tiene la capacidad de adaptarse a condiciones ambientales extremas como déficit hídrico, bajas temperaturas y salinidad, haciendo posible su cultivo en un amplio rango de ambientes. Estudios de caracterización de colecciones de germoplasma de quínoa en los principales países actualmente productores de este cultivo como Bolivia y Perú, ha permitido generar información complementaria a la caracterización morfo-fenológica de gran utilidad en planes de mejoramiento genético. Respecto a esto, el germoplasma nativo de Argentina no se encuentra caracterizado, lo que limita su utilización en el mejoramiento y valorización. En este trabajo se planteó determinar la magnitud de la diversidad y la estructura genética de germoplasma de quínoa, para lo cual se caracterizaron 22 *loci* microsatélites en 80 accesiones de *C. quinoa*, describiendo la variabilidad alélica en forma separada para el germoplasma del NOA (36) y del resto de Sudamérica (44 - ExtraNOA). Para caracterizar cada accesión se determinó la riqueza alélica, Heterocigocidad (como medida de diversidad), el porcentaje de *loci* polimórficos (%P) y el número de alelos privados. Se calculó la distancia genética entre las accesiones y se analizaron las relaciones según el agrupamiento obtenido por UPGMA, además de analizar la varianza molecular en diferentes niveles jerárquicos. La diversidad genética promedio entre las accesiones de quínoa nativa fue ~0,30; se detectaron 360 alelos en total, 97 de los cuales fueron alelos únicos. El 18% del total de la varianza se debió a la diferenciación entre regiones ($F_{rt} = 0,18$), el 39 % entre poblaciones ($F_{st} = 0,57$), el 27 % entre plantas individuales y el 16 % restante intra- individuos. Los valores de F_{is} (0,63) y F_{it}

(0,84) indicaron una deficiencia de genotipos heterocigotas. El germoplasma se estructuró longitudinalmente en la región del Noroeste, formando cuatro grandes grupos de poblaciones que corresponden a regiones agroecológicamente diferentes: Puna, valles secos, valles húmedos y una zona de transición de altura. De oeste a este, la magnitud de la diversidad genética a nivel de grupo presentó un gradiente decreciente hacia el este junto con la altitud, encontrando una correlación baja pero significativa con el régimen de precipitaciones de la región (que se incrementa hacia los valles orientales húmedos). El gradiente de diversidad genética molecular se refleja también en un gradiente en el síndrome de domesticación que presenta la especie (mayor diversidad en sitios de mayor antigüedad de uso), evidenciando un patrón característico de una especie que evolucionó como cultivo, post-domesticación. Veinticinco de las 36 accesiones de quínoa nativa fueron caracterizadas morfo-fenológicamente complementando la caracterización molecular. El análisis de caracterización conjunta sustentó el agrupamiento observado para la quínoa del NOA pudiendo determinar cómo caracteres fenotípicos más influyentes en la diferenciación de las poblaciones los relacionados con la fenología, la morfometría de hoja y el diámetro del tallo. Las accesiones provenientes de los valles interandinos (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 presentaron un estado intermedio para los caracteres mencionados, pero se diferenciaron del resto por presentar menor diámetro de grano. Las accesiones de quínoa ExtraNOA se diferenciaron exitosamente a partir de la caracterización molecular, obteniéndose un alto valor de distancia genética promedio entre todas (~0,83). Se detectaron 553 alelos en total, de los cuales el 292 (52,8 %) resultaron en común entre todas las entradas, 67 (12,1 %) fueron exclusivos del germoplasma del NOA y 194 (35,1 %) exclusivos de las entradas del resto de Sudamérica. La inclusión de germoplasma del NOA, el extremo sur de la distribución de la especie en la región Andina, en un análisis a nivel de Sudamérica evidenció un patrón de agrupamiento longitudinal de acuerdo a las

características ambientales de los sitios de origen (ambiente seco y ambiente húmedo) y en un segundo orden, tierras altas y tierras bajas. Las accesiones de quínoa procedentes del centro-sur de Chile compusieron el grupo genético más diferenciado. Este agrupamiento sustenta la segunda hipótesis postulada acerca de que el origen del germoplasma en el NOA es ocurrencia de procesos de introducción independientes de zonas ecológicas similares en contraposición a un único evento de introducción y su posterior dispersión. Se discuten las relaciones genéticas en términos de la dinámica del cultivo y el contexto histórico del cual formó parte, considerando hallazgos arqueológicos que documentaron la presencia de la especie. Los resultados obtenidos a partir de este trabajo permitirán definir las relaciones entre las accesiones y el grado de influencia del ambiente en la estructura genética aportando criterios en conjunto para la elección de germoplasma en futuros programas de mejoramiento.

ABSTRACT

Genetic variability of *Chenopodium quinoa* Willd. in the Argentinean Northwest and its relation with the dispersion of the species.

Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), one of the main crops domesticated in the Andean highlands thousands of years ago, played an important role as a protein source since it contains high levels and a good balance of essential amino acids lysine and methionine. On the other hand, quinoa may adapt to extreme environmental conditions such as drought stress, low temperatures and salinity, enabling its cultivation in a wide range of environments. Characterization studies of quinoa germplasm collections in producing countries (e.g Bolivia and Peru) have allowed generating information related to morpho-phenological characterization useful in breeding plans, something unknown for quinoa native germplasm limiting their use for crop improvement and recovery. In this work the aim was to determine the extent of molecular genetic diversity of quinoa germplasm and their structure. Eighty germplasm accessions from South América were studied using 22 microsatellite (SSR) markers. The description of allelic diversity were for accessions collected along the Northwest Argentina (NWA) region (36) and the rest of South America (44 – ExtraNWA), separately. The allelic richness, Heterozygosity (as a measure of diversity), percentage of polymorphic *loci* (% P), and the number of private alleles were determined for each accession. Allelic frequencies among populations were used to calculate the genetic distance among them and then clustering were performed by UPGMA method. In addition, an AMOVA was performed to analyze the molecular variance at different hierarchical levels. All SSR *loci* analyzed were highly polymorphic detecting a total of 360 alleles among native quinoa accessions populations. Cluster analyses grouped the accessions into four main clusters at the average genetic distance level (~0.80), each of which represented a different environment of the NWA region: Puna, Dry Valleys, Eastern Humid Valleys, and a transition area with high altitudes between the last two environments. AMOVA analyses showed a strong genetic structure: a high population subdivision relative to the grouping by region

($F_{rt}=0.18$) together with a high genetic differentiation among populations ($F_{st}=0.57$) and a heterozygous defect ($F_{is}=0,63$ and $F_{it}=0,84$). An eastward decreasing gradient of genetic diversity along with the altitude showed a low but significant correlation with rainfall in the region (which increases towards the humid eastern valleys). The gradient of molecular genetic diversity was also reflected in a gradient of domestication syndrome presenting species (greater diversity in senior sites use), showing a characteristic pattern of a species evolved as a crop, post-domestication. Twenty-five from 36 native quinoa accessions were characterized morpho-phenologically complementing molecular characterization. The joint analysis sustained populations clustering observed by molecular characterization, and also allowed to determine the most influential phenotypic traits in differentiating populations. They were related to phenology, leaf morphometry and stem diameter. The accessions from the Andean valleys were characterized by greater plant height, cycle intermediate or late maturity, larger diameter stem and leaf surface while larger highland accessions (Puna) had lower height, shorter cycle and smaller leaves. Accessions from transition zone presented an intermediate state for the above characters, but differed from the rest by having lower grain diameter. The allelic richness in the entire collection (80 accessions) was 553, of which 292 (52.8%) were common among all accessions, 67 (12.1%) were unique for NWA germplasm and 194 (35.1%) unique to inputs of the rest of South America. At the level of average genetic distance (~ 0.83) quinoa accessions clustered in five groups. The total analyses of allelic diversity distribution showed a longitudinal pattern grouping according to the environmental characteristics of the sites of origin (dry environment and atmosphere wet) and in a second order, highlands and lowlands (four groups). The fifth and more differentiated group was composed for Quinoa accessions from central-south Chile. This clustering supports the second hypothesis postulated about the origin of the germplasm in the NWA is independent processes occurring introduction of similar ecological zones as opposed to a single event of introduction and subsequent spread. Genetic relationships are discussed in terms of the dynamics of culture and historical context which formed part, considering archaeological findings that documented the presence of the species. The

results obtained from this work will allow defining the relationships between quinoa germplasm accessions and the influence of the environment on the genetic structure together with providing criteria for the selection of germplasm in future breeding programs.

AGRADECIMIENTOS

Con algunos anhelos respecto a que las cosas podrían haber sido de otra manera, pero aprendiendo siempre de lo que trae el camino como desafío, me encuentro escribiendo los agradecimientos de la tesis. En un proceso de sacarle formas a las cosas quizá incurra en algunas des-formalidades...

El camino de la investigación se inició en mí sin quererlo conscientemente, motivada supongo por la curiosidad, el gusto por la observación y la mirada analítica, que me surgen siempre. Enmarcada en la Agronomía, la profesión que elegí, se fueron abriendo las puertas y presentando oportunidades en la genética (vegetal), habiendo estado siempre convencida que me gustaban los animales...pero claro, entonces hubiera seguido veterinaria, en fin... A la larga me di cuenta que esta disciplina es transversal a todo proceso biológico, y eso es lo que la hace interesante. Aplicada a la producción es fascinante, y como profesional en la era Biotecnológica nada mejor que conocer los procesos biológicos para potenciar su uso. En este sentido, haber desarrollado la descripción genética de una especie vegetal milenaria, como la quínoa, en pleno auge y con gran potencial de uso como alimento funcional, fue para mí una oportunidad excepcional.

El desarrollo de este trabajo me llevó de viaje por distintos lugares, me dio la oportunidad de conocer otras culturas, y eso actualmente brinda apertura para el trabajo cotidiano. Me gustaría poner un álbum de fotos más que contárselos aquí...se los dejo en el *face*. Las tantas historias sucedidas en este tiempo (de amor, sobre todo) sin duda dan mucho color a esta gran etapa.

Gracias a los que me acompañaron en lo académico e hicieron posible la conducción del trabajo que se expone en la tesis, mis directores Dra. María Marcela Manifesto, el Dr. Sergio Bramardi y el Dr. Daniel Bertero, guías en los grandes temas que abarcan el trabajo, y otros condimentos durante el camino de doctorado. A mis compañeras de Instituto que formaron parte de cada día de trabajo, en especial a Carla Arizio, una gran amiga y colega. Al Dr. Ramiro Curti por brindarse siempre ("de one"). A Rochi Darquier por su aliento incansable, más aún en momentos difíciles. A mi familia por la confianza plena, mis padres,

Moni y Gaby, que bancaron siempre TODO y mis hermanos Nati y Tin, que hicieron el esfuerzo por entender de qué va esto del “sistema científico”, pero creo que siguen sin lograrlo... Los quiero con todo el corazón.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por los fondos disponibles para que esta tesis pudiera desarrollarse. Al Instituto de Recursos Biológicos de INTA Castelar por el lugar de trabajo.

*A Santi, por la mutua admiración.
Al ser que hoy me hace ser completa.
A mi familia incondicional.*

CONTENIDO

RESÚMEN	2
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Generalidades	15
1.2. Quínoa en Argentina.....	17
1.3. La especie <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.....	21
1.3.1. Características botánicas y morfológicas.....	21
1.3.2. Características nutricionales.....	24
1.3.3. Ploidia	25
1.4. Caracterización y conservación de la variabilidad genética	25
1.4.1. Marcadores moleculares microsatélites.....	27
1.4.2. Desarrollo de marcadores microsatélites a partir de secuencias de ADN que se expresan (EST)	29
1.5. Antecedentes.....	30
1.5.1. Diversidad genética y estructura poblacional en plantas.....	30
1.5.2. Caracterización conjunta de germoplasma	32
1.5.3. Caracterización, variabilidad y relaciones genéticas de <i>C. quinoa</i>	33
2. Hipótesis de trabajo	41
2.1. Justificación e implicancia de la tesis.....	41
3. OBJETIVO GENERAL	43
3.1. Objetivos específicos.....	43
4. MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.1. Material vegetal	44
4.2. Selección de poblaciones	44
4.3. Extracción de ADN genómico	50
4.4. Selección de marcadores SSR y amplificación por PCR	51

4.5.	Separación y visualización de los productos de amplificación	53
4.6.	Análisis de datos	54
4.6.1.	Matriz básica de datos.....	54
4.6.2.	Diversidad molecular	54
4.6.3.	Diversidad genética de las poblaciones	55
4.6.4.	Matriz de distancia genética	56
4.6.5.	Análisis de agrupamiento	56
4.6.6.	Test de Mantel.....	57
4.6.7.	Regresión Lineal Múltiple	58
4.7.	Estructura genética de las poblaciones.....	59
4.8.	Caracterización conjunta	60
4.8.1.	Análisis de datos mixtos mediante método de ordenamiento.....	62
4.9.	Análisis bioinformático para la identificación de regiones microsatélites en secuencias ESTs (Expressed Sequence Tags).	63
4.9.1.	Detección de unigenes	64
4.9.2.	Determinación de secuencias microsatélites (SSR) en unigenes	64
4.9.3.	Determinación de posibles funciones de los unigenes que contienen microsatélites (EST-SSRs).....	64
5.	Resultados	66
5.1.	Resultados preliminares y elección de estrategia de trabajo.....	66
5.2.	Germoplasma procedente de la región del Noroeste Argentino (NOA).....	67
5.2.1.	Diversidad molecular	67
5.2.2.	Diversidad genética de las poblaciones	69
5.2.3.	Distancia genética entre las poblaciones del NOA.....	70
5.2.4.	Análisis de agrupamiento	71
5.2.5.	Estructura genética de las poblaciones	73
5.2.6.	Diversidad alélica entre grupos de poblaciones	74

5.2.7. Relación entre la magnitud de la diversidad genética y las características climáticas de la región del NOA.....	75
5.2.8. Caracterización conjunta	76
5.3. Germoplasma procedente del resto de Sudamérica	80
5.3.1. Diversidad molecular	80
5.3.2. Diversidad genética de las poblaciones	82
5.4. Relaciones genéticas entre las poblaciones del Noroeste Argentino y las poblaciones del resto de Sudamérica.	84
5.4.1. Diversidad alélica entre las poblaciones	84
5.4.2. Distancia genética y agrupamiento entre las poblaciones.....	86
5.4.3. Diversidad alélica entre grupos de poblaciones	89
5.5. Marcadores EST-SSR.	92
5.5.1. Análisis bioinformático para la identificación de regiones microsatélites en secuencias ESTs (Expressed Sequence Tags).....	92
5.5.2. Evaluación de los EST-SSR en poblaciones nativas de <i>C. quinoa</i>	95
6. DISCUSIÓN	98
6.1. Diversidad genética y molecular del germoplasma procedente de la región del Noroeste Argentino (NOA)	98
6.2. Estructura genética de <i>C. quinoa</i> en el Noroeste Argentino (NOA).....	101
6.3. Diversidad genética y molecular del germoplasma procedente del resto de Sudamérica en comparación con las poblaciones de quinoa nativa del Noroeste Argentino (NOA)	108
6.4. Microsatélites derivados de ESTs vs. microsatélites genómicos.....	117
7. Conclusiones	120
7.1. Proyecciones.....	123
8. REFERENCIAS.....	125
9. ANEXO	144

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

La biodiversidad presente en los ecosistemas de América del Sur está determinada por una amplia riqueza de plantas adaptadas a las diferentes condiciones climáticas. Esta biodiversidad está asociada también a la existencia de centros de origen y diversidad de especies cultivadas, representando un papel fundamental para la seguridad alimentaria. La Región Andina forma parte de las “Américas”, cuatro regiones del continente Americano en donde ocurrieron eventos de domesticación independientes. Está conformada por un conjunto de montañas, mesetas y valles que se extiende sobre el oeste de América del Sur y presenta una amplia variabilidad ambiental. En la Región Andina la agricultura se inició probablemente en los valles interandinos extendiéndose hacia las tierras más altas (Tapia & Fries, 2007). Según registros arqueológicos el uso de especies cultivadas data desde hace 7000 años, sin embargo, restos de *Chenopodium quinoa* Willd. (Quínoa) aparecen entre 4000 y 5000 años antes del presente (Pickersgill, 2007).

Utilizada como un cereal y cultivada desde el sur de Chile al norte de Colombia (Figura 1), la quínoa fue uno de los principales cultivos y alimentos de las sociedades andinas (Tapia et al., 1979) convirtiéndose en la principal fuente de proteínas en el altiplano por su capacidad de crecer en altura y ambientes extremos, una zona donde la disponibilidad de proteína de origen animal era limitada. De acuerdo a crónicas del período posterior a la Conquista, la papa, el maíz y la quínoa eran los tres alimentos principales almacenados en ese entonces por las comunidades del lugar (Cusack, 1984). Garcilaso de la Vega (1609) menciona que “*El segundo lugar entre los cereales que crecen en la superficie (luego del maíz) es dado a lo que ellos llaman quinua*” (Cusack, 1984). Desplazada luego por cereales introducidos, principalmente trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare*), el cultivo de la quínoa quedó marginado (Tapia, 1990).



FIGURA 1: Distribución de la quínoa desde tiempos precolombinos. El patrón más denso de puntos indica las zonas actuales de mayor producción (NRC, 1989).

Desde la segunda mitad de la década del 60 se inició la revalorización del grano de quínoa en los países andinos a partir del estudio de su potencial nutritivo, sin embargo tuvo un papel marginal hasta mediados de los años 80. A partir de entonces el incremento de la demanda de quínoa ha llevado a la multiplicación de la superficie cultivada y de su producción principalmente en el altiplano de Bolivia, Perú (Laguna, 2002) y más recientemente Ecuador. De acuerdo a estimaciones de la FAO, la superficie cosechada de quínoa en el año 2011 totalizó 101.527 ha, de las cuales Bolivia concentró el 64 %, Perú el

35 % y Ecuador el 1 %, y se produjeron 80.241 tn. Perú es el país que registra los mejores rendimientos, por lo que concentra el 52% de la producción. En el año 2010 Bolivia exportó el 40% de su producción, a un precio de USD 1330 la tn, aproximadamente, generando importantes ganancias para el país (FAO Statistics Division, 2013). La Asociación de Exportadores de Perú informó que desde el 2006 se registra un incremento en las exportaciones de quínoa. En el año 2012 la quínoa se exportó a 13 países del mundo concentrando Estados Unidos el 62 % de la exportación, seguido por Israel, Australia y Canadá. Además figuraron entre los compradores Bélgica, Alemania, Italia y Reino Unido, entre otros (exportacionesdelperu.blogspot.com.ar/quinua, 2013)

En el último censo agropecuario de Ecuador, la superficie sembrada de quínoa era de alrededor de 1300 hectáreas con una producción de 1050 toneladas, de las cuales el 80% corresponde a producción orgánica. Aunque el cultivo se realiza principalmente para autoconsumo, existen fincas que lo destinan a la producción comercial y algunos grupos de productores se nuclean para la comercialización al exterior (Junovich, 2003). Desde 1990, en Chile una cooperativa agrícola ubicada en la región VI (Región del Libertador Bernardo O'Higgins) ha orientado sus ventas al mercado de exportación, siendo Canadá su principal destino. En el mercado interno de ese país las ventas han ido aumentando de 14 tn en 2004 a 120 tn el 2008, a consecuencia de una mayor difusión de las propiedades alimenticias de la quínoa.

1.2. Quínoa en Argentina

La siembra de quínoa en Argentina se realiza en Salta y Jujuy principalmente, y Catamarca y Tucumán, en menor medida. Estas cuatro provincias forman parte de la región del Noroeste Argentino (NOA) (Figura 2). La zona donde se cultiva quínoa es un área pequeña en comparación con la superficie del cultivo en países como Bolivia y Perú; sin embargo, presenta ambientes y paisajes muy contrastantes en distancias reducidas. El oeste del NOA está recorrido por cordones montañosos de la cordillera y pre - cordillera de los Andes. En cuanto a su relieve presenta una gran meseta situada a 3800 metros (la

Puna) y una serie de mesetas con altura media entre 3000 y 3500 m. Al norte del paralelo 27° S se extiende la Puna formando un continuo con el Altiplano Boliviano al norte y la Puna de Atacama al oeste, en Chile. Varios de los picos cordilleranos superan los 6000 msnm. El clima es árido con gran amplitud térmica, heladas frecuentes y baja precipitación (desde ausencia de lluvias en el SO hasta 300 - 400 mm al año en el NE). Hacia el este, el límite de la Puna es la Cordillera Oriental, continuación de la Cordillera Peruana Oriental y la Cordillera Central Boliviana. Ingresa a Jujuy como sierra de Santa Victoria, y a partir del Abra de Tres Cruces (22, 54 °S y 65, 34 °O) se separa en dos cordones principales en dirección Norte-Sur, el Occidental con picos de gran altitud, algunos con nieves permanentes (sierras de Aguilar –de más de 5000 m de altura- y de Chañi –que culmina en el nevado de Chañi de 6200 m, la mayor altura de Jujuy) y el Oriental (sierras de Zenta y Tilcara) de menor altitud (la altura promedio de los valles donde se hace agricultura es de 2500 msnm) con un clima más húmedo. Este cordón Oriental termina de enmarcar por el naciente a la Quebrada de Humahuaca, el elemento más característico de este sistema que separa a los encadenamientos nombrados, además de valles y quebradas menores, atravesadas por ríos que descienden desde la Puna (Lorenzini et al., 1999). En la provincia de Jujuy la Quebrada de Humahuaca, surcada en toda su longitud por el Río Grande, constituye la conexión principal entre el altiplano boliviano y las tierras bajas al este. En ésta zona la red hidrográfica está jerarquizada, ya que todas las quebradas secundarias son recorridas por cauces menores, conectados posteriormente por el Río Grande. La temperatura media anual varía entre 12 y 14 °C, y la precipitación entre 150 y 190 mm; además ocurren frecuentes vientos que se orientan en el sentido de las quebradas. Las tierras agrícolas quedan enmarcadas por los ríos, donde se cultiva con y sin riego. Hacia el sur, en la provincia de Salta, se encuentra otra región de valles secos conocida como Valles Calchaquíes cuyas características climáticas son semejantes a aquellas de la Quebrada de Humahuaca (Bianchi et al., 2005). Hacia el este de la Cordillera Oriental se encuentran las Sierras Subandinas, bajas y paralelas en sentido noreste – sudoeste, continuando por el

norte en Bolivia y Perú, donde el clima es subtropical con abundantes lluvias. En contraposición, hacia el este se continúa con la parte occidental de la región Chaqueña, poco poblada, presentando un bosque xerófilo.

La quínoa cultivada está distribuida en todos estos ambientes hacia el oeste en la aridez y altitud de la Puna, en las laderas orientales de la cordillera Oriental y entre estos dos extremos en la Quebrada de Humahuaca y los Valles Calchaquíes (Curti et al., 2010). Se distinguen la Quebrada de Humahuaca y la Puna Jujeña, próxima a la ruta panamericana, como localizaciones donde el cultivo de quínoa está orientado hacia su comercialización y utilizándose muchas veces semillas de origen boliviano (Vorano & García, 1976, obs. pers.). En otras zonas aisladas, donde se realiza agricultura con fines de subsistencia, es posible encontrar quínoa en pequeñas parcelas, con frecuencia en inter-siembra con papa o como borde de parcela (Vorano & García 1976; Mujica et al., 1999). Fuera de la región del NOA se pueden encontrar cultivos de quínoa en la provincia de Chubut (Gallardo, com. pers., 2011).

Tanto los granos como las hojas de quínoa son empleados en la preparación de alimentos (guisos, estofados, bocadillos, etc.); en los pueblos ubicados en el departamento de Santa Victoria (Salta) el consumo de alimentos preparados en base a quínoa es muy frecuente. Además de ser una fuente de alimento, son varios los usos que se le dan a la quínoa: la planta entera (cosechada en algunas ocasiones antes de floración) y/o los tallos se utilizan en la elaboración de llipta o lejía (uso alternativo al bicarbonato como mordiente para coquear). El agua de lavado de los granos es empleada ocasionalmente para lavar prendas e higiene personal. Algunos agricultores emplean un macerado de los residuos livianos de la trilla para el control de plagas en su cultivo de quínoa (Bertero, 2002). Algunas prácticas sugieren un fuerte significado simbólico de la quínoa en la región: el guiso de quínoa es la comida con la que el dueño de una casa invita a aquellos vecinos que participaron de una minga, para reparar los techos de una casa. Además, las semillas de quínoa se utilizan en los ritos funerarios: cuando alguien muere se colocan en los bolsillos como “dinero” para llevar al otro mundo. El tipo de uso puede estar asociado con el cuidado

que los agricultores tienen al seleccionar sus semillas por tamaño y color. El uso sostenido en el tiempo de diversos cultivos por los agricultores en sus fincas es una forma reconocida de conservación *in situ* y por lo tanto considerada como un medio para mantener procesos evolutivos y de adaptación dinámica de los cultivos a sus entornos (Thomas et al., 2011). La siembra de quínoa en cultivos aislados, fundamentalmente para autoconsumo, parece haberse mantenido durante las últimas décadas entre los agricultores del NOA, y comenzado a modificarse a partir del ingreso de la quínoa en el mercado mundial, principalmente de aquella producida en la región cercana al Salar de Uyuni, Bolivia. En el año 2010 se documentó una experiencia de promoción del cultivo de quínoa entre productores del departamento de Yavi, en Jujuy, con el objetivo de constituir un espacio de trabajo y fomentar el consumo local, revalorizar la quínoa tanto en relación a sus propiedades alimenticias como culturales y mejorar o reconstruir el manejo agronómico. Una de las principales dificultades mencionadas fue la falta de semillas de variedades adaptadas a la zona, debido a la inexistencia de producción local para la escala planteada, debiéndose importar de Bolivia (Golsberg et al., 2010). Entre los aspectos a superar a corto plazo se expresó la necesidad de una maquinaria que facilite la poscosecha para obtener un producto con mayor rentabilidad. Durante el 2012 se desarrolló un prototipo de máquina para la trilla y el venteo de quínoa, aumentando la calidad del producto cosechado y por ende su rentabilidad (INTA Informa, 2012).

La recuperación del interés en quínoa implica un riesgo potencial de erosión genética del germoplasma nativo. El reconocimiento de éste riesgo, además de la falta de documentación sobre las prácticas de uso y cultivo en la zona, motivaron el inicio de esfuerzos sistemáticos de colección, caracterización y conservación de germoplasma del Noroeste Argentino. Esto se logró inicialmente mediante la recuperación de germoplasma local conservado en colecciones de Perú, Bolivia y Estados Unidos, seguido por viajes de colección entre los años 2001 y 2007 (Bertero, com. pers., 2008).

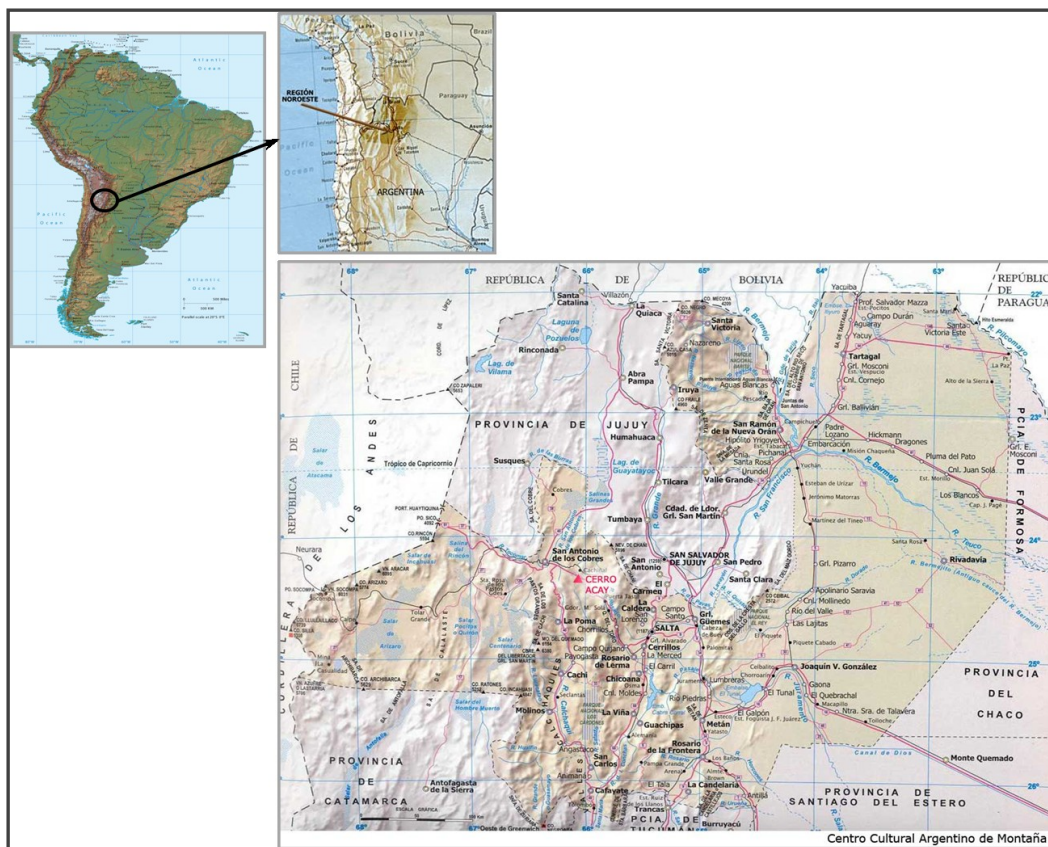


FIGURA 2: Región del Noroeste Argentino (tomado de <http://rutanacional40.com/Mapas.asp>).

1.3. La especie *Chenopodium quinoa* Willd.

1.3.1. Características botánicas y morfológicas

La especie pertenece a la familia de las Amarantáceas, sub-familia Chenopodioideae. Es una planta herbácea de desarrollo anual, dicotiledónea, erguida de variada altura dependiendo del genotipo, de las condiciones ambientales donde crece y de la fertilidad de los suelos. El período vegetativo varía desde los 90 hasta los 240 días. La coloración varía según los genotipos y etapas fenológicas, desde el verde hasta el rojo, pasando por el púrpura oscuro, amarillento, anaranjado y granate (Mujica, 1989). Posee un sistema radicular pivotante, bastante ramificado y fibroso. Tiene un tallo erecto, cilíndrico en el cuello de la planta y anguloso a partir de las ramificaciones. Es de color verde (a veces con estrías o líneas rojas), rojo o amarillo. Las hojas son alternas, de longitud variable dentro de la misma planta, la lámina es polimorfa (Tapia et al., 1979) y la morfometría es variable

según el genotipo. La inflorescencia es una panoja (Figura 3) de 15 a 70 cm de longitud con un eje principal del cual se originan ejes secundarios y terciarios (Risi & Galwey, 1984). Fueron descritos dos tipos de inflorescencia para quínoa: amarantiforme y glomerulada, dependiendo de la inserción del glomérulo. Las flores son incompletas ya que carecen de pétalos; el glomérulo puede presentar flores perfectas y pistiladas. La flor perfecta presenta un perigonio sepaloide, anteras y un ovario superior del cual emergen dos o tres estigmas (Hunziker, 1943). En general las flores perfectas están ubicadas en el extremo distal del glomérulo sobresaliendo sobre las pistiladas, ubicadas en el extremo proximal (Gandarillas, 1979).

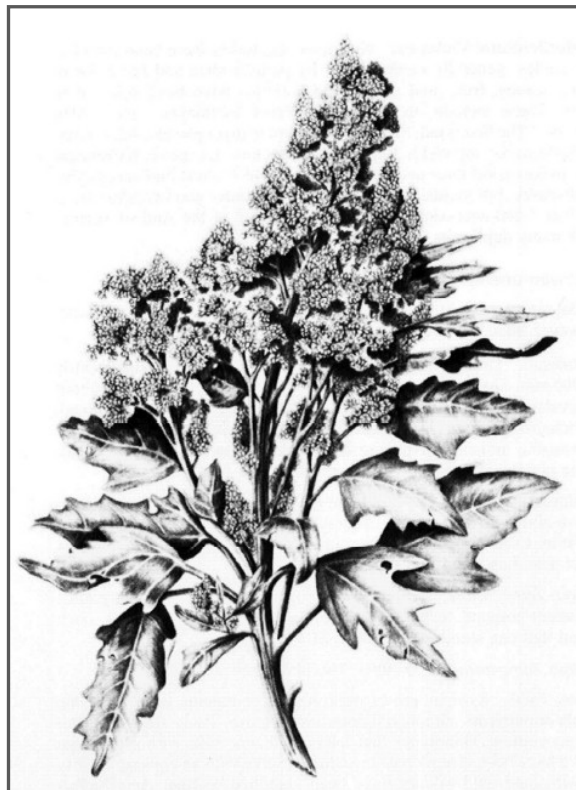


FIGURA 3: Ilustración de la panoja de *C. quinoa* (NRC, 1989).

El fruto es un aquenio, tiene forma elipsoidal o redonda de diferentes colores dado por el perigonio que lo recubre y que se desprende fácilmente cuando está seco. El pericarpio del fruto está pegado a la semilla (a veces se separa fácilmente) y es donde está presente la saponina, un antinutriente que le transfiere sabor amargo; la semilla está envuelta por el episperma en forma de una delgada membrana. El embrión está formado por

un eje hipocotile-radícula y los cotiledones, que envuelven al perisperma como un anillo. El perisperma es almidonoso, generalmente de color blanco, y constituye la mayor parte de la semilla (Figura 4). Los diferentes colores del perigonio, pericarpio y episperma hace que la inflorescencia de quínoa presente colores muy variados (Figura 1.5) (Gandarillas, 1979).

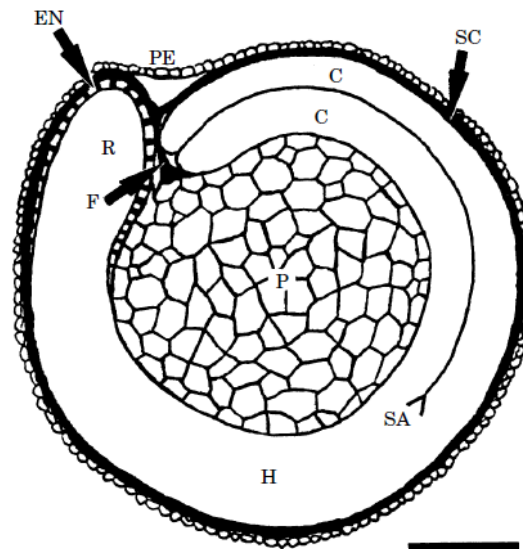


FIGURA 4: Sección media longitudinal del grano de *Chenopodium quinoa*. Se observa el pericarpio (PE) que cubre la semilla; el embrión consiste en un eje hipocotile-radícula (H) y dos cotiledones (C). El endosperma (EN) está presente en la región micropilar. F, funículo; P, perisperma; PE, pericarpio; R, radícula; SA, brote apical. Barra 500 μm (Prego et al., 1998).



FIGURA 5: (a) Cultivo de quínoa Real en Bolivia, panojas de quínoa en pie y semillas (Fotos propias). (b) Quínoa en la Quebrada de Humahuaca, Jujuy, Argentina (gentileza Dr. Ramiro Curti).

1.3.2. Características nutricionales

Las semillas de quínoa poseen un elevado nivel de proteínas citándose diferente rango de valores según los estudios. Mayormente el contenido varía entre 13 % y 18 % siendo 15 % el promedio (De Bruin et al., 1963; Koziol, 1992; Wright et al., 2002). Esta proteína es de buena calidad ya que contiene altos niveles de aminoácidos esenciales como la lisina (7,9 % / g de proteína) y metionina (4,5 % / g de proteína), los cuales usualmente se encuentran en menor cantidad en los granos de cereales y legumbres (Ruas et. al., 1999). La mayoría de las semillas de quínoa maduras contienen en el pericarpio compuestos triterpenoides no nutricionales denominados saponinas. Estos compuestos afectan la digestibilidad y la absorción de nutrientes, por lo que deben ser eliminadas antes de su consumo. También se la considera como una de las mejores fuentes de concentrado de proteína en hoja teniendo un gran potencial como sustituto de proteína en alimentos y de aplicación en la industria farmacéutica (Carlsson R., 1989).

En los últimos años hubo un notorio avance en la investigación de la especie en el campo de la nutrición. González et al., (2011) estudiaron la variación en la producción de semilla, contenido total de proteína y composición de aminoácidos de diferentes genotipos procedentes de dos regiones agroecológicas diferentes encontrando una clara diferencia para los tres parámetros medidos entre los genotipos de las dos regiones, siendo la composición de aminoácidos lo más afectado. El estudio reveló que factores climáticos y del ambiente tuvieron influencia en la composición nutricional de la quínoa. También se abordaron aspectos bioquímicos del efecto de las semillas de quínoa o extractos hidrolizados de semilla en distintos procesos metabólicos en roedores con el objetivo de la aplicación de éstas sustancias en nutrición humana (Paško et al., 2010; Meneguetti et al., 2011). El desarrollo de distintas formulaciones con harina de quínoa además de amaranto (*Amaranthus sp.*) y trigo sarraceno (*Polygonum fagopyrum*) para el desarrollo de alimentos libre de gluten ha sido últimamente un tema muy estudiado (Villaruel et al., 2009; Del Castillo et al., 2009; Alvarez-Jubete et al., 2010; Schoenlechner et al., 2010). Los panificados desarrollados a partir de estas formulaciones muestran niveles más altos de

proteína, grasa, fibra y minerales ajustándose a las recomendaciones nutricionales de las dietas libres de gluten.

1.3.3. Ploidía

El número de cromosomas de la especie es $2n = 36$. Siendo el número básico de cromosomas para el género *Chenopodium* $x = 9$ (Nelson, 1968), la quínoa ha sido asumida como un tetraploide. Mediciones en la relación de la longitud de los brazos cromosómicos en quínoa indican alopoliploidía (Catacora, 1977). Ward (2000) estudió la segregación de tres caracteres agronómicos observando herencia disómica y tetrasómica, propio de un organismo alopoliploide, dependiendo del genotipo de los parentales utilizados en cada cruzamiento. En ese trabajo se indica que las segregaciones obtenidas en los caracteres estudiados, como único indicador, no dan soporte a que el modelo de herencia de la quínoa sea funcionalmente diploide. En un mapa de ligamiento desarrollado por Maughan et al., (2004) basado en marcadores moleculares de ADN (RAPD; AFLP y SSR), de los 21 marcadores microsatélites (SSR) identificados como polimórficos, la mitad produjeron un patrón de bandas monogénico y fueron codificados fácilmente como co-dominantes. De los marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) testados, solo el 4,2 % de los *loci* mostró una segregación distorsionada ($p < 0,05$) y un 0,7 % con $p < 0,01$, respecto de la proporción esperada para caracteres mendelianos (3:1 ó 1:2:1). Estos resultados mostraron que, para el set de datos obtenidos no hay evidencia estadísticamente significativa que apoye una desviación del modelo de segregación disómica. Además, Maughan et al., (2004) atribuyen como posible que la pequeña distorsión obtenida en la segregación de los marcadores moleculares puede ser producto de la segregación tetrasómica a partir del apareamiento multivalente errático durante la meiosis, reportado por Ward (2000).

1.4. Caracterización y conservación de la variabilidad genética

La conservación y caracterización de los recursos fitogenéticos, definido por la FAO como cualquier material genético de origen vegetal con valor real o potencial para la alimentación y la agricultura, tiene una importancia central ya que son fuente de caracteres

necesarios para llevar adelante cualquier proceso de fitomejoramiento (Scocchi & Rey, 2004). Una evaluación precisa de la magnitud y el patrón de organización de la diversidad genética de los individuos, grupo de individuos o poblaciones conservadas es fundamental para entender la estructura genética e identificar de manera confiable cada genotipo, facilitando: (i) el conocimiento de la variabilidad de los cultivares (Smith, 1984; Cox et al., 1986) (ii) la identificación de genotipos parentales que resulten en progenies con el máximo nivel de variabilidad para continuar con la selección (Barrett & Kidwell, 1998) y (iii) la introgresión de genes deseables en un genotipo o en un fondo genético de interés (Thompson et al., 1998).

La caracterización y evaluación de germoplasma puede realizarse utilizando diferentes metodologías (de Vicente et al., 2004). La evaluación de caracteres morfológicos o caracteres agronómicos de tipo cuantitativo y/o cualitativo visualizada a través del fenotipo es una de las técnicas más utilizadas. En este proceso se debe tener en cuenta la influencia del ambiente en la expresión fenotípica, por lo que muchos caracteres se expresan recién en el estadio de planta adulta prolongando los tiempos de evaluación; además, no toda la variación genética está expresada en el fenotipo en el momento en que se mide el carácter de interés. Estos caracteres pueden ser limitados en número y en algunos casos presentar bajos niveles de polimorfismo. Es por ello que la caracterización molecular es un complemento a la caracterización tradicional del fenotipo, de mayor sensibilidad para detectar cambios en el genotipo (Fernández, 2004).

En la caracterización molecular de un individuo, la detección del polimorfismo es mediante la observación de patrones electroforéticos diferenciales resultado de diferencias en el tamaño de los fragmentos de ADN, producidos a través de diferentes tecnologías: digestión del ADN con enzimas de restricción (RFLP: *Restriction Fragment Length Polimorphism*) o amplificación vía PCR (en castellano: Reacción en Cadena de la Polimerasa); por ejemplo SSR o RAPD (SSR: *Simple Sequence Repeat*; RAPD: *Random Amplified Polimorphism DNA*, respectivamente) o bien la combinación de ambos métodos (AFLP: *Amplified Fragment Length Polimorphism*) (Pica et al., 2004). La amplificación del

ADN utilizando PCR ha tenido gran difusión en la caracterización y evaluación de la variabilidad genética de las especies. El empleo de marcadores moleculares para la caracterización del germoplasma vegetal así como también para la estimación de parámetros genéticos de poblaciones conservadas, como ser: el grado de heterocigosis, el flujo de genes, la diferenciación genética de unidades taxonómicas, ha tomado un rol creciente en la evaluación y manejo de los recursos genéticos vegetales conservados en los Bancos de Germoplasma a nivel mundial. Las relaciones genéticas y las distancias entre individuos obtenidas a través de estudios de diversidad pueden ser explotadas para aprovechar el potencial de cada población (Spooner et al., 2005). La información generada por los marcadores resulta de inmediata aplicación en el diseño de diferentes actividades: dónde coleccionar, qué intercambios realizar, que accesiones conservar (identificación de duplicados en las colecciones, monitoreo de los cambios en la composición genética que puedan ocurrir durante la multiplicación o preservación de los materiales), conocimiento del nivel de diversidad genética de la colección y definición de una distribución eficiente de los recursos genéticos hacia los usuarios (Carrera et al., 2004).

1.4.1. Marcadores moleculares microsatélites

Uno de los marcadores moleculares más robustos y polimórficos son los SSR ó microsatélites; son regiones del genoma constituidas por repeticiones en tandem 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 (Figura 6). Los SSR se distribuyen a través del todo el genoma de un organismo tanto en regiones codificantes como no codificantes. Se amplifican mediante la técnica de PCR utilizando *primers* o cebadores específicos de 18 a 25 pb que resultan complementarios a las regiones flanqueantes del *loci* microsatélite. Se clasifican de acuerdo a la composición del motivo como Simples [Ej. (TA)_n, (CGA)_n, etc.] ó Compuestos [Ej. (TA)_n(AGT)_n]; Perfectos (sin interrupciones en el motivo) ó Imperfectos [con alguna interrupción, por ejemplo: (TA)_nC(TA)_n, (CGA)_nT(CGA)_n, etc.] (Oliveira et al., 2006).

Los SSR se caracterizan por ser altamente polimórficos, codominantes (permite conocer si el locus es homocigota o heterocigota) y permiten analizar un único locus del conjunto de homeoloci de una especie poliploide; son muy abundantes y se encuentran uniformemente distribuidos en el genoma, brindando una amplia cobertura (Pica et al., 2004; Oliveira et al., 2006). Los SSR genómicos se desarrollan a partir de la construcción de genotecas, utilizando el aislamiento y secuenciación de clones de ADN conteniendo posibles SSR, y se diseñan *primers* o cebadores flanqueantes a éstas regiones. Requieren baja cantidad de ADN como molde y, al amplificarse la secuencia de un locus conocido utilizando *primers* específicos, es posible trabajar con temperaturas elevadas generando resultados reproducibles. La inversión inicial de recursos económicos para su desarrollo y la experiencia técnica requerida para el clonado y secuenciación de los *loci* SSR de la especie en estudio puede representar un limitante (Guo et al., 2007). Sin embargo, una vez desarrollada la herramienta es posible su automatización y reproducibilidad entre distintos laboratorios.

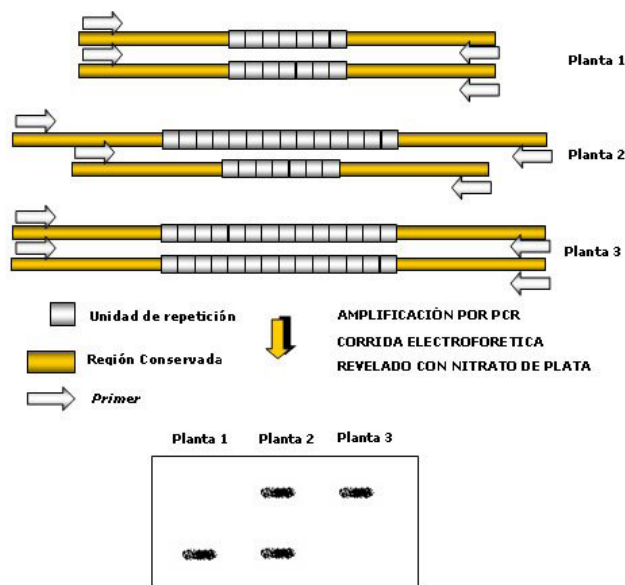


FIGURA.6: Esquema representando una región microsatélite como marcador molecular (gentileza Dra. Carla Arizio).

1.4.2. Desarrollo de marcadores microsatélites a partir de secuencias de ADN que se expresan (EST)

La implementación de proyectos de secuenciación masiva de genomas, conjuntamente con el desarrollo de nuevos equipos y de herramientas bioinformáticas para el análisis de grandes volúmenes de información, ha dado lugar a una nueva generación de marcadores. En particular, los EST-SSR son marcadores que se desarrollan a partir de EST (Expressed Sequence Tags). Los EST son secuencias de ADN entre 200 a 500 nucleótidos de longitud que son generadas a partir de la conversión de ARN mensajero (ARN_m) a ADN copia (ADN_c) mediante la enzima Transcriptasa Reversa. El ADN_c es una molécula mucho más estable en el medio extracelular y, al ser generado de un ARN_m en el que los intrones han sido removidos, representa solo la secuencia de ADN que se expresa. Permiten detectar diferencias a nivel de los genes que se están expresando, haciéndolos aplicables al estudio funcional de los genomas. La disponibilidad de secuencias en bases de datos públicas permite el desarrollo de marcadores in silico, lo que representa una ventaja frente a los SSR genómicos por su bajo costo. Además, los EST-SSR tienen mayor tasa de transferibilidad intraespecífica, por estar diseñados a partir de regiones codificantes y por lo tanto más conservadas en el genoma (Varshney et al., 2005). Los fragmentos corresponden a secuencias que se expresan en las células de ciertos tejidos u órganos de diferentes organismos. (Figura 7).

La disponibilidad de secuencias en las bases de datos hace que la búsqueda de SSR y diseño de *primers* sea un proceso rápido. En un estudio de revisión sobre los progresos en el uso de microsatélites en plantas se comparan los EST-SSR y SSR genómicos. Si bien el polimorfismo detectado en los EST-SSR es menor, tiene mayor poder de transferibilidad intraespecífica; el menor costo y labor para su desarrollo, en comparación con los SSR genómicos, justifica su uso ya que ambos tipos de marcadores son de gran utilidad en tareas de selección asistida por marcadores (MAS) (Kalia et al., 2011). Esta metodología se ha utilizado en muchas especies incluyendo girasol (Paniego et al., 2002), pasto llorón (*Eragrostis*) (Cervigni et al., 2008), caña de azúcar (Cordeiro et al., 2001), trigo (Yu et al.,

2004; Zhang et al., 2005), cebada (Chabane et al., 2005), centeno (Hackauf & Wehling, 2002), entre otras.

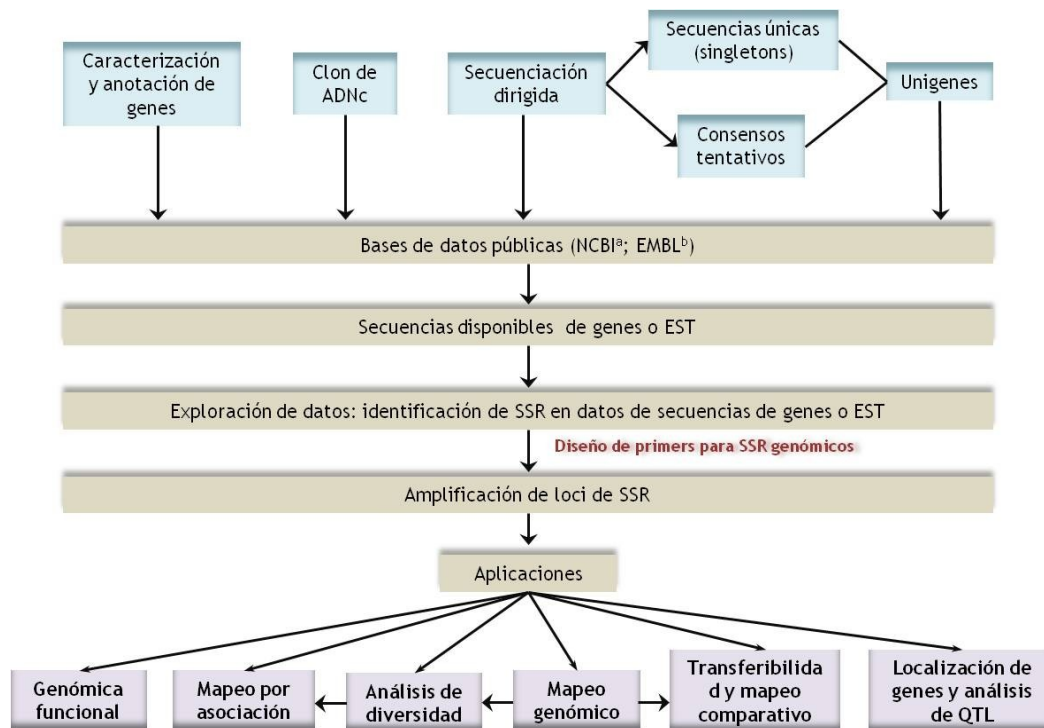


FIGURA 7: Representación esquemática del desarrollo y aplicación de marcadores SSR de genes y/o EST.

^ªNCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA; <http://www.ncbi.nih.gov/>); ^ᵇEMBL, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany (<http://www.embl-heidelberg.de/>). Estas bases de datos pueden ser utilizadas para descargar secuencias o EST que se encuentren disponibles en el dominio público (Adaptado de *TRENDS in Biotechnology*, Varshney et al., 2005).

1.5. Antecedentes

1.5.1. Diversidad genética y estructura poblacional en plantas

La distribución de la variación genética dentro de las especies es resultado de una combinación de procesos a nivel poblacional incluyendo mutaciones, deriva genética, flujo génico, dispersión y demografía (Wang, 2010), cuyas señales podrían captarse a nivel molecular con marcadores moleculares que presenten distinta tasa de mutación (Thomson et al., 2010 en Wang, 2010). El análisis molecular permite conocer la estructura genética de cada una de las poblaciones conservadas en una colección de germoplasma pudiendo describirla posteriormente en función del nivel de polimorfismo, la riqueza alélica, el grado

de heterocigosidad, o la frecuencia de alelos raros, entre otros parámetros. Una vez que se conoce la estructura genética de cada población pueden estimarse las relaciones genéticas entre ellas, y el grado de diversidad. Además, es posible identificar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones según su origen geográfico, lo que permite conocer el patrón de distribución geográfica de la variabilidad genética (Ligarreto, 2003).

Los microsatélites pueden proveer información relevante para identificar unidades de conservación y para investigar procesos genéticos que tuvieron lugar en las poblaciones, tales como flujo de genes, la generación de “genetic neighborhoods” o grupos genéticos y la incidencia de la deriva génica (Oliveira et al., 2006) mediante el análisis de diferentes parámetros. Son muy empleados en plantas silvestres y cultivadas por su naturaleza codominante y alto poder informativo, pudiendo detectar procesos microevolutivos recientes y en curso (Knowles, 2009). Se han utilizado para determinar la magnitud de la diversidad genética de poblaciones locales (landraces) y definir áreas de conservación de germoplasma, como en *Triticum turgidum* (Mondini et al., 2010), definir grupos genéticos o razas de maíz (*Zea mays*) nativas del NOA (Lia et al., 2009), detectar flujo génico entre grupos de poblaciones de *Phaseolus vulgaris* (Asfaw et al. 2009) y *Aegilops tauschii* (Naghavi et al., 2010) y para determinar la estructura genética en poblaciones naturales de *Chamaecyparis obtusa*, una especie arbórea (Matsumoto et al., 2010), entre otros.

Otra característica importante de los marcadores SSR es la posibilidad de transferibilidad entre genomas de especies vegetales del mismo género o familia donde el éxito en la amplificación es inverso a la distancia evolutiva entre las especies. Los primeros trabajos de transferibilidad se reportan en especies de gramíneas a partir del conocimiento de alto grado de colinealidad entre los genomas (Wang et al., 2005; Kuelung et al., 2006), siguiendo en otras especies como *Phaseolus coccineus* un pariente cercano al *P. vulgaris*, pudiendo utilizar los marcadores de *P. vulgaris* en individuos silvestres (Spataro et al., 2011).

1.5.2. Caracterización conjunta de germoplasma

Las colecciones de recursos fitogenéticos han sido desarrolladas para ser utilizadas, fundamentalmente, en el mejoramiento genético, y no simplemente para ser conservadas en los bancos de germoplasma. Como se dijo anteriormente, para la caracterización de germoplasma pueden utilizarse características morfológicas, fenológicas y de adaptación, además de los marcadores moleculares o bioquímicos. Aunque la caracterización molecular ofrece una serie de ventajas, no necesariamente sustituye a la realizada con características morfológicas y agronómicas, ya que los dos tipos de información tienen historias evolutivas diferentes y pueden estar mostrando facetas diferentes de la diversidad. Desde el punto de vista del mejoramiento genético, la información sobre caracteres morfológicos y agronómicos es insustituible, ya que incorpora variantes en estos caracteres que es en muchos casos el objetivo de los programas (Peñaloza et al., 2010)

En muchos estudios la caracterización molecular ha sido complemento de otras caracterizaciones (agronómica, fenológica, etc.), pudiendo contrastar el ordenamiento obtenido en cada caracterización o bien generar información complementaria para la selección de genotipos. En colecciones conservadas en bancos de germoplasma la evaluación conjunta es poco frecuente, sin embargo permite describir las accesiones de manera completa aumentando las posibilidades de su uso en programas de fitomejoramiento. En algunos trabajos de caracterización conjunta el análisis de datos de cada caracterización se realiza por separado, comparándose luego los resultados obtenidos en cada una (Routray et al., 2007; Lattoo et al., 2008; Bagavathiannan et al., 2010). Para realizar el análisis de datos procedente de distintas caracterizaciones de manera simultánea una de las herramientas propuesta es el Análisis de Procrustes Generalizado (APG; Gower, 1975). Este análisis permite representar las relaciones entre diferentes taxa (ó OTU: Unidad Taxonómica Operacional) a través de una armonización de las configuraciones individuales obtenidas. Bramardi et al., (2005) aplicaron APG para evaluar simultáneamente accesiones de pepino (*Cucumis sativus* L.) caracterizadas con marcadores RAPD, variables cuantitativas y variables cualitativas generando un ordenamiento consenso de las

accesiones. Este tipo de análisis constituyen una aproximación para futuros análisis de asociación entre caracteres.

1.5.3. Caracterización, variabilidad y relaciones genéticas de C. quinoa.

La quínoa se encuentra distribuida en un área extensa, desde el sur de Colombia hasta el centro sur de Chile, en un amplio rango de ambientes (desde el nivel del mar - Costa Chilena- hasta alrededor de los 4000 m. s. n. m.). En Colombia fue cultivada, utilizada y diseminada por los Chibchas a través de la sabana de Bogotá (Pulgar Vidal, 1954); en Ecuador ha sido cultivada principalmente en la región montañosa central. En Perú, se cultiva tanto en los valles inter-andinos como en el Altiplano central, en la zona montañosa árida y en la región de la costa. En Bolivia está distribuida en el Altiplano, en los valles inter-andinos y en localidades alrededor del Salar de Uyuni. En Chile fue cultivada por los Aymara en el norte, y su distribución se extiende hasta el centro- sur del país (47° de latitud), asociado a la cultura mapuche, presentando un patrón fragmentado (Fuentes et al., 2008). Actualmente, el cultivo se realiza al norte en el Altiplano Chileno (como continuación del Altiplano Boliviano), y hacia el sur a nivel del mar, en las regiones VI (Pichilemu) y VII (Cauquenes) y zonas alrededor de Concepción y Valdivia ubicadas en las regiones VIII y XIV, respectivamente (Mujica & Jacobsen, 2002). La existencia de prácticas culturales y agronómicas diferenciales entre las regiones mencionadas dio lugar a documentar tres sistemas agrícolas, aunque actualmente es la producción del altiplano la única censada por su importancia desde el punto de vista agrícola (Bécares & Bazile, 2009). En Argentina distintas fuentes indican que a la llegada de los conquistadores el cultivo de quínoa se extendía desde el noroeste hasta el territorio de las actuales provincias de Córdoba (Hunziker, 1952) y Santa Fé (Paucke, 1944). La evidencia arqueológica indica su presencia en las provincias de Mendoza y Salta 2000 años atrás (Hunziker 1943; Hunziker & Planchuelo 1971). Parodi, (1966) señaló su cultivo entre los 1200 y los 3600 m. s. n. m. en las provincias de Salta, Jujuy, Catamarca y Tucumán, y mencionó su cultivo por los Mocovíes de Santa Fé en el siglo XVIII. Mintzer, (1933) y Vorano & García (1976) mencionan su cultivo en pequeñas extensiones en la Puna de Jujuy y en la Quebrada de Humahuaca a partir de los 1500 m. s. n. m., asimismo

Hunziker (1943) menciona cultivos de quínoa en los valles Calchaquíes y en San Antonio de los Cobres (provincia de Salta). También los araucanos cultivaron la quínoa como recurso alimenticio en las proximidades del lago Nahuel Huapi (Hunziker, 1952), en la región de la Patagonia. Actualmente el área más importante de cultivo tradicional de quínoa se encuentra en las provincias de Salta, Jujuy y Catamarca, pertenecientes a la región del Noroeste Argentino (NOA), situada entre los 22 ° a 28 ° de latitud sur y los 62 ° a 69 ° de longitud oeste.

En todo el territorio sudamericano se realizaron colecciones de germoplasma de quínoa y otras especies del género *Chenopodium*, que actualmente se encuentran conservados en Bancos de semilla. Tomando como referencia los datos de Del Castillo et al. (2008) en Colombia hay conservadas 300 accesiones, en Ecuador 400, en Bolivia 5411, en Perú 2810, en Chile 73, en Brasil 800 y en Argentina 450.

La clasificación taxonómica la ubica en el género *Chenopodium*, perteneciente a la subfamilia *Chenopodioideae*, familia *Amaranthaceae* (Angiosperm Phylogeny Group 1998) que comprende más de 120 especies en 16 secciones. Las especies domesticadas de éste género han sido clasificadas dentro de la sección *Chenopodium* en dos sub-secciones: *Cellulata* ($2n=4x=36$) y *Leiosperma* ($2n=4x=36$). En Sudamérica se distinguen *C. hircinum* (silvestre) y *C. quinoa* (formas cultivadas y malezas acompañantes conocidas como “ajaras”), ambas de la sub-sección *Cellulata* (Wilson 1990). Al presente la clasificación vigente para la especie cultivada es la definida por Tapia, (1982) quien clasificó la quínoa en “ecotipos” según las cinco principales regiones donde se cultiva, proponiendo cinco grupos: de **Valle**, agrupa ecotipos de zonas mesotérmicas que crecen en los valles interandinos del sur de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia entre 2000 y 3500 metros de altura con precipitaciones moderadas (500 – 1500 mm anuales) y 3° C de temperatura mínima promedio, de grano pequeño con bajo contenido de saponina; de **Altiplano**, plantas que crecen en el Altiplano Central y Norte (3800 a 4100 m. s. n. m) a orillas del Lago Titicaca que comparte Perú y Bolivia, con precipitaciones que fluctúan entre 400 y 800 mm y una temperatura mínima media de 0° C; de **Salar**, cultivadas en el área circundante a los salares

del Altiplano sur boliviano y de la puna del norte de Chile (fronterizo con Bolivia y el Noroeste Argentino) y agrupa genotipos que se caracterizan por tolerar alta salinidad, (Tapia et al., 1979; Chilo et al., 2009), baja precipitación anual (de 50 mm a 400 mm) y -1° C de temperatura mínima media; **Sub-tropical** o de **Yungas**, que se cultivan en la vertiente oriental de los Andes de Bolivia (1500 - 2000 m. s. n. m.) con abundantes precipitaciones anuales (1000 a 2000 mm) y temperatura mínima de $\sim 11^{\circ}$ C y de **Nivel del Mar** que se cultivan a baja altura cerca del mar al sur de Chile hasta el paralelo 47° S, con clima lluvioso (1000 - 1500 mm anuales), temperatura mínima de 5° C y menores precipitaciones (400 mm) en el valle Central de Chile.

En las últimas décadas se condujeron varios estudios de caracterización de germoplasma sobre diferentes colecciones utilizando descriptores morfológicos (Risi & Galwey, 1989a, 1989b; Ortiz et al., 1998b; Rojas, 2003 a; Bhargava et al., 2006; Anabalón-Rodríguez & Thomet-Isla, 2009; Delgado et al., 2009; Fuentes & Bhargava, 2011; Curti et al., 2011) que permitieron determinar cuáles son las principales características agromorfológicas que contribuyen a la definición de grupos de genotipos. En simultáneo Wilson, (1988 a, b) utilizó marcadores moleculares (isoenzimas) y descriptores referidos a la morfología de hojas y frutos para hacer una caracterización del germoplasma de quínoa de Sudamérica. El uso de marcadores moleculares basados en ADN es la herramienta más reciente en este campo de la investigación en quinoa (ej. Ruas et al., 1999; Maughan et al., 2004; Del Castillo et al., 2006; Christensen et al., 2007; Fuentes et al., 2008).

Risi & Galwey (1989 a, b, c, d) caracterizaron una colección de 294 accesiones procedentes de Sudamérica (desde 2° N en Colombia hasta 40° S en el sur de Chile) con los descriptores definidos por el IPGRI (1981). El objetivo de los dos primeros trabajos fue determinar el grado de asociación entre las variables y cuáles eran las más determinantes en la separación de los ecotipos ya descriptos para la especie. Si bien no detectaron una fuerte asociación entre variables que pueda dar una descripción parsimoniosa de la colección en términos de unos pocos ejes, agruparon las entradas en categorías pero no pudieron determinar claramente si estas correspondían a distintos grupos de ecotipos.

Observaron una variación independiente de las variables relacionadas con el crecimiento y desarrollo, sugiriendo un buen margen sobre estas características para considerar en casos de selección de plantas para lograr la adaptación al entorno. Además, determinaron que la gran variación en diferentes características en el germoplasma de quínoa es un punto a favor para el desarrollo de genotipos ya que, por lo general, las accesiones comparten dos o tres características pero no tienen las demás en común y esto está disponible para una gama de combinaciones de genotipos, favorable para su explotación en diversos ambientes, sistemas agrícolas y demanda de mercados. En los trabajos siguientes aplicaron análisis multivariado sobre los datos de la caracterización pudiendo separar a grandes rasgos plantas grandes, de ciclos largos con hojas muy dentadas, de accesiones que produjeron inflorescencias grandes en ciclos más cortos, aunque no hubo un patrón claro en cuanto a la contribución de las variables sobre cada componente multivariada. Además observaron una combinación entre las características de las accesiones de Valle y Altiplano, éstas últimas parecen ser poco sensibles al fotoperíodo (Bertero et al., 1999). Ambos análisis confirmaron la homogeneidad relativa del grupo formado por los genotipos procedentes del Nivel de Mar. Rojas, (2003 a) caracterizó una colección de 1512 accesiones procedente de un rango geográfico entre 11° S en Perú y 43 °S en Chile, desde el nivel del mar hasta los 3885 m. s. n. m., entre las cuales había algunas entradas de Chile y Argentina (0,8 % de cada uno de estos dos países), pero la mayoría procedía de Bolivia (69 %) y Perú (29,4 %). A partir de un análisis de componentes principales determinaron una fuerte contribución de las variables relacionadas con la fenología del cultivo (tiempo hasta aparición del botón floral, antesis y madurez fisiológica), diferenciando accesiones más tardías y de bajo Índice de Cosecha (IC), de accesiones de ciclo corto y alto IC. Por otro lado, aplicando un análisis de agrupamiento no jerárquico, y utilizando sólo variables cualitativas, el germoplasma se agrupó en siete grupos de diferente nivel de diversidad, en los cuales la arquitectura de planta y la morfología de panoja fueron las variables más determinantes. Otra evaluación de germoplasma procedente de distintos orígenes de Sudamérica (27 accesiones de *C. quinoa* conservadas en Estados Unidos y Alemania) fue llevada a cabo por Barghava et al., (2007)

en las planicies del río Ganges, al norte de India. Posteriormente se realizaron distintas evaluaciones sobre colecciones de germoplasma más acotadas geográficamente, como los trabajos llevados a cabo por Anabalón-Rodríguez & Thomet-Isla, (2009) y Fuentes & Bhargava (2010) en germoplasma chileno y Delgado et al., (2009) con accesiones de quínoa colectadas en Colombia. Curti et al., (2011) caracterizaron 34 accesiones de *C. quinoa* colectadas en las provincias de Salta y Jujuy, en el Noroeste Argentino utilizando la lista de descriptores del IBPGR. De acuerdo a los datos de las variables cuantitativas y como resultado del análisis multivariado aplicado, las accesiones se diferenciaron en distintos grupos representando diferentes ambientes de la región del NOA: altiplano, valles secos centrales, valles orientales y una zona de transición entre ellos, mientras que el análisis de las variables cualitativas solo discriminó entre accesiones de los valles orientales y la zona de transición. Ambas caracterizaciones mostraron ser complementarias, en acuerdo con la baja correlación entre ellas. Otra observación destacable a partir de la caracterización es que las accesiones procedentes del altiplano y de los valles secos presentaron mayor grado de domesticación que el resto.

Como se mencionó anteriormente, los marcadores bioquímicos fueron la primera herramienta molecular utilizada para caracterizar el germoplasma de quínoa (Wilson 1988 a, b). En primera instancia la variación en el patrón electroforético de isoenzimas para 21 *loci*, junto con datos morfométricos de hojas y frutos se usó para un análisis comparativo de 98 poblaciones de *C. quinoa* representando el área de distribución en Sudamérica. El estudio reveló dos elementos fundamentales: uno de tipo costeño originario del suroeste de Chile y un tipo andino distribuido sobre los 1800 m, desde el NOA hasta el sur de Colombia, mostrando una distribución bi-modal (un grupo norteño y otro sureño). En el segundo trabajo, y con la misma metodología, comparó 99 poblaciones de quínoa andina domesticada y silvestre (“ajaras”) y algunas poblaciones de *C. hircinum*. Nuevamente las poblaciones provenientes de la parte alta de los Andes entre el NOA y Colombia mostraron estar muy relacionadas y separadas respecto al germoplasma de Chile y poblaciones silvestres *C. hircinum* originarias de Argentina. Se identificaron dos elementos principales

dentro de la subsección Cellulata para Sudamérica: *C. hircinum*, distribuida en planicies bajas del sureste de Sudamérica (Argentina, Uruguay y sur de Brasil) y en elevaciones medianas sobre laderas Andinas orientales y *C. quinoa* en el lado oeste de Sudamérica. Se descartó la inclusión de las poblaciones andinas dentro de la especie *C. hircinum*. La forma silvestre de quínoa, localmente denominada “ajara” o “aspha” mostró mayor afinidad con *C. quinoa* andina que aquella denominada localmente “quingua”, cultivada en baja altura en la costa chilena. Esta afinidad entre el patrón morfogenético de las poblaciones silvestres y domesticadas simpátricas del tipo andino refleja posible flujo genético entre ellas.

Rúas et al., (1999) y del Castillo et al., (2006) fueron los primeros en realizar estudios con marcadores moleculares de ADN distintos a los microsatélites. El trabajo de Rúas et al., (1999) abordó el estudio de las relaciones genéticas entre diferentes accesiones de quínoa (cultivadas y ajaras) y accesiones de otras especies del género *Chenopodium* distribuidas a lo largo del continente Americano mediante RAPDs (*Random Amplified Polimorphic DNA*). Mostró que el grupo de accesiones de *C. quinoa* se asemejaba más al de *C. berlandieri* spp. *nuttalliae* (huazontle), forma cultivada en Méjico mientras que una accesión de *C. berlandieri* spp. *berlandieri* de EEUU (forma silvestre) se encontraba más alejada. Accesiones de *C. pallidicaule* (cañihua) y *C. ambrosioides* (paico) se unieron a las especies de la sub sección *Cellulata / Favosa* a distancias mayores, en forma coherente con los criterios taxonómicos (Aellen & Just, 1943). Por su parte, Del Castillo et al., (2006), estudiaron la estructura genética de 8 poblaciones de quínoa del Altiplano Boliviano y valles de altura de ese país encontrando una fuerte estructuración geográfica, pudiendo diferenciar un grupo del Altiplano Norte y Central, otro de valles interandinos de altura (Potosí) y un tercero del altiplano sur (Salares). Anabalón-Rodríguez y Thomet-Isla (2009) utilizaron marcadores moleculares de ADN del tipo AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism) junto con descriptores morfológicos para evaluar variedades de quínoa del Norte y Centro de Chile, encontrando mayor diversidad genética en el germoplasma de Chile de lo que inicialmente se había supuesto en base a marcadores bioquímicos (Wilson, 1990). Esta variabilidad se atribuyó recientemente a la posibilidad de cruzamientos espontáneos entre quínoa, *C.*

hircinum y *C. album* en el sur de Chile (Jellen et al., 2011). Su análisis confirma la distinción entre materiales del centro y norte de Chile y distingue, por primera vez, dos grupos dentro de los materiales conocidos como de Nivel del mar: uno de costa, cercano al mar, y otro de pre-cordillera (cultivado entre 330 y 600 msnm).

A partir del desarrollo de marcadores microsatélites para quínoa (Mason et al., 2005) se pudieron realizar estudios más detallados de la variabilidad genética, además de generar el primer mapa de ligamiento incluyendo otros tipos de marcadores (Maughan et al., 2004). Evaluaron la amplificación de los SSR desarrollados en germoplasma de *C. quinoa* y se incluyeron a su vez otras especies relacionadas de *Chenopodium*. El 67 % de los SSR evaluados amplificaron en todas las especies. Respecto a la quínoa cultivada se analizaron 31 accesiones representantes de cuatro de los cinco ecotipos propuestos por Tapia (1982). El análisis de conglomerados permitió distinguir entre quínoas de Nivel del mar y Andinas, en acuerdo con los resultados de isoenzimas y lo estudiado en los trabajos de caracterización morfológica, aunque sin poder establecer una diferenciación geográfica dentro de estas últimas. Sin embargo, dentro del grupo de las quínoas andinas se visualizaron tres sub-grupos separados según los ecotipos incluidos (Salares, Andinas y Valle). La colección de germoplasma de quínoa del Departamento de Agricultura de los EEUU (USDA) y el Centro Internacional de la Papa (CIP-FAO), que incluye 143 accesiones, fue caracterizada posteriormente con 36 SSR (Christensen et al., 2007), detectando 420 alelos entre todas las accesiones con un promedio de 11 alelos por locus. El agrupamiento resultante fue similar al mencionado anteriormente: uno compuesto por accesiones de la zona Andina (Perú, Bolivia, Ecuador, Argentina y norte de Chile) y otro por accesiones de Nivel del mar, junto a un conjunto de materiales de origen desconocido. Estos marcadores fueron también utilizados por Fuentes et al., (2008), quienes caracterizaron accesiones de quínoa Chilena (31 de las tierras bajas del sur y 28 del altiplano norte) utilizando SSR con fluorescencia en reacciones de PCR multiplex, obteniendo información genética para 20 *loci* que resultaron altamente polimórficos (150 alelos en total con un promedio de 7,5 alelos por

locus). En ese trabajo las accesiones se agruparon en dos grupos: las originarias del norte (Andinas) y las accesiones del sur (de la costa).

Todos estos antecedentes muestran que la información dada por la caracterización molecular en quínoa se está incrementando. La región de NOA no ha estado adecuadamente representada en los estudios con marcadores moleculares previamente mencionados, dado que hasta hace algunos años no existía una colección representativa de los diferentes ambientes de cultivo incluidos en esta región. Esto constituye la justificación fundamental de este trabajo de tesis y es la base de las hipótesis y objetivos propuestos.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Según los antecedentes, la estructura genética de *C. quínoa* está influenciada en gran medida por el ambiente. Por lo tanto, la variabilidad genética y la distribución de las poblaciones de quínoa nativa del Noroeste Argentino estarían influenciadas por la variación en las condiciones agroecológicas que presenta la región. Una de las clasificaciones más corrientes de la quínoa de Sudamérica es en diferentes ecotipos, de acuerdo a la zona de cultivo (Tapia, 1982). Wilson, (1988) discriminó dos elementos fundamentales entre la quínoa de Sudamérica: la quínoa Andina, a su vez dividida en dos grupos (un grupo norteño y otro sureño) y un tipo costeño, originario del suroeste de Chile. Además, a lo largo del área de cultivo, la mayor variación fenotípica reportada para la especie se encontró alrededor del Lago Titicaca entre Cuzco (Perú) y Lago Poopó (Bolivia), región considerada habitualmente como centro de domesticación para la especie (Gandarillas, 1979; Pearsall, 1992). El NOA representa el extremo sur de la distribución de *C. quínoa* y es considerado un cultivo marginal en esta región (Bertero, 2001). Los antecedentes de su distribución predicen que el origen del germoplasma en el NOA puede haber sido a partir de la ocurrencia de procesos de introducción independientes en contraposición a un único evento de introducción y su posterior dispersión en la región. De lo expuesto se derivan las siguientes hipótesis:

- **Existe coherencia entre la organización de la variabilidad genética y la diferenciación agroecológica.**
- **Las poblaciones locales de quínoa derivan de procesos de introducción independientes en las diferentes regiones ecológicas del NOA.**

2.1. Justificación e implicancia de la tesis

Chenopodium quínoa Willd., cultivada desde la antigüedad como un pseudo-cereal (Hunziker, 1943) en la región Andina de Sudamérica, presenta una gran capacidad de adaptación a diferentes ambientes, aún bajo condiciones climáticas extremas (stress abiótico). Además de ser una fuente importante de proteínas para pobladores de la región

andina, se la puede considerar como una de las especies “sub - utilizadas” de mayor potencial en el mundo. En la última década se ha incrementado el volumen de exportación desde los principales países productores así como también se han abierto nuevos mercados (principalmente en países desarrollados). Presenta la posibilidad de ser una especie con adaptación a regiones áridas y semiáridas, habitualmente relegadas para el cultivo de plantas. Sus cualidades nutricionales justifican su uso en la alimentación cotidiana. Además, los avances en el área de nutrición ubican la quínoa como una materia prima promisoría para el desarrollo de alimentos funcionales (ej.: alimentos aptos para celíacos).

En Argentina la especie se cultiva principalmente a nivel local en la región del NOA, siendo pequeño el volumen que se comercializa. El conocimiento acerca de la variabilidad genética del germoplasma nativo de quínoa es escaso debido a la inadecuada representatividad en estudios de caracterización previos como consecuencia directa del escaso número de accesiones en las colecciones de quínoa conservadas en otros países. Hasta hace algunos años no existía una colección representativa de los diferentes ambientes de cultivo de la región Noroeste. El conocimiento de la distancia genética entre los materiales de la colección y la distribución de la variabilidad molecular, en conjunto con la caracterización a nivel morfo-fenológico aporta información relevante para el uso del germoplasma en futuros programas de mejoramiento de la especie, y para la definición de estrategias de colecta y conservación. A nivel de Sudamérica los resultados de la tesis aportan conocimiento en relación al patrón de distribución del cultivo en la región Andina.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la magnitud de la diversidad y la estructura genética de germoplasma de quínoa local y esclarecer la relación y el patrón de dispersión de la especie en el NOA mediante la comparación con entradas o poblaciones de otros países de Sudamérica.

3.1. Objetivos específicos

A. Caracterizar molecularmente poblaciones de quínoa nativa del Noroeste Argentino (NOA) y procedentes de otros países de Sudamérica, utilizando microsatélites.

B. Describir la estructura genética de la especie en la región del NOA.

C. Identificar posibles alelos particulares que caractericen las poblaciones pertenecientes a diferentes regiones ecológicas.

D. Evaluar, para las poblaciones con las que se cuente con datos, la relación entre la variación genética y la variación morfo – fenológica.

E. Evaluar la variabilidad de las poblaciones extranjeras en relación a su procedencia.

F. Evaluar las relaciones y las distancias genéticas entre las poblaciones locales y extranjeras e inferir los patrones de dispersión de la especie en Sudamérica.

G. Desarrollar marcadores microsatélites a partir de secuencias de ADN que se expresan (EST: Expressed Sequence Tags)

H. Caracterizar las poblaciones utilizando los ESTs desarrollados.

I. Contrastar la variabilidad detectada por los microsatélites neutros con la encontrada por los microsatélites derivados de ESTs (EST-SSR).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado forma parte de la colección de *C. quinoa* que se encuentra conservado en el Banco de Germoplasma del Instituto de Recursos Biológicos (IRB) - INTA Castelar. La colección está compuesta por 450 entradas procedentes de diferentes fuentes. Noventa entradas son quínoas cultivada en el Noroeste Argentino (NOA), algunas de ellas colectadas durante 2006 y 2007. Otras entradas fueron incorporadas de colecciones conservadas en Mendoza (INTA La Consulta), Bolivia (Fundación Proinpa), Perú (Universidad Nacional del Altiplano) y el Banco de Germoplasma del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (National Plant Germplasm System, <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html>).

En la colecta a campo se visitaron agricultores de la zona quienes donaron las semillas utilizadas por ellos durante largos períodos (inclusive utilizadas por varias generaciones). Cada donación fue considerada como una entrada en el Banco de Germoplasma y como una población en este estudio.

4.2. Selección de poblaciones

Para la evaluación poblacional de quínoa del NOA, se seleccionaron treinta y seis poblaciones, de acuerdo a los criterios de cobertura de la zona de cultivo conocida y las diferentes eco-regiones descritas para la misma (Tabla 1, N° 1 a 36, Figura 7 y 8). Para evaluar las relaciones genéticas con otras poblaciones de quínoa de Sudamérica se seleccionaron otras 43 poblaciones (Tablas 2, entradas N° 39 a 81), según los ecotipos definidos por Tapia (1979) y teniendo en cuenta la zona de dispersión de la especie en Sudamérica (desde el sur de Colombia –Nariño- hasta el sur de Chile –Chiloé- Figura 7, 9, 10, 11). En este análisis se incluyeron dos entradas (Tabla 1, N° 37 y 38) procedentes de Cholila (provincia de Chubut, Argentina) cedidas por una agricultora local.

TABLA 1: Datos de pasaporte de las accesiones de *C. quinoa* procedentes de Argentina.

Nº Orden	ID	Departamento de origen/Cultivar	Provincia/ Departamento	País	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
1	BL	Barranca Larga, Belén	Catamarca	Argentina	-27,32	-67,07	1900
2	ANT	Antofagasta de la Sierra, Antofagasta de la Sierra	Catamarca	Argentina	-26,05	-67,42	S/D
3	CHEN183*	QQ 101-NSL 106396, Yavi	Jujuy	Argentina	-22,12	-65,47	3457
4	CHEN434	Cangrejillos, Yavi	Jujuy	Argentina	-22,43	-65,58	3583
5	CHEN438*	Rachaite, Cochinoca	Jujuy	Argentina	-22,85	-66,15	3640
6	CHEN431*	Susques, Susques	Jujuy	Argentina	-23,04	-66,36	3619
7	CHEN446	La consulta 660-Aparzo, Humahuaca	Jujuy	Argentina	-23,08	-65,18	3823
8	CHEN58*	Coctaca, Humahuaca	Jujuy	Argentina	-23,15	-65,28	3215
9	CHEN275*	1485 Coctaca, Humahuaca	Jujuy	Argentina	-23,15	-65,28	3215
10	CHEN182*	QQ 95- NSL 106394, Humahuaca	Jujuy	Argentina	-23,20	-65,33	2939
11	CHEN231*	Ocumaso, Humahuaca	Jujuy	Argentina	-23,20	-65,25	3000
12	CHEN274	1484 , Humahuaca	Jujuy	Argentina	-23,20	-65,33	2939
13	CHEN211	Barrancas, Cochinoca	Jujuy	Argentina	-23,33	-66,08	3500
14	CHEN468*	Santa Ana, Valle Grande	Jujuy	Argentina	-23,36	-64,99	3379
15	CHEN184	QQ 87-NSL 101697, Susques	Jujuy	Argentina	-23,40	-66,36	3619
16	CHEN252*	Maimará, Tilcara	Jujuy	Argentina	-23,62	-65,40	2334
17	CHEN269	1479, La Poma	Jujuy	Argentina	-23,85	-65,82	3480
18	CHEN272	1482, La Poma	Jujuy	Argentina	-23,85	-65,82	3480
19	CHEN427*	Puesto Sey, Susques	Jujuy	Argentina	-23,95	-66,48	4012
20	CHEN458*	Morro de Pucará, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,18	-64,97	2645
21	CHEN451*	Rodeo Pampa, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,23	-65,03	2898
22	CHEN482*	Lizoite, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,26	-65,16	3310
23	CHEN212*	San Felipe-Santa Victoria, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,27	-64,97	2507
24	CHEN466*	San José del Aguilar, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,34	-65,17	3960
25	CHEN456*	Trigo Huaico, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,36	-65,05	3230
26	CHEN465*	Santa Cruz del Aguilar, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,38	-65,18	3955
27	CHEN461*	Poscaya, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,45	-65,08	3208
28	CHEN463*	Aguadas, Santa Victoria	Salta	Argentina	-22,53	-65,11	3073
29	CHEN213	Chiyayoc, Iruya	Salta	Argentina	-22,73	-65,20	3200
30	CHEN256*	Campo Luján, Iruya	Salta	Argentina	-22,78	-65,22	3000
31	CHEN60*	Abralaite de Colanzulí, Iruya	Salta	Argentina	-22,90	-65,23	3711
32	CHEN432*	Cobres, La Poma	Salta	Argentina	-23,65	-66,28	3591
33	CHEN426*	Santa Rosa de los Pastos Grandes, Los Andes.	Salta	Argentina	-24,47	-66,66	3939
34	CHEN422	Tolar Grande, Los Andes	Salta	Argentina	-24,58	-67,38	3533
35	CHEN414*	La Poma, La Poma	Salta	Argentina	-24,72	-66,12	3016
36	CHEN420*	Antofallita, Los Andes	Salta	Argentina	-25,25	-67,52	3498
37	Chol 1	Cholila	Chubut	Argentina	-42,51	-71,45	S/D
38	Chol 2	Cholila	Chubut	Argentina	-42,51	-71,45	S/D

* Poblaciones incluidas en la caracterización conjunta (ver sección 4.8).

TABLA 2: Datos de pasaporte de las accesiones de *C. quinoa* procedente de otros países de Sudamérica.

Nº Orden	ID	Departamento de origen/Cultivar	Provincia/ Departamento	País	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
39	CHEN0247	Monteagudo I	Chuquisaca	Bolivia	-17,37	-66,15	S/D
40	CHEN0248	Potosi I	Potosí	Bolivia	-19,58	-65,78	S/D
41	CHEN0253	Utusaya (tipo real), Salar de Uyuni	Potosí	Bolivia	-20,30	-67,60	S/D
42	CHEN0339	AMES 13215 (Est. Exp. Patacamaya)	La Paz	Bolivia	-17,24	-67,93	S/D
43	CHEN0346	PI 470932.Pasan Ralle	La Paz	Bolivia	-16,02	-68,73	S/D
44	CHEN0369	PI 614904. CQ 104.AMES 21912	Oruro	Bolivia	-17,00	-68,00	S/D
45	CHEN0447	Chillpi, Salar de Uyuni	Potosí	Bolivia	-20,30	-67,60	S/D
46	CHEN0448	Kanchis Amarilla, Salar de Uyuni	Potosí	Bolivia	-20,30	-67,60	S/D
47	CHEN0449	Pandela, Salar de Uyuni	Potosí	Bolivia	-20,30	-67,60	S/D
48	ChucA	Chuquisaca	Chuquisaca	Bolivia	-20,02	-64,15	S/D
49	ChucB	Chuquisaca	Chuquisaca	Bolivia	-20,02	-64,15	S/D
50	ChucC	Chuquisaca	Chuquisaca	Bolivia	-20,02	-64,15	S/D
51	ChucD	Chuquisaca	Chuquisaca	Bolivia	-20,02	-64,15	S/D
52	TAR1	San Lorenzo, Cercado	Tarija	Bolivia	-21,42	-64,73	2100
53	TAR3	Belén	Potosí	Bolivia	-19,86	-65,54	S/D
54	TAR7	Monte, Cercado	Tarija	Bolivia	-21,52	-64,72	S/D
55	TAR8	Sama, Mendez	Tarija	Bolivia	-21,49	-64,98	3513
56	TAR9	Iscayachi, Mendez, quinua de Betanzos, Potosí	Tarija	Bolivia	-21,49	-65,97	3446
57	TAR11	Huayllajara, Aviles	Tarija	Bolivia	-22,00	-65,10	3856
58	TAR13	Yesera Sur	Tarija	Bolivia	-21,45	-64,57	2102
59	TAR14	Yesera Centro	Tarija	Bolivia	-21,41	-64,55	2189
60	TAR15	Abra de la Cruz	Tarija	Bolivia	-21,84	-64,67	2077
61	CHEN0024	Pichilemu	Pichilemu (S)	Chile	-34,40	-72,02	S/D
62	CHEN0025	Lo Valdivia	Lo Valdivia (S)	Chile	-39,83	-73,27	S/D
63	CHEN0050	Cauquenes	Cauquenes (S)	Chile	-35,96	-72,34	S/D
64	CHEN0169	Ollague	Ollague (N)	Chile	-21,23	-68,26	S/D
65	CHEN0178	Isluga	Isluga (N)	Chile	-19,15	-68,84	S/D
66	CHEN0233	Chadmo (Chiloe)	Chiloé (S)	Chile	-42,94	-73,61	S/D
67	CHEN0235	Concoche 860	Valdivia (S)	Chile	-39,83	-73,27	S/D
68	VI-1	Región VI, al interior	Región VI	Chile	-34,57	-71,01	S/D
69	PRJ	Región VI, Nilahue, costa	Región VI	Chile	-34,57	-71,76	S/D
70	Curicó	Región VII, Valle central	Región VII	Chile	-35,52	-71,57	S/D
71	CHEN0002	Nariño	Nariño	Colombia	1,64	-78,37	S/D
72	CHEN0073	Ingapirca	-	Ecuador	-2,89	-78,98	S/D
73	CHEN0166	Ecu-420	-	Ecuador	-1,82	-80,68	S/D
74	CHEN0001	Blanca de Julí	Puno	Perú	-15,23	-71,30	S/D
75	CHEN0003	Blanca de Junin	Junín	Perú	-11,00	-75,08	S/D
76	CHEN0005	Camacani I	Puno	Perú	-15,23	-71,30	S/D
77	CHEN0080	Huariponcho	Puno	Perú	-15,23	-71,30	S/D
78	CHEN0168	Cheweca	Puno	Perú	-15,23	-71,30	S/D
79	CHEN0352	PI 510532*	Sandia, Puno	Perú	-14,42	-69,33	S/D
80	CHEN0361	PI 510546*	Puno	Perú	-16,00	-69,78	S/D
81	CHEN0007	Amarilla de Marangani	Cuzco	Perú	-13,53	-72,03	S/D

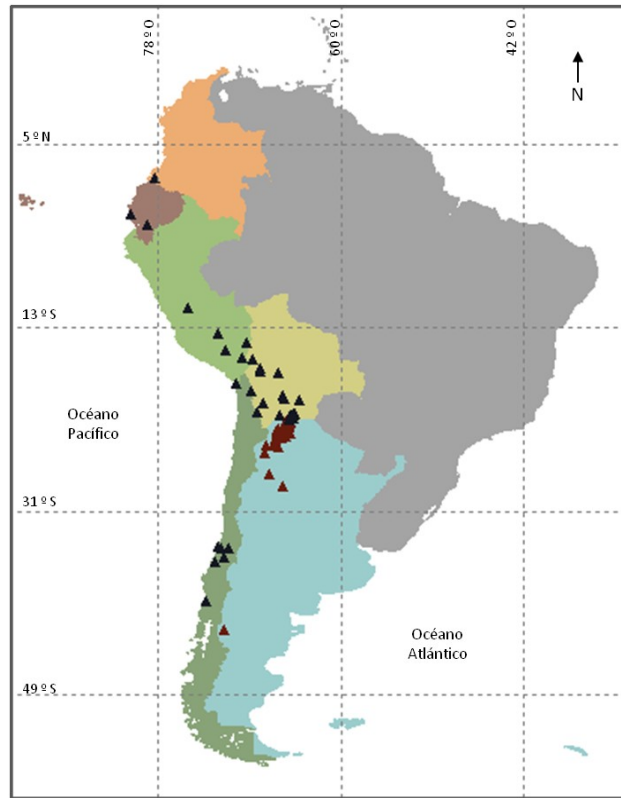


FIGURA 7: Ubicación de las poblaciones. Poblaciones de Argentina (triángulo rojo), poblaciones extranjeras (triángulo azul).

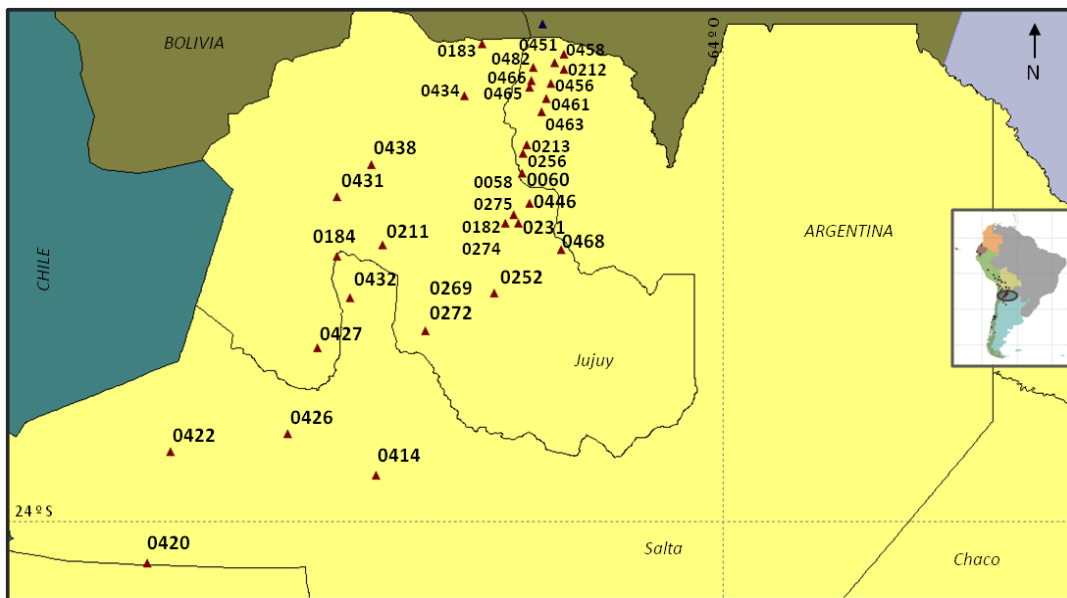


FIGURA 8: Ubicación de las poblaciones procedentes del Noroeste Argentino según ID (Tabla N° 1).



FIGURA 9: Detalle de la ubicación de las poblaciones extranjeras, desde Nariño (Colombia) hasta Cochabamba (Bolivia) según ID (Tabla N° 2).

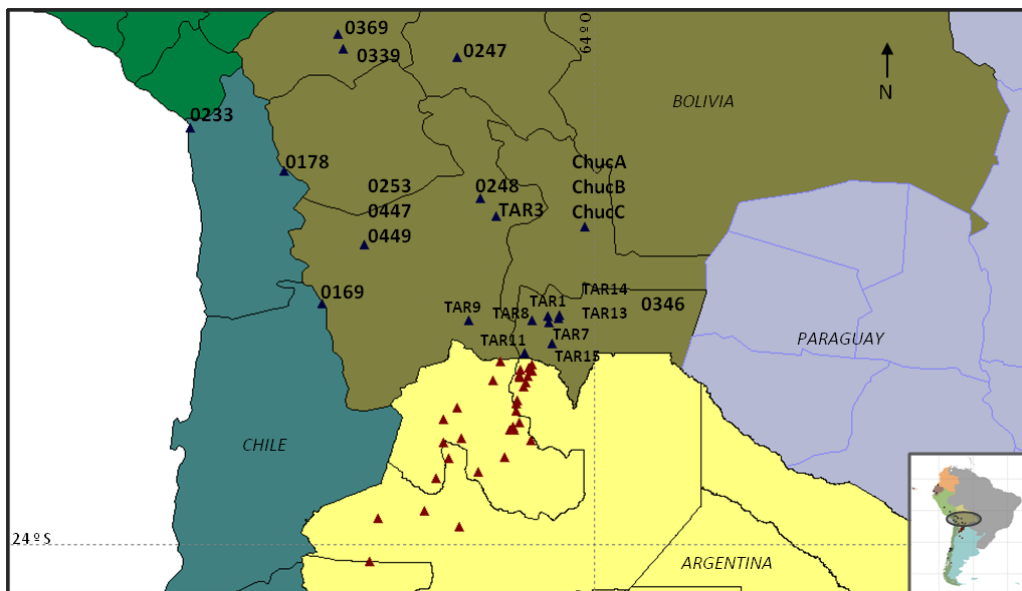


FIGURA 10: Detalle de la ubicación de las poblaciones extranjeras en Bolivia y norte de Chile según ID (Tabla N° 2).

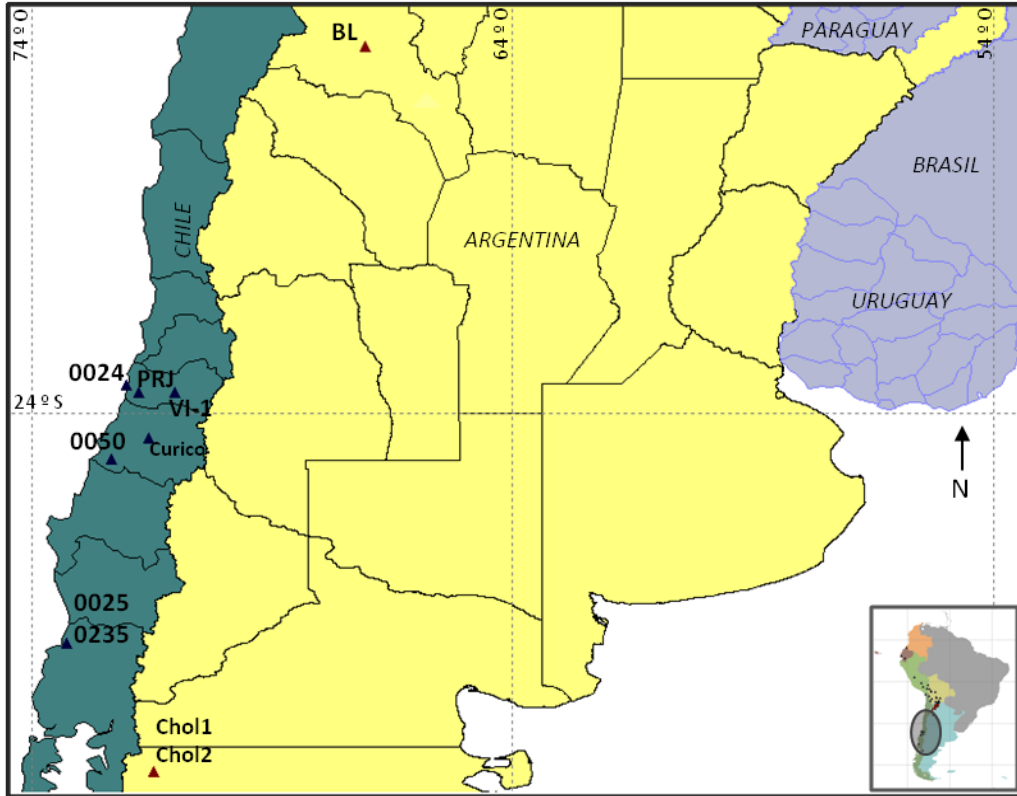


FIGURA 11: Detalle de la ubicación de las poblaciones extranjeras en el sur de Chile, provincia de Chubut y sur de Catamarca (Argentina) según ID (Tabla N° 1 y 2).

Cada entrada (población) estuvo representada por diez plantas individuales, las que se sembraron en maceta y mantuvieron en un invernáculo en el IRB – INTA, con una temperatura promedio de 25 °C (Figura 12). Cinco o seis hojas de cada planta fueron cosechadas 45 días luego de la siembra y liofilizadas por 48 hs.



FIGURA 12: Siembra de plantas individuales en el invernáculo del IRB. Detalle de una plántula.

4.3. Extracción de ADN genómico

Se realizó una adaptación del protocolo descrito por Dellaporta (1983) modificado para arroz (Mc Couch et al., 1988), para una micro-extracción de *C. quinoa* a partir de 50 – 100 mg de tejido liofilizado molido descrito en detalle como sigue:

1. 50 – 100 mg de tejido liofilizado molido.
2. Transferir el polvo a un tubo de 2 ml.
3. Agregar 1000 µl de buffer de extracción (anexo) sin SDS y mezclar con vortex.
4. Agregar el SDS y mezclar vigorosamente (sin vortex).
5. Incubar en baño a 65 °C por 30 minutos (agitar cada 10 minutos aproximadamente).
6. Agregar 1/3 del volumen de acetato de potasio 5M y mezclar vigorosamente.
7. Transferir los tubos a hielo rápidamente e incubar por 30 minutos (agitar cada 10 minutos aproximadamente).
8. Centrifugar a 4 °C por 30 minutos (1200 rpm).
9. Transferir los tubos a hielo.
10. Transferir rápidamente la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml.
11. Agregar 2/3 del volumen de isopropanol frío (-20 °C).
12. Incubar a -20 °C toda la noche.
13. Centrifugar a 4 °C por 30 minutos (1200 rpm).
14. Descartar el sobrenadante.
15. Lavar los pellets de ADN con etanol 70 % frío (-20 °C) y dejar secar 40 minutos aproximadamente.
16. Disolver el pellet de ADN en 500 µl de TE (anexo) (ideal dejar suspender toda la noche en heladera).
17. Centrifugar a 4 °C por 10 minutos (1200 rpm).
18. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 o 2 ml si el *pellet* resultante está muy sucio, sino conservar el tubo original.
19. Agregar 8-10 µl/ml de ARNasa e incubar a 37 °C por 30 minutos.
20. Agregar 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M (pH: 5,2) y dos volúmenes de etanol 96 % a -20 °C y mezclar vigorosamente.
21. Incubar a -20 °C por 30 – 60 minutos.

22. Centrifugar a 4 °C por 5 – 10 minutos (1200 rpm).
23. Descartar el sobrenadante.
24. Lavar los *pellets* de ADN con 1 ml de etanol 70 % frío (-20 °C) y dejar secar.
25. Disolver el *pellet* de ADN en 150 µl de TE.

La integridad de la calidad del ADN fue testada por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %, visualizado con luz UV y la masa obtenida cuantificada por comparación con una muestra de ADN vegetal de masa previamente conocida (Figura 13).

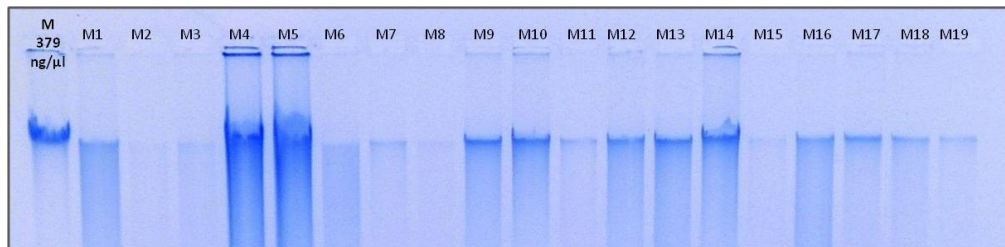


FIGURA 13: Gel de cuantificación de ADN. La primera calle muestra un ADN de masa conocida y las sucesivas son distintas muestras de quínoa.

4.4. Selección de marcadores SSR y amplificación por PCR

Se seleccionaron 35 marcadores SSR desarrollados por Mason et al., (2005) y Jarvis et al., (2008) según el Número de Alelos Observados, Heterocigocidad y la capacidad de amplificación en otras especies del género *Chenopodium* citada en la bibliografía. Se consideró la ubicación cromosómica de los SSR a partir de un mapa de ligamiento desarrollado por Jarvis et al., (2008) en que describe 41 grupos de ligamiento. Se evaluaron preliminarmente sobre diez genotipos y se eligieron 22 SSR según la nitidez del patrón obtenido y el polimorfismo detectado (Tabla 3).

TABLA 3: Detalle de los 22 *loci* microsatélites utilizados: locus, secuencia del oligo-nucleotido y temperatura de *annealing*.

Locus		Secuencia del oligo	T° <i>annealing</i>	Locus		Secuencia del oligo	T° <i>annealing</i>
QAAT074	F	ATGGAACACCCATCCGATAA	55 °C	KGA03	F	ATTGCCGACAATGAACGAAT	59 °C
	R	ATGCCTATCCTCATCCTCCA			R	ATGTAATGGCATGTCCCAAC	
QAAT088	F	TCCTAACTTCTTGTGACATTTCTT	55 °C	QAAT022	F	TGGTCGATATAGATGAACCAAA	58 °C
	R	CCACGATCCCAGAACAAATTT			R	GGAGCCCAGATTGTATCTCA	
QAAT001	F	ATATTGCATGTCGAGCACCA	58 °C	KGA020	F	TCACCTACCTCGGTAAGGAAA	60 °C
	R	TGGGACTTCCATAAGGCAAC			R	GGAGCAGATGATGAACATGG	
QAAT097	F	AAATCATTTGACTTTGTAGGTTT	50 °C	QGA002	F	GAACCTTTAATAGGTCTGTACCAAATC	60 °C
	R	GATGTGATAAGGAATAATCCAA			R	AAGAAATGTCACAAGCAAGCA	
QAAT076	F	GCTTCATGTGTTATAAAATGCCAAT	50 °C	QAAT024	F	ACCATAACAGCACCCACCTT	58 °C
	R	TCTCGGCTTCCCCTAATTTT			R	AGGGATCAATCTTGTTCATTCA	
QAAT087	F	CGTGATGCTGCTCACATCTT	58 °C	QAAT078	F	AGCGAAGGAAATTTGGAAT	58 °C
	R	TTGCTCTAACTGAATTTGGTGTG			R	TAACGATACGCTCCAAGGAA	
QAAT112	F	CCCGATCCACCATAAGAGAA	58 °C	QAAT084	F	GTGGATGTAAAGGTGGTTT	56 °C
	R	TGAAGTGTAAGATTGGAGAATGACA			R	ACAACCTATTTGTTAGCTAGATTATT	
QAAT050	F	GGCACGTGCTGCTACTCATA	56 °C	QGA03	F	TATATGCCACCGGAATGTCA	59 °C
	R	ATGGCGAATGGTTAATTTGC			R	TGTATCCCTTTGCATTCTTTGA	
QAAT027	F	AATGAGGAGGCAATGCAAAG	55 °C	QCA067	F	GCAAGACCTGCTCACAACAA	61 °C
	R	CGGCTCCCTACCAATTTCTT			R	TATCAACAGCAACGGAAGCA	
QAAT062	F	CACAAGTGCGCATAGCAAAG	60 °C	QAAT026	F	ATTTACATAAATGCAACAACCTTTT	56 °C
	R	CCAGTACACGCACGAAGAAA			R	CCAGATTGTATCTCGACTCC	
QAAT106	F	TCAGTAAGATAATACCCATCAGTAAG	55 °C	QAAT071	F	CATCACCCGCTGAATAGACAC	60 °C
	R	AAATCCCCTCTATAATTACCAA			R	TACCCTAATGCCACGATTCC	

Las reacciones de amplificación de PCR se ajustaron a un volumen final de 7 μ l, cuya composición fue la siguiente: 10 μ M de cada *primer*, 2.5 mM MgCl₂, 0.200 μ M dNTPs, 0.5U Taq polimerasa y 30 ng de ADN genómico como molde. Las amplificaciones se realizaron siguiendo el siguiente protocolo: 94 °C por 1 minuto como desnaturalización general, seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 30 segundos a la temperatura de *annealing*, 72 °C por 1 minuto; y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

4.5. Separación y visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación se separaron en geles desnaturizantes de poliacrilamida 6% (19:1 acrilamida:bis-acrilamida), durante 3 a 5 hs a 50 W, utilizando un sistema de Gibco-BRL Modelo S2. Para la corrida se colocó buffer TBE 0.5X (Anexo) en el ánodo, y TBE 1X (Anexo) en el cátodo. Las muestras fueron incubadas con 4 µl Buffer de siembra-formamida (Anexo), desnaturizadas durante 5 min a 94°C y colocadas rápidamente en hielo y sembradas en los geles utilizando peines de siembra de 96 muestras. Se utilizaron muestras individuales como testigos entre los múltiples geles realizados para comparar los fragmentos.

La detección se llevó a cabo mediante tinción con nitrato de plata, de acuerdo al protocolo de Tinción con Plata para Secuenciación de Promega Biotech, que consta de los siguientes pasos:

- Fijación del gel en ácido acético al 10% durante 20 min.
- 3 lavados en agua ultrapura de 2 min cada uno.
- Tinción con solución de nitrato de plata (anexo) durante 30 min.
- Lavado durante 3 s en agua ultrapura.
- Revelado en solución de carbonato de sodio (anexo) hasta la aparición de bandas.
- Detención de la reacción con ácido acético al 10% durante 2 minutos.
- 2 lavados con agua durante 2 minutos.
- Secado a temperatura ambiente.

El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando el programa de computación Gel (J. Dubcovsky com. pers.), el cual se basa en el método de los recíprocos (Elder & Southern, 1987), a partir de comparar el patrón de migración de los fragmentos de ADN con el patrón de un marcador de peso molecular conocido (10 pb DNA Ladder, Invitrogen).

4.6. Análisis de datos

4.6.1. Matriz básica de datos

La evaluación de los resultados se realizó manualmente, mediante la observación de los patrones obtenidos en un trans-iluminador de luz blanca. Para cada individuo de la población se registró el tamaño del fragmento amplificado (alelo) y el genotipo (homocigota o heterocigota), para todos los *loci* SSR estudiados. Sólo se consideraron los fragmentos o bandas cuyo peso molecular se encontraba en el rango citado en la bibliografía. Las bandas dudosas o datos perdidos fueron codificados como -1.

Teniendo en cuenta esta codificación, se generaron las matrices básicas de datos (MBD) a partir de las cuales se calcularon las frecuencias alélicas relativas de cada población utilizando el programa GenAlex 6.2 (Peakall & Smouth, 2006).

4.6.2. Diversidad molecular

Se estimaron varios parámetros para caracterizar el grado de polimorfismo detectado en los *loci* SSR estudiados:

■ Número de alelos por locus (A)

■ **Heterocigosidad (Ht):** es una medida de diversidad alélica. Para cada locus analizado se interpreta como la probabilidad de que al extraer dos alelos al azar de la población, éstos sean diferentes. Representa la heterocigosidad esperada del locus considerando un agrupamiento de todas las poblaciones estudiadas.

$$Ht = 1 - \sum \overline{p_i}^2$$

Donde del alelo p_i es la frecuencia del alelo i-ésimo alelo, en promedio entre todas las poblaciones (Peakall & Smouse, 2006).

■ **Índice de Información (I):** equivalente al Índice de Shannon & Weaver utilizado en estudios ecológicos, se utilizó para evaluar la diversidad alélica detectada en cada locus analizado, calculado según la fórmula:

$$I = -1 \sum [p_i * \ln(p_i)]$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i - en la totalidad de los *loci* analizados (Peakall & Smouth, 2006). El índice está basado en la frecuencia alélica en los *loci* polimórficos y caracteriza el locus (Nassiry et al., 2009), siendo más alto el nivel de diversidad detectada a medida que el valor de I se acerca a 1 (uno) (útil para elegir los *loci* SSR más informativos).

4.6.3. Diversidad genética de las poblaciones

La diversidad genética de las poblaciones fue estimada utilizando el valor de heterocigocidad no sesgada (ó insesgada) (UHe):

$$UHe = \left(\frac{2N}{2N-1} \right) * \sum_{l=1}^L He \quad \text{Y, } He = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i - en el locus l ; L es el número total de *loci* analizados y N es el tamaño de la población (Peakall & Smouth, 2006).

La **UHe** es una medida indirecta de la heterogeneidad genética, recomendada para poblaciones pequeñas ($N < 50$ individuos, Nei, 1978) ya que el cálculo se relativiza al tamaño de la población. El parámetro ignora alelos en baja frecuencia y el porcentaje de *loci* polimórficos, resultando una medida menos afectada por el error de muestreo (Nei & Chesser, 1983).

■ **Riqueza alélica (Na):** número total de alelos presentes en una determinada población (Frankel et al., 1995).

■ **Alelos privados:** alelos presentes exclusivamente en un determinado grupo de genotipo o población. Además se registró la presencia de alelos raros, alelos cuya frecuencia de ocurrencia en la población es menor al 5 %.

■ **Porcentaje de *loci* polimórficos (%P).**

Todos estos parámetros fueron calculados utilizando GenAlex (Peakall & Smouth, 2006).

4.6.4. Matriz de distancia genética

A partir del cálculo de las frecuencias alélicas relativas para cada población se construyó la Matriz de Distancia Genética, utilizando el programa NTSYS-pc v. 2.11 W (Rohlf, 1989). Existen varias medidas de distancia genética propuestas para transformar las frecuencias alélicas y genotípicas en datos de distancia genética (Wright, 1978). Entre las más utilizadas se probaron Nei (1972), Hillis (1984), Cavalli – Sforza y Edwards (cuerda) (1967), Rogers (1972), Prevosti (Wright, 1978), (Bramardi, 2008). Las distintas propiedades matemáticas de cada medida varían según el criterio considerado respecto al tamaño de la muestra para las unidades X_i y X_j .

La performance de cada medida se comprobó realizando el Test de Mantel (sección 4.6.7) contrastando la matriz de distancia y la matriz de valores cofenéticos que determinan el agrupamiento (Tabla 3, anexo). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se definió utilizar la medida de distancia definida por Prevosti (1974, y citado por Wright, 1978), también conocida como de Gregorius (1974):

$$\frac{1}{p} \sum_{k=1}^p \sum_{l=1}^q |x_{ikl} - x_{jkl}|$$

Esta es una medida de distancia genética d_{ij} entre OTUs o taxa basados en las frecuencias alélicas (relativas) correspondientes a p loci, cada uno de ellos con q alelos. $K = 1, 2, \dots, p$ y $l = 1, 2, \dots, q$; n_i y n_j es el tamaño de la muestra de los taxones i y j . El valor de la distancia puede variar entre 0 (ausencia de distancia genética) y 1 (máxima distancia). La matriz resultante es triangular, con las poblaciones ordenadas de igual forma en columnas y filas.

4.6.5. Análisis de agrupamiento

Para expresar las relaciones entre las poblaciones se utilizó un Método de Agrupamiento, también llamado clasificación ó Análisis de clúster. A partir del grado de asociación entre las OTUs i y j , definido por la d_{ij} , se construyen grupos o clúster por la unión sucesiva de los pares de OTUs (en este caso poblaciones) más cercanos. Inicialmente cada

población constituye en sí misma un grupo y, a medida que el agrupamiento avanza, el número de grupos va disminuyendo conformándose unidades. El proceso se completa cuando se unen los dos últimos grupos en un único conglomerado que contiene todas las poblaciones originales. Se utilizó la técnica SHAN (Sequential Agglomerative Hierarchic Nonoverlapping) (Sneath & Sokal, 1973) que agrupa las poblaciones en forma jerárquica y secuencial basándose en los niveles de distancia. El método de ligamiento utilizado fue UPGMA (Unweighted Pair-group Method using Arithmetic Averages) (Sokal & Michener, 1958) que considera el valor de distancia promedio entre la OTU (o taxa) candidata a incorporarse y el grupo o núcleo más cercano. Este tipo de agrupamiento tiende a unir grupos con poca varianza y producir grupos con varianza semejante y es el más ampliamente utilizado en estudios de caracterización genética (Sneath & Sokal, 1973; Panchen, 1992 en Mohammadi, 2003). Se utilizó el módulo *Clustering* del programa NTSYS-pc v. 2.11 W (Rohlf, 1989).

La representación gráfica para visualizar el resultado del análisis de agrupamiento es un dendograma o árbol jerárquico, en el que se observa cómo se asocian las OTUs analizadas a medida que disminuye el grado de semejanza entre ellas. El diagrama va acompañado por un eje que indica la distancia a la que se han producido las diferentes uniones, lo que se denomina Índice de Jerarquía. Para dividir o clasificar las OTUs en se traza una línea recta para un valor de distancia determinado y se observan los distintos grupos por debajo de ella.

4.6.6. Test de Mantel

La significancia de la correlación entre matrices se evaluó utilizando el Test de Mantel (1967) mediante el programa NTSyS v. 2.11 W (Rohlf, 1989). Siendo x_{ij} and y_{ij} elementos no diagonales de las matrices X e Y , si dos matrices muestran relaciones similares el valor de Z^1 observado debe ser mayor al esperado de su distribución por permutaciones al azar. Se comparan las dos matrices elemento a elemento y se obtienen la

$$Z = \sum_{i < j}^n x_{ij} \cdot y_{ij}$$

correlación momento – producto, r , y el estadístico, Z , para medir el grado de significancia de relación entre las dos matrices. El valor de r se relaciona al Z obtenido de las permutaciones, o sea, la distribución obtenida si se compara una matriz X con todas las posibles matrices Y en las que el orden de los elementos o variables haya sido permutado aleatoriamente (Smouse et al., 1986). Valores en el coeficiente de correlación, r , superiores a 0.80 indican una buena representación (Rohlf, 1992, en Mohammadi, 2003).

Se utilizó la correlación co-fenética (Sokal & Rohlf, 1962) para medir la coherencia entre la matriz de distancia y el agrupamiento. Consiste en comparar mediante el test de Mantel la matriz de distancia genética y la matriz de valores cofenéticos, cuyos elementos son los niveles en que cada OTU es ligada en los sucesivos pasos de conformación del árbol en el análisis de agrupamiento jerárquico (Bramardi, 2008) y sirve para cuantificar la concordancia o adecuación entre un cluster y la matriz de distancia que le dio origen.

4.6.7. Regresión Lineal Múltiple

Para analizar la relación entre la magnitud de la diversidad genética y las características climáticas de la región, de manera general, se llevó a cabo un Análisis de Correlación Lineal Simple (CLS) y de Regresión Lineal Múltiple (RLM) (Costa Tártara et al., 2012). Como variable dependiente se utilizó la medida de diversidad genética (UHe) calculada para cada una de las poblaciones. Las variables explicativas que se utilizaron en el modelo fueron 19 variables derivadas de datos de temperatura y precipitación mensual (anexo), extraídas de Bioclim (Hijmans et al., 2005) y los datos de altitud de cada punto de colecta, extraídos del Shuttle Radar Topography Mission (SRTM, Farr et al., 2007) para la región delimitada (Figura 14). Se procedió a una transformación logarítmica de los datos de diversidad genética (UHe) por falta de normalidad en la escala original. Para extraer el valor de cada variable en la ubicación geográfica asignada a cada población se utilizó el software SAGA GIS v. 2.0.7 (Böhner et al. 2006). El análisis de CLS y RLM se llevó a cabo con el software STATISTICA, version 7.1. (StatSoft Inc. 2005).

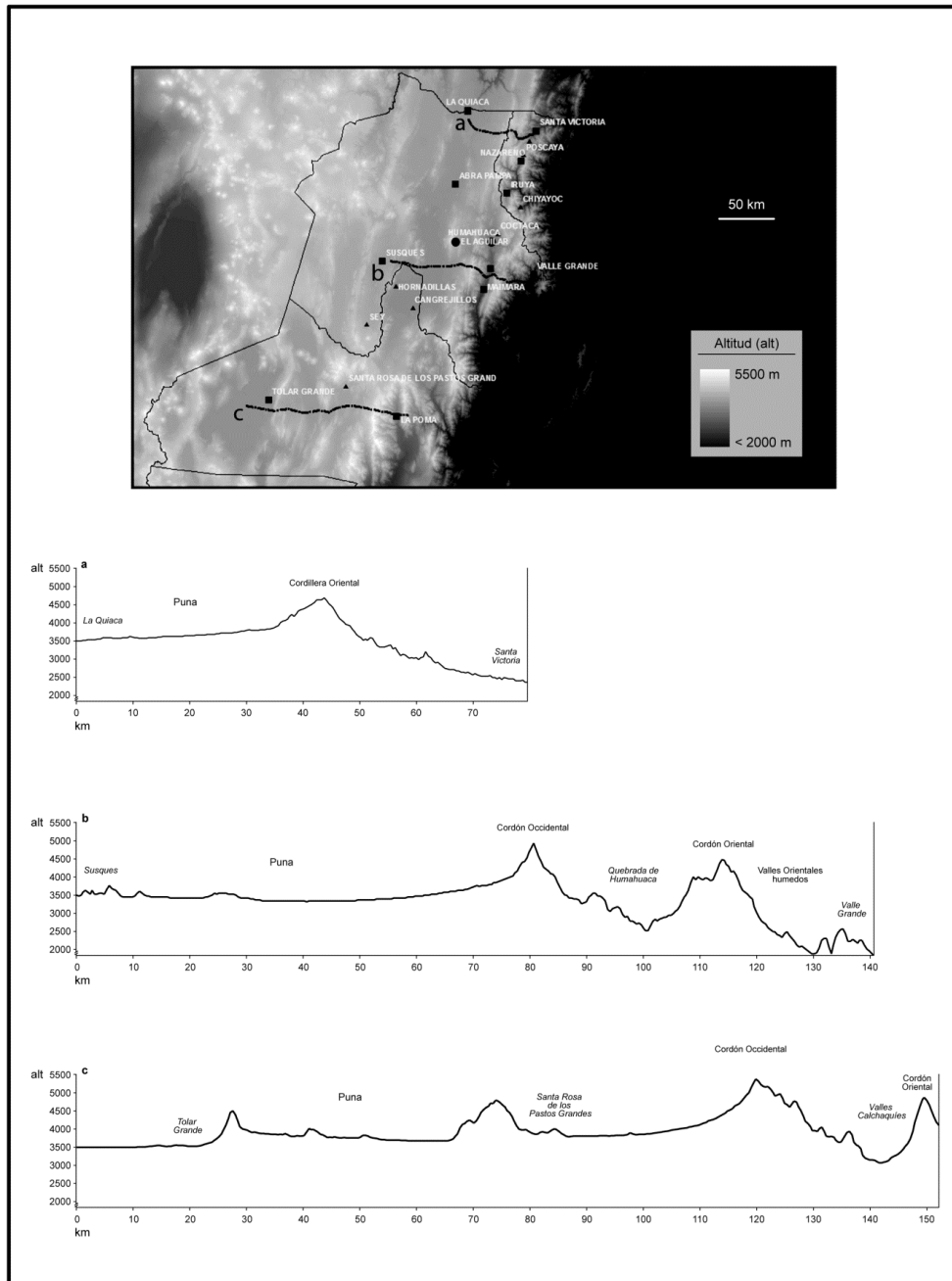


FIGURA 14: Modelo digital de elevación de una sección de la región del Noroeste Argentino con datos del SRTM (Shuttle Radar Topography Mission; Farr et al., 2007). El relieve y los distintos ambientes se muestra a través del trazado de tres transectos a diferentes latitudes: a) a 22° 15' S, de la Quiaca (65° 36' longitud O) a Santa Victoria Oeste (64° 57' O); b) a 23° 30' S, de Susques (66° 17' O) a Valle Grande (65° 00' O); y c) a 24° 40' S, de Tolar grande (67° 24' O) a La Poma (66° 12' O).

4.7. Estructura genética de las poblaciones

La estructura genética de las especies puede definirse como la distribución no al azar de alelos o genotipos en el espacio o el tiempo (Loveless & Hamrick, 1984) y es producto de

su dispersión. Utilizando un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier, 1992) se evaluó la estructura genética de las poblaciones de *C. quinoa* mediante el estudio de la diferenciación genética a través de la partición de la varianza en diferentes niveles jerárquicos (Peakall & Smouth, 2006). Para el AMOVA se utilizó la opción de distancia *Codon-Allelic* que genera una matriz de distancia $2N \times 2N$, en representación de las distancias por pares entre todos los alelos de un locus (Michalakis & Excoffier, 1995). Se utilizaron los estadísticos F (Wright, 1921), estimados a partir del AMOVA, para medir la estructuración en los diferentes niveles (intra-individuos, entre individuos, entre poblaciones y entre regiones). Los índices de fijación F miden la variación en la heterocigocidad comparando el valor observado con el esperado si las poblaciones estuvieran en equilibrio Hardy-Weinberg, o en ausencia de subdivisión, ya que asume que la variación dada entre los dos parámetros es producto de la sub-división poblacional. El índice de Fijación, F_{is} , considera la heterocigocidad de un individuo en promedio respecto a la de la sub-población en promedio; F_{it} , considera la heterocigocidad de un individuo respecto a la población total; F_{st} , considera la heterocigocidad de una sub-población respecto a la población total; F_{sr} , es la varianza de una subpoblación respecto a una región determinada y F_{rt} , es la varianza de una región respecto al total (Peakall & Smouth, 2006; Hartl & Clark, 2007).

4.8. Caracterización conjunta

Veinticinco de las 36 poblaciones nativas del NOA incluidas en esta tesis (ver Sección 4.2; tabla 1) fueron caracterizadas a su vez con 17 variables morfo-fenológicas cuantitativas (Tabla 4), según la lista de descriptores para quínoa definidos por el IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute, 1981; actualmente Bioversity International). La disponibilidad de estos datos permitió realizar un análisis de caracterización conjunta y describir el patrón de variación genotípica de las poblaciones a partir de una configuración consenso. A continuación se describe brevemente la metodología utilizada en la caracterización: el experimento se llevó a cabo en la localidad de Calete (Depto. Humahuaca 23° 12' S, 65° 20' O; 2939 msnm; Jujuy-Argentina) durante el ciclo de cultivo

2008-2009; el diseño del experimento fue en bloques completamente aleatorizados con dos repeticiones. Cada parcela consistió de tres surcos de 5 metros de longitud separados por 0,5 metros de distancia. Las 17 variables seleccionadas se registraron en 10 plantas (5 en cada repetición) seleccionadas al azar de la porción media del surco (Curti et al., 2011).

TABLA 4: Variables cuantitativas utilizadas en la caracterización morfológica.

Descriptor	Unidad
Ramas principales (NR) N° de dientes de la hoja superior (ND)	N°
Diámetro de Tallo (DT) Longitud de pecíolo (LP) Longitud de hoja media (LHM) Ancho de hoja media (AHM) Longitud de glómérulo (LGLO) Longitud de cotiledones (LCOT) Longitud de hipocótilo (LHYP) Diámetro de grano (DG)	mm.
Longitud de Panoja (LPAN) Altura de planta (ALTP)	cm.
Siembra-Emergencia (SEMR) Siembra-Botón floral (SBF) Siembra-Floración (SFL) Siembra-Madurez fisiológica (SMF)	días
Forma de la hoja superior (FHS)	

Los estadios de desarrollo (registrados cuando al menos el 50% de las plantas en las parcelas hubieron alcanzado el estadio) fueron determinados como: emergencia, botón floral visible (BFV), primera antesis (al menos una flor abierta) y madurez fisiológica (determinado visualmente del examen de semillas en el tercio medio de la inflorescencia) (Bertero & Ruiz, 2008). El número de ramas se determinó sobre el tallo principal entre el nudo basal y el último nudo por debajo de la panoja. El largo, ancho, número de dientes y longitud del

pecíolo se midieron sobre una hoja basal completamente expandida del tercio medio de la planta. La forma de la hoja superior, definida como la relación largo ancho⁻¹, se midió sobre una hoja completamente expandida del tercio superior de la planta. La mayoría de las características fenotípicas fueron registradas al momento de antesis excepto para aquellas de los estadios de plántula y madurez fisiológica (Curti et al., 2011).

4.8.1. Análisis de datos mixtos mediante método de ordenamiento

Además del Método de Agrupamiento o Clasificación descrito anteriormente para visualizar las relaciones entre las OTUs a partir de los datos obtenidos en la caracterización molecular, puede recurrirse también a los Métodos de Ordenamiento. Estos tienen por objetivo generar una representación geométrica de las OTUs en función de una matriz de distancia asociada, donde se expresen sus diferencias y analogías en un espacio euclídeo con un mínimo de pérdida de información. Ambas técnicas de análisis son de tipo multivariado por lo que analizan simultáneamente medidas múltiples para cada OTU y su principal virtud consiste en permitir la descripción de las OTUs tomando en cuenta todas las variables sin dejar de considerar la relación existente entre ellas (Franco e Hidalgo, 2003).

El Análisis de Procrustes Generalizado (APG) propuesto por Gower (1975), tiene por objetivo examinar en qué medida dos configuraciones resultantes de algún método de ordenamiento son similares (Tussel, 2005), transformando cada configuración individual. La transformación consiste en la traslación, rotación, reflexión y escalamiento de la nube de puntos manteniendo la distancia relativa entre los elementos de cada configuración y minimizando la suma de cuadrados entre puntos análogos. Se utilizó el APG para generar una configuración consenso entre las configuraciones resultantes de la caracterización molecular y aquella con caracteres agromorfológicos.

Dependiendo de la naturaleza de las variables se utiliza un método distinto de ordenamiento: cuando las variables de origen son de tipo cuantitativo se utiliza un Análisis de Componentes Principales (ACP) en que las OTUs quedan separadas en el espacio por distancias euclídeas. Para los descriptores cuantitativos se recurrió al ACP a partir de la matriz de correlación de Pearson confeccionada para establecer las asociaciones entre

pares de descriptores. Luego de calculados los autovalores y autovectores de la matriz de correlación se representaron los puntos individuales (accesiones) en los dos primeros componentes. Se consideraron los auto-valores > 1 , puesto que estos describen variaciones significativas en el conjunto de datos (Cuadras, 2010). En el caso de la caracterización molecular se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) en el que la representación geométrica del ordenamiento de las OTUs se realiza a través de una medida de distancia que respete la estructura de semejanza definida por la matriz de distancia genética. Se calculó el producto escalar de la matriz de distancia y luego los autovalores y autovectores. Se graficaron las OTUs en un bi-plot en que la distancia entre los puntos refleja las relaciones entre las poblaciones según la matriz: las más similares son representadas por puntos que están próximos, mientras que las más disímiles por puntos que están más alejados. Sobre la configuración obtenida de cada método de ordenación se superpuso un Árbol de Expansión Mínima (AEM) para interpretar las relaciones de similitud entre las poblaciones. Con el objetivo de evaluar la importancia del análisis conjunto de los datos se calcularon las correlaciones entre las matrices de distancia para las accesiones caracterizadas por las variables morfológicas y moleculares, y las de éstas con la matriz de consenso.

Todos los análisis anteriormente descriptos se realizaron con el programa NTSyS v. 2.11 W (Rohlf, 1989).

4.9. Análisis bioinformático para la identificación de regiones microsatélites en secuencias ESTs (Expressed Sequence Tags).

Con el objetivo de diseñar marcadores moleculares microsatélites a partir de secuencias de EST se analizaron las genotecas disponibles en bases de datos publicadas en GeneBank (NCBI: National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), actualizadas a agosto 2011 resultando:

- 424 secuencias EST de *Chenopodium quinoa* obtenidas de tejido de semilla inmadura y tejido floral (Coles et al., 2005).

■ 697 secuencias EST de *Chenopodium album* obtenidas en un ensayo bajo stress salino (Gu et al., 2011).

4.9.1. *Detección de unigenes*

Se analizó la redundancia de secuencias de ESTs de la base de datos, mediante el programa EGassembler (Masoudi-Nejad et al., 2006). Las secuencias que mostraron más del 85% de identidad, en tramos de 30 nucleótidos, fueron consideradas idénticas y se asignaron a un grupo específico (“contig”), el resto fueron consideradas secuencias únicas (“singletons”).

4.9.2. *Determinación de secuencias microsatélites (SSR) en unigenes*

Se realizó la búsqueda de regiones microsatélites en las secuencias únicas o no redundantes, mediante la utilización del servidor GDR SSR (Genome Database for Rosaceae; Jung et al., 2004; 2008). Se consideraron secuencias microsatélites con un motivo simple y perfecto. En el caso de motivos dinucleotídicos el mínimo fue de cinco repeticiones para motivos trinucleotídicos de cuatro repeticiones y de tres repeticiones para motivos tetra- y pentanucleotídicos. Se diseñaron todos los oligonucleótidos para amplificar las regiones microsatélites encontradas mediante el software *Primer3* (v. 0.4.0) (Rozen & Skaletsky, 2000) a través del servidor GDR SSR. Dicho programa excluye a aquellas regiones que se encuentran cercanas a los extremos 5' o 3' y no dejan una longitud de secuencia flanqueante suficiente para el diseño de los mismos.

4.9.3. *Determinación de posibles funciones de los unigenes que contienen microsatélites (EST-SSRs)*

Con el fin de asignar una función molecular probable a cada secuencia EST, se analizaron las dos bases de datos utilizando el programa Blast2Go (Conesa et al., 2005) que asigna una clasificación según *Gene Ontology* (GO). El software mencionado describe los productos de los genes, en términos de: proceso biológico asociado (P), componente celular (C) y función molecular (F). Las anotaciones Gene Ontology (GO) se generaron en un proceso de 3 pasos:

- 1) SIMILITUD BLAST: se buscó similitud de secuencias con la base de datos (GenBank) no redundante (nr) de proteínas, utilizando un e-valor de corte de $E \leq 10^{-5}$.
- 2) MAPEO: se utilizaron los resultados del análisis de similitud BLASTX para obtener los términos *Gene Ontology* (GO) mediante archivos de anotación provistos por el Consorcio GO que se incorporaron a la base de datos del servidor Blast2GO.
- 3) ANOTACIÓN: las secuencias se anotaron usando parámetros provistos por el usuario.

Los términos de InterPro se obtuvieron del servidor InterProScan (análisis funcional de proteínas) del EBI (European Bioinformatics Institute), los cuales pudieron ser convertidos y combinados con los términos GO. El programa permitió realizar las anotaciones *Evidence Code* (EC) y de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) generadas a partir de GO.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados preliminares y elección de estrategia de trabajo

La quínoa es una especie autógama con un porcentaje variable de alogamia (entre un 2% y un 10 %) (Gandarillas, 1976) dependiendo de la variedad y de la distancia entre plantas a campo por lo que se esperaría una baja variabilidad genética intra – poblacional. En los antecedentes de caracterización molecular de *C. quinoa* mediante marcadores SSR (Christensen et al., 2007 y Fuentes et al., 2008) utilizaron la técnica de bulk de tres plantas como muestra representativa de cada genotipo, sin posibilidad de estimar la variabilidad intra-poblacional dado por el grado de alogamia de la especie.

Para definir la estrategia de trabajo se comparó la técnica de bulk y plantas individuales (Figura 15). El análisis de agrupamiento agrupó cada bulk con los individuos correspondientes de la misma población, sin embargo la técnica no presentó la sensibilidad suficiente para detectar toda la variabilidad existente. En las poblaciones que presentaron alto polimorfismo el análisis de individuos permitieron observar la aparición de alelos poco frecuentes que no fueron detectados utilizando la técnica de bulk. A partir de los resultados obtenidos se decidió realizar la caracterización a nivel de planta individual. Adicionalmente, dada la naturaleza co-dominante de los SSR, el análisis de las poblaciones a nivel de individuos permitiría conocer otros parámetros poblacionales de la especie.

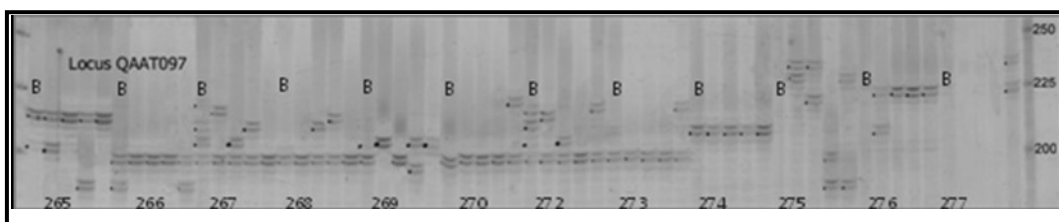


FIGURA 15: Patrón de bandas obtenido para el locus QAAT097 (letra B indica el bulk de seis plantas y luego las cuatro plantas individuales).

5.2. Germoplasma procedente de la región del Noroeste Argentino (NOA)

5.2.1. Diversidad molecular

Se evaluaron 22 *loci* SSR en 36 poblaciones de *C. quinoa* nativa del NOA. Se caracterizaron diez individuos de cada población, y se corrieron en el gel de poliacrilamida junto con individuos control con el objetivo de validar la identidad alélica entre las distintas poblaciones, y entre los distintos geles, para cada locus analizado. Muchos de los *loci* presentaron patrones mono-nucleotídicos, incongruentes con el motivo del microsatélite correspondiente, detectándose con mayor frecuencia en los *loci* QAAT050, QAAT027, QAAT024 y QAAT071. Estos patrones pueden ser producto de eventos de inserción o deleción (Chen et al., 1997), mutaciones puntuales o fallas en la actividad de la polimerasa (deslizamientos) (Calabrese et al., 2001). Todos los *loci* presentaron un patrón de amplificación monogénico y fueron codificados fácilmente como co-dominantes (Figura 16), al igual que lo reportado por Maughan et al. (2004) y Mason et al. (2005).

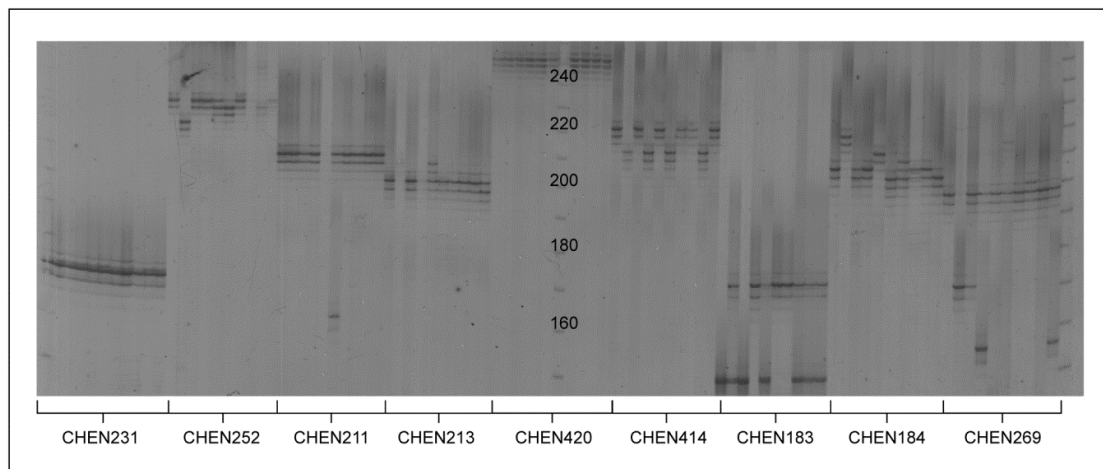


FIGURA 16: Ejemplo de patrón de amplificación monogénico para el locus QAAT022. Los corchetes en la parte inferior indican los diez individuos de cada población.

Los 22 *loci* SSR se caracterizaron mediante los parámetros Heterocigosidad total (Ht), número de alelos por locus (A), presencia de alelos privados, y la media aritmética entre todas las poblaciones del Índice de información (I), que se describen en la Tabla 4. El promedio de alelos detectados por locus fue de 16, aproximadamente, en un rango de 6 (QCA067) a 33 (QAAT022), detectándose en total 360 alelos diferentes entre todas las

poblaciones. El rango de tamaño de los alelos en cada locus se indica en la tabla 4, mientras que el detalle de tamaño de los alelos detectados en cada locus se detallan en el anexo (Tabla 1). Considerando los valores de Ht, la mayoría de los *loci* SSR caracterizados fueron altamente polimórficos, presentando valores superiores a 0,70, excepto para los *loci* QAAT084 y QGA002 que presentaron valores menores (0,58 y 0,62, respectivamente). Los valores de I variaron de 0,250 (QCA067) a 0,714 (QAAT088) mostrando mayor variabilidad a través de los *loci*. Excepto el locus QCA067, todos los *loci* presentaron al menos un alelo privado o exclusivo con una frecuencia relativa del 5 % como mínimo (Tabla 2, anexo), detectándose 97 alelos privados en total.

TABLA 5: Locus, Heterocigosidad total (Ht), Número de alelos (A), Número de alelos privados, Rango tamaño de los alelos (pb) y media aritmética de los valores de Índice de Información (I) ^a.

Locus	Ht	A	Alelos privados	Rango de tamaño de alelos (pb)	I
QAAT074	0,82	14	4	167-207	0,535 (0,092)
QAAT088	0,90	21	3	112-200	0,714 (0,099)
QAAT001	0,89	19	5	134-215	0,565 (0,081)
QAAT097	0,89	18	4	167-218	0,624 (0,101)
QAAT076	0,92	20	4	142-215	0,581 (0,089)
QAAT087	0,91	19	6	166-235	0,509 (0,083)
QAAT112	0,78	11	3	185-220	0,407 (0,071)
QAAT050	0,84	17	7	184-228	0,408 (0,075)
QAAT027	0,87	21	4	147-187	0,581 (0,083)
QAAT062	0,90	18	1	155-206	0,587 (0,080)
QAAT106	0,75	12	4	287-319	0,405 (0,066)
KGA03	0,73	9	2	137-167	0,288 (0,060)
QAAT022	0,93	33	13	146-252	0,712 (0,096)
KGA020	0,89	15	5	156-199	0,394 (0,075)
QGA002	0,62	10	1	184-208	0,372 (0,076)
QAAT024	0,84	19	5	193-247	0,495 (0,076)
QAAT078	0,80	14	5	178-253	0,548 (0,073)
QAAT084	0,58	9	2	147-177	0,320 (0,075)
QGA03	0,77	20	10	129-197	0,491 (0,076)
QCA067	0,70	6	0	197-214	0,250 (0,066)
QAAT026	0,84	14	5	151-206	0,357 (0,070)
QAAT071	0,93	21	4	138-257	0,469 (0,085)
Total		360	97		
Promedio		16,4			

^a Números entre paréntesis corresponden a los valores de Error Estándar (EE).

5.2.2. Diversidad genética de las poblaciones

La diversidad genética de las poblaciones se determinó mediante distintos parámetros de diversidad alélica calculados en cada población, descritos en la tabla 6. Las poblaciones se ordenaron de menor a mayor según el valor de UHe. El rango de los valores de riqueza alélica entre las poblaciones fue entre 20 y 124 con un promedio de $50 \pm 4,1$. La media aritmética de UHe entre todas las poblaciones fue $0,29 \pm 0,01$, en un rango entre 0 y $0,71 \pm 0,03$. Los valores extremos de ambos parámetros fueron para las poblaciones CHEN274 y 272, respectivamente. El promedio de *loci* polimórficos entre todas las poblaciones fue $62,1 \pm 4,9$. La población CHEN274 no presentó polimorfismo en ningún *loci*, mientras que las poblaciones CHEN269, 272, 432 (La Poma) y 427 (Susques), presentaron polimorfismo en el 100 % de los *loci* analizados, siendo las últimas cuatro las poblaciones con mayor riqueza alélica y mayor diversidad genética de la colección explorada. Se detectaron alelos privados en 28 poblaciones.

TABLA 6: Patrón de diversidad alélica para cada población. Riqueza alélica (Na), media aritmética de la Heterocigosidad esperada insesgada ^a (UHe), Porcentaje de *loci* polimórficos (%P) y presencia ^b y número de alelos privados.

Población	Na	UHe	%P	Nº de alelos privados
CHEN 274	20	0,00 (0,00)	0,00	-
CHEN 463 ^b	23	0,02 (0,02)	4,55	2
CHEN 212 ^b	26	0,03 (0,01)	18,18	2
CHEN 458	24	0,03 (0,02)	9,09	-
CHEN 434	30	0,07 (0,02)	36,36	-
CHEN 60 ^b	28	0,09 (0,03)	27,27	1
CHEN 466 ^b	34	0,10 (0,03)	45,45	1
CHEN 420	31	0,10 (0,04)	31,82	-
CHEN 213	33	0,12 (0,04)	45,45	2
CHEN BL ^b	32	0,14 (0,04)	45,45	2
CHEN 211 ^b	36	0,16 (0,04)	54,55	2
CHEN 183 ^b	37	0,16 (0,04)	50,00	1
CHEN 456	32	0,16 (0,05)	40,91	-
CHEN 451	36	0,18 (0,04)	59,09	-
CHEN 422 ^b	38	0,20 (0,05)	59,09	1
CHEN 256 ^b	39	0,22 (0,06)	50,00	4
CHEN 431 ^b	45	0,24 (0,05)	63,64	1
CHEN 465 ^b	44	0,25 (0,06)	59,09	1
CHEN ANT ^b	52	0,27 (0,03)	90,91	6

CHEN 231 ^b	41	0,27 (0,06)	59,09	1
CHEN 468 ^b	43	0,29 (0,05)	63,64	2
CHEN 252 ^b	44	0,29 (0,06)	59,09	6
CHEN 414 ^b	39	0,34 (0,05)	68,18	3
CHEN 482 ^b	52	0,35 (0,05)	81,82	5
CHEN 446 ^b	60	0,38 (0,04)	100,00	3
CHEN 461 ^b	51	0,38 (0,06)	72,73	1
CHEN 58 ^b	60	0,42 (0,05)	86,36	4
CHEN 426	60	0,45 (0,05)	86,36	-
CHEN 182 ^b	57	0,45 (0,06)	81,82	2
CHEN 438 ^b	74	0,50 (0,05)	95,45	4
CHEN 184 ^b	73	0,53 (0,05)	95,45	4
CHEN 275 ^b	91	0,58 (0,06)	95,45	9
CHEN 269 ^b	98	0,61 (0,03)	100,00	8
CHEN 427 ^b	89	0,65 (0,02)	100,00	4
CHEN 432 ^b	97	0,71 (0,02)	100,00	3
CHEN 272 ^b	124	0,71 (0,03)	100,00	12
Promedio	50 (4,1)	0,29 (0,01)	62,12 (4,87)	97

^a Números entre paréntesis corresponden a los valores de Error Estándar (EE).

^b Poblaciones que presentan alelos privados.

5.2.3. Distancia genética entre las poblaciones del NOA

A partir de la Matriz de frecuencias alélicas relativas (de dimensión 36 x 360), se calculó la distancia genética entre poblaciones utilizando diferentes medidas (Anexo). Mediante correlación entre matrices y test de Mantel se evaluó la relación entre las distintas medidas de distancia (Tabla 7). Los altos valores de correlación obtenidos muestran que las diferentes matrices de distancia están muy relacionadas exhibiendo prácticamente la misma estructura entre las poblaciones. La distancia de Nei supone que la tasa de sustitución de bases por locus es uniforme a lo largo de los *loci* y linajes, lo que es poco probable en la realidad (Swofford y Olsen, 1990). Respecto a este supuesto Hillis (1984) propuso calcular la distancia de Nei para cada locus y luego promediarla por todos los *loci*, uniformizando la tasa de sustitución. Los inconvenientes de las dos distancias es que ninguna cumple con la propiedad de ser métrica, el valor de distancia puede tender a infinito en caso de que haya discrepancia total entre las OTU comparadas, y además son medidas angulares. Para subsanar esto Cavalli-Sforza y Edwards (1967) presentaron varias distancias, entre ellas la de la cuerda, que las estandariza respecto a tendencias aleatorias, por lo que la tasa de

incremento en la distancia genética es independiente de los valores iniciales de las frecuencias alélicas. Otra distancia sencilla para interpretar es la de Rogers (1972) que se basa en el promedio de las distancias euclídeas entre los vectores de frecuencias alélicas de las OTU que se están comparando. La distancia de Prevosti (1974, 1978) consiste en hallar la media aritmética sobre la distancia de Manhattan (Cain & Harrison, 1958 en Bramardi, 2008) calculada para cada locus. Las tres últimas distancias son euclídeas, propiedad necesaria en los métodos de ordenación (Bramardi, 2008).

TABLA 7: Matriz de correlación entre las medidas de distancia genética testeadas ($P < 0,001$).

	Nei (1972)	Rogers (1972)	Hillis (1984)	Cavalli-Sforza&Edwards (1967)	Prevosti (1978)
Nei (1972)	1				
Rogers (1972)	0,871	1			
Hillis (1984)	0,993	0,879	1		
Cavalli-Sforza&Edwards (1967)	0,902	0,941	0,913	1	
Prevosti (1978)	0,873	0,883	0,873	0,958	1

Para terminar de definir la medida de distancia a utilizar se evaluó la correlación co-fenética, respecto al dendograma UPGMA, de las distancias que cumplieran la propiedad de ser euclídeas (Tabla 3, anexo). El mayor valor de correlación obtenido fue para la medida de Prevosti (1978) ($r=0,90$, $p < 0,001$), indicando la mejor representación entre la matriz de distancia y el agrupamiento de las OTU. El promedio de distancia genética entre las poblaciones fue de $0,81 \pm 0,01$ con un rango entre 0,17 (entre CHEN 465 y 466) y 0,99 (entre CHEN BL y 256) (Tabla 4, anexo).

5.2.4. Análisis de agrupamiento

Para visualizar las relaciones entre las poblaciones según su distancia se construyó un dendograma con criterio de ligamiento UPGMA (Figura 17). Realizando un corte en el valor de la distancia genética promedio se formaron cuatro grandes grupos. El grupo 1 (G1) formado por las poblaciones CHEN 414, 231, 183, 275, 58, 182, 252, 434, 60, 274 que se

une a una distancia de 0,84, aproximadamente, con el grupo 2 (G2), formado por las poblaciones CHEN213, 456, 458, 461, 463, 451, 212 y 482. El grupo 3 (G3), formado por las poblaciones CHEN468, 465, 466, 256, 446 y ANT se une a 0,86 de distancia con las anteriores, para finalmente agruparse con el grupo 4 (G4), formado por las poblaciones CHEN420, BL, 422, 211, 426, 438, 184, 431, 427, 432, 272 y 269. La figura 18 muestra los distintos grupos de poblaciones según el sitio de origen. Siguiendo un gradiente longitudinal de este a oeste, los grupos representan diferentes subregiones del NOA: G4 agrupa las poblaciones procedentes de la Puna, G1 las poblaciones procedentes de la zona de los Valles secos y G2 poblaciones procedentes de los Valles húmedos. Las poblaciones agrupadas en G3, con excepción de la procedente de Antofagasta de la sierra (provincia de Catamarca) proceden de una zona de transición entre los Valles secos y los Valles húmedos.

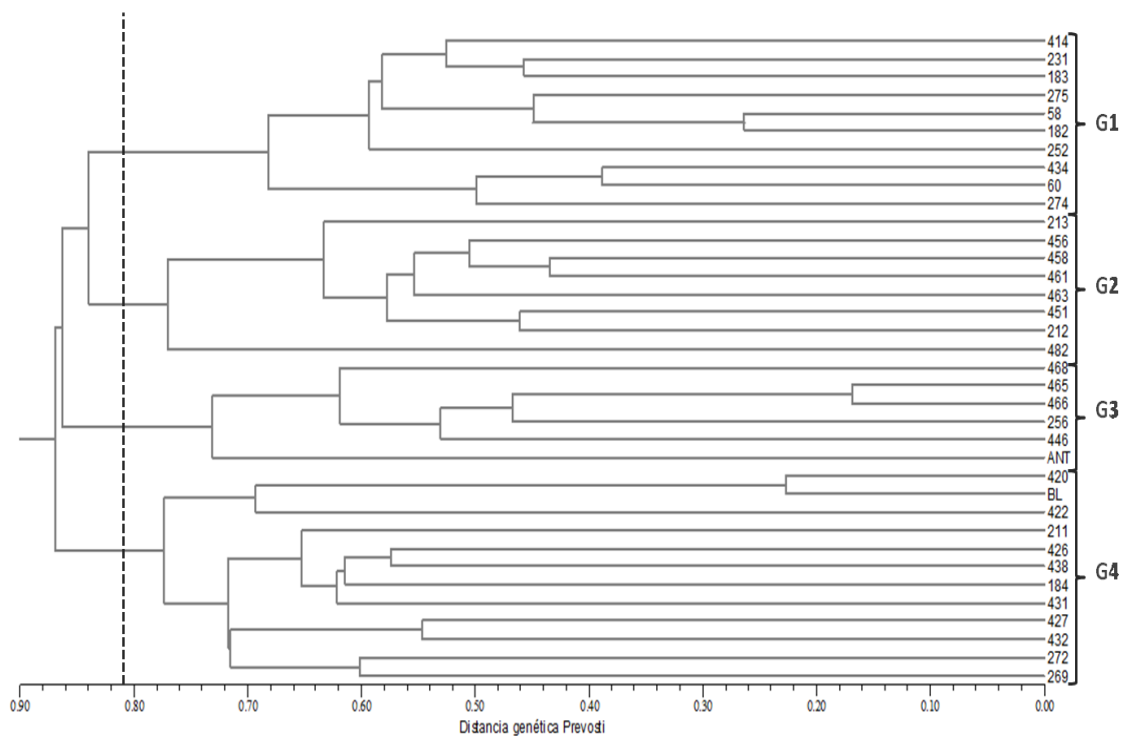


FIGURA 17: Dendrograma UPGMA generado a partir de la matriz de distancia genética de Prevosti. Se indica la distancia promedio (línea punteada), nivel al que se forman cuatro grandes grupos: G1, G2, G3 y G4.

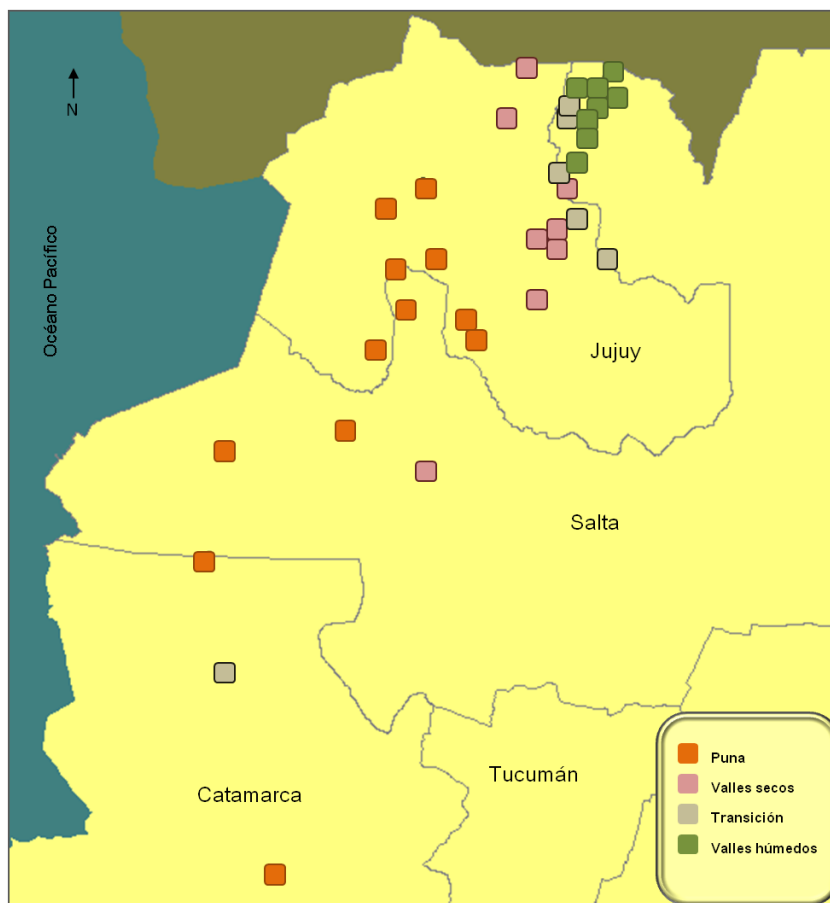


FIGURA 18: Visualización del agrupamiento de las poblaciones según su distancia genética. **G1**, poblaciones de valles secos (cuadrado rosa); **G2**, poblaciones procedentes de valles húmedos (cuadrado verde); **G3**, poblaciones procedentes de una zona de transición (cuadrado gris); **G4**, poblaciones procedentes de la puna (cuadrado naranja).

5.2.5. Estructura genética de las poblaciones

En base a los cuatro grandes grupos obtenidos en el análisis de agrupamiento se realizó un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA), particionando la varianza total en diferentes niveles jerárquicos (Figura 19; tabla 5, anexo). El 18% del total de la varianza se debió a la diferenciación entre regiones, el 39 % entre poblaciones, 27 % entre plantas individuales y el 16 % restante, intra- individuos (generada a partir del calcular la distancia entre los alelos de cada individuo). Según los valores de los índices de Fijación, hay un grado de estructura debido a la división en regiones ($F_{rt} = 0,18$). De acuerdo a la escala cualitativa citada por Wright (1978), el $F_{st} = 0,57$ indica una gran diferenciación entre las poblaciones. Los valores de F_{is} (0,63) y F_{it} (0,84) indican una deficiencia de genotipos

heterocigotas, en relación a lo esperado en cada sub-población y a la población total, respectivamente. Todos los valores de los índices F fueron estadísticamente significativos, según un test de permutaciones ($p = 1000$) (Peakall & Smouse, 2006).

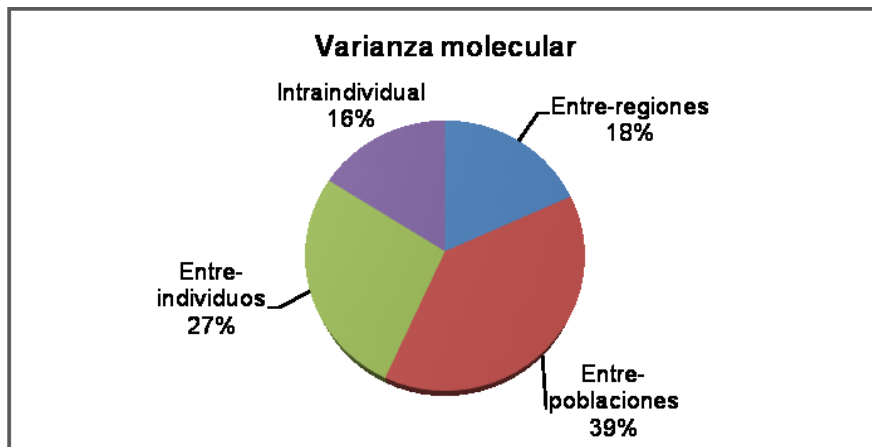


FIGURA 19: Partición de la varianza molecular total.

5.2.6. Diversidad alélica entre grupos de poblaciones

Como se mencionó anteriormente, los cuatro grupos de poblaciones representan distintos ambientes o sub-regiones del NOA (Figura 18), con excepción de la población CHEN-ANT. Con el objetivo de caracterizar cada grupo de poblaciones se calcularon diferentes parámetros de diversidad (Tabla 8) sin considerar la población mencionada. De oeste a este, la Puna (G4), los Valles secos (G1), la zona de transición (G3) y los Valles húmedos (G2) muestran un gradiente decreciente en la magnitud de la diversidad genética. Las poblaciones procedentes de la Puna (12) fueron en promedio las más diversas ($U_{He} = 0,42 \pm 0,02$), el 77,65 % de los *loci* caracterizados, en promedio, fueron polimórficos amplificándose en total 797 alelos de los cuales 41 fueron exclusivos. Todos los *loci* fueron altamente informativos, presentando un rango de valor de I entre $0,974 \pm 0,120$ (QAAT027) y $0,439 \pm 0,084$ (QAAT106) (Tabla 6, anexo). En orden decreciente por la magnitud de la diversidad, la diversidad entre las poblaciones procedentes de los Valles secos (10) y de la zona de transición (5) fue similar ($0,27 \pm 0,03$ y $0,25 \pm 0,02$, respectivamente). Entre las poblaciones de los Valles secos el 56,36 % de los *loci*, en promedio, fueron polimórficos

amplificándose 447 alelos en total de los cuales 27 fueron exclusivos. El *I* promedio entre los *loci* fue moderado ($0,43 \pm 0,04$) resultando los *loci* QAAT088, QAAT062, QAAT022 y QAAT024 los más informativos (Tabla 6, anexo). En las poblaciones que componen el clúster de Transición se amplificaron 220 alelos totales de los cuales 11 fueron exclusivos, presentando el 63,64 % de los *loci* polimórficos, en promedio. Los *loci* más informativos fueron QAAT088 y QAAT 112 (Tabla 6, anexo). Las poblaciones procedentes de los Valles húmedos (8) fueron las menos diversas ($U_{He} = 0,16 \pm 0,01$); el 41,18 % de los *loci* caracterizados, en promedio, resultaron polimórficos, amplificándose 277 alelos totales (12 exclusivos). El *I* en promedio entre los *loci* caracterizados fue bajo ($0,246 \pm 0,02$), siendo los *loci* QAAT022 y QAAT078 los más informativos.

TABLA 8: Número de poblaciones, promedio de Heterocigosidad (U_{He}), promedio del Porcentaje de *loci* polimórficos (%P), alelos totales y alelos privados detectados en las poblaciones de cada subregión ^a.

Sub-region	N	U_{He}	Alelos totales	%P	Alelos privados
Puna (G4)	12	0,42 (0,02)	797	77,65 (0,07)	41
Valles secos (G1)	10	0,27 (0,03)	447	56,36 (0,09)	27
Transición (G3)	5	0,25 (0,02)	220	63,64 (0,10)	11
Valles húmedos (G2)	8	0,16 (0,01)	277	41,48 (0,10)	12

^a Números entre paréntesis corresponden a los valores de Error Estándar (EE).

5.2.7. Relación entre la magnitud de la diversidad genética y las características climáticas de la región del NOA

De la relación entre la magnitud de la diversidad genética y las distintas variables climáticas se puede decir que ésta es, en términos generales, inversa, es decir a mayor precipitación y temperatura disminuye la U_{He} . La única excepción es la variable BIO15 que corresponde a la variabilidad de las lluvias, que exhibe una relación positiva con la diversidad genética. Por otro lado es de destacar los valores bajos de correlación encontrados, que no superan en ningún caso el 50%, muchos de ellos resultando incluso no significativos (Tabla 7, anexo).

Con el objetivo de encontrar un modelo predictivo de la diversidad genética en función de estas variables climáticas se realizó una Regresión Lineal Múltiple (RLM). El conjunto de variables explicativas (19 de la base de datos Bioclim y altitud) fueron testeadas mediante el método paso a paso, siendo la variable Precipitación del cuarto más húmedo la única incluida en el modelo ($p < 0,01$). El R^2 fue bajo (0,25) y como era de esperarse la pendiente resultó negativa (Figura 20). Se verificaron los supuestos de normalidad dando como resultados valores residuales normales y homocedásticos (Tabla 8, anexo).

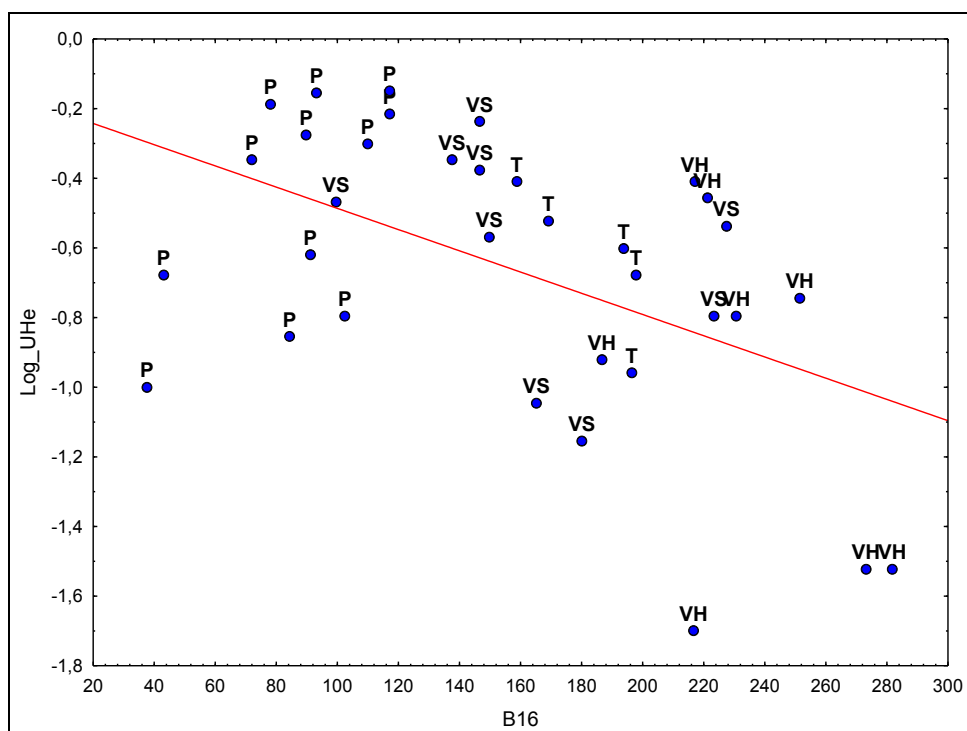


FIGURA 20: Diagrama de dispersión diversidad genética (UHe) versus Precipitación del Cuarto más húmedo (B16). Se indican las poblaciones de acuerdo a la pertenencia de los grupos genéticos **P**: puna, **VS**: valles secos, **T**: transición y **VH**: valles húmedos.

5.2.8. Caracterización conjunta

Veinticinco de las 36 poblaciones nativas del NOA estudiadas en esta tesis (Tabla 1) fueron caracterizadas con 17 variables morfo-fenológicas cuantitativas (Tabla 3) y, en conjunto con la caracterización molecular se estudió un ordenamiento consenso de las poblaciones mediante un Análisis de Procrustes Generalizado (APG). En un paso previo se

calculó la correlación entre las matrices de distancia derivadas de cada caracterización (euclídea estandarizada para morfo-fenológica y Prevosti para molecular). La correlación fue baja ($r = 0,43$) pero estadísticamente significativa ($p < 0,01$), indicando complementariedad en la información de cada caracterización.

Se utilizaron métodos de ordenación separadamente según el tipo de caracterización efectuada para estudiar el ordenamiento de las 17 poblaciones en un espacio bi-dimensional según la distancia euclídea entre ellas. En el Análisis de Componentes Principales (ACP) obtenido a partir de la caracterización morfo-fenológica (Figura 21) los dos primeros componentes explicaron el 56,3 % de la variación total. El componente uno (CP1) representó el 41,5 % de la variación siendo la altura de planta (ALTP) la variable que más peso tuvo sobre dicha componente, de acuerdo a los valores de los auto-vectores (Tabla 9, anexo). Seguidamente las variables más influyentes fueron las relacionadas con la fenología: Siembra-botón floral (SBF), Siembra-floración (SFL), Siembra-madurez fisiológica (SMF); la morfometría de hoja: Longitud del peciolo (LP), Longitud de la hoja media (LHM), Ancho de la hoja media (AHM) y el diámetro del tallo (DT). Sobre el primer componente se separaron las accesiones procedentes de los Valles Secos y Húmedos (CHEN252, 414, 60, 58, 231, 182, 183, 451, 456, 458, 461, 463, 212) que presentan mayor altura, un ciclo de madurez intermedio o tardío, mayor diámetro de tallo y hojas de mayor superficie y otro grupo compuesto por accesiones procedentes del altiplano (CHEN431, 432, 438, 420, 426, 427) de menor altura, ciclo más corto y hojas más pequeñas. Un tercer grupo de poblaciones procedente de la zona de Transición de altura (CHEN465, 466, 468, 482) presentó valores intermedios para las variables mencionadas. Sobre el segundo componente (CP2) el diámetro de grano (DG) y la forma de la hoja superior (FHS) fueron las variables con mayor peso. El CP2 representó el 14,8 % de la variación y sobre esta se separaron las entradas procedentes de la zona de Transición de altura, del resto. Presentaron valores menores de DG y valores mayores de FHS. La población CHEN256 procedente del departamento de Iruya y la CHEN275 procedente del departamento de Humahuaca se ubicaron más lejos de los grupos, sin embargo, el Árbol de Expansión

Mínima (AEM) superpuesto en el PCA las une al grupo de accesiones procedentes de los valles.

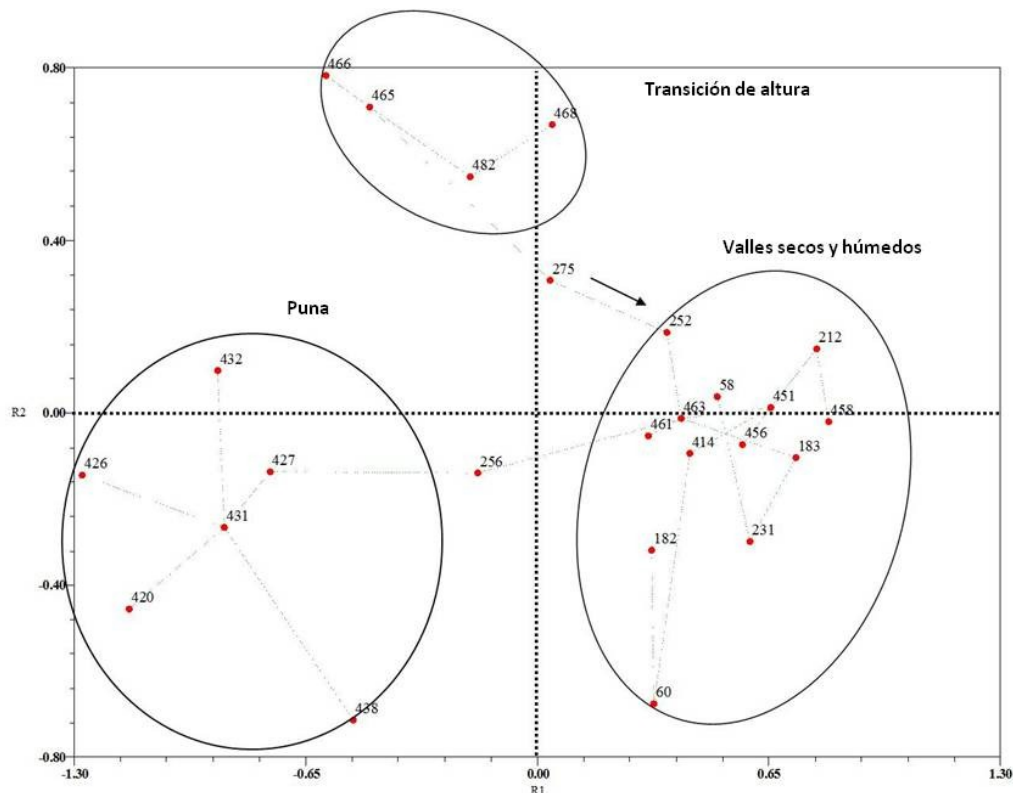


FIGURA 21: Ordenación de la accesiones sobre las dos primeras componentes del Análisis de Componentes Principales en base a la caracterización morfo-fenológica. Se indican tres grupos de accesiones: procedentes de los valles, de la zona de transición de altura y procedentes de la Puna.

En el Análisis de Coordenadas Principales (ACoP) obtenido a partir de la caracterización molecular (Figura 22) los dos primeros ejes representaron el 36,9 % de la dispersión total de los puntos, particionado en 20,3 % en la primer coordenada y el 16,6 % en la segunda. En el ACoP las distancias entre los puntos reflejan el grado de similitud entre ellos, determinado por la matriz de distancia original. Las accesiones se ordenaron en cuatro grupos según el ambiente de origen: Puna, Valles secos, Transición de altura y Valles húmedos. El AEM superpuesto en el ACoP muestra las relaciones entre las accesiones y el orden de unión entre los grupos según la semejanza entre ellos. Aunque la población CHEN60 procedente de Iruya se ordenó a mayor distancia del resto de las accesiones de valles secos, se une al grupo mencionado. La población CHEN482 procedente del

departamento de Santa Victoria se ordenó de manera intermedia a los grupos de accesiones procedentes de valles. El AEM muestra que se separa luego del grupo de valles secos quedando a mayor distancia del grupo de accesiones de valles húmedos.

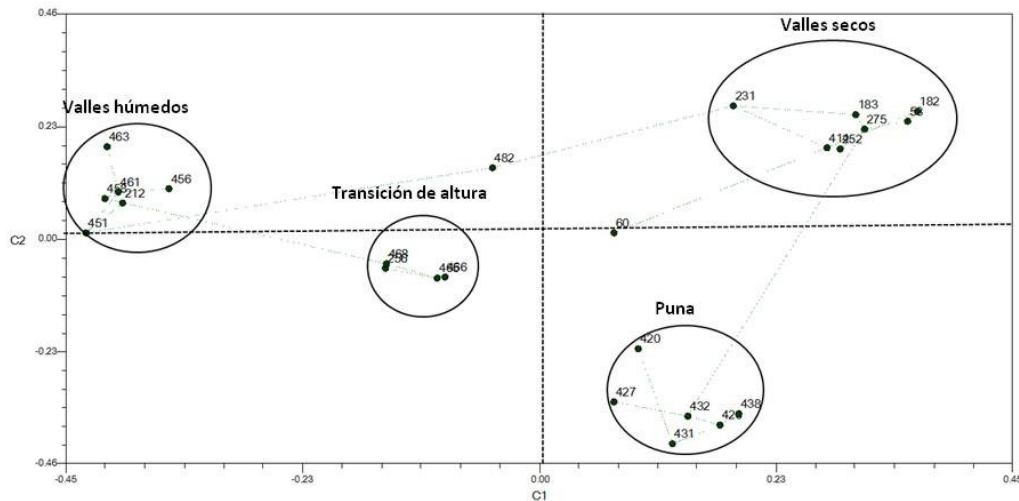


FIGURA 22: Ordenación de la accesiones sobre las dos primeras coordenadas del Análisis de Coordenadas Principales. Se indican cuatro grupos de accesiones: procedentes de la Puna, de los valles secos, de los valles húmedos y de la zona de transición de altura.

A partir de las configuraciones obtenidas del ACP y del ACoP se realizó el Análisis de Procrustes Generalizado (APG). La Figura 22 muestra el ordenamiento consenso obtenido. Las accesiones se ordenaron en cuatro grupos al igual que en el ACoP, definiendo la unión de CHEN 482 y 60 a los grupos de las accesiones procedentes de los valles de altura y de los valles secos, respectivamente. A mayor distancia entre los puntos y el consenso, mayor es la discrepancia de las caracterizaciones. Las poblaciones CHEN 427, 431 y 432 fueron las que presentaron menor discrepancia entre ambas caracterizaciones. La correlación entre la matriz de distancia consenso y las matrices de distancia derivadas de cada caracterización ($r=0,78$ distancia euclídea y $r=0,67$ distancia genética; $p<0,001$) fue mayor que la correlación obtenida *a priori* entre las caracterizaciones indicando una representación adecuada. Además los valores de correlación indican mayor participación en el consenso de la caracterización morfológica.

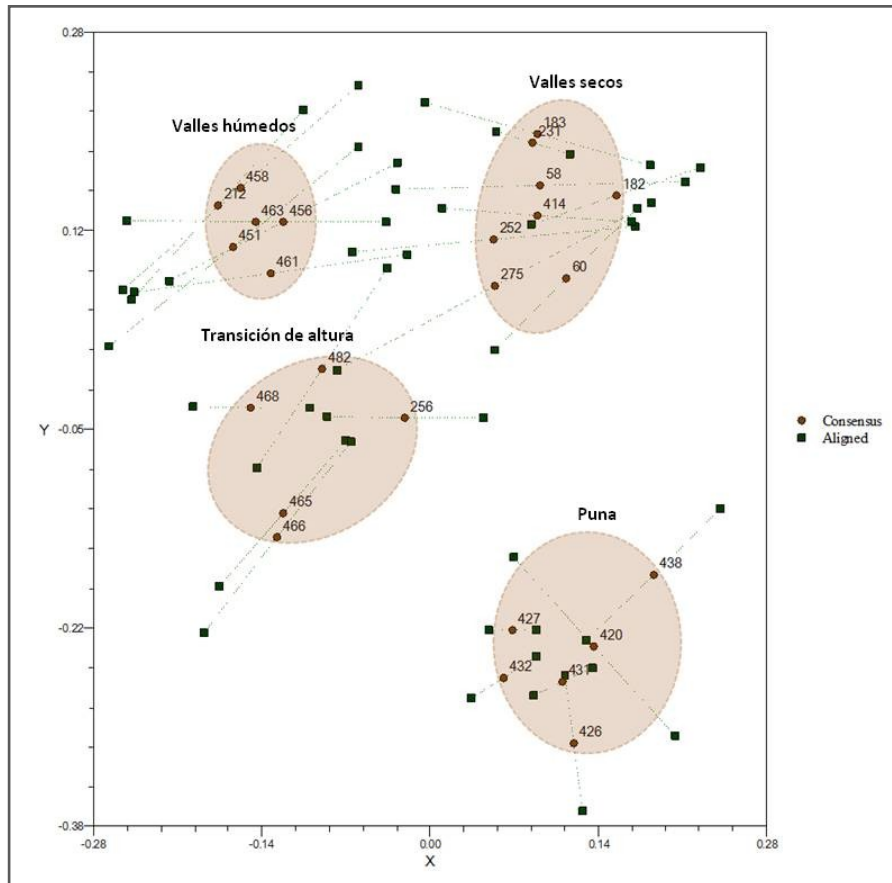


FIGURA 22: Ordenación consenso resultante del APG con variables morfológicas y moleculares. Se indican cuatro grupos de accesiones: procedentes de la puna, de los valles secos, de los valles húmedos y de la zona de transición de altura.

5.3. Germoplasma procedente del resto de Sudamérica

5.3.1. Diversidad molecular

Se utilizaron los mismos 22 *loci* de SSR (utilizados en la caracterización del germoplasma del NOA) para caracterizar molecularmente 45 poblaciones de *C. quinoa* procedentes de distintos países de Sudamérica: Bolivia (22), Chile (10), Colombia (1), Ecuador (2), Perú (8) (Tabla 1). Además se caracterizaron dos poblaciones procedentes de Cholila, provincia de Chubut, Argentina, que se incluyeron en este grupo por su procedencia (fuera de la región considerada habitualmente tradicional de cultivo). La población TAR15 procedente de Abra de la Cruz, departamento de Tarija, Bolivia no se consideró en el análisis ya que sólo tres individuos tuvieron éxito en la amplificación. En la Tabla 8 se describen los parámetros: Heterocigosidad total (Ht), número de alelos por locus (A),

presencia de alelos privados, y la media aritmética entre todas las poblaciones del Índice de información (I), caracterizando el nivel de información de cada locus sobre las entradas extranjeras.

TABLA 9: Locus, Heterocigosidad total (Ht), número de alelos (A), número de alelos privados, rango tamaño de los alelos (pb) y media aritmética de los valores de Índice de información (I) ^a.

Locus	Ht	A	Alelos privados	Rango de tamaño de alelos (pb)	I
QAAT074	0,91	19	3	169-219	0,680 (0,080)
QAAT088	0,92	23	3	122-175	0,895 (0,090)
QAAT001	0,95	29	7	130-222	0,628 (0,081)
QAAT097	0,90	24	7	167-224	0,680 (0,074)
QAAT076	0,93	32	8	142-226	0,796 (0,080)
QAAT087	0,92	25	4	166-285	0,560 (0,086)
QAAT112	0,76	15	4	192-225	0,440 (0,066)
QAAT050	0,92	31	8	176-243	0,710 (0,083)
QAAT027	0,91	22	5	147-224	0,585 (0,087)
QAAT062	0,93	35	13	152-282	0,931 (0,084)
QAAT106	0,86	19	4	285-332	0,500 (0,070)
KGA03	0,82	17	5	146-179	0,490 (0,070)
QAAT022	0,96	32	7	135-239	0,789 (0,077)
KGA020	0,89	18	6	156-191	0,608 (0,066)
QGA002	0,81	14	4	162-208	0,385 (0,061)
QAAT024	0,92	25	5	196-253	0,549 (0,079)
QAAT078	0,88	16	2	178-230	0,733 (0,072)
QAAT084	0,86	12	0	147-191	0,434 (0,059)
QGA03	0,89	23	8	140-221	0,599 (0,064)
QCA067	0,80	7	1	195-214	0,318 (0,056)
QAAT026	0,99	18	4	170-229	0,326 (0,082)
QAAT071	0,92	29	8	126-195	0,715 (0,076)
Total		485	116		
Promedio		22,1			

^a Números entre paréntesis corresponden a los valores de Error Estándar (EE).

El promedio de alelos detectados por locus fue de 22,1 en un rango de 7 (QCA067) a 35 (QAAT0062), detectándose en total 486 alelos diferentes entre todas las entradas. El rango de tamaño de los alelos se indica en la tabla 8, mientras que el tamaño de los alelos detectados en cada locus se detalla en el anexo (Tabla 1). Considerando los valores de Ht, todos los *loci* SSR caracterizados fueron altamente polimórficos, presentando valores superiores a 0,70. Los valores de I variaron de 0,32 (QCA067) a 0,93 (QAAT062). La

amplificación del locus QAAT026 entre el germoplasma de Sudamérica fue errática, obteniendo datos para 19 de las 45 poblaciones. Excepto para el locus QAAT84, todos los *loci* presentaron al menos un alelo privado o exclusivo con una frecuencia relativa de 5 % como mínimo (Tabla 2, anexo), detectándose 116 alelos privados entre todas las poblaciones.

5.3.2. Diversidad genética de las poblaciones

Se determinó la diversidad genética de las entradas mediante distintos parámetros calculados para cada población, descritos en la Tabla 10. Las poblaciones se ordenaron de menor a mayor según el valor de diversidad genética, de acuerdo a su país de procedencia, con el objetivo de evaluar la variabilidad por región. El rango de magnitud de la diversidad genética de las entradas de Bolivia fue de 0 a $0,63 \pm 0,05$ (accesiones ChucA, procedente de Chuquisaca y TAR3 de Potosí, respectivamente) marcando también el rango de riqueza alélica (entre 20 y 97), con un promedio de $54 \pm 4,1$. El porcentaje de *loci* polimórficos fue muy variable y se detectaron 56 alelos privados, 9 de los cuales se detectaron en la accesión ChucD. Entre las accesiones procedentes de Chile el rango de los valores de UHe fue de 0 a $0,55 \pm 0,07$ (CHEN178 y 169, respectivamente, ambas procedente del Altiplano Norte) con un promedio de $0,31 \pm 0,06$, marcando también el rango de riqueza alélica (entre 21 y 72, con una media de $48,3 \pm 6,2$). En promedio, $54,5 \pm 3,2$ % de los *loci* fueron polimórficos y se detectaron 32 alelos privados, 10 de ellos en la accesión CHEN025 (Lo Valdivia, de la región conocida como Secano Costero al sur-oeste de Santiago de Chile). Las accesiones procedentes de Perú presentaron un rango en valores de diversidad de $0,03 \pm 0,02$ a $0,56 \pm 0,05$ y entre 24 y 86 de riqueza alélica (para CHEN005 y 361, respectivamente, ambas procedentes del Dpto Puno). El $65,91 \pm 11,59$ % de los *loci* caracterizados fueron polimórficos, y se detectaron 15 alelos privados. En la única entrada caracterizada procedente de Nariño, Colombia (CHEN002) se detectaron 72 alelos totales, entre los cuales 2 fueron privados, resultando polimórficos el 90,9 % de los *loci*. La diversidad genética fue de $0,5 \pm 0,05$. Las dos entradas caracterizadas procedentes de Ecuador presentaron una riqueza alélica similar (83 y 84 alelos) y en total 9 alelos privados.

La población más diversa fue CHEN166 ($0,62 \pm 0,04$, cultivar Ecu-420) que presentó el 100 % de los *loci* polimórficos mientras que CHEN073 (Ingapirca) presentó una diversidad de $0,57 \pm 0,06$ y el 81,82 % de *loci* polimórficos. Las accesiones procedentes de Cholila, Chubut, Argentina presentaron niveles de diversidad y riqueza alélica similares: 57 y 56 alelos y $U_{He} = 0,47 \pm 0,04$ y $0,48 \pm 0,05$ para Chol1 y Chol2, respectivamente. Ambas poblaciones presentaron polimorfismo en el 90,91 % de los *loci*. Cabe mencionar que las dos poblaciones fueron donadas por una agricultora de la región y se separaron por el color de la semilla (verde y roja) determinándose así las dos poblaciones. Aunque fueron altamente similares, la entrada Chol1 presentó 2 alelos privados.

TABLA 10: Parámetros de diversidad alélica de las accesiones de Sudamérica: Riqueza alélica (Na), media aritmética de la Heterocigosidad esperada insesgada (U_{He})^a, porcentaje de *loci* polimórficos (%P) y presencia y número de alelos privados, según procedencia y entre todas las poblaciones.

	Población	Na	U_{He}	%P	Nº de alelos privados
Bolivia	ChucA	20	0,00 (0,00)	0,00	-
	CHEN 369	32	0,11 (0,04)	31,82	2
	ChucC	28	0,18 (0,05)	36,36	2
	ChucB	29	0,18 (0,05)	36,36	-
	CHEN 447	52	0,27 (0,07)	59,09	1
	TAR8	42	0,28 (0,060)	54,55	3
	CHEN 448	50	0,29 (0,05)	72,73	-
	CHEN 247	47	0,31 (0,05)	77,27	4
	TAR13	47	0,34 (0,06)	68,18	-
	TAR7	51	0,36 (0,06)	68,18	2
	ChucD	51	0,39 (0,05)	81,82	9
	TAR14	57	0,39 (0,06)	77,27	2
	TAR11	53	0,44 (0,06)	81,82	2
	CHEN 449	64	0,45 (0,05)	86,36	1
	TAR9	57	0,45 (0,05)	81,82	4
	TAR1	65	0,48 (0,05)	86,36	2
	CHEN 339	66	0,50 (0,05)	95,45	1
	CHEN 346	66	0,57 (0,03)	95,45	8
	CHEN 253	76	0,58 (0,05)	90,91	2
	CHEN 248	85	0,61 (0,048)	95,45	5
TAR3	97	0,63 (0,054)	95,45	6	
	Promedio	54,0 (4,1)	0,37 (0,04)	70,13 (0,53)	3
Chile	CHEN 178	21	0,00 (0,00)	0,00	1
	CHEN 235	22	0,03 (0,02)	9,09	-

	CHEN 233	24	0,12 (0,05)	22,73	2
	CHEN 24	48	0,29 (0,06)	59,09	3
	CHEN 50	49	0,37 (0,05)	77,27	3
	PRJ	54	0,38 (0,06)	68,18	4
	Curicó	62	0,41(0,07)	68,18	3
	VI-1	59	0,43 (0,07)	72,73	5
	CHEN 25	72	0,50 (0,07)	81,82	10
	CHEN 169	72	0,55 (0,07)	86,36	1
	Promedio	48,3 (6,2)	0,31 (0,06)	54,55 (3,16)	4
Colombia	CHEN 2	73	0,50 (0,05)	90,91	2
Ecuador	CHEN 73	83	0,57 (0,06)	81,82	3
	CHEN 166	84	0,62 (0,04)	100,00	6
Perú	CHEN 005	24	0,03 (0,02)	13,64	1
	CHEN 352	25	0,08 (0,05)	13,64	1
	CHEN 7	43	0,27 (0,05)	72,73	3
	CHEN 80	57	0,32 (0,05)	77,27	1
	CHEN 003	75	0,38 (0,07)	86,36	5
	CHEN 168	65	0,51 (0,05)	86,36	1
	CHEN 001	77	0,56 (0,06)	86,36	-
	CHEN361	86	0,56 (0,05)	90,91	3
Promedio	56,5 (8,4)	0,34 (0,07)	65,91 (11,59)	3	
Argentina	Chol 1	57	0,47 (0,04)	90,91	2
	Chol 2	56	0,48 (0,05)	90,91	0
	Promedio total	55,1 (3,0)	0,37 (0,01)	68,18 (4,26)	116

^a Números entre paréntesis corresponden a los valores de Error Estándar (EE).

5.4. Relaciones genéticas entre las poblaciones del Noroeste Argentino y las poblaciones del resto de Sudamérica.

5.4.1. Diversidad alélica entre las poblaciones

Con el objetivo de comparar la diversidad alélica entre el germoplasma nativo del NOA y el germoplasma del resto de Sudamérica se cuantificaron los alelos en común entre todas las poblaciones y los exclusivos para cada grupo de entradas (Tabla 11). Entre los 22 *loci* de SSR caracterizados se detectaron 553 alelos en total, de los cuales el 292 (52,8 %) resultaron en común entre todas las entradas, 67 (12,1 %) fueron exclusivos del germoplasma del NOA y 194 (35,1 %) exclusivos de las entradas del resto de Sudamérica. Entre las poblaciones nativas, los *loci* QAAT022 y QGA03 fueron los que presentaron más alelos exclusivos (10 y 8, respectivamente), mientras que entre las entradas del resto de

Sudamérica fueron los *loci* QAAT050 y QAAT062 (18 y 16, respectivamente). En la Tabla 1 (anexo) se detallan el tamaño en pb y la correspondencia de los alelos amplificados en cada locus.

TABLA 11: Alelos en común entre todas las poblaciones caracterizadas para cada locus, alelos exclusivos de las entradas del NOA y alelos exclusivos de las entradas del resto de Sudamérica.

Locus	Alelos exclusivos entradas NOA	Alelos exclusivos entradas Extra NOA	Alelos en común	Total
QAAT074	1	6	13	20
QAAT088	2	4	19	25
QAAT001	3	13	16	32
QAAT097	2	8	16	26
QAAT076	0	12	20	32
QAAT087	4	10	15	29
QAAT112	4	9	7	20
QAAT050	5	18	13	36
QAAT027	5	6	16	27
QAAT062	0	16	18	34
QAAT106	1	9	11	21
KGA03	2	10	7	19
QAAT022	10	9	23	42
KGA020	3	7	11	21
QGA002	1	5	9	15
QAAT024	2	8	17	27
QAAT078	5	7	9	21
QAAT084	1	4	8	13
QGA03	8	11	12	31
QCA067	1	2	5	8
QAAT026	2	6	12	20
QAAT071	5	14	15	34
TOTAL	67	194	292	553
%	12,1	35,1	52,8	100,0

5.4.2. Distancia genética y agrupamiento entre las poblaciones

Se calculó la distancia genética de Prevosti entre todas las poblaciones caracterizadas y se analizaron las relaciones genéticas según su magnitud. El valor promedio de la distancia fue $0,83 \pm 0$, con un rango entre 0,17 (distancia entre NOA465 y 466) y 1 entre EChi050 procedente de Cauquenes, sur de Chile y NOA212, 456 y 213, procedentes del Dpto Santa Victoria e Iruya, respectivamente, en los valles orientales húmedos (Tabla 10, anexo). Para visualizar las relaciones entre las poblaciones según su distancia se construyó un dendograma (Figura 23). A nivel del valor de la distancia genética promedio todas las entradas se agruparon en cinco grupos denominados con la letra *T*. A una distancia de 0,84 se separan dos ramas principales que anidan los cuatro primeros clusters: de arriba-abajo el primero es T1 que agrupó entradas procedentes de Chuquisaca y el este de Potosí (Bolivia), junto con el germoplasma procedente de los valles secos del NOA; en T2 se agruparon poblaciones nativas de la sub-región de la Puna (G4, Figura 17) junto a poblaciones bolivianas procedentes de la región del Salar de Uyuni, una entrada procedente del Altiplano de Tarija y una entrada procedente de Ollague, Altiplano norte de Chile. A una distancia de 0,72, y dentro de T2, se agruparon las dos entradas procedentes de Cholila, provincia de Chubut, con dos poblaciones nativas del NOA de La Poma, una población de Belén (Potosí) y una entrada de La Paz. El grupo T3 agrupó entradas procedentes del altiplano de Puno, Perú, excepto la entrada EPe352 procedente de Sandia, zona de valle; las entradas de Ecuador, una población procedente del Dpto. de Oruro y el germoplasma de la zona de Transición entre los valles secos y húmedos del NOA (G3, Figura 17); T4 agrupó cuatro poblaciones bolivianas procedentes del este de Tarija (Valles) con el grupo de poblaciones nativas de los Valles orientales húmedos del NOA (G2, figura 17), la entrada procedente de Nariño (sur de Colombia) y una entrada procedente de Junín (norte de Perú) que se unieron a una distancia de 0,80 a la población NOA482, procedente de Lizoite, Santa Victoria. Por último, y con una separación notoria, con línea de corte a 0,89 de distancia, aproximadamente, se anida el grupo más externo (T5) que está conformado por el germoplasma procedente de Chile.

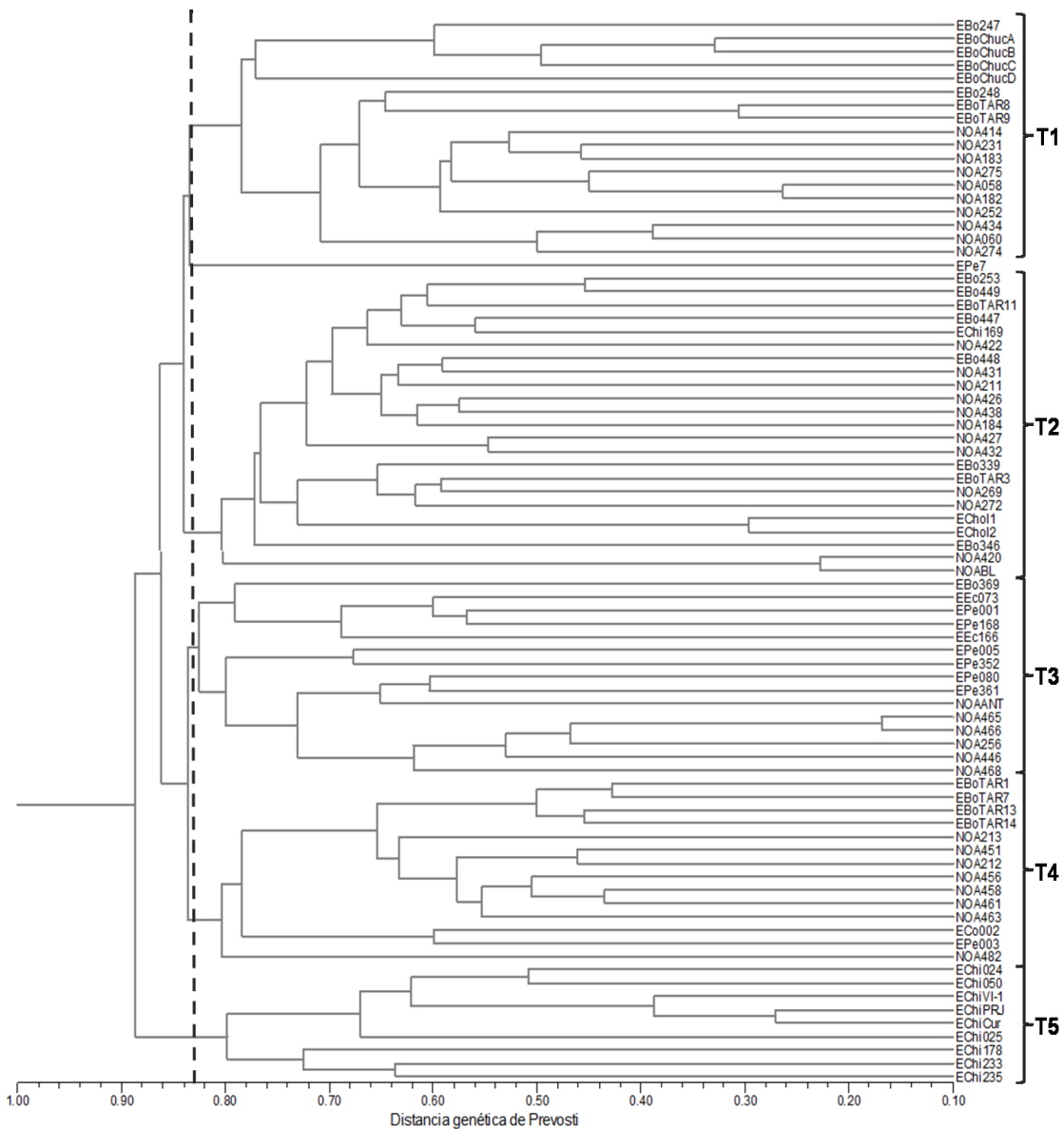


FIGURA 23: Dendrograma generado a partir de la matriz de distancia genética entre todas las poblaciones caracterizadas. Se indica la distancia promedio (línea punteada), nivel al que se forman cinco grandes grupos: T1, T2, T3, T4 Y T5. Las poblaciones nativas del NOA se indican con la sigla respectiva; las entradas del resto de Sudamérica se indican con la letra E seguido de las iniciales del país de procedencia: Bolivia (Bo), Chile (Chi), Colombia (Co), Ecuador (Ec), Perú (Pe), excepto las entradas procedentes de Cholila (consideradas en este grupo por estar fuera del NOA).

Las figuras 24, 25 y 26 muestran la distribución de las poblaciones en Sudamérica, diferenciadas por color según la pertenencia al grupo determinado en el dendrograma. Los grupos T1, T2, T3, T4 contienen las accesiones distribuidas desde Colombia hasta la región del NOA, mientras que el T5 agrupó la mayoría de las accesiones procedentes de Chile.

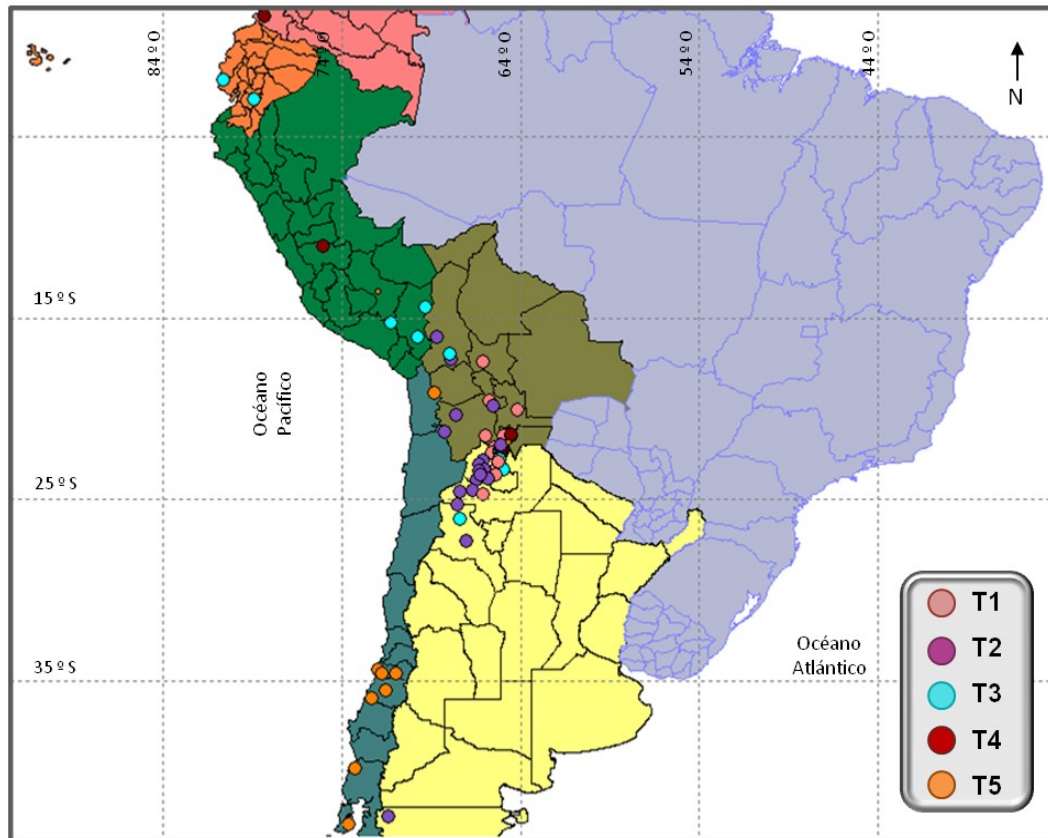


FIGURA 24: Vista general del agrupamiento de las poblaciones en Sudamérica.

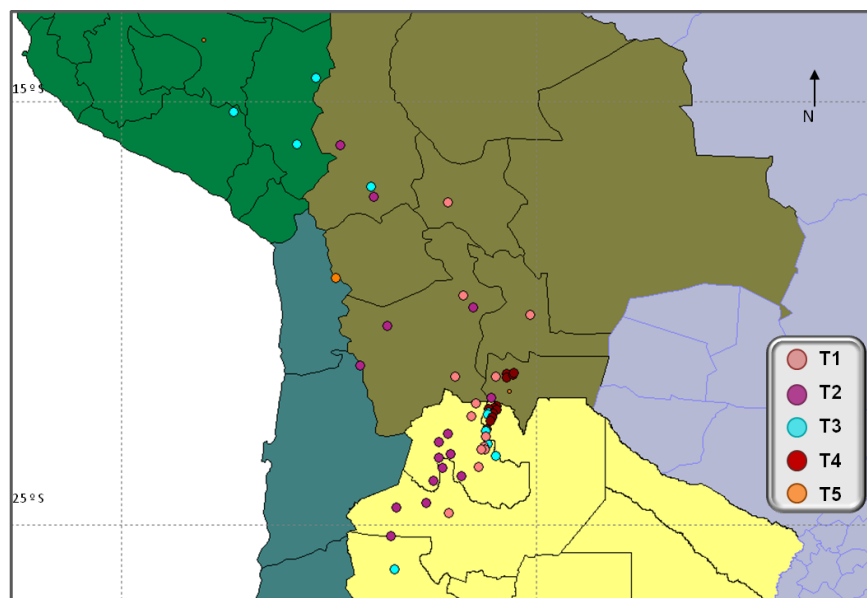


FIGURA 25: Detalle de la distribución de los grupos T1, T2, T3, T4.

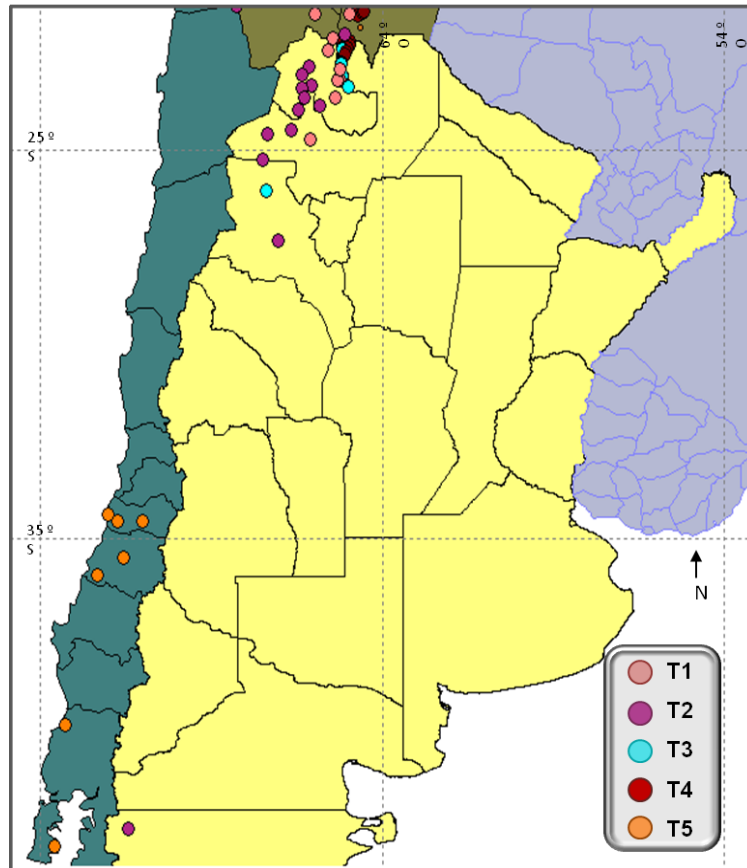


FIGURA 26: Detalle de la distribución del grupo T5.

5.4.3. Diversidad alélica entre grupos de poblaciones

Se realizó un AMOVA entre los cinco grupos observados en el dendrograma (T1, T2, T3, T4 y T5) considerando cada grupo como un región diferente (Tabla 11, anexo). El 11 % de la variación total correspondió a la diferenciación entre regiones, el 42 % entre poblaciones, el 34 % dentro de poblaciones, y el 14% restante intra-individual. Los índices de Fijación indicaron estructura a nivel de regiones ($F_{rt} = 0,11$), entre poblaciones ($F_{st} = 0,53$). Los índices de Fijación calculados entre e intra-individuos ($F_{is} = 0,72$ y $F_{it} = 0,86$, respectivamente), indicaron una deficiencia de heterocigotas respecto a los esperado por el equilibrio. Todos los valores de los índices F fueron estadísticamente significativos, según un test de permutaciones ($p = 1000$) (Peakall & Smouse, 2006).

Se caracterizó la diversidad alélica de cada grupo de poblaciones según los siguientes parámetros: número de alelos, número de alelos con frecuencia mayor igual al 5

%, número efectivo de alelos, índice de información, número de alelos privados, número de alelos en común con frecuencia menor o igual a 0,25 y 0,50, respectivamente, y la heterocigocidad (Figura 27). Todos los parámetros están resumidos en histogramas que representan cada grupo observado en el dendograma, y permite comparar la variabilidad de cada población dentro de cada uno. En la Tabla 12 se detallan el número total de alelos detectados en el grupo con frecuencia mayor al 5 %, la media aritmética de la Heterocigosidad esperada Insesgada (UHe) y el Porcentaje de *loci* polimórficos (% P). En orden decreciente según la magnitud de la diversidad, T2 (compuesto por 23 poblaciones del altiplano seco), fue el grupo más diverso ($0,445 \pm 0,012$), luego T3 (compuesto por 15 poblaciones del altiplano húmedo), $0,324 \pm 0,016$; T1 (compuesto por 18 poblaciones de los valles secos), y T5 (compuesto por 9 poblaciones) presentaron iguales valores de diversidad ($0,281 \pm 0,014$ y $0,281 \pm 0,022$, respectivamente), y el 50 % de *loci* polimórficos, aproximadamente, aunque en T1 se detectaron el doble de número de alelos (806 y 411, respectivamente). El grupo T4, compuesto por 14 poblaciones de los valles húmedos, fue el grupo menos diverso ($0,265 \pm 0,016$).

TABLA 12: Diversidad alélica entre grupos de poblaciones: número de poblaciones (N), número total de alelos en el grupo con frecuencia mayor al 5 %, media aritmética de la heterocigosidad esperada insesgada (UHe) y porcentaje de *loci* polimórficos (% P).

	T1	T2	T3	T4	T5
N	18	23	15	14	9
Na Frec. >= 5%	806	1506	805	645	411
UHe	0,281 (0,014)	0,445 (0,012)	0,324 (0,016)	0,265 (0,016)	0,281 (0,022)
% P	57,07 (6,98)	81,62 (4,12)	66,06 (7,60)	57,79 (7,89)	51,01 (10,49)

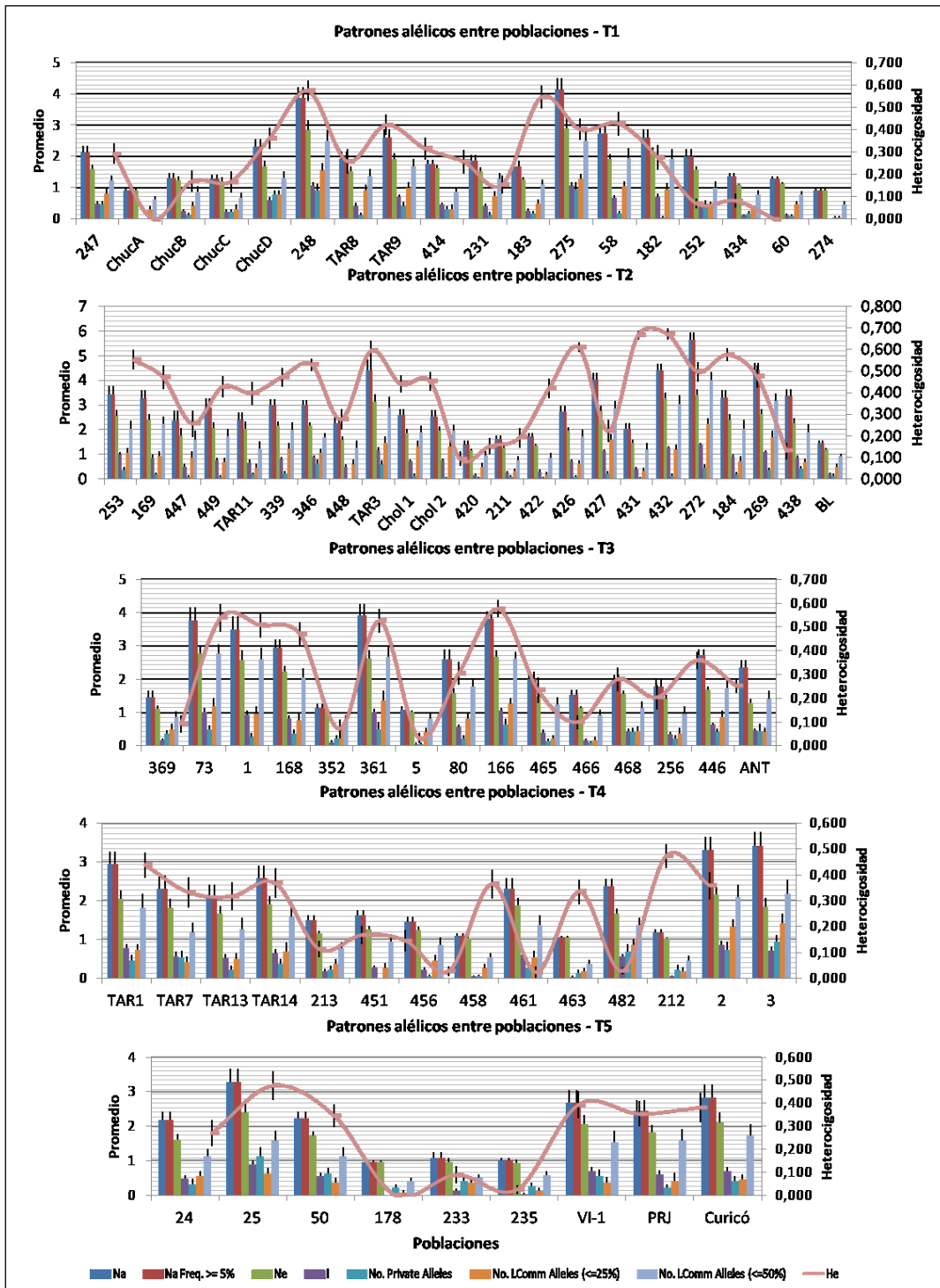


FIGURA 27: Patrones alélicos para cada grupo de poblaciones: número de alelos (Na), número de alelos con frecuencia mayor igual a 0,05 (Na freq. >= 5%), número efectivo de alelos (Ne), índice de información (I), número de alelos privados (No. private alleles), número de alelos en común con frecuencia menor o igual a 0,25 y 0,50 (No. LComm alleles <= 25%; No. LComm alleles <= 50%), respectivamente, heterocigosidad (He).

5.5. Marcadores EST-SSR.

5.5.1. Análisis bioinformático para la identificación de regiones microsatélites en secuencias ESTs (Expressed Sequence Tags).

Las 424 secuencias de la *library* de EST de quínoa se ensamblaron en 341 unigenes. Con el fin de asignar una función probable se analizaron todos los unigenes utilizando el programa Blast2Go (Conesa et al., 2005; www.blast2go.de), que asigna una clasificación según *Gene Ontology* (GO) respecto al Proceso Biológico (P) en que se halla involucrado, la Función Molecular (F) y el Componente Celular (C). Setenta y un unigenes (20,8 %) presentaron similitud significativa ($E \leq 10^{-5}$) con la base de proteínas no redundantes usando BLASTX y tuvieron asignación GO (Tabla 12, anexo). Sobre 60 unigenes se detectaron 80 regiones SSR, entre las que el tri-nucleótido fue el motivo más frecuente seguido por el tetra-nucleótido, pudiéndose diseñar 42 pares de *primers* EST-SSR (Tabla 13, anexo), según el esquema de la Figura 28.

Las 697 secuencias ESTs de *C. album* depositadas en el banco de datos del GenBank se ensamblaron en 629 unigenes (53 contigs y 576 singletons), de los cuales 423 (67,2%) tuvieron asignación GO. Sobre 15 unigenes con anotación GO se detectaron 17 secuencias SSR (Tabla 14 y 15, anexo), sobre los que se pudieron diseñar 11 pares de *primers*. Como resultado del proceso de anotación GO, todos los unigenes de *C. album* seleccionados por contener SSR presentaron *Evidence Code* (EC), un índice que puede interpretarse como indicador de confiabilidad de la anotación (Conesa et al., 2005).

```
ACCTAAAAATATAGATGTTTTACTGGTAGAACAAGAGATAATTGG
TGATGATAGATCAGCACTTGAAGCAGTTGTTTCAGCCAATGAAGA
ATTGGTGAGACTCAGGAAAGAGGCTGCATCTTTCAGAATGCTTC
TTCTGCAGAGGATGGTGCTAATGATGATGATGTTGGGGATGATGC
AGGAGAGAGACTTGCTGAATTGTATGAGCAACTGAATTTGTTGGA
TGCAGATGCTGCTGAGGCTCAGGCATCTAAAATTTAGCTGGTTT
AGGGTTCACAAAGGATATGCAGGAGCGTCCTACCAAGTCATTTCAG
CGGAGGATGGAGAATGAGAATCTC
```

FIGURA 28: Motivo microsatélite ATG encontrado en el EST gi 212727927. Se indica el motivo repetido en gris y la ubicación de los oligos diseñados (flechas).

Teniendo en cuenta las secuencias que presentaban algún motivo microsatélite (y de ellas la longitud del motivo y número de repeticiones) y la similaridad resultado del BLAST, se seleccionaron 11 *primers* en total entre las dos *libraries* exploradas (Tabla 13 – extendida en tabla 16, anexo). En el nombre del *primer*, el prefijo CA indica los procedentes de la *library* de ESTs de *C. album* y el prefijo CQ de la *library* de ESTs de *C. quinoa*.

TABLA 13: Detalle de los *primers* EST-SSR desarrollados. Nombre del *primer*, detalle del oligo, denominación gi de la secuencia de procedencia, asignación GO (Gene Ontology): Proceso biológico –P; Función molecular –F; Componente celular -C y tamaño esperado en pares de bases (pb).

ID - Primer SSR	Oligo	GenBank gi	Asignación Gene Ontology	Tamaño esperado (pb)
CA927 - F	CAGTTGTTTCAGCCAATGAAGA	gi 212727927	P:transport; P:auxin biosynthetic process; C:mitochondrion; F:phosphonate transmembrane-transporting ATPase activity; C:plastid; C:ATP-binding cassette (ABC) transporter complex; F:ATP binding; F:DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) activity; P:DNA topological change; F:RNA binding; P:RNA-dependent DNA replication; P:response to water deprivation; C:mitochondrion; P:protein folding; P:embryonic development ending in seed dormancy; P:response to salt stress; P:response to chlorate; F:RNA-directed DNA polymerase activity; P:response to heat; F:ATP binding; C:chloroplast stroma; F:unfolded protein binding; P:de-etiolation; C:plasma membrane	214
CA927 - R	AAGTCTCTCTCCTGCATCATCC			
CA888 - F	CCATCTACACATGGCAAGAAAA	gi 212727888	P:sulfate assimilation; F:sulfate adenylyltransferase (ATP) activity; C:heterotetrameric ADPG pyrophosphorylase complex; P:photoperiodism, flowering; P:starch biosynthetic process; C:chloroplast stroma; F:glucose-1-phosphate adenylyltransferase activity; P:response to cadmium ion; C:plasma membrane; C:apoplast	155
CA888 - R	GGGCTTAGTCTCATTGGTCAAC			
CA774 - F	GATGGAAGGTTTTGGTGAATA	gi 212727774	P:auxin biosynthetic process; F:protein serine/threonine kinase activity; C:integral to membrane; P:transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway; C:cytoplasmic membrane-bounded vesicle; F:ATP binding; F:protein binding; C:endomembrane system; P:unidimensional cell growth; P:plant-type cell wall organization; F:transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity; C:plasma membrane; P:protein amino acid phosphorylation	350
CA774 - R	CGAGTTTTGACCAGAGAAATCC			
CA625 - F	GGAGGGCTACTGAGAAGACTGA	gi 212727625	C:membrane; F:galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase activity	350

CA625 - R	TCTTTGTCTACCCTCCGTCACT			
CA342 - F	TAAAACCCAGAATAATGTGCGCC	gij212727342	C:membrane; F:galactosylgalactosylxylosylprotein 3- beta-glucuronosyltransferase activity	133
CA342 - R	CCCATTAAAAATGAAGCAGCTC			
CQ715 - F	TGGGGCATAACTCTTCATTTCT	gij47561715	P:putrescine biosynthetic process from arginine; P:arginine catabolic process; C:mitochondrion; P:defense response to bacterium; F:cobalt ion binding; F:arginase activity; F:agmatinase activity; C:chloroplast	269
CQ715 - R	ATGGTCACCACCTAAAACCATC			
CQ701 - F	TGAACCTGTTGTTGAGGATGAC	gij47561701	P:response to salt stress; C:cytosolic ribosome	300
CQ701 - R	CTCAGATCTTCAATCTTCGCCT			
CQ665 - F	AACGATAGGAAAGGGGAATTA	gij47561665	C:ribonucleoprotein complex; F:nucleotide binding; C:membrane; F:RNA binding	226
CQ665 - R	AAAGGAGCGAAGAAACAATCTG			
CQ631 - F	GTCAAGGTTATGATGGCCAAGT	gij47561631	P:oxidation reduction; F:calcium ion binding; P:regulation of photomorphogenesis; F:2-alkenal reductase activity; P:detection of calcium ion; C:vacuolar membrane; F:protein binding; P:pollen germination; P:protein catabolic process; P:calcium- mediated signaling; C:plasma membrane	278
CQ631 - R	AAAACCTTGTAGAACCCCAGGNC			
CQ578 - F	AGCCACTTCTTCTTCTCCTTG	gij47561578	F:structural constituent of ribosome; P:embryonic development ending in seed dormancy; C:cell wall; C:cytosolic small ribosomal subunit; C:chloroplast; C:membrane; P:translation; F:rRNA binding	183
CQ578 - R	GCTTTCCTTTCCAGTTTTCTT			
CQ470 - F	AAGCTTATTCGAGCAGATGGAG	gij47561470	P:response to abscisic acid stimulus; F:calcium ion binding; P:drought recovery	191
CQ470 - R	CCCATGAACACNTTGAGAAGAG			

5.5.2. Evaluación de los EST-SSR en poblaciones nativas de *C. quinoa*

Para evaluar el polimorfismo de los EST-SSR desarrollados se seleccionaron 8 entradas, dos de cada grupo de poblaciones según los resultados obtenidos de la caracterización conjunta, con distinto nivel de diversidad: Puna (CHEN427; CHEN420); Valles secos (CHEN275; CHEN414); valles de altura o zona de transición (CHEN461; CHEN458); Valles orientales húmedos (CHEN468; CHEN466).

De los 11 *primers* sintetizados y evaluados en el germoplasma seleccionado, 6 amplificaron alelos de un tamaño distinto al esperado (CA888, CQ715, CQ701, CQ665, CQ578, CQ470). En la Tabla 14 se detallan el peso y número de alelos obtenidos por locus, el polimorfismo y la temperatura de *annealing* en la que hubo amplificación. La entrada CHEN427 resultó polimórfica para todos los *loci*. El locus CA342 fue polimórfico también para la población CHEN466 y el CQ470 para las poblaciones CHEN275, 466 y 468.

TABLA 14: Amplificación de los *primers* EST-SSR: nombre del primer, temperatura de *annealing*, número de alelos amplificados (Na), tamaño (pb), poblaciones polimórficas.

ID EST-SSR	Temperatura annealing	Numero de Alelos	Tamaño (pb)	Poblaciones polimórficas
CA927	59º	1	127	-
CA888*	59º	3	972 - 1099 - 1182	CHEN427
CA774	60º	3	228 - 229 - 231	CHEN427
CA625	63º	1	152	-
CA342*	59º	5	122 - 124 - 134 - 136 - 138	CHEN427 - CHEN 466
CQ715*	59º	4	917 - 934 - 1180 - 1200	CHEN427
CQ701	60º	2	927 - 948	CHEN427
CQ665	58º	1	entre 480 y 490	-
CQ631	60º	3	274 - 277 - 284	CHEN427
CQ578	59º	2	377 - 385	CHEN427
CQ470*	60º	5	738 - 775 - 800 - 843 - 875	CHEN275 - CHEN427 - CHEN466 - CHEN468

**Loci* no considerados para el cálculo de las frecuencias alélicas y Heterocigosidad.

Los *primers* CA342, CA888, CQ715, CQ470 amplificaron más de un locus (Figura 29), por lo que no fueron tomados en cuenta para el cálculo de las frecuencias alélicas y la heterocigosidad, de manera de ser comparables los resultados con lo SSR genómicos.

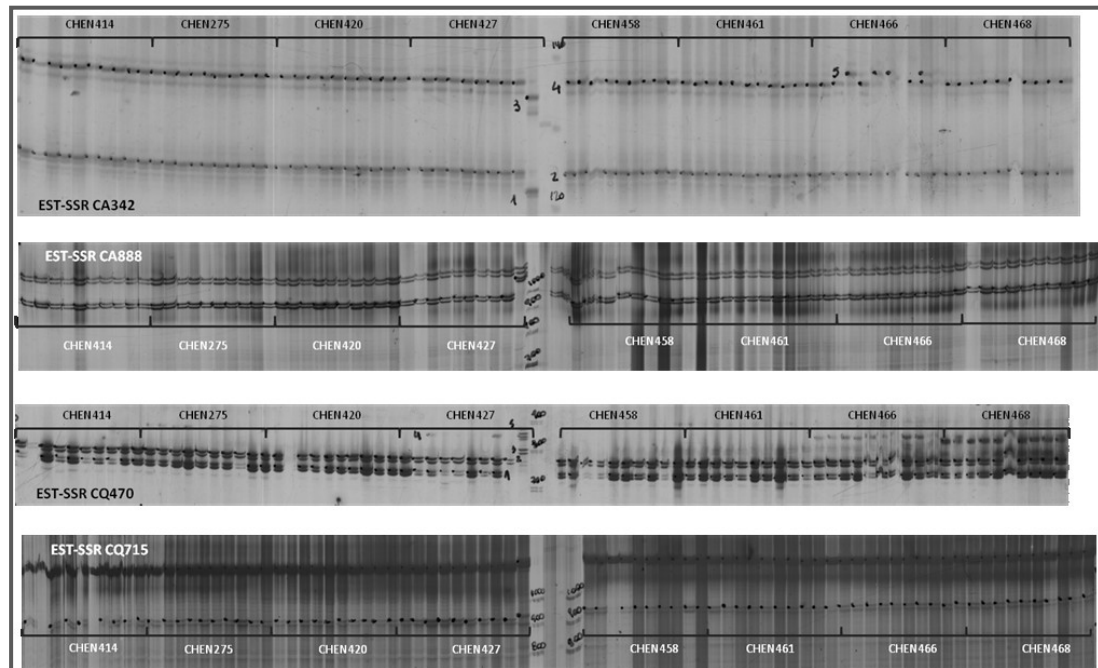


FIGURA 29: Producto de amplificación de los *loci* CA342, CA888, CQ715, CQ470.

Con el objetivo de contrastar la variabilidad detectada en los *loci* SSR genómicos con aquella de los *loci* SSR derivados de ESTs se compararon la riqueza alélica detectada en cada población, la diversidad y el porcentaje de *loci* polimórficos (Tabla 15). El número de *loci* EST-SSR amplificados y considerados para el análisis comparativo fue de 7 mientras que el número de *loci* SSR fue de 22, por lo que la comparación es descriptiva sin poder concluir acerca de la performance de los EST-SSR. Con excepción de la entrada CHEN458 la variabilidad detectada por los SSR fue mayor. La entrada CHEN427 presentó el 57,14 % de *loci* polimórficos, fue el individuo número 10 el que amplificó alelos variables.

TABLA 15: Comparación de la diversidad alélica por población de *loci* SSR vs. EST-SSR. Riqueza alélica (Na), media aritmética de la heterocigosidad esperada insesgada (UHe)^a, porcentaje de *loci* polimórficos (%P).

Población	SSR			EST-SSR		
	NA	UHe	%P	NA	UHe	%P
CHEN420	31	0,10 (0,03)	31,82	7	0	0
CHEN427	89	0,65 (0,02)	100	12	0,08 (0,03)	57,14
CHEN414	39	0,34 (0,05)	68,18	7	0	0
CHEN275	91	0,58 (0,06)	95,45	7	0	0
CHEN458	24	0,03 (0,02)	9,09	8	0,03 (0,03)	14,28
CHEN461	51	0,38 (0,06)	72,73	7	0	0
CHEN466	34	0,11 (0,03)	45,45	7	0	0
CHEN468	43	0,30 (0,05)	63,64	7	0	0

^a Números entre paréntesis corresponden a los valores de Error Estándar (EE).

El diseño de nuevos marcadores SSR a partir de secuencias EST y el éxito en la amplificación pone disponible una herramienta diferente para futuras investigaciones relacionadas al estudio de la diversidad genética en quínoa. Aunque el polimorfismo detectado por los EST-SSR fue menor que con los SSR genómicos, la base de su diseño hace que sea una herramienta complementaria para estudiar la variabilidad genética en otras regiones del genoma. Asimismo, el éxito en la transferabilidad de los nuevos marcadores hace posible su uso en especies emparentadas.

6. DISCUSIÓN

6.1. Diversidad genética y molecular del germoplasma procedente de la región del Noroeste Argentino (NOA)

Este trabajo es la primera caracterización de una muestra representativa de germoplasma de quínoa nativa de Argentina realizada mediante marcadores moleculares microsatélites (SSR). Esta caracterización permitió determinar la magnitud y distribución de la diversidad genética del germoplasma del NOA. Se caracterizaron treinta y seis poblaciones de *Chenopodium quinoa* spp. *quinoa* cultivada en las provincias de Salta, Jujuy y Catamarca. La estrategia de muestreo seguida para este trabajo resultó del balance entre el número de entradas de *C. quinoa* seleccionadas a fin de cubrir la principal región de cultivo, un número estándar de individuos que permita detectar la variación intra-poblacional y factible de caracterizar, y un número de *loci* que permita describir la variación genética en la unidad taxonómica determinada, en este caso poblaciones. La caracterización de 22 *loci* SSR en diez plantas individuales de cada entrada permitió estimar la variación genética intra-poblacional para determinar luego el grado de diferenciación entre las poblaciones (Frankel et al., 1995).

El contenido de información polimórfica de los 22 *loci* SSR fue alto. En 16 *loci* SSR el valor de Heterocigocidad total (Ht) obtenido fue mayor que lo citado en la bibliografía (Mason et al., 2005 y Jarvis et al., 2008), y sólo dos *loci* (QAAT084 y QCA067) mostraron un valor de Ht menor a 0,70. Dieciséis *loci* están localizados en el mapa en diferentes grupos de ligamiento (Jarvis et al., 2008), distribuyéndose un marcador por cromosoma (16 grupos de los 41 descritos en la bibliografía), indicando independencia. El número de alelos promedio por locus fue de 16 en un rango de 6 a 33, reflejado en un amplio rango en el valor del Índice de Información y, además, en casi todos los *loci* se detectaron alelos privados. Para los marcadores moleculares del tipo microsatélites no se ha podido demostrar si el grado de polimorfismo de los *loci* (Ht) y/o el número de *loci* analizados tengan una relación directa con la variación en la medida de la distancia genética (Oliveira et al., 2006), por lo que el único

requerimiento es asegurarse de analizar un número de alelos suficiente. En relación a los trabajos de caracterización molecular de *loci* SSR en accesiones de *C. quinoa* (Christensen et al., 2007; Fuentes et al., 2008), el promedio de alelos por locus en las accesiones del NOA fue mayor junto con la relación de alelos detectados por accesión (~3 y 2,5, respectivamente) que fue igual a 10. En Christensen et al. (2007) se analizan 143 accesiones procedentes de Sudamérica con 36 SSR detectando 420 alelos entre todas las accesiones y un promedio de 11 alelos por locus, mientras que Fuentes et al. (2008) analizaron 59 entradas de quínoa procedentes solamente de Chile con 20 SSR y detectaron 150 alelos en total con un promedio de 7,5 alelos por locus. Utilizando tal comparación puede considerarse que 360 alelos detectados en el germoplasma nativo son suficientes para explorar su estructura, aunque se debe tener en cuenta las diferencias de muestreo entre los estudios referenciados. Para una comparación más fiel entre en los tres trabajos se realizaron algunas correcciones sobre siete *loci* SSR en común (KGA03, KGA020, QAAT024, QAAT050, QAAT074, QAAT076, QAAT078), de manera similar al procedimiento seguido por Lia et al. (2009). El contenido polimórfico de los *loci* fue similar indicando un alto nivel de polimorfismo. El número de alelos promedio detectado en los siete *loci* fue variable (15,4 para las entradas del NOA, 20,1 y 11,1 para las accesiones de Christensen et al., 2007 y el germoplasma chileno, Fuentes et al., 2008, respectivamente). El número total de alelos detectados en los siete *loci* SSR representó el 30 % de la riqueza alélica contenida en las accesiones del NOA, mientras que para la colección de CIP-FAO fue el 33 % y 52% para el germoplasma de Chile. Habiendo corregido por éste sesgo, las diferencias observadas entre los tres estudios reflejan la diversidad alélica genuina detectada en cada colección y el grado de información de los siete SSR en común. El polimorfismo de las poblaciones del NOA se refleja también en el promedio del porcentaje de *loci* polimórficos ($62,12 \pm 4,87$ %) y la riqueza alélica ($50 \pm 4,10$), con un amplio rango de valores en ambos parámetros. Las entradas CHEN427, 432, 272 y 269 fueron las de mayor riqueza alélica y las más diversas genéticamente presentando polimorfismo en el 100 % de los *loci* analizados, todas procedentes de la región de la Puna. La riqueza alélica encontrada en el germoplasma

nativo es comparable con el nivel de variabilidad alélica en accesiones de otras procedencias documentadas en Christensen et al. (2007) utilizando 42 entradas de Bolivia, 28 de Perú y 24 de Chile que amplificaron 290, 271 y 198 alelos, respectivamente. En las 36 entradas del NOA caracterizadas se amplificaron 360 alelos diferentes, valor superior a lo documentado hasta ahora.

Cada población fue caracterizada a través de la estimación de la riqueza alélica (Frankel et al., 1995), la heterocigocidad (Nei, 1978) y el porcentaje de *loci* polimórficos. A pesar de ser considerada una especie mayormente autógama, las poblaciones de quínoa mostraron un amplio rango de variación en los valores de diversidad genética, siendo los extremos una población monomórfica (CHEN274) y CHEN272 ($U_{He} = 0.71$), posiblemente una ajara con alto grado de diversidad (Curti, 2012, com. pers.). La diversidad genética intra-poblacional depende del número y las frecuencias de alelos entre todos los *loci*, y de la estructura genética de la población (Crossa et al., 1993). En términos generales, la variación genética dentro de una variedad local (landrace) puede ser de magnitud considerable ó no, pero está lejos de ser aleatoria. Muchas de las accesiones nativas de quínoa caracterizadas son poblaciones locales por lo que puede suponerse que han sobrevivido en la región durante un largo periodo de tiempo, ó también pueden ser descendientes de genotipos que han sido objeto de selección por muchas generaciones. Como unidad, integran varios componentes (agronómicos y culturales) que se han ajustado entre sí a través de generaciones (Harlan, 1992) y son reflejo de decisiones tomadas por los agricultores. Este patrón de diversidad genética intra e inter poblacional en poblaciones de quínoa fue también estudiado en base a *loci* de iso-enzimas y marcadores moleculares RAPD (Wilson, 1988a, b; Del Castillo et al., 2006) ambos marcadores menos polimórficos que los SSR (Picca et al., 2004) y, por lo tanto, las comparaciones deben ser cuidadosas. Del Castillo et al. (2006) estudiaron la estructura genética de 8 poblaciones de quínoa del Altiplano Boliviano y valles de altura de ese país encontrando una fuerte estructuración geográfica de acuerdo a un gradiente decreciente en dirección norte-sur de temperatura y precipitaciones. Diferenciaron quínoa de altiplano norte y central, luego un grupo de valles interandinos de altura (Potosí)

y, por último, de altiplano sur (Salares). El promedio (0,16), y rango de valores (0,11) de diversidad genética inter-poblacional fue menor que las entradas del NOA. Si bien la especie es mayormente autógama, la similitud en el patrón morfogenético de poblaciones silvestres y domesticadas simpátricas, resultado de la caracterización con isoenzimas, evidenció potencial flujo de genes, corroborado luego en un estudio sobre el flujo de polen de plantas silvestres con las poblaciones cultivadas segregando genotipos híbridos (malezas), con características morfológicas intermedias entre los dos grupos (Wilson & Manhart, 1992). Este mecanismo evolutivo es mucho mayor que en la dirección opuesta y es un aspecto importante para interpretar la magnitud y variación intrapoblacional. Además, los niveles de heterocigosidad y el grado de alogamia detectado en poblaciones de *C. hircinum*, (mayormente autógama), pariente silvestre de *C. quinoa*, muestra alto potencial de flujo genético intra-poblacional (Wilson, 1988a, b). En el muestreo llevado a cabo para el estudio de estructura poblacional de quínoa boliviana en Del Castillo et al., (2006) se recolectaron plantas de fenotipo silvestre de las mismas parcelas de cultivo donde se muestrearon las poblaciones de quínoa cultivada. Los resultados evidenciaron mayor similitud genética entre las poblaciones de quínoa simpátricas (*C. quinoa spp. quinoa* / *C. quinoa spp. melanospermum*) que entre poblaciones silvestres de lugares distintos, y mayor diferenciación entre poblaciones que entre formas (silvestres y cultivadas), confirmando lo observado por Wilson (1988a, b).

6.2. Estructura genética de *C. quinoa* en el Noroeste Argentino (NOA)

La variabilidad genética molecular del germoplasma de quínoa nativo del NOA analizada con marcadores microsatélites evidenció una marcada estructura a nivel geográfico. El Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) fue significativo para todos los niveles estudiados. Los índices de fijación calculados en cada nivel indicaron una alta diferenciación de las poblaciones (en concordancia con lo observado en el agrupamiento por la distancia genética) y una estructuración a nivel regional significativa. La diferenciación entre poblaciones fue mayor que la intra-poblacional, como lo propuesto para especies

autógamas (Hamrick & Nason, 1996). Crossa et al. (1993) mencionan que la diversidad alélica entre las accesiones (o entradas) de especies autógamas puede ser de gran magnitud pero no estará reflejada en individuos heterocigotas, ya que se espera bajo número de ellos. Esta situación es la que presentó las accesiones de quínoa, que mostraron un amplio rango de diversidad genética y riqueza alélica, signo de alta variabilidad, pero no reflejado en individuos heterocigotos ya que valores de *Fis* y *Fit* indicaron deficiencia de individuos heterocigotas y baja variación intra-individual, respecto a lo esperado en equilibrio.

Chenopodium quinoa se considera un cultivo de tierras de montaña, utilizada en la región Andina, y está clasificada según las zonas agroecológicas donde se cultiva. En estas tierras la altitud se relaciona directamente con las temperaturas, reduciéndose la temperatura media conforme se asciende, acortando la estación de crecimiento de los cultivos y limitando la agricultura. La estructura genética poblacional de quínoa nativa se podría entonces clasificar en grupos genéticos, o ecotipos (Tapia, 1982), en consistencia también con lo encontrado por Curti et al. (2011). Las 36 entradas de quínoa del NOA analizadas se agruparon en cuatro grandes grupos a nivel del valor de la distancia genética promedio, representando cada uno un ambiente diferente de la región: la Puna, los Valles secos (Quebrada de Humahuaca y Valles Calchaquíes), los Valles orientales húmedos y una zona de transición entre los valles (Figura 16). La alta correlación ($r=0,90$) entre la matriz confenética y la matriz de distancia genética fortalece la hipótesis de existencia de una estructura jerárquica entre las poblaciones (Bramardi, 2008). Además, el *F_{st}* resultado del AMOVA mostró una diferenciación significativa a nivel de regiones ($F_{st}=0,183$, $P=0,001$), dándole significancia al punto de corte determinado para el dendograma. En este los grupos de accesiones de los valles secos (G1) y húmedos (G2) (interandinos) fueron los más cercanos genéticamente, luego se agruparon las poblaciones de la zona de transición de altura (G3) y las más lejanas fueron las poblaciones de la Puna (G4). El ordenamiento consenso del sub-grupo de poblaciones analizadas de manera conjunta entre caracterización molecular y agronómica (APG, figura 22) presentó la misma estructura. Los

análisis de agrupamiento jerárquico y de ordenamiento pueden ser complementarios, ya que los últimos son más sensibles a la presencia de patrones no jerárquicos entre las OTUs analizadas (Mohammadi et al., 2003). Comparando el dendograma con el ordenamiento observado en el ACP (Figura 20), hay correspondencia entre la caracterización molecular y morfo-fenológica y los resultados son congruentes con lo observado en Curti et al., (2011). Las accesiones de los valles interandinos muestran la mayor cercanía genética a nivel molecular entre grupos (G1 y G2) y son morfo – fenológicamente similares por lo que no se discriminan en el PCA, en concordancia con los grupos fenotípicos estructurados según el sitio de origen y la altitud (Curti et al., 2011). Es a partir de la caracterización molecular que las accesiones se discriminan según procedan de valles secos y húmedos (ACoP, figura 21). Retomando la idea de la existencia de ecotipos, los caracteres fenotípicos más influyentes en la diferenciación de las poblaciones fueron los relacionados con la fenología, la morfometría de hoja y el diámetro del tallo. Las accesiones provenientes de los valles interandinos se caracterizan 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 presentaron un estado intermedio para los caracteres mencionados, pero se diferenciaron del resto por presentar menor diámetro de grano.

Los cuatro grupos de poblaciones se ordenaron de oeste a este siguiendo un gradiente altitudinal (Figuras 14 y 18) y de magnitud decreciente de diversidad genética. La variación genética de los cuatro grupos de poblaciones se caracterizó teniendo en cuenta medidas de diversidad y variabilidad alélica (Tabla 7). La primera considera la sumatoria de la información genética potencial en base a lo conocido, mientras que la segunda es más útil para indicar una porción de la diversidad capturada (Rojas, 2003b). La región de Puna fue la más diversa, de mayor número de poblaciones en el análisis y mayor dispersión en el espacio. A nivel de la variabilidad detectada, este grupo presentó el mayor número de alelos privados y polimorfismo en ~80 % de los *loci* SSR. Le siguieron las accesiones de los Valles

secos y de Transición que presentaron valores similares de diversidad y polimorfismo en ~50 % de los *loci*, aunque la variabilidad alélica de la región de Valles secos fue mayor. Última se encuentra la región de Valles húmedos, menos diversa y cuyas accesiones presentaron los menores valores de los parámetros de variabilidad. Todos los grupos presentaron alelos únicos en correspondencia con el gradiente descrito, aunque G3 y G2 presentaron valores similares. La presencia de alelos privados permite definir configuraciones genéticas particulares vinculadas a condiciones ambientales extremas, siendo estos alelos una herramienta potencial para identificar genes de tolerancia, favorables a ciertas condiciones (Mondini et al., 2010).

En agricultura, la incidencia de las precipitaciones es el factor limitante de la amplitud del área agrícola. Los Andes se caracterizan por la irregularidad de las lluvias y su relativa escasez, con una distribución estacional acentuada y, a su vez, una distribución espacial y temporal que determina la presencia y/o ausencia de diferentes cultivos y variedades (Tapia, 1982, 1990). A través de una Regresión Lineal Múltiple se encontró una relación baja, significativa y negativa entre la magnitud de la diversidad genética (UHe) y las precipitaciones de los sitios donde fueron colectadas las accesiones. En especies arbóreas se reporta un comportamiento similar relacionado a la variación de la diversidad genética (Chase et al., 1995; Lowe et al., 2003; Cavers et al., 2003). Chase et al. (1995) justifican esto con que en regiones secas pueden encontrarse una gran diversidad de hábitats como consecuencia de una compleja disponibilidad local del agua en estos. En contraste, hábitats con mayor disponibilidad de agua son más homogéneos y pueden haber sido colonizados más tarde por ecotipos adaptados a condiciones más húmedas, produciendo efectos fundadores y resultando en poblaciones que presentan menor diversidad. La estructura genética de quínoa del NOA podría explicarse en términos de adaptación, presentando un patrón de este tipo: la Puna (al oeste) el ambiente más extremo de la región estudiada (condiciones severas de déficit hídrico y baja humedad ambiente) en donde las accesiones están dispersas en una mayor superficie y presentan la mayor diversidad. Hacia el este situaciones intermedias y, en el extremo, los valles orientales húmedos, un área con mayor

régimen de precipitaciones y menor grado de diversidad (Figura 30). Los ambientes contrastantes presentes en el NOA pueden haber contribuido durante un largo período para el desarrollo de una amplia diversidad genética del germoplasma de quinua adaptado a diferentes condiciones ambientales. Los grupos fenotípicos reconocidos en el NOA presentan similitud con algunos de los propuestos por Rojas (2003a) en accesiones bolivianas (accesiones de altiplano, valles de altura y valles orientales), estructura ratificada por Castillo et al. (2007) utilizando RAPDs. Esto sugiere procesos similares de diferenciación genética en los Andes del sur respondiendo a gradientes de aridez y temperaturas (Curti et al., 2011).

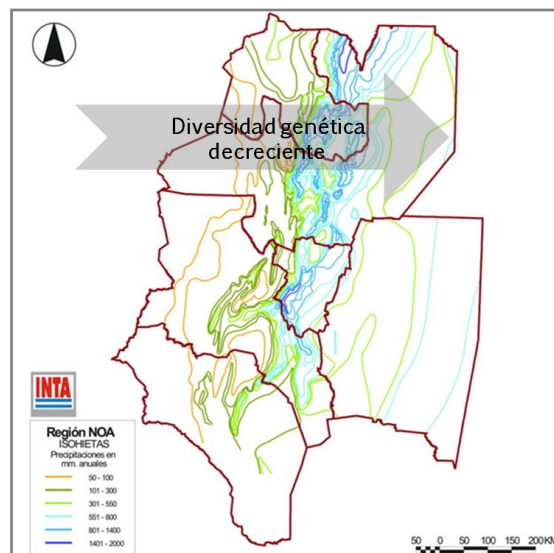


FIGURA 30: Esquema representativo del gradiente de diversidad genética Vs. el régimen de precipitaciones de la región del NOA.

La quinua es una especie con una prolongada historia en Argentina, anterior al origen de los estados nacionales y a la conformación del imperio Incaico. En el NOA el cultivo está asociado a culturas andinas, donde se ha consumido el grano como alimento entre otros usos (Bertero, 2002), influenciando el criterio de los agricultores para seleccionar sus semillas. Actualmente el uso más frecuente documentado por algunas comunidades es la elaboración de *llypta* o *lejja* (uso alternativo al bicarbonato como mordiente para coquear). En algunas localidades del altiplano occidental, donde los granos no se consumen, los agricultores consideran quinua cultivada a plantas que difieren escasamente de las

silvestres en morfología y tamaño, así como también en el tamaño y la forma de los granos (oscuros, pequeños y biconvexos), o cultivan mezclas de semillas de tipo cultivado (grandes, con borde truncado y blancas) y semi-silvestres (mayor tamaño que las silvestres). Muchas de las entradas caracterizadas en este estudio son variedades locales (landraces) donadas por los agricultores, por lo tanto son poblaciones de plantas muy dinámicas, con distinto origen histórico, identidad y quizá con ausencia de mejoramiento (Camacho Villa et al., 2005) adaptadas a los sistemas agrícolas locales por un tiempo indefinido. Los índices de fijación resultantes de cada nivel analizado en el AMOVA y el rango de diversidad entre las accesiones (reflejados en la magnitud de la riqueza alélica y la presencia de alelos únicos) reflejan procesos poblacionales influenciados por las decisiones de los agricultores respecto a la diversidad de usos y preferencias, por lo que la interpretación de la magnitud de la diversidad y distribución de la variabilidad deben considerarse bajo las implicancias de la intervención humana (Wilson 1988).

Así como se registra un gradiente en la magnitud de la diversidad genética molecular, fenotípicamente las accesiones procedentes de la Puna y Valles secos presentaron mayor diversidad que las procedentes de los valles húmedos (Curti et al. 2011). Además, y considerando algunas características morfológicas relacionadas al grado de domesticación como ser el tipo de panoja y el hábito de crecimiento (ramificado, con panojas laxas y abiertas en los extremos como rasgos silvestre, en contraposición con un crecimiento definido en altura y una panoja terminal, como rasgo domesticado) (Wilson 1980, 1990; Harlan, 1992), las accesiones nativas de quínoa mostraron un gradiente en el grado de domesticación. Las accesiones de Puna y Valles secos fueron similares al tipo domesticado, mientras que las accesiones de la zona de transición y de los valles orientales (húmedos), más a las quínoas silvestres. Acerca de estas diferencias, Curti et al., (2011) postulan la ocurrencia de un efecto fundador hacia la zona oriental asociado a una dispersión más reciente desde el centro de origen, congruente a lo postulado en relación a la adaptación ambiental. En una comparación con el gradiente de diversidad genética molecular se encuentra que accesiones con rasgos similares al fenotipo domesticado de

quínoa son más diversas a nivel molecular y fenotípico, mientras que aquellas con rasgos tipo silvestres son menos diversas para todas las características. Una de las teorías sobre la domesticación de especies postula la ocurrencia de cuellos de botella como consecuencia de la selección por parte de los agricultores de un número reducido de plantas que contienen las características deseadas según el uso del cultivo para la siguiente generación (Doebley et al., 2006), por lo que se encontraría menor diversidad en germoplasma con mayor antigüedad de uso como cultivo. Sin embargo, los resultados de la caracterización de quínoa muestran un patrón exactamente opuesto: los marcadores moleculares y muchos de los caracteres involucrados en la caracterización fenotípica fueron monomórficos o presentaron menor diversidad alélica en las accesiones de valles húmedos (orientales), similares a la quínoa silvestre, y mayor polimorfismo en las accesiones de Puna y valles secos, de morfología típica a la quínoa domesticada. Este patrón es similar al descrito para especies vegetales que han evolucionado como cultivo (post-domesticación) (Abbo et al., 2014), y puede relacionarse con la historia de uso de la quínoa. Las primeras referencias de presencia de la especie en Argentina datan desde hace 3500 años aproximadamente y para la Puna de Catamarca, correspondiendo a grupos cazadores-recolectores que desarrollaban una horticultura para consumo doméstico junto con la producción de camélidos. Más adelante hay registros de semillas carbonizadas de *Chenopodium* (morfológicamente afines a la quínoa), en espacios domésticos de otros sitios del altiplano, y en zonas de valles y quebradas por debajo de los 3500 msnm, de menor antigüedad (más próximos a la era cristiana y de los primeros siglos) (Babot, 2009; 2011). La evidencia arqueológica relevada hasta ahora y la documentación sobre los usos actuales de la quínoa en relación al gradiente de diversidad alélica molecular y el síndrome de domesticación son elementos que sustentan la posibilidad de que *C. quinoa* sea un especie en evolución como cultivo (post-domesticación) (Abbo et al., 2014).

Los estudios de biodiversidad de quínoa de Sudamérica postulan los Andes del sur (alrededor del Lago Titicaca entre Cuzco y el lago Poopó), como centro de origen de la especie por ser la zona de mayor variación fenotípica (Gandarillas, 1979; Wilson 1988a;

Pearsall, 1992). Respecto a la estructura de la diversidad del complejo de *C. quinoa* Andina se determinaron diferentes ecotipos en base a las principales zonas de cultivo (Valles, Altiplano, Salar, Sub-tropical y Nivel del Mar; Tapia (1982) sugiriendo una estructura genética influenciada en gran medida por el ambiente. En un enfoque a mayor escala, y en base a la variabilidad genética molecular, se definieron posteriormente dos grandes grupos: quínoas Andinas (conteniendo los ecotipos de Valle, Altiplano y Salar) y de Nivel del Mar (Wilson 1988a; Christensen et al., 2007). A escala regional, la estructura del germoplasma nativo descrita en este trabajo tiene relación con la primera de las hipótesis planteadas acerca de la existencia de coherencia entre la organización de la variabilidad genética y la diferenciación agroecológica. La distribución de la variabilidad genética molecular diferenció cuatro grupos de accesiones: de Puna, Valles secos, Valles húmedos y una zona de Transición de altura, manteniendo además una fuerte diferenciación entre poblaciones dentro de cada grupo. La caracterización analizada en conjunto, corroboró la estructura y además se pudieron determinar las principales diferencias fenotípicas entre los grupos genéticos (Costa Tártara et al., 2011). El gradiente en magnitud de la diversidad genética evidenciado a escala regional (dirección oeste-este) en correspondencia con el agrupamiento longitudinal de las poblaciones, muestra un patrón no documentado anteriormente. Además, las observaciones morfológicas llevadas a cabo por Curti et al., (2011) indicarían un gradiente en el grado de domesticación, entendiendo una relación positiva entre el grado de domesticación de la quínoa y la antigüedad del uso como cultivo.

6.3. Diversidad genética y molecular del germoplasma procedente del resto de Sudamérica en comparación con las poblaciones de quínoa nativa del Noroeste Argentino (NOA)

La caracterización molecular de 22 *loci* SSR en 42 accesiones extranjeras, considerando el mismo tamaño de muestra que en las accesiones del NOA, hicieron comparables las medidas de variabilidad genética estimadas sobre el germoplasma nativo de quínoa (NOA y Extra-NOA), pudiendo relativizar el nivel de diversidad de la colección

estudiada y estimar parámetros de estructura genética a nivel de Sudamérica. La discusión de las relaciones genéticas del germoplasma nativo con germoplasma procedente de otras regiones de Sudamérica da lugar a contrastar lo postulado en la segunda hipótesis.

Doce de las accesiones bolivianas caracterizadas proceden de la región oriental (Dtos. Tarija y Chuquisaca), una región sub-muestreada en otros estudios, y fueron colectadas en el año 2010 ante resultados preliminares que pusieron a prueba las hipótesis planteadas (Costa Tártara et al., 2010). Los 22 *loci* caracterizados en 80 poblaciones de *C. quinoa* amplificaron 553 alelos en total. El 12 % (67) fueron únicos entre las accesiones nativas, el 35 % (194) únicos entre las accesiones Extra-NOA y el 52 % (292) restante fue compartido, al menos entre dos accesiones. La fijación de variantes alélicas únicas en la quínoa nativa justifica la conservación de este germoplasma dando sustento a lo sugerido en publicaciones anteriores (NRC, 1989).

La variabilidad alélica de las accesiones Extra-NOA, separándolas según su país de procedencia (Tabla 9), mostraron un amplio rango de variación en el polimorfismo inter-poblacional; desde accesiones prácticamente monomórficas (ChucA, Bolivia; CHEN178 Chile; CHEN005, Perú), a accesiones con más de 90 % de *loci* polimórficos. El número de alelos promedio entre poblaciones fue una medida más homogénea de representación de la variabilidad genética molecular capturada en la muestra entre las distintas procedencias: Argentina 50; Bolivia 54; Chile ~ 48; Perú ~ 56; Ecuador ~ 83; Colombia 73. Las accesiones de Ecuador y Colombia fueron las más polimórficas y diversas genéticamente (~ 0,60 y 0,50, respectivamente), a diferencia de lo descrito en Christensen et al. (2007), sin embargo puede ser un resultado sesgado por el escaso número de muestras caracterizadas en esta tesis. Entre las 22 accesiones de Bolivia el promedio de la diversidad genética fue 0,37, y las poblaciones más diversas fueron las del Salar de Uyuni (CHEN253), de los valles interandinos (CHEN248, TAR3) y del altiplano central (CHEN339, 346, costa del Lago Titicaca), coincidiendo con lo reportado por del Castillo et al. (2006), aunque el valor de diversidad entre las 8 poblaciones bolivianas caracterizadas con RAPDs fue menor. Entre las 10 accesiones procedentes de Chile el promedio de diversidad genética fue 0,31, siendo

las poblaciones más polimórficas la CHEN169 (Ollague, altiplano norte) y la CHEN025 (procedente de Lo Valdivia, cerca de Pichilemu, región VI). Trabajos específicos de caracterización sobre germoplasma chileno (Anabalón-Rodríguez & Thomet-Isla, 2009; Fuentes et al., 2008; 2012) encontraron un amplio rango de variabilidad en el germoplasma, siendo las entradas más variables las accesiones procedentes de la costa (ecotipo Nivel del Mar) que las del altiplano. Esto no es coherente con lo observado en la accesión de Ollague, pero podría ser un sesgo en el muestreo de los individuos. Entre las 8 accesiones de Perú las más diversas fueron las procedentes de Puno (CHEN168, 001, 361, altiplano central), mientras que el promedio de la diversidad genética fue intermedio (0,34). La magnitud de la diversidad genética molecular es una medida potencial de variabilidad en base al germoplasma conocido (o lo capturado en una colección), haciendo comparables las distintas procedencias. Comparando los valores promedio de la magnitud de la diversidad genética Bolivia y Perú fueron las más diversas, en concordancia con lo postulado en caracterizaciones anteriores (Wilson, 1988a; Christensen et al., 2007, coherente en el contexto de la hipótesis de centro de origen de quínoa), seguido por Chile y por último Argentina (0,29). Sin embargo, se evidencia cierta variabilidad dentro de cada procedencia, reflejando posiblemente una situación inherente a la estructura genética de la quínoa cultivada, independientemente de su procedencia. La antigüedad de la quínoa como planta domesticada se remonta por lo menos a cuatro milenios (Pickersgill, 2007), un tiempo suficiente para que ocurran distintos procesos moleculares relacionados con aspectos biológicos y culturales, algunos de ellos discutidos en el apartado 6.2, debilitando el valor de la comparación entre procedencias.

Wilson (1988; 1990) clasificó a nivel molecular la quínoa cultivada en Sudamérica en dos grandes grupos: la quínoa Andina, dispersa por la región homónima como un complejo de especies (cultivada y tipo silvestre simpátrica), y la “quingua”, quínoa cultivada a baja altura en la costa chilena, clasificadas además en cinco ecotipos por Tapia (1982). Las relaciones genéticas en base a la distancia entre las 80 poblaciones caracterizadas evidenciaron un patrón de agrupamiento longitudinal, en que se diferencian los dos

elementos descriptos: a nivel de la distancia promedio el análisis de clúster agrupó las accesiones de quínoa Andina en cuatro grupos (T1, T2, T3, T4) (Figuras 23 y 24), conteniendo todas la accesiones distribuidas desde Colombia hasta la región del NOA, y mostrando el patrón longitudinal antes mencionado. Las accesiones nativas de quínoa se distribuyeron entre los cuatro grupos, formando parte del gran grupo de quínoa Andina. T1 incluyó entradas de valles secos del NOA junto a otras accesiones de valles de Chuquisaca y Potosí (ecotipo de Valle); T2, accesiones de Puna de Argentina, altiplano de Tarija de Bolivia, la zona perisalar de Uyuni y una accesión del norte de Chile (ecotipos Altiplano y Salares). Las dos accesiones caracterizadas procedentes de Cholila, provincia de Chubut, se agruparon en T2; T3 incluye accesiones de la zona de transición de altura del NOA, junto con entradas procedentes de la costa del Titicaca en Perú y las accesiones de Ecuador (ecotipo de Valle); T4, accesiones de valles orientales húmedos de Tarija y del NOA, una accesión procedente del centro de Perú (Junín) y la procedente de Nariño, Colombia (Figura 25)². El quinto grupo (T5), el más diferenciado, agrupó la mayoría de las accesiones procedentes de Chile (ecotipo Nivel del Mar) (figura 8.4), excepto la EChi169 procedente del altiplano norte (Ollague) agrupada con otras accesiones de altiplano seco (T2), al igual que lo descrito por Christensen et al. (2007). El AMOVA evidenció una fuerte estructura a nivel poblacional y una estructuración a nivel regional significativa, dando sentido al punto de corte elegido en el dendograma, así como también una alta correlación co-fenética significativa ($r=0,82$) que indica la correcta representación del mismo.

² Algunas entradas de este grupo podrían representar el ecotipo sub-tropical, el quinto entre los descriptos por Tapia (1982), ausente en otras caracterizaciones.

La inclusión de un vasto número de accesiones del NOA en un análisis de diversidad a nivel de Sudamérica evidenció un patrón de agrupamiento diferencial para el gran clúster de quínoa Andina, pudiendo discutir algunos de las hipótesis postuladas hasta el momento en relación a la dispersión de la especie cultivada en Sudamérica. El patrón bi-modal descrito por Wilson (1988a) para la quínoa Andina y corroborado en trabajos posteriores utilizando marcadores microsatélites (Mason et al., 2005; Christensen et al., 2007) se expresa en esta tesis como un patrón longitudinal que guarda cierta correspondencia con el régimen hídrico general que caracteriza la región (Figura 2, anexo), al menos desde un punto de vista cualitativo (similar al patrón observado en las quínoas del NOA). T1 y T2 agruparon accesiones de valles y altiplano seco, respectivamente, mientras que T3 y T4 agruparon accesiones de valles y altiplano húmedo. La variación isoenzimática reportada por Wilson (1988a) de germoplasma procedente de elevaciones medias en los valles de Cochabamba (centro de Bolivia, al norte de Chuquisaca y Potosí) mostraba mayor similitud genética con las quínoas del altiplano sur (germoplasma que estaría agrupado en T2 en este trabajo), sin embargo morfológicamente se asemejaban a germoplasma del altiplano norte y por eso las clasificó como de ecotipo “valle” (Wilson, 1990). La unión de T1 y T2 es coherente con ésta relación genética, y el agrupamiento de las accesiones procedentes de los valles secos del NOA junto con las del centro-este de Bolivia, discrimina un grupo poco definido en caracterizaciones anteriores.

La quínoa cultivada forma parte de las quenopodiáceas cultivadas y semicultivadas que han sido parte de las grandes culturas que florecieron en los Andes, principalmente la civilización Thiahuanacota (pre-incaica) y luego el imperio Incaico (Tawantisuyu). La quinoa cumplía diferentes roles (y de allí la diversidad de usos) (Bonifacio, 2003), factores que pueden haber influido en la dispersión. En este sentido, el patrón longitudinal observado en el agrupamiento de la quínoa Andina podría reflejar la existencia de corredores de difusión con dirección norte-sur desde el centro de origen propuesto para la especie, según el esquema de la Figura 31.

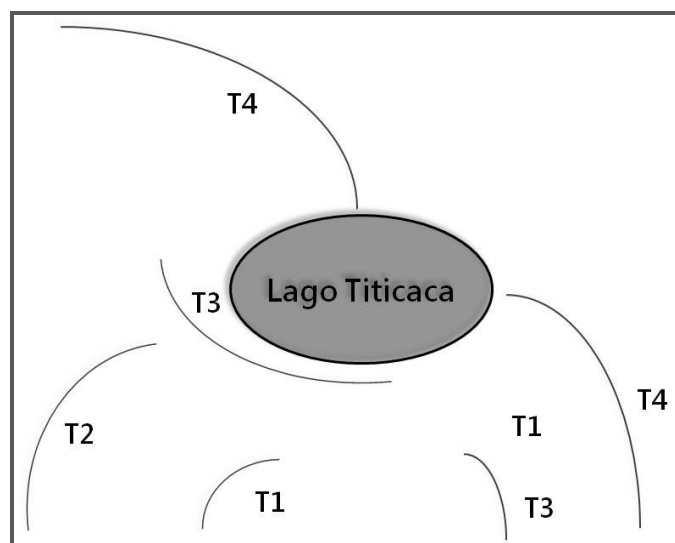


FIGURA 31: Esquema representativo de los corredores longitudinales de dispersión de la quínoa Andina.

Entre las accesiones de altiplano seco (T2), que agrupó ecotipos “Altiplano” y “Salar”, entradas colectadas en el altiplano de Tarija y las de Puna del NOA, se agruparon las dos poblaciones procedentes de Cholila, provincia de Chubut. Las referencias sobre las semillas donadas de Cholila indican que forman parte del germoplasma utilizado como cultivo en el lugar hace un tiempo largo y se reconocen localmente bajo la denominación de “quingua” (misma denominación dada por los agricultores chilenos). Si bien se indica que actualmente no es usual encontrar el cultivo entre los pobladores de esa zona, reconocen que en algún tiempo tuvo un papel importante en la dieta (Gallardo, com. pers., 2011). La mayor cercanía genética de estas accesiones al germoplasma del altiplano sugiere la posibilidad de ser un relicto de un germoplasma cultivado en las tierras bajas del actual territorio argentino, al este de los Andes, sobre el que el último registro data de finales del siglo XVIII (Paucke, 1944). La morfología de las hojas y atributos de semilla (dos rasgos taxonómicos críticos para *Chenopodium* en general y quínoa en particular) indicarían diferencias respecto al germoplasma de quínoa de Nivel del Mar, ya que las semillas procedentes de Cholila se observaron blancas y pequeñas (Bertero, com. pers., 2012). En contraposición, podrían ser

estas semillas el resultado de una introducción reciente procedente del norte, sin embargo, el conocimiento de la especie acerca de la respuesta a la duración del día durante el llenado imposibilitarían el cuaje de frutos en esas latitudes (Bertero, et al., 1999). siendo estas dos adaptaciones improbables de adquirirse en corto plazo. Los resultados sobre este germoplasma proporcionan evidencia para la arqueología sobre el itinerario de semillas de quinua a lo largo de corredores longitudinales de los Andes, finalizando en un entorno muy diferente a los Andes centrales de Sudamérica, único lugar donde este grupo genético había sido observado hasta el presente. Además podrían ser un modelo de estudio sobre fisiología de adaptación a días largos y mayores temperaturas.

Las accesiones agrupadas en T3 (altiplano húmedo) proceden mayormente de los valles interandinos del sur de Perú (Puno) y Ecuador, caracterizadas como de ecotipo “valle”, uniéndose a ellas las accesiones de quínoa nativa colectadas en la zona de transición de altura de los valles del NOA, hacia los valles orientales. El T4 agrupa accesiones de los valles orientales húmedos (Dpto. Santa Victoria) hacia el este de la Cordillera oriental, junto con entradas procedentes de valles de Tarija, la entrada de Nariño y “Blanca de Junín”, variedad originaria del centro de Perú. Esta región es conocida como “yungas” en Argentina y como “valle” en la zona de Tarija (Oliveto & Ventura, 2009), en tanto que algunas de las entradas podrían representar el grupo “subtropical” característico de elevaciones bajas (1800 mts) en las yungas (valle) de Bolivia, el elemento domesticado más distintivo del complejo andino (Wilson 1990), congruente con la diferenciación genética observada en el dendograma.

El agrupamiento de las accesiones de T3 y T4 puede explicarse parcialmente en relación a las dinámicas poblacionales de los andes del sur, principalmente durante el imperio incaico, cuyo poder estaba centralizado en el Cusco (actual territorio de Perú). La rápida expansión del imperio, implicó gran diversidad de poblaciones y geografías conquistadas, y exigió una compleja organización socio-económica principalmente para satisfacer la constante demanda de mano de obra necesaria para la explotación de los recursos de las tierras conquistadas (Oliveto & Ventura, 2009). Las selvas, bosques y

pastizales que se extienden al este de la Cordillera Oriental fueron un importante sitio de explotación en aquella época, estructurándose en los valles orientales de los actuales Perú, Bolivia y Argentina, sociedades multiétnicas producto del traslado, en muchos casos, de poblaciones en calidad de *mitmaquna*³ que cumplieron funciones económicas, sociopolíticas y de defensa (Renard Casevitz et al., 1988; Alconini, 2003 en Oliveto & Ventura, 2009). En los valles orientales de Tarija y Salta (frontera del imperio incaico) se menciona como principal característica la alta movilidad, inclusive durante la conquista de los españoles: circulación de objetos, personas y seguramente elementos simbólicos, ya que se procedió a la relocalización de comunidades externas, utilizadas en defensa por parte de los incas frente a grupos no dominados (ej. Chiriguanos). Los Incas dejaron claras muestras de su presencia en los valles orientales del sur de Tarija ya que hay sectores muy bien conservados del camino incaico que unen distintos puntos de los valles tarijeños, tanto en sentido norte-sur como este-oeste. La continuidad de ocupación atribuible al momento incaico conforma una línea de asentamientos que prosigue en el territorio salteño (Ventura et al., 2009).

Las accesiones que componen a T5 pertenecen al ecotipo Nivel del Mar y se caracterizan por crecer a bajas altitudes, además de poseer características morfológicas muy diferenciadas (Wilson, 1990). La gran diferenciación de las accesiones chilenas y el bajo polimorfismo en la isoenzimas de Wilson (1988a) dieron lugar a postular su origen como consecuencia de un efecto fundador producto de la dispersión del cultivo desde el altiplano sur. Resultados posteriores de estudios de diversidad molecular analizando un mayor número de accesiones, evidenciaron germoplasma más diverso (coherente con los resultados de esta tesis) y diferenciado quinoas de costa (Nivel del Mar) y andinas (Altiplano) (Christensen et al., 2007; Anabalón-Rodríguez y Thomet-Isla, 2009; Fuentes et al. 2008; 2012). El hallazgo de macro-restos arqueológicos en la zona central chilena

³ Ocloyas, churumatas, paypayas, ossas, gaypetes y chuis fueron las poblaciones relocalizadas por los incas como *mitmaquna*.

pertenecientes a diversas especies vegetales, entre ellas semillas carbonizadas de *Chenopodium* sp. (algunas identificadas como *C. quínoa*) evidencian la circulación de ciertas especies (cultígenos) entre poblaciones muy antiguas que habitaban la región central de Chile (entre el final de periodo arcaico, 8000 a 600 AP, y alfarero temprano, 500 AP a 650 de nuestra era), cuyo uso también alcanzaba a lo ceremonial, y dieron lugar a postular la posible ocurrencia de un doble proceso de domesticación: la primera en las tierras altas Andinas y la segunda en las tierras bajas de la costa de Chile (Planella y Tagle, 2004).

La lejanía genética del T5 surge de una fuerte diferenciación alélica y la presencia de alelos privados, tal como se ejemplifica en la Figura 3 (anexo). En este pool de germoplasma se observan algunos *loci* SSR que presentaron un importante número de alelos privados, siguiendo en muchos casos un patrón mutacional homogéneo de acuerdo a lo esperado según el modelo mutacional de paso a paso (Ohta y Kimura 1973 en Alcántara). La ocurrencia de alelos privados tiene importancia potencial en caso de utilizarse el germoplasma para mejoramiento (Mondini et al. 2010), tal como se mencionó anteriormente. Por la tasa de mutación estimada sobre regiones microsatélites (del orden 10^{-4}) su variación evidencia procesos microevolutivos recientes, ocurridos o en marcha (Goldstein & Schlotterer 1999; Whittaker et al., 2003 en Wang, 2010). El hecho de que los alelos privados detectados sean numerosos indicaría un prolongado proceso de deriva génica en las poblaciones de quínoa chilena, coherente con la antigüedad del cultivo en la región, bajo la hipótesis de introducción de germoplasma de los Andes. Sin embargo, se reporta también la detección de polimorfismo en los intrones del gen SOS1 y en marcadores de cloroplasto (cpDNA) para germoplasma procedente de Chile (Jellen, 2011), marcadores moleculares que presentan menor tasa mutación estimada (orden 10^{-8}) (Haag-Liautard et al., 2008 en Wang, 2010), y son utilizados en estudios de filogenia. El polimorfismo de estas regiones sustenta la diferenciación de T5 observada en esta tesis y aporta elementos de importancia en dirección a la hipótesis de una domesticación independiente en la región.

6.4. Microsatélites derivados de ESTs vs. microsatélites genómicos

A fin de comparar distintos tipos de marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética de la especie, se desarrollaron marcadores microsatélites a partir de dos genotecas de ESTs, una desarrollada a partir de tejido floral y semilla inmadura de quinoa (Coles et al. 2005) y otra desarrollada a partir de tejido de *C. álbum* en un ensayo de stress salino (Gu et al. 2011). La búsqueda de motivos microsatélites se realizó en ambas genotecas sobre secuencias no redundantes (Varshney et al., 2005) analizadas con el software Blast2Go, a fin de conseguir una descripción putativa para cada una y la clasificación según la anotación *Gene Ontology* (GO). Debido a la alta tasa de mutación que presentan los microsatélites hay mayor concentración de ellos en regiones no codificantes, hipótesis demostrada a partir de estudios comparativos (Tóth et al., 2000 en Oliveira et al., 2006). Entre los SSR presentes en regiones codificantes es esperable encontrar principalmente motivos trinucleotídicos ó sus múltiplos, por estar probablemente distribuidos de manera uniforme en ambas regiones (Metzgar et al., 2000 en Oliveira et al., 2006), y el resto de los motivos presente con mayor frecuencia en regiones no codificantes (Varshney et al., 2005; Oliveira et al., 2006), lo que refleja cierta presión de selección contra mutaciones que pueden cambiar el marco de lectura de un gen. En concordancia con estas hipótesis, entre ambas genotecas se detectaron mayormente microsatélites de motivo trinucleótido, sin embargo entre los once EST-SSR seleccionados y testados (cinco de la genoteca de *C. album* –CA-, y seis de la genoteca de *C. quinoa* –CQ- Tabla 7.8, sección resultados) hubo motivos di-, tri-, y tetra- nucleotídicos con el objetivo de evaluar la calidad de amplificación de diferentes motivos SSR.

Los 11 marcadores EST-SSR testados sobre las 8 accesiones de *C. quinoa* nativas del NOA amplificaron exitosamente, consiguiendo excelente transferibilidad de los marcadores diseñados sobre secuencias ESTs de *C. album*, una de las principales ventajas que presentan los SSR génicos (Gupta et al., 2003; Varshney et al., 2005; Kalia et al., 2011). Seis marcadores amplificaron alelos de un tamaño mayor al estimado (cinco de ellos pertenecientes al set CQ), un resultado frecuente en los productos de amplificación de EST-

SSR posiblemente debido a la presencia de intrones y/o *In—Dels* en la secuencia genómica correspondiente (Varshney et al., 2005). Probablemente el polimorfismo detectado por el set CQ de EST-SSR esté relacionado con ello, aunque para su confirmación sería necesario la secuenciación y alineamiento de los productos de amplificación con la secuencia genómica original tanto para verificar la identidad como para determinar la presencia de de intrones y/o *In—Dels*. Cuatro marcadores EST-SSR amplificaron *loci* múltiples (CA342, CA888, CQ715, CQ470), una tendencia marcada respecto a los SSR genómicos, también observada en *primers* EST-SSR de otra especie poliploide (Saha et al., 2004 en Varshney et al., 2005). Igualmente se documentó para quínoa la amplificación de patrones complejos para un bajo número de *primers* SSR genómicos (Maughan et al., 2005).

Los EST-SSR evidencian variabilidad en regiones codificantes del genoma, por ende deberían dar asociaciones muy aproximadas con el rasgo o funcionalidad de la secuencia y la posterior utilización del marcador desarrollado en especies relacionadas (Gupta et al., 2003 en Kalia et al., 2011). La utilización de software como el Blast2Go brinda información putativa de cada secuencia resultado de la similitud con bases de datos de secuencias del GenBank (BLAST) así como también asigna una posible función molecular por anotación GO. Este procedimiento fue realizado sobre ambas *libraries* con fines descriptivos ya que ninguno de los productos de amplificación fue secuenciado para verificar la identidad de la secuencia. Según lo reportado por Maughan et al., (2007), la mayoría de las secuencias depositadas en el GenBank de la library desarrollada a partir de tejido de *C. quinoa* (Coles et al., 2005) mostraron funciones putativas relacionadas con mecanismos de defensa, que, entre otras, fueron algunas de las anotaciones observadas en relación al proceso biológico involucrado (Tabla 11, anexo), aunque los elegidos para desarrollar los marcadores presentaron anotaciones diversas. Las anotaciones de los unigenes de la *library* de *C. album* seleccionados para el desarrollo de EST-SSR también fueron diversos, pero presentaron mayor confiabilidad en su anotación GO (dado por la asignación de EC, *Evidence Code*) (Conesa et al., 2005) (Tabla 15, anexo). Por el objetivo abordado en esta tesis, el criterio de selección de las secuencias para el desarrollo de los marcadores EST-

SSR se priorizó el tipo de SSR detectado (a fin de validar la herramienta), y el grado de similitud resultante del BLAST, en detrimento de la funcionalidad putativa dada por el tipo de anotación GO.

Los EST-SSR fueron testados en 2 accesiones de cada grupo genético (según la estructura genética descrita en esta tesis) de diferente nivel de diversidad a fin de explorar el posible alcance de los marcadores como herramienta complementaria en análisis de diversidad genética. Solo se consideraron los marcadores que presentaron un patrón monogénico para hacer la comparación con los SSR genómicos, la que resultó de igual manera desbalanceada (7 *primers* EST-SSR contra 22 SSR genómicos). En general el polimorfismo detectado por los EST-SSR fue menor que los SSR genómicos, tal como se da en muchas especies de plantas (Varshney et al., 2005), sugiriendo su uso como herramienta complementaria para análisis de diversidad. La fortaleza de los EST-SSR radica en que detectan variabilidad en regiones génicas, por lo que se recomienda su uso en mapeo genético (ó QTLs) y/ó bien para diferenciar poblaciones o taxones superiores por tratarse de variabilidad en regiones altamente conservadas (Kalia et al., 2011).

7. CONCLUSIONES

Los antecedentes de la distribución de *C. quinoa* spp. *quinoa* en la región Andina de Sudamérica predicen que el origen del germoplasma en el NOA puede haber sido a partir de la ocurrencia de procesos de introducción independientes en contraposición a un único evento de introducción y su posterior dispersión en la región, lo que dio lugar a formular dos hipótesis: (1) Existe coherencia entre la organización de la variabilidad genética y la diferenciación agroecológica, y (2) Las poblaciones locales de quínoa derivan de procesos de introducción independientes en las diferentes regiones ecológicas del NOA. Bajo estas hipótesis el objetivo general de esta tesis fue determinar la magnitud de la diversidad y la estructura genética de germoplasma de quínoa local y esclarecer la relación y el patrón de dispersión de la especie en el NOA mediante la comparación con entradas o poblaciones de otros países de Sudamérica. A través de cumplir cada uno de los objetivos específicos formulados, se expone a continuación las principales conclusiones de la tesis y posibles proyecciones de trabajo.

El concepto desarrollado por Vavilov respecto a determinar el sitio con mayor diversidad para una especie como centro de origen, se sustenta en suponer que allí el cultivo permaneció el tiempo suficiente para desarrollar una amplia diversidad. Aunque fue muy utilizado para delinear hipótesis acerca de la dispersión de muchas especies, en la actualidad se considera muy simplista (Harlan, 1995), siendo necesario estudiar el proceso de cada cultivo de manera separada. El NOA representa geográficamente el extremo sur en la distribución del complejo de *C. quinoa* Andina y nunca había sido muestreado exhaustivamente por ser considerado un cultivo marginal en esta región, o aún casi desaparecido (Bertero, 2001). En el contexto de la hipótesis sobre el centro de origen, el NOA representa un extremo en la distribución, pudiéndose esperar baja variabilidad genética, sin embargo, la riqueza alélica del germoplasma nativo es comparable con el nivel de variabilidad alélica en accesiones de otras procedencias de Sudamérica documentadas en Christensen et al. (2007).

- El germoplasma caracterizado presentó un marcada estructura genética a partir de la diferenciación observada en los diferentes niveles estudiados, pudiendo definir longitudinalmente cuatro grandes grupos que corresponden a regiones agroecológicamente diferentes: Puna, Valles secos, Valles húmedos y una zona de transición de altura. Dentro de cada grupo genético la diferenciación entre poblaciones fue alta, además de observarse un amplio rango en los valores de diversidad genética intra-poblacional. Esta estructura se discutió teniendo en cuenta que la evolución de la quínoa es un complejo de especies (weed/crop) lo que puede dar lugar a un porcentaje de cruzamientos con especies parientes silvestres simpátricos.

- La magnitud de la diversidad genética a nivel de grupo presentó un gradiente decreciente hacia el este junto con la altitud, encontrando una correlación baja pero significativa con el régimen de precipitaciones de la región, que se incrementa hacia los valles orientales húmedos. El gradiente de diversidad genética molecular se refleja también en un gradiente en el síndrome de domesticación que presenta la especie (mayor diversidad en sitios de mayor antigüedad de uso), evidenciando un patrón característico de una especie que evolucionó como cultivo, post-domesticación.

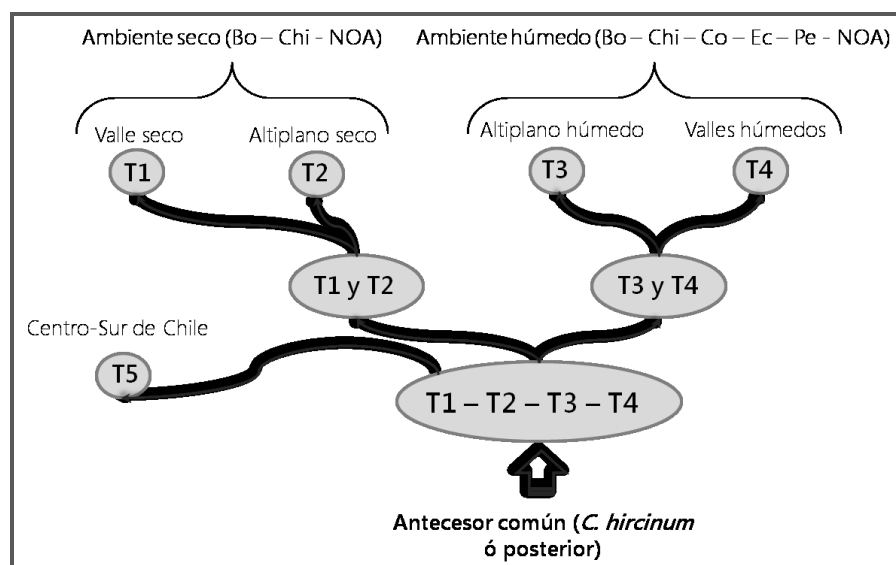
- El análisis de caracteres morfo-fenológicos sustentó el agrupamiento resultante en la caracterización molecular, pudiendo determinar los más relevantes para cada grupo genético. La caracterización conjunta y determinación de alelos únicos permite proyectar aproximaciones analíticas para determinar posible asociación de caracteres.

- Las accesiones caracterizadas procedentes del resto de Sudamérica se diferenciaron exitosamente a partir de la caracterización de *loci* SSR, obteniéndose un alto valor de distancia genética promedio entre todas.
- La inclusión de germoplasma del NOA, el extremo sur de la distribución de la especie en la región Andina, en un análisis a nivel de Sudamérica evidenció un patrón de agrupamiento longitudinal de acuerdo a las características ambientales de los sitios de origen (ambiente seco y ambiente húmedo) y en un segundo orden, tierras altas y tierras bajas, lo que sustenta la segunda hipótesis postulada acerca de que el origen del germoplasma en el NOA es ocurrencia de procesos de introducción independientes de zonas ecológicas similares en contraposición a un único evento de introducción y su posterior dispersión. Las accesiones de quínoa procedentes del centro-sur de Chile compusieron el grupo genético más diferenciado.
- En relación a la dispersión del cultivo en la región Andina de Sudamérica se plantea la posibilidad de la existencia de “Corredores longitudinales en la difusión de la quínoa de los Andes del Sur”, considerando la dinámica poblacional de la región en la época pre-incaica y durante el Imperio Incaico.
- La diferenciación genética del germoplasma procedente del centro-sur de Chile del resto de la quínoa Andina responde a la hipótesis de una posible domesticación independiente.
- La mayor cercanía genética de accesiones de quínoa procedentes de Cholíla (Chubut, Argentina), a germoplasma procedente del altiplano seco de los Andes del sur sugiere la posibilidad de ser un relicto de un germoplasma cultivado en las tierras bajas del actual territorio argentino.

- Los EST-SSR desarrollados y testados resultaron exitosos en la amplificación aunque el nivel de polimorfismo detectado fue menor que los SSR genómicos. De todas maneras el hecho de que los EST-SSR detecten variabilidad a nivel de secuencias funcionales indica que son una herramienta complementaria a los SSR genómicos tanto en estudios de diversidad como en asociación de caracteres y/o mapeo genético de genes.

7.1. Proyecciones

La distribución de la variabilidad genética molecular observada en esta tesis (simplificada en el esquema inferior) apoya la ocurrencia de eventos de domesticación independientes y abre proyecciones acerca del estudio del antecesor común a la quínoa cultivada.



En relación a la domesticación, el supuesto acerca de la distribución geográfica de la variabilidad genética (disminución con la distancia desde el lago Titicaca) antes mencionado, se ve cuestionado ante publicaciones recientes que indican la presencia de una alta variabilidad en zonas presuntamente marginales para la especie (Fuentes et al., 2008; Anabalón-Rodríguez y Thomet-Isla, 2009; Costa Tártara et al., 2012) y destacan la necesidad de una mayor intensidad de muestreo en todo el área de distribución del cultivo.

Por otra parte, la noción de la domesticación como un evento único y geográficamente localizado, de igual manera, encuentra objeción en la evidencia arqueológica y molecular de quínoa. Hallazgos de muestras arqueológicas identificadas como *C. quinoa* en Chile (Planella et al., 2005) y el centro oeste de Argentina (Hunziker & Planchuelo, 1971) de entre 2000 y 2960 años de antigüedad, con atributos considerados intermedios en el proceso de domesticación (semilla pequeña y ausencia de borde truncado) (Bruno & Whitehead, 2003), llevaron a sugerir la posibilidad de un evento de domesticación independiente en el sur de Chile (Planella et al., 2005; Bertero, 2007). Asimismo, una comparación entre dos accesiones chilenas y tres andinas de quinua sugiere una diferenciación temprana de ambos tipos de poblaciones, aunque la muestra es muy pequeña para permitir una generalización (Maughan et al., 2006).

8. REFERENCIAS

- Abbo, S., Pinhasi van-Oss, R., Gopher, A., Saranga, Y., Ofner, I. & Peleg, Z.** 2014. Plant domestication versus crop evolution: a conceptual framework for cereals and grain legumes. *Trends in Plant Sciences* 1124 (in press).
- Aellen, P. & Just, T.** 1943. Key and synopsis of the American species of the genus *Chenopodium* L. *The American Midland Naturalist* 30: 47-67.
- Alconini Mc Elhinny, Sonia & C.L. Rivera Casanovas.** 2003. La tradición cerámica “estampada e incisa de bordes doblados” en la vertiente oriental de los Andes: un caso de interacción e influencia desde las zonas bajas. En: *La Mitad Verde del Mundo Andino. Investigaciones arqueológicas en la vertiente oriental de los Andes y las tierras bajas de Bolivia y Argentina.* Ortiz, G. & Ventura, B. (Eds.) Universidad Nacional de Jujuy, Jujuy, Argentina. pp 153-177.
- Alvarez Jubete, L., Arendt, E.K. & Gallagher, E.** 2010. Nutritive value of pseudocereals and their increasing use as functional glutenfree ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 21: 106-113.
- Anabalón-Rodríguez, L. & Thomet-Isla, M.** 2009. Comparative analysis of genetic and morphologic diversity among quinoa accessions (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the South of Chile and highland accessions. *Journal of Plant Breeding Crop Science* 1: 210-216
- Angiosperm Phylogeny Group.** 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85:531–553
- Asfaw, A., Blair, M.W. & Almekinders, C.** 2009. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the East African highlands. *Theoretical and Applied Genetics* 120: 1–12
- Babot, M.P.** 2009. La cocina, el taller y el ritual. Explorando las trayectorias del procesamiento vegetal en el Noroeste Argentino. *Darwiniana* 47: 7-30

- Babot, M.P.** 2011. Cazadores-recolectores de los Andes Centro-Sur y procesamiento vegetal. Una discusión desde la Puna Meridional Argentina (ca. 7000-3200 años a.p.). *Chúngara* 43: 413-432.
- Bagavathiannan, M.V., Julier, B., Barre, P., Gulden, R.H. & Van Acker, R.C.** 2010. Genetic diversity of feral alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations occurring in Manitoba, Canada and comparison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits. *Euphytica* 173: 419-432
- Barrett, B.A. & Kidwell, K.K.** 1998. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific North-west. *Crop Science* 38: 1261-1271.
- Bécares, D.A. & Bazile, D.** 2009. La quínoa como parte de los sistemas agrícolas en Chile: 3 regiones y 3 sistemas. *Revista Geográfica Valparaíso*. 42: 61-72.
- Bertero, H.D., King, R.W. & Hall, A.J.** 1999. Photoperiod-sensitive developmental phases in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Field Crops Research* 60: 231–243
- Bertero, H.D.** 2001. Quinoa (*Chenopodium quinoa*, Chenopodiaceae) puede llegar a ser un cultivo importante para la agricultura Argentina. *Boletín Sociedad Argentina de Botánica* 36: 3-4
- Bertero, H.D.** 2002. Adaptación de Quinoa (*Chenopodium quinoa*) para cultivo en las localidades de Colanzulí y Pueblo Viejo (Departamento Iruya, Salta). Informe de avance del proyecto.
- Bertero, H.D.** 2007. Quinoas de Nivel del mar ¿resultado de una domesticación independiente?. Exposición del II Congreso Internacional de la quinoa, Iquique, Chile.
- Bertero, H.D. & Ruiz, R.A.** 2008. Determination of seed number in Sea Level Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivars. *European Journal of Agronomy* 28: 186-194
- Bhargava, A., Shukla, S. & Ohri, D.** 2006. *Chenopodium quinoa* — An Indian perspective. *Industrial Crops and Products* 23: 73–87
- Bianchi, A.R., Yañez, C.E. & Acuña, L.R.** 2005. Base de datos mensuales de precipitaciones del noroeste argentino. INTA, Salta, Argentina. 41 pp.

- Bonifacio, A.** 1990. Caracteres hereditarios y ligamiento factorial en la quinua. Ing. Agr. Tesis. Universidad Mayor de San Simón, Cochamamba, Bolivia
- Bonifacio, A.** 2003. *Chenopodium* Sp.: Genetic resources, ethnobotany, and geographic distribution. Food Reviews International 19: 1-7
- Bramardi, S.** 2008. Análisis Multivariado: su aplicación en la caracterización de recursos genéticos. Apunte curso de Posgrado.
- Bramardi, S.J., Bernet, G.P., Asíns, M.J. & Carbonell, E.A.** 2005. Simultaneous Agronomic and Molecular Characterization of Genotypes via the Generalised Procrustes Analysis: An Application to Cucumber. Crop Science 45:1603–1609
- Bruno, M. & Whitehead, W.** 2003. *Chenopodium* cultivation and formative period agriculture at Chiripa, Bolivia. Latin American Antiquity 14: 339–355
- Cain, A.J. & Harrison, G.A.** 1958. An anlysis of the taxonomists' judgement of affinity. Proceedings of the Zoological Society of London. 131: 85-98
- Calabrese, P.P., R.T. Durrett, & C.F. Aquadro.** 2001. Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. Genetics 159: 839-852
- Camacho Villa, T.C., Maxted, N., Scholten, M. & Ford-Lloyd, B.** 2005. Defining and identifying crop landraces. Plant Genetic Resources 3: 373-384
- Carlsson, R.** 1989. Green biomass of native plants and new, cultivated crop for multiple uses: food, fodder, fuel, fibre for industry, phytochemical products and medicine. En: New crops for food and industry. G.E. Wickens, N. Haq & P.R. Day (Eds.) London. pp 223 - 234
- 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, 149-160.
- Catacora, A.G.** 1977. Determinación del cariotipo en cinco líneas de Quinua. Tesis de grado, Universidad Nacional Técnica del Altiplano, Puno, Perú.
- Cavalli-Sforza, L.L. & Edwards, A.W.F.** 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. Evolution. 21: 550-570

Cavers, S., Navarro, C. & Lowe, A.J. 2003. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics* 4: 571–580

Cervigni, G.D., Paniego, N., Diaz, M., Selva, J.P., Zappacosta, D., Zanazzi, D., Landerreche, I., Martelotto, L., Felitti, S.; Pessino, S., Spangenberg, G. & Echenique, V. 2008. Expressed Sequence Tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Molecular Biology*. 67: 1-10

Chabane, K., Ablett, G.A., Cordeiro, G.M., Valkoun, J. & Henry, R.J. 2005. EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 52: 903-909

Chase, M.R., Boshier, D.H. & Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. *American Journal of Botany* 82: 468–475

Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y.G. & McCouch, S.R. 1997. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 553–567

Chilo, G., Vacca Molina, M., Carabajal, R. & Ochoa, M. 2009. Efecto de la temperatura y salinidad sobre la germinación y crecimiento de plántulas de dos variedades de *Chenopodium quinoa*. *Agriscientia*. 26: 15-22.

Christensen, S.A., Pratt, D.B., Pratt, C., Nelson, P.T., Stevens, M.R., Jellen, E.N., Coleman, C.E., Fairbanks, D.J., Bonifacio, A. & Maughan, P.J. 2007. Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. *Plant Genet Resour* 5: 82 – 95

Coles, N.D., Coleman, C.E., Christensen, S.A., Jellen, E.N., Stevens, M.E, Bonifacio, A., Rojas-Beltran, J.A., Fairbanks, D.J. & Maughan, P.J. 2005. Development and use of an expressed sequenced tag library in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) for the discovery of single nucleotide polymorphisms. *Plant Science*. 168: 439–447

- Conesa, A., Götz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Talon, M. & Robles, M.** 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21: 3674-3676.
- Cordeiro, G.M., Casu, R., MCintyre, C.L., Manners, J.M. Henry, R.J.** 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to Erianthus and Sorghum. *Plant Science* 160: 1115-1123
- Costa Tártara S.M., Manifesto M.M., Bertero H.D.** 2010. Caracterización genética de *Chenopodium quinoa* nativa del Noroeste Argentino y su relación con germoplasma de Sudamérica. Conferencia, III Congreso Mundial de la Quinoa, Oruro, Bolivia.
- Costa Tártara, S.M., Curti, R.N., Bramardi, S., Manifesto, M.M & Bertero, D.** 2011. Análisis simultáneo de variables morfológicas cuantitativas y marcadores moleculares para la caracterización de accesiones nativas de quinoa del noroeste argentino. Conferencia, XVI Reunión Argentina del GAB, Salta, Argentina.
- Costa Tártara, S.M., Manifesto, M.M., Bramardi, S.J. & Bertero, H.D.** 2012. Genetic structure in cultivated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), a reflection of landscape structure in Northwest Argentina. *Conservation Genetics* 13: 1027-1038.
- Cox, T.S., Murphy, J.P. & D.M. Rodgers.** 1986. Changes in genetic diversity in the red winter wheat regions of the United States. *PNAS* 83: 5583–5586.
- Crossa, J., Hernandez, C.M., Bretting, P., Eberhart, S.A. & Taba, S.** 1993. Statistical genetic considerations for maintaining germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 673-678
- Cuadras, C.M.** 2010 Nuevos métodos de análisis Multivariante. CMC Editions, Barcelona, España. 249 pp
- Curti, R.N., Bertero, H.D., Andrade, A.J., Velásquez, B. & Bramardi, S.** 2010. Caracterización morfo-fenológica preliminar del germoplasma nativo de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) del Noroeste Argentino. Conferencia, III Congreso Mundial de la Quinoa, Oruro, Bolivia.

- Curti, R.N., Andrade, A.J., Bramardi, S., Velásquez, B. & Bertero, H.D.** 2011. Ecogeographic structure of phenotypic diversity in cultivated populations of quinoa from Northwest Argentina. *Annals of Applied Biology*. 160: 114-125
- Cusack, D.F.** 1984. Quinoa: Grain of the Incas. *The Ecologist* 14: 21-31
- De Bruin, A.** 1963. Investigation of the food value of quinoa and cañihua seed. *Journal of Food Science*. 29:872–876
- de Vicente, M.C., Metz, T. & Alercia, A.** 2004. Descriptors for Genetic Marker Technologies. Rome, Italy, IPGRI.
- Del Castillo, C., Winkel, T., Mahy, G. & Bizoux, J.P.** 2007. Genetic Structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) of the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 897 – 905
- Del Castillo, C., Mahy, G. & Winkel, T.** 2008. La quinoa en Bolivie: une culture ancestrale devenue culture de rente “bio-équitable”. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 12: 421-435
- Del Castillo, V., Lescano, G. & Armada, M.** 2009. Formulación de alimentos para celíacos con base en mezclas de harinas de quínoa, cereales y almidones. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59: 332-336
- Delgado, A., Palacios, J.H. & Betancourt, C.** 2009. Evaluación de 16 genotipos de quinoa dulce (*Chenopodium quinoa* Willd.) en el municipio de Iles, Nariño (Colombia) *Agronomía Colombiana* 27: 159-167
- Dellaporta, S., Wood & Hicks, J.** 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19 – 21
- Doebley, J.F., Gaut, B.S. & Smith, B.D.** 2006. The Molecular Genetics of Crop Domestication. *Cell* 127: 1309-1021
- Elder, J.K. & Southern, E.M.** 1987. Computer-aided analysis of one dimensional restriction fragment gels. *Restriction Fragment Gels, Chapter 7* 165-172 pp

Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131: 479-491

Exportaciones de Perú. Quinoa 2013. Disponible en: <http://exportacionesdelperu.blogspot.com.ar>. Ultimo acceso: abril de 2013.

FAO (Food and Agriculture Organization). Statistics Division. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/en/>. Ultimo acceso: abril de 2013.

Farr T.G., Rosen, P., Caro, E., Crippen, R., Duren, R., Hensley, S., Kobrick, M., D., Paller, M., Rodriguez, E., Roth, R., Seal, D., Shaffer, S., Shimada, J., Umland, J., Werner, M., Oskin, M., Burbank, D. & Alsdorf, D. 2007. The Shuttle Radar Topography Mission, *Reviews of Geophysics* 45, RG2004, doi: 10.1029/2005RG000183

Fernández, H. 2004. Uso de Marcadores Moleculares RAPD en la Caracterización de Bancos de Germoplasma en Venezuela. *Revista Digital CENIAP Hoy*. N° 5. Disponible en: www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n5/arti/hfernandez.htm

Food and Agriculture Organization of the United Nations. The Statistics Division. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway>. Ultimo acceso, abril de 2013.

Franco, T.L. e Hidalgo, R (Eds.) 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico N° 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.

Frankel, O.H., Brown, A.H.D. & Burdon, J.J. 1995. *The conservation of Plant Biodiversity*. Cambridge University Press, UK, pp 10-38

Fuentes, F. & Bhargava, A. 2011. Morphological Analysis of Quinoa Germplasm Grown Under Lowland Desert Conditions. *Journal of Agronomy & Crop Science* 197: 124-134

Fuentes, F.F., Bazile, D., Bhargava, A. & Martínez, E.A. 2012. Implications of farmers seed exchanges for on-farm conservation of quinoa, as revealed by its genetic diversity in Chile. *Journal of Agricultural Science* doi:10.1017/S0021859612000056, 15 pp.

Fuentes, F.F., Martinez, E.A., Hinrichsen, P.V., Jellen, E.N. & Maughan, P.J. 2008. Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)

germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. *Conservation Genetics* 10: 369-377

Gandarillas, H. & G. Tapia. 1976. La variedad de quinua dulce Sajama. En: II Convención Internacional de Quenopodiaceas, Quinua y Cañahua. UBTF, CDOP de Potosí, IICA. Potosí, Bolivia. pp. 105.

Gandarillas, H. 1979. Botánica; Genética y origen. En: La quinua y la kañiwa, cultivos andinos. IICA, Bogotá, 227 pp.

Goldstein, D.B. & Schlotterer, C. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Golsberg, C., Orcasitas, E., Chauque, J.G. 2010. La quinua en la Región del Noroeste Argentino. Reconstrucción del conocimiento del cultivo y revalorización cultural y alimenticia. Conferencia, III Congreso Mundial de la Quinua, Oruro, Bolivia.

González, J.A., Konishi, Y., Bruno, M., Valoy, M., Prado, F.E. 2011. Interrelationships among seed yield, total protein and amino acid composition of ten quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivars from two different agroecological regions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92: 1222-1229

Gower, J.C. 1975. Generalized Procrustes Analysis. *Psychometrika* 40: 33-51

Gregorius, H. 1974. Genetischer Abstand Zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica* 23: 1-3

Gu L., Xu D., You T., Li X., Yao S., Chen S., Zhao J., Lan H. & Zhang F. 2011. Analysis of gene expression by ESTs from suppression subtractive hybridization library in *Chenopodium album* L. under salt stress. *Molecular Biology Reports* 38: 5285-95.

Guo, W., Cai, C., Wang, C., Han, Z., Song, X., Wang, K., Niu, X., Wang, C., Lu, K., Shi, B. & Tianzhen, Z. 2007. A Microsatellite-Based, Gene-Rich Linkage Map Reveals Genome Structure, Function and Evolution in *Gossypium*. *Genetics* 176: 527–541

Gupta, P.K., Rustgi, S., Sharma, S., Singh, R., Kumar, N. & Balyan, H.S. 2003. Transferable EST–SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 270: 315–323

- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, .D, Lynch, M., Charlesworth, B. & Keightley, P.D.** 2008. Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* 6: e204
- Hackauf, B. & Wehling, P.** 2002. Identification of microsatellite polymorphisms in an expressed portion of the rye genome. *Plant Breeding* 121: 17-25
- Hamrick, J.L. & Nason, J.D.** 1996. Consequences of dispersal in plants. En: *Populations Dynamics in Ecological Space and Time*. Rhodes, O., Chesser, R.K. & Smith, M.H. (Eds.) University of Chicago. 203-236 pp
- Harlan, J.R.** 1992. *Crops and Man*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Hartl, D.L & Clark, A.G.** 2007. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A.** 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978
- Hillis, D.M.** 1984. Measure and modification of Nei's genetic distance. *Systematic Zoology* 33: 238-240
- Hunziker, A.T.** 1943. Las especies alimenticias de *Amaranthus* y *Chenopodium* cultivadas por los indios de América. *Revista Argentina de Agronomía* 30: 297-353
- Hunziker, A.T.** 1952. Los pseudocereales de la agricultura indígena de América. Acme Agency, Buenos Aires. 37 pp.
- Hunziker, A.T. & Planchuelo, A.M.** 1971. Sobre un hallazgo de *Amaranthus caudatus* en tumbas indígenas de Argentina. *Kurtziana* 6: 63-67.
- IBPGR.** 1981. Descriptores de quinoa (*Chenopodium quinoa*). International Board of Plant Genetic Resources, Rome. 25 pp.
- INTA Informa.** 2012. Quinoa, un cultivo andino con manejo nacional. Disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/?p=12134>

- Jarvis, D.E., Kopp, O.R., Jellen, E.N., Mallory, M.A., Pattee, J., Bonifacio, A., Coleman, C.E., Stevens, M.R., Fairbanks, D.J. & Maughan, P.J.** 2008. Simple sequence repeats marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Genetics* 87: 39-51
- Jellen, E., Kolano, B., Sederberg, M., Bonifacio, A. & Maughan, P.** 2011. *Chenopodium*. En: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Kole, C. (Ed.) Springer Verlag. 35-61 pp
- Jung, S., Jesudurai, C., Staton, M., Du, Z., Ficklin, S., Cho, I., Abbott, A., Tomkins, J. & Main, D.** 2004. GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web resources for Rosaceae genomics and genetics research. *BMC Bioinformatics* 5: 130
- Jung, S., Staton, M., Lee, T., Blenda, A., Svancara, R., Abbott, A. & Main, D.** 2008. GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Nucleic Acids Research* 36: D1034-D1040
- Junovich, A.** 2003. La quinua en el Ecuador a través de los datos del III Censo Nacional Agropecuario. Proyecto SICA, Ministerio de Agricultura y Ganadería/Banco Mundial, Quito.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R. & Dhawan, A.K.** 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309–334
- Knowles, L.L.** 2009. Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 593–612.
- Koziol, M.J.** 1992. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) *Journal of Food Composition Analysis* 5: 35–68.
- Kuelung, C., Baezinger, P.S., Kachman, S.D. & Dweikat, I.** 2006. Evaluating the genetic variability of triticale with wheat and rye SSR markers. *Crop Science* 46: 1692–1700
- Laguna, P.** 2002. La Cadena Global de la Quinua: un reto para la Asociación Nacional de Productores de Quinua. En: *La Gestión Económica-Ambiental en las Cadenas Globales de Mercancías en Bolivia*. Romero, C. & Padilla, W. (Eds.). IESE-PROMECA-IVO, Cochabamba, Bolivia. 89-195 pp

- Lattoo, S.K., Dhar, R.S., Khan, S., Bamotra, S., Bhan, M.K., Dhar, A.K. & Gupta, K.K.** 2008. Comparative analysis of genetic diversity using molecular and morphometric markers in *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. *Genetic Resources and Crop Evolution* 55: 33–43
- Lia, V.V., Poggio, L. & Confalonieri, V.A.** 2009. Microsatellite variation in maize landraces from Northwestern Argentina: genetic diversity, population structure and racial Affiliations. *Theoretical Applied Genetics* 119: 1053–1067
- Ligarreto, G.** 2003. Caracterización de germoplasma. En: *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Franco, T.L. e Hidalgo, R. (Eds.). Boletín técnico N° 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- Lorenzini, H.N., Echeverría, M.J. & Balmaceda, R.** 1999. Geografía la Argentina. A-Z, Buenos Aires, Argentina, 143-164 pp
- Loveless, M.D. & Hamrick, J.L.** 1984. Ecological determinants of genetic structure of plant populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 15: 65-95
- Lowe, A., Jourde, B., Colpaert, N., Navarro, C. & Cavers, S.** 2003. Genetic diversity in Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*) II: Impact of logging on level, structure and dynamics. *Heredity* 90: 268–275
- Mason, S.L., Stevens, M.R., Jellen, E.N., Bonifacio, A., Fairbanks, D.J., Coleman, C.E., McCarty, R.R., Rasmussen, A.G. & Maughan, P.J.** 2005. Development and use of microsatellite markers for germoplasma characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science* 45: 1618-1630
- Masoudi-Nejad, A., Tonomura, K., Kawashima, S., Moriya, Y., Suzuki, M., Itoh, M., Kanehisa, M., Endo, T. & Goto, S.** 2006. EGassembler: online bioinformatics service for large-scale processing, clustering and assembling ESTs and genomic DNA fragments. *Nucleic Acids Research* 34: W459-462.

- Matsumoto, A., Uchida, K., Taguchi, Y., Tani, N. & Tsumura, Y.** 2010. Genetic diversity and structure of natural fragmented *Chamaecyparis obtusa* populations as revealed by microsatellite markers. *Journal of Plant Research* 123: 689–699
- Maughan, P.J., Bonifacio, A., Jellen, E.N., Stevens, M.R., Coleman, C.E., Ricks, M., Mason, S.L., Jarvis, D.E., Gardunia, B.W. & Fairbanks, D.J.** 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1188–1195
- Maughan, P.J., Kolano, B.A., Maluszynska, J., Coles, N.D., Bonifacio, A., Rojas, J., Coleman, C.E., Stevens, M.R., Fairbanks, D.J., Parkinson, S.E. & Jellen, E.N.** 2006. Molecular and cytological characterization of ribosomal RNA genes in *Chenopodium quinoa* and *Chenopodium berlandieri*. *Genome* 49: 825-39
- McCouch, S.R., G. Kochert, Z.H. Yu, Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman & S.D. Tanksley.** 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 815-829
- Meneguetti, Q.A., Brenzan, M.A., Batista, M.R., Barbosa Bazotte, R., Rodrigues Silva, D. & Garcia Cortez, D.A.** 2011. Biological Effects of Hydrolyzed Quinoa Extract from Seeds of *Chenopodium quinoa* Willd. *Journal of Medicinal Food* 14: 653-657
- Metzgar, M., Bytof, J. & Wills, C.** 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10:72-80.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L.** 1995. A Generic Estimation of Population Subdivision Using Distances Between Alleles With Special Reference for Microsatellite *Loci*. *Genetics* 142: 1061-1064
- Mintzer, M.J.** 1933. Las quínoas. Su cultivo en la Argentina. Su importancia como planta alimenticia. *Boletín del Ministerio de Agricultura de la Nación* 34: 59-77.
- Mohammadi, S.A. & Prasanna, B.M.** 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science* 43: 1235–1248
- Mondini, L., Farina, A., Porceddu, E. & Pagnotta, M.A.** 2010. Analysis of durum wheat germplasm adapted to different climatic conditions. *Annals of Applied Biology* 211–219

- Mujica, A. & Jacobsen, S.E.** 2002. Genetic resources and breeding of the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Plant Genetic Resources Newsletter 130: 54–61
- Mujica, A., Jacobsen, D., Bertero, D. & Gonzalez, J.** 1999. Un recorrido por el Noroeste Argentino buscando quínoa. Informe: primer taller internacional sobre quinoa: recursos genéticos y sistemas de producción. Lima, Perú.
- Nassiry, M.R., Javanmard, A. & Reza, T.** 2009. Application of Statistical Procedures for Analysis of Genetic Diversity in Domestic Animal Populations. American Journal of Animal & Veterinary Science 4: 136-141
- National Center for Biotechnology Information (NCBI).** Library EST *Chenopodium* (Online). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest/?term=chenopodium>. Ultimo acceso, marzo 2011.
- National Plant Germplasm System,** disponible en: <http://www.ars-grin.gov/npgs/searchgrin.html>
- National Research Council.** 1989. Quinoa. En: Lost crops of the Incas: little-known plants of Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press, Washington DC, 441 pp
- Nei, M. & Chesser, R.K.** 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. Annals of Human Genetics 47: 253-259
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist. 106: 283-292.
- Nei, M.** 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583-590
- Nelson, D. C.** 1968. Taxonomy and origins of *Chenopodium quinoa* and *Chenopodium nuttalliae*. PhD. dissertation, Indiana University. Bloomington, Indiana.
- Oliveira, E.J., Gomes Pádua, J., Zucchi, M.I., Vencovsky, R. & Carneiro Vieira, M.L.** 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29: 294-307

- Oliveto, G. & Ventura, B.** 2009. Dinámicas Poblacionales de los valles orientales del sur de Bolivia y norte de Argentina, siglos XV-XVII. Aportes etnohistóricos y arqueológicos. *Población y sociedad* 16: 119-150.
- Ortiz, R., Ruiz-Tapia, E.N. & Mujica-Sanchez, A.** 1998. Sampling strategy for a core collection of Peruvian quinoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 475-483
- Otha, T. & Kimura, M.** 1973. The model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. *Genetic Research* 22: 201-204.
- Paśko, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P., Gorinstein, S. & Foltá Mand Zachwieja, Z.** 2009. Anthocyanins, total polyphenols and antioxidant activity in amaranth and quinoa seeds and sprouts during their growth. *Food Chemistry* 115:994–998
- Paniego, N., Eschaide, M., Muñoz, M., Fernández, L., Torales, S., Faccoi, P., Fuxan, I., Carrera, M., Zandomeny, R., Suarez, E., & Hopp, H.** 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome* 45: 34-43.
- Parodi, L.R.** 1966. La agricultura aborigen argentina. EUDEBA.
- Paucke, F.** 1944. Hacia allá y para acá (Una estadía entre los indios Mocovíes, 1749-1767). Tomo III: Segunda parte. Publicaciones Especiales del Instituto de Antropología (V). Buenos Aires: Ediciones Coni. Universidad Nacional de Tucumán. N° 349.
- Peakall, R. & Smouse, P.E.** 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295
- Pearsall, D.M.** 1992. The origins of plant cultivation in South America. En: The origins of agriculture. Smithsonian Institution Press, Washington, pp 173–205.
- Peñaloza, A., Valls, J.F.M., Rosso, B. & Condón, F.** 2010. Caracterización y evaluación de recursos fitogenéticos. En: Estrategia en los recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur. PROCISUR, IICA, Montevideo. 172p.
- Pica, A., Helguera, M., Salomón, N. & Carrera, A.** 2004. Marcadores Moleculares. En: Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Echenique, V., Rubinstein, C. & Mroginski, L. (Eds.) Ediciones INTA – Argenbio, Buenos Aires. 61-68.

- Pickersgill, B.** 2007. Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany* 100: 925 – 940.
- Planella, M.T., L. Cornejo, & B. Tagle.** 2005. Alero Las Morrenas 1: evidencias de cultígenos entre cazadores recolectores de finales del período Arcaico en Chile Central. *Chungara Revista de Antropología Chilena*. 37: 59-74
- Prego, I., Maldonado, S. & Otegui, M.** 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany* 82: 481-488.
- Prevosti, A.** 1974. La distancia genética entre poblaciones. *Miscellanea Alcobé* Publicaciones, Universidad de Barcelona. 109- 118 pp
- Pulgar Vidal, J.** 1954. La quinua o suba en Colombia. Bogotá, Colombia.
- Renard-Casevitz, F.M., T.H. Saignes & Taylor, A.C.** 1988. Al Este de los Andes. Tomo 2. Ediciones Abya-Yala, IFEA.
- Risi, J. & Galwey, N.W.** 1984. The *Chenopodium* grains of the Andes: Inca crops for modern agriculture. *Annals of Applied Biology* 10: 145–216
- Risi, J.C. & Galwey, N.W.** 1989a. The pattern of genetic diversity in the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) I Associations between characteristics. *Euphytica* 41: 147-162
- Risi, J.C. & Galwey, N.W.** 1989b. The pattern of genetic diversity in the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) II Multivariate methods. *Euphytica* 41: 135 – 145.
- Rogers, J. S.** 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics* VII. University of Texas Publications 7213: 145-153.
- Rohlf, F.** 1989. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Vs 2.0 Exeter Publ. LTD, Setauket, New York
- Rojas, W.** 2003a. Multivariate analysis of genetic diversity of Bolivian quinoa germplasm. *Food Review International* 19: 9-23
- Rojas, W.** 2003b. Análisis multivariado en estudios de variabilidad genética. En: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Franco, T.

L. e Hidalgo, R. (eds.) Boletín técnico N° 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 pp

Routray, P., Basha, O., Garg, M., Singh, N.K. & Dhaliwal, H.S. 2007. Genetic diversity of landraces of wheat (*Triticum aestivum* L.) from hilly areas of Uttaranchal, India. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 1315–1326

Rozen, S. & Skaletsky, H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods in Molecular Biology. 132: 365-86

Ruas, P.M., Bonifacio, A., Ruas, C.F., Fairbanks, D.J. & Anderson, W.R. 1999. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L. by random amplified polymorphic DNA fragment (RAPD). Euphytica 105: 25-32

Saha, M.C., Rouf Mian, M.A., Zwonitzer, J.C., Wang, L. & May, G.D. 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. Theoretical and Applied Genetics. 109: 783–791

Schoenlechner, R., Mandala, I., Kiskini, A., Kostaropoulos, A. & Berghofer, E. 2010. Effect of water, albumen and fat on the quality of gluten-free bread containing amaranth. International Journal of Food Science & Technology. 45: 661–669

Scocchi, A. & Rey, H. 2004. Conservación de germoplasma in vitro. Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Ediciones INTA – Argenbio, Buenos Aires. 179-185.

Smith, J.S. 1984. Genetic variability within U.S. hybrid maize: Multivariate analysis of isozyme data. Crop Science. 24: 1041–1046

Sneath, H.A. & Sokal, R.R. 1973 Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco.

Sokal, R.R. & Michener, C.D. 1958. A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. The University of Kansas Scientific Bulletin. 38: 1409-1438

Spataro, G., Tiranti, B., Arcaleni, P., Bellucci, E., Attene, G., Papa, R., Spagnoletti Zeuli, P. & Negri, V. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. Theoretical and Applied Genetics. 122: 1281–1291

- Spooner D., R. van Treuren & M.C. de Vicente.** 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- StatSoft Inc.** 2005. STATISTICA (data analysis software system), version 7.1. Disponible en: www.statsoft.com
- Swofford, D.L. & Olsen, G.J.** 1990. Phylogenetic reconstruction. En *Molecular systematics*, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc. 411-501 pp
- Tapia, M. (ed).** 1979. La quinua y la kañiwa, cultivos andinos. IICA, Bogotá, 227 pp.
- Tapia, M.** 1990. Cultivos andinos sub explotados y su aporte a la alimentación. FAO, Santiago de Chile. 170 pp.
- Tapia, M.,** 1982. The Environment, Crops and Agricultural Systems in the Andes and Southern Peru. IICA.
- Tapia M.E. & Fries A.M.** 2007. Guía de campo de los cultivos Andinos. FAO y ANPE, Lima, Perú. 222 pp.
- Tapia, M.E., Mujica, S.A. & Canahua, A.** 1980. Origen, distribución geográfica y sistemas de producción de la quinua. I Reunión sobre genética y fitomejoramiento de la quinua. PISCA-UNTA-IBTA-IICA-CIID, Puno, Perú pp. A1–A8
- Thomas, M., Dawson, J.C., Goldringer, I. & Bonneuil, C.** 2011. Seed exchanges, a key to analyze crop diversity dynamics in farmer-led on-farm conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* doi: 10.1007/s10722-011-9662-0
- Thompson, J.A., Nelson, R.L. & Vodkin, L.O.** 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Science*. 38: 1348–1355
- Thomson, R.C., Wang, I.J. & Johnson, G.** 2010. Genome - enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology*. 19: 2184–2195
- Tóth, G., Gáspari, Z. & Jurka, J.** 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*. 10: 967-981.
- Tussel, F.** 2005. Análisis Multivariante. Apunte de estudio.

- Varshney, R.K., Graner, A. & Sorrells, M.E.** 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology* 23: 48-55.
- Ventura, B., Delcourt, P., Ortiz, G., Methfessel, L., Greco, C., Buitrago, W. & Paredes, F.** 2010. El registro arqueológico de las antiguas poblaciones de los valles orientales de la Provincia Arce, Tarija, Bolivia. *Intersecciones en Antropología* 11: 59-72
- Villarreal, M., Huiriqueo, C., Hazbun, J. & Carrillo, D.** 2009. Desarrollo de una formulación optimizada de galletas para celíacos utilizando harina desgrasada de avellana chilena (*Gevuina avellana*, Mol) y harina de quinoa (*Chenopodium quinoa Willd*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 59: 184-190.
- Vorano, A. & García, R.** 1976. La quinoa en la provincia de Jujuy, Argentina. *Actas de la II Convención Internacional sobre Quenopodiaceas. Serie Informes de Reuniones* 96. Potosí, Bolivia: Ediciones IICA.
- Wang, I.J.** 2010. Recognizing the temporal distinctions between landscape genetics and phylogeography. *Molecular Ecology* 19: 2605–2608
- Wang, M.L., Barkley, N.A., Yu, J.K., Dean, R.E., Newman, M.L., Sorrells, M.E. & Pederson, G.A.** 2005. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation. *Plant Genetic Resources* 3: 45–57
- Ward, S.M.** 2000. Allotetraploid segregation for single-gene morphological characters in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Euphytica* 116: 11 – 16
- Whittaker, J.C., Harbord, R.M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G. & Sibly R.M.** 2003. Likelihoodbased estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics* 164: 781-787
- Wilson, H.D.** 1980. Artificial hybridization among species of *Chenopodium* section *Chenopodium*. *Systematic Botany* 5: 253-263
- Wilson, H.D.** 1988a. Quinoa biosystematics I: Domesticated populations. *Economic Botany* 42: 461-477
- Wilson, H.D.** 1988b. Quinoa biosystematics II: free living populations. *Economic Botany* 42: 478–494

- Wilson, H.D.** 1990. Quinoa and Relatives (*Chenopodium* sect. *Chenopodium* subsect. *Cellulata*). *Economic Botany* 44: 92–110
- Wilson, H.D. & Manhart, J.** 1993. Crop/weed gene flow: *Chenopodium quinoa* Willd. and *C. berlandieri* Moq. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 642-648
- Wright, K.H., Pike, O.A., Fairbanks, D.J. & Huber, S.C.** 2002. Composition of Atriplex hortensis, sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds. *Food Chemistry and Toxicology* 67: 1383–1385
- Wright, S.** 1921. Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178
- Wright, S.** 1978. *Evolution and the Genetics of Populations Vol 4*. University of Chicago Press, Chicago
- Yu, J.K., Dake, T.M., Singh, S., Benscher, D., Li, W., Gill, B. & Sorrells, M.E.** 2004. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexaploid wheat. *Genome*. 47: 805-818
- Zhang, L.Y., Bernard, M., Leroy, P., Feuillet, C. & Sourdille, P.** 2005. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theoretical and Applied Genetics*. 4: 677-687