

CARACTERIZACION DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN BOLIVIANA DE QUINUA, UTILIZANDO MICROSATÉLITES

SILENE VERAMENDI, ALEJANDRO BONIFACIO, XIMENA CADIMA, WILFREDO
ROJAS

Fundación PROINPA, Cochabamba-Bolivia, s.veramendi@proinpa.org

Resumen

El origen y la diversidad genética de la quinua se encuentran en la región Andina y en particular en el altiplano que comparte Bolivia y Perú. La colección boliviana de quinua está conformada por más de 3000 accesiones. En el periodo 2003 al 2008 y con el propósito de conocer mejor esta diversidad, cerca del 90% de la colección de quinua compuesta por materiales provenientes del altiplano boliviano (centro con 827, norte con 138 y sur con 434 accesiones, respectivamente), de los valles (325 accesiones), del Perú (562 accesiones), de materiales silvestres (133 accesiones) y una fracción proveniente de otros países (96 accesiones), fueron seleccionadas para caracterizarlas molecularmente utilizando ocho marcadores microsatélite. Los objetivos del presente estudio fueron: asignar un perfil molecular a cada accesión, analizar la estructura poblacional de la colección, identificar accesiones duplicadas y contribuir a la conformación de una colección núcleo. El ADN total fue extraído de foliolos siguiendo el protocolo de Doyle&Doyle (1990), y se cuantificó por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Se realizó la PCR con los ocho marcadores microsatélite bajo las siguientes condiciones: 94°C por 5 min; desnaturalización inicial 94°C por 1 min, T de hibridación (51°C, 53°C, 55°C y 60°C para los diferentes iniciadores) por 45 seg, y elongación 72°C por 60 seg. La separación de los fragmentos obtenidos se realizó en geles de poliacrilamida al 6%, en condiciones desnaturalizantes (7M urea), y teñidos con nitrato de plata. Los datos se analizaron utilizando el programa NTSys.pc 2.10. Se determinó que estos microsatélite presentan un alto nivel de polimorfismo, con valores del 'índice de contenido polimórfico' mayores a 0.73, siendo el marcador QAAT-022 el más polimórfico con un valor de 0.95. Se encontraron 129 alelos, con un rango de 5 a 30 alelos por locus y tamaño que va de 111 a 239 pb. Los resultados muestran una diversidad genética en general elevada para todas las regiones mencionadas, en orden descendente se ubicaron el altiplano centro, sud, valles y norte. El análisis de conglomerados y de coordenadas principales revela una estructura genética al interior de la población con accesiones que se agrupan por regiones a excepción de las silvestres que se van distribuyendo entre éstas. Se han encontrado ocho accesiones potencialmente duplicadas distribuidas en cuatro ramas en el dendrograma. La información generada permitió la conformación de una colección núcleo con 189 accesiones únicas en total.

Palabras Clave: Marcadores microsatélite, quinua, diversidad genética, colección núcleo.

INTRODUCCION

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) es un cultivo importante para el consumo humano debido a su sobresaliente balance nutricional en proteínas, grasas, aceites, fibra y almidón. El contenido de proteínas en el grano de quinua es elevado (entre 11 y 17%) y es de alta calidad por su composición en aminoácidos esenciales como la lisina, metionina y cisteína. (Chauhan *et al.*, 1992)

La quinua es una planta alotetraploide ($2n=4x=36$), muestra una herencia disómica para la mayoría de los caracteres cualitativos y es esencialmente autógama (Simmonds, 1971; Ward, 2000). Su período de crecimiento varía entre 90 y 220 días, dependiendo de las variedades (Bonifacio, 2001).

La quinua fue domesticada en Bolivia, en inmediaciones del lago Titicaca (Gandarillas, 1979) hace más o menos 7000 años atrás. Desde este centro de diversidad y domesticación, su cultivo se ha extendido por toda la cordillera de los andes. Actualmente la quinua se cultiva en Argentina, Chile, Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia, siendo Bolivia el principal país productor y exportador. La quinua puede ser cultivada desde el nivel del mar hasta los 4,000 m de altitud.

La distribución geográfica de la quinua en Bolivia es amplia y por estudios realizados por Rojas (2002) y Rojas *et al.* (2010), la variabilidad de quinua se distribuye en el polígono comprendido por 15° 42' provincia Omasuyo del departamento de La Paz, 21° 57' provincia Omiste del departamento de Potosí, 64° 19' provincia Tomina del departamento de Chuquisaca y 69° 09' de Manco Kapac del departamento de La Paz.

La colección de germoplasma de quinua que se conserva en Bolivia tiene una amplia variabilidad genética con 3121 accesiones de materiales cultivados y silvestres, colectados en la región del altiplano y los valles interandinos de los departamentos de La Paz, Oruro, Potosí, Cochabamba, Chuquisaca y Tarija (Rojas *et al.*, 2010). La colección también cuenta con un germoplasma proveniente de Perú, Ecuador, Colombia, Argentina entre otros (Rojas *et al.*, 2010).

Estudios previos realizados con la colección denotaron una amplia variabilidad genética evaluada por caracteres morfológicos. Se han determinado por ejemplo variaciones en el

color de la planta antes de la floración en un rango entre verde, púrpura y rojo; el color de la planta a la madurez fisiológica presenta otro rango de colores como blanco, crema, amarillo, anaranjado, rosado, rojo, púrpura, café y negro; la forma de panoja que va de amarantiforme, glomerulada e intermedia; la densidad de la panoja varía entre compacta, laxa e intermedia; el color del grano varía entre blanco, crema, amarillo, rosado, rojo y púrpura; el ciclo vegetativo de 110 a 120 días; el rendimiento de grano por planta va de 48 a 250 g.; el peso de 100 gramos de 0.12 a 0.60 g; el contenido proteico del grano de 10.21 a 18.39 % y el diámetro del gránulo de almidón de 1.5 a 22 μ (Rojas 2002, 2003 y 2008).

Para complementar los estudios de diversidad genética de la colección de quinua, en el presente estudio se eligieron los marcadores moleculares tipo microsatélites porque ellos combinan muchas ventajas: codominancia, multialelismo y tienen alta heterocigosidad. El alto nivel de polimorfismo que puede ser detectado con estos marcadores, permite la discriminación entre individuos no relacionados y proporciona información sobre la estructura genética de las poblaciones. La evaluación de la diversidad genética utilizando parámetros complementarios del tipo morfológico y molecular, permite contar con información valiosa para fortalecer la conservación y utilización de los recursos genéticos de cultivos como la quinua, cuya importancia va creciendo progresivamente no solo para los pobladores andinos sino para el mundo (Ramakrishna *et al.*, 1995).

Por lo mencionado los objetivos del presente trabajo fueron:

- Caracterizar la diversidad genética de la colección Boliviana de quinua utilizando ocho marcadores microsatélites: QCA-006, QATG-019, QAAT-051, QCA-058, QAAT-050, QAAT-074, QAAT-076 y QAAT-022.
- Asignar un perfil molecular a cada una de las accesiones de quinua.
- Analizar la estructura poblacional de la colección Boliviana de quinua en base a marcadores moleculares.
- Identificar posibles accesiones duplicadas al interior de la colección.
- Contribuir a la conformación de una colección núcleo.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Fueron evaluadas 2515 accesiones de la colección de quinua, de las cuales 434 accesiones corresponden al Altiplano Sur (A S), 827 al Altiplano Centro (AC), 138 al Altiplano Norte (AN), 325 a los Valles (V), 133 a materiales silvestres (Silv), 562 al Altiplano del Perú (AP) y 96 accesiones a un grupo denominado Otros Países (OP), de Chile, Ecuador, Argentina y México.

Extracción de ADN

Se colectaron en invernadero foliolos sanos de cada una de las accesiones de la colección, y se almacenaron en bolsas plásticas a -20 ° C hasta la extracción de ADN. Los foliolos fueron molidos en nitrógeno líquido (-195°C) hasta obtener un polvo fino y uniforme. La extracción de ADN genómico se realizó mediante el protocolo de CTAB 2X (hexadecil bromuro de trimetil amonio) desarrollado por Doyle y Doyle (1990) descrito a continuación: un volumen de 700 µl de la solución CTAB (CTAB 2X, Tris-HCL 100mM PH 8.0, EDTA 20mM PH 8.0, NaCl 1.4M, y Polivinilpirrolidona (PVP) se añadió a los tubos Eppendorf que contenían 100 mg de muestra molida, posteriormente se homogenizó e incubó a 65°C durante 45 minutos, a continuación se agregó 700 µl de cloroformo/isoamilalcohol (24:1) para la precipitación de proteínas y separación de las fases seguido de centrifugación. Para precipitar el ADN se empleó 300 µl de isopropanol al 99%, una vez precipitado el pellet de ADN se lavó con 350 µl de etanol al 70%, se dejó secar y se disolvió en 50µl de agua miliQ con RNAasa (10 mg/ml), para luego ser incubado por 60 minutos a 37°C y finalmente ser almacenado a -20°C.

Cuantificación de ácidos nucleídos

La cuantificación del ADN genómico extraído, se hizo en geles de agarosa al 1%, visualizando el ADN con bromuro de etidio a través de un trans-iluminador UV marca Biorad y comparando la intensidad de las bandas de las muestras con cada una de las

bandas del marcador de peso molecular de concentración conocida (10.000 bp Eurogentec).

Selección de microsatélites para el estudio

Se utilizaron ocho marcadores microsatélites para el estudio de diversidad genética de la colección de quinua. Las secuencias de los marcadores seleccionados y la correspondiente temperatura de hibridación se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 1. Características de los microsatélites utilizados en el estudio

Nº	Microsatelite	Motivo repetido	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Th °C
1	QCA006	(CA)15CG(CA)4	gctctattaaggaaatgaggttaca	gccattcaattcagcaaagg	51
2	QATG019	(ATC)12	ccaacaaaagacaataaggaaacc	cgaggftgaaggagattcca	60
4	QAAT051	(AAT)14	cctcgacaagggtccatta	cgtccatagtggaggcattt	53
3	QCA058	(GT)17	ctcgaccagcaggggtctg	ctagctaggcgttgcctgac	60
5	QAAT050	(AAT)17	ggcacgtgctgctactcata	tggcgaatggttaattgc	51
7	QAAT074	(ATT)14	atggaacacccatccgataa	atgcctatcctcatcctcca	55
6	QAAT076	(ATT)30	gcttcattgtgtataaaaatgccaat	tctcggctcccactaatttt	55
8	QAAT022	(TTA)29	tggtcgatatagatgaaccaaa	Ggagcccagattgtatctca	53

Amplificación de microsatélites mediante PCR (Reaccion en cadena de la polimerasa)

Para la PCR se consideró: 15 µl de mezcla, conteniendo 20 ng de ADN Molde, 1X de Tampón PCR 10X (50mM KCl, 10 mM Tris HCl PH 8.0, 1.5 mM MgCl), 0.2 mM dNTP, 1 pmol/µl de cada iniciador (F y R) y 0.025 U/µl de la enzima Taq-polimerasa. El programa de amplificación fue realizado en un termociclador MJ research PTC 100, con un tiempo de desnaturalización inicial del ADN por 5 min a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura de anillamiento 51°C, 53 °C, 55 °C, y 60 °C por 45 s, y 72°C por 1 min con una extensión final de 72°C por 5 min y 1 ciclo a 15°C por 1 min, según el marcador. Subsecuentemente, los productos de amplificación fueron visualizados y cuantificados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.8%.

Electroforesis de microsatélites en geles de poliacrilamida (PAGE)

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en una cubeta de electroforesis vertical BIO – RAD Sequi Gen GT (38 x 50 cm) con un gel de poliacrilamida al 6% en

condición desnaturalizante (7 M urea) se siguió el protocolo de la firma PROMEGA (1993) con algunas modificaciones.

Lectura de resultados y análisis estadístico

Los perfiles moleculares obtenidos en los geles de poliacrilamida fueron transformados a matrices binarias (1 presencia y 0 ausencia), con las que se logró generar la matriz de distancias mediante coeficiente de Jaccard con el programa NTSyS pc-2.10 (Rohlf, 2002; Zambrano *et al.* 2003) para los análisis de conglomerados se utilizó el método de ligamiento promedio UPGMA (Sokal *et al.* 1963).

Conformación de la colección núcleo de quinua

Para la conformación de la colección núcleo se consideraron tanto los datos a nivel morfológico (W. Rojas, comunicación personal) como los datos a nivel molecular, para lo cual se utilizó el programa libre Power Core, que permite realizar un muestreo mediante la estrategia M de maximización (van Hintum *et al.*, 2003). Se elaboró una matriz con los datos moleculares y morfológicos y se realizó la búsqueda con el programa PowerCore, luego se generó el dendrograma con las accesiones de la colección total utilizando el programa NTSYSpc Ver. 2.1. En el dendrograma se remarcaron las accesiones correspondientes a la colección núcleo con un asterisco, esto para visualizar la distribución de las mismas dentro de la estructura genética de la colección total.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

El protocolo utilizado permitió obtener un ADN de buena calidad y en cantidad suficiente (20 a 100 ng/μl en un volumen total de 50 -60 ul por muestra) para los análisis moleculares con microsatélites utilizados en el estudio. Una de las principales ventajas de los marcadores moleculares tipo microsatélites es la pequeña cantidad de ADN que se necesita para la amplificación, siendo esta de 5 a 50 ng por reacción (Torrez y Moreno, 2001).

Diversidad genética

Cada una de las regiones de microsatélites constituye un locus genético y los diferentes tamaños de bandas que se pueden amplificar constituyen el patrón alélico o los diversos alelos de ese locus (Hajeer *et al.*, 2000) entonces un individuo queda identificado por el total de alelos obtenidos (huella digital) (Fig. 1). La comparación de estos patrones alélicos a través de un coeficiente de similitud, permite establecer las relaciones genéticas de los individuos que se representan mediante un dendrograma (Pejic *et al.*, 1998).

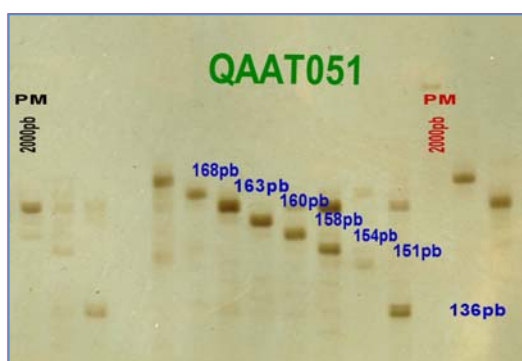


Fig. 1 Patrón alélico en accesiones de quinua

Se detectaron un total de 129 alelos entre las diferentes regiones analizadas, en un rango de 5 (QCA006) y 30 (QAAT 022) con un promedio de 16 alelos por locus, que van de 111 pares de bases (pb) a 239 pb (Tabla 2), observándose un mayor número de alelos detectados en relación a los reportados por Maughan *et al.*, (2004), y Fuentes *et al.*, (2008).

Tabla 2. Número de alelos en pares de bases (pb) y frecuencias alélicas de los loci analizados.

Nº	QCA006		QATG019		QAAT051		QCA058		QAAT050		QAAT074		QAAT076		QAAT022		
	Alelos pb	Frecuencia alélica	Alelos pb	Frecuencia alélica	Alelos pb	Frecuencia alélica	Alelos pb	Frecuencia alélica	Alelos pb	Frecuencia alélica	Alelos pb	Frecuencia alélica	Alelos pb	Frecuencia alélica	Alelos pb	Frecuencia alélica	
1	126	0,09118480	188	0,00112108	168	0,02673959	187	0,00129582	235	0,04365782	239	0,00619893	218	0,01532148	235	0,01197246	
2	124	0,28406793	185	0,00067265	163	0,09054998	185	0,02721214	227	0,01769912	214	0,01831502	215	0,00930233	228	0,02184975	
3	122	0,27335220	182	0,17690583	160	0,21938620	184	0,20844132	220	0,02477876	210	0,02958580	213	0,00683995	223	0,03412152	
4	113	0,16761019	179	0,03094170	158	0,33272562	182	0,20510922	215	0,02654867	206	0,03381234	209	0,02626539	213	0,03920982	
5	111	0,18378488	176	0,22645740	154	0,07383774	180	0,03424658	210	0,02772861	203	0,05409975	206	0,02435021	209	0,03771326	
6			174	0,01322870	151	0,08052264	178	0,00925583	205	0,08141593	199	0,05353621	203	0,01121751	206	0,02274768	
7			172	0,01165919	148	0,07869948	175	0,02128841	203	0,12182891	197	0,08368555	198	0,02325581	203	0,05208022	
8			168	0,21614350	146	0,00972349	173	0,00166605	201	0,10884956	195	0,04339250	195	0,02325581	201	0,02723735	
9			164	0,32286996	140	0,00000000	171	0,02054795	198	0,11209440	193	0,09157509	193	0,03419973	198	0,04310087	
10					136	0,08690368	170	0,20492410	194	0,14778761	189	0,07016061	189	0,05991792	195	0,04639330	
11					134	0,00091158	168	0,22639763	191	0,10353982	186	0,08791209	187	0,06347469	192	0,05716851	
12							166	0,03961496	186	0,07581121	183	0,09016624	184	0,06210670	190	0,07333134	
13									184	0,00648968	180	0,04818259	178	0,07414501	187	0,07542852	
14									182	0,02654867	178	0,03183995	175	0,07359781	185	0,07303203	
15									178	0,06607670	175	0,02479572	172	0,07004104	183	0,01945525	
16									174	0,00678466	171	0,04621020	170	0,02763338	181	0,05357677	
17									172	0,00058997	169	0,08424908	168	0,06374829	179	0,04759054	
18									170	0,00176991	166	0,07354184	165	0,06320109	176	0,01975456	
19											163	0,02874049	161	0,07824897	173	0,03472014	
20													157	0,04295486	171	0,04160431	
21													153	0,02134063	169	0,02963185	
22													150	0,01942544	167	0,04250224	
23													148	0,03201094	165	0,01885663	
24													145	0,05745554	162	0,02514217	
25													143	0,01668947	159	0,01795870	
26														154	0,00987728		
27															148	0,00808141	
28															146	0,00688417	
29															143	0,00718348	
30															135	0,00179587	

El contenido de información polimórfica (PIC) para la colección total, presentó valores entre 0.73 a 0.95 con un promedio de 0.84, resultando todos los marcadores altamente polimórficos (Tabla 3), siendo similares o mayores a los hallados por Mason *et al.* (2005) y Maughan *et al.*(2004).

Observando los valores de PIC por regiones (Tabla 3), los microsatélites QAAT074, QAAT076 y QAAT022 resultan ser los más polimórficos y con valores superiores a los reportados por los mismos autores.

En la Tabla 3 se muestra también la diversidad genética expresada por el valor de PIC para cada grupo de quinuas de las diferentes regiones evaluadas, siendo las quinuas del Altiplano Central y del Altiplano Sur las más representativas de Bolivia presentando altos valores de PIC.

Tabla 3. Valores de PIC para los ocho microsátélites por regiones y para la colección total

Locus	Valor de PIC por Region							PIC	H
	A C	A S	A N	V	Silv.	AP	OP	Colección total	
QCA006	0,72	0,69	0,00	0,00	0,00	0,69	0,72	0,74	0,77
QATG019	0,69	0,65	0,00	0,00	0,00	0,71	0,75	0,73	0,77
QAAT051	0,75	0,79	0,71	0,74	0,79	0,51	0,66	0,78	0,81
QCA058	0,76	0,80	0,00	0,00	0,00	0,81	0,81	0,79	0,82
QAAT050	0,77	0,73	0,74	0,75	0,88	0,87	0,90	0,90	0,91
QAAT074	0,92	0,90	0,90	0,87	0,89	0,89	0,89	0,93	0,93
QAAT076	0,92	0,92	0,89	0,93	0,91	0,90	0,90	0,94	0,95
QAAT022	0,91	0,90	0,87	0,94	0,92	0,91	0,88	0,95	0,95
Promedio	0,81	0,80	0,51	0,53	0,55	0,79	0,81		

Donde AC: Altiplano Centro; AS: Altiplano Sur; AN: Altiplano Norte; V: Valles; Silv.: Silvestre; AP: Altiplano Perú; OP: Otros Países. PIC: Contenido de información Polimórfica, H: Heterocigocidad.

La Figura 2 muestra el dendrograma generado en base a marcadores moleculares. El coeficiente de similitud varió entre 0.05 y 1, lo que demuestra la gran variabilidad existente en la colección, este dendrograma permite visualizar grupos claramente definidos al interior de la población, y que también presentan una mayor correlación con la distribución geográfica. Así, se pueden identificar grupos compuestos predominantemente por accesiones del Altiplano Centro, del Altiplano del Perú, y del Altiplano Sur. Las accesiones del grupo denominado “Otros Países” se distribuyen en los diferentes grupos, lo que significa que sus características son compartidas con las quinuas de diferentes regiones. Las quinuas silvestres no forman un grupo separado de las quinuas cultivadas, éstas se entremezclan con quinuas del Altiplano Norte y de los Valles.

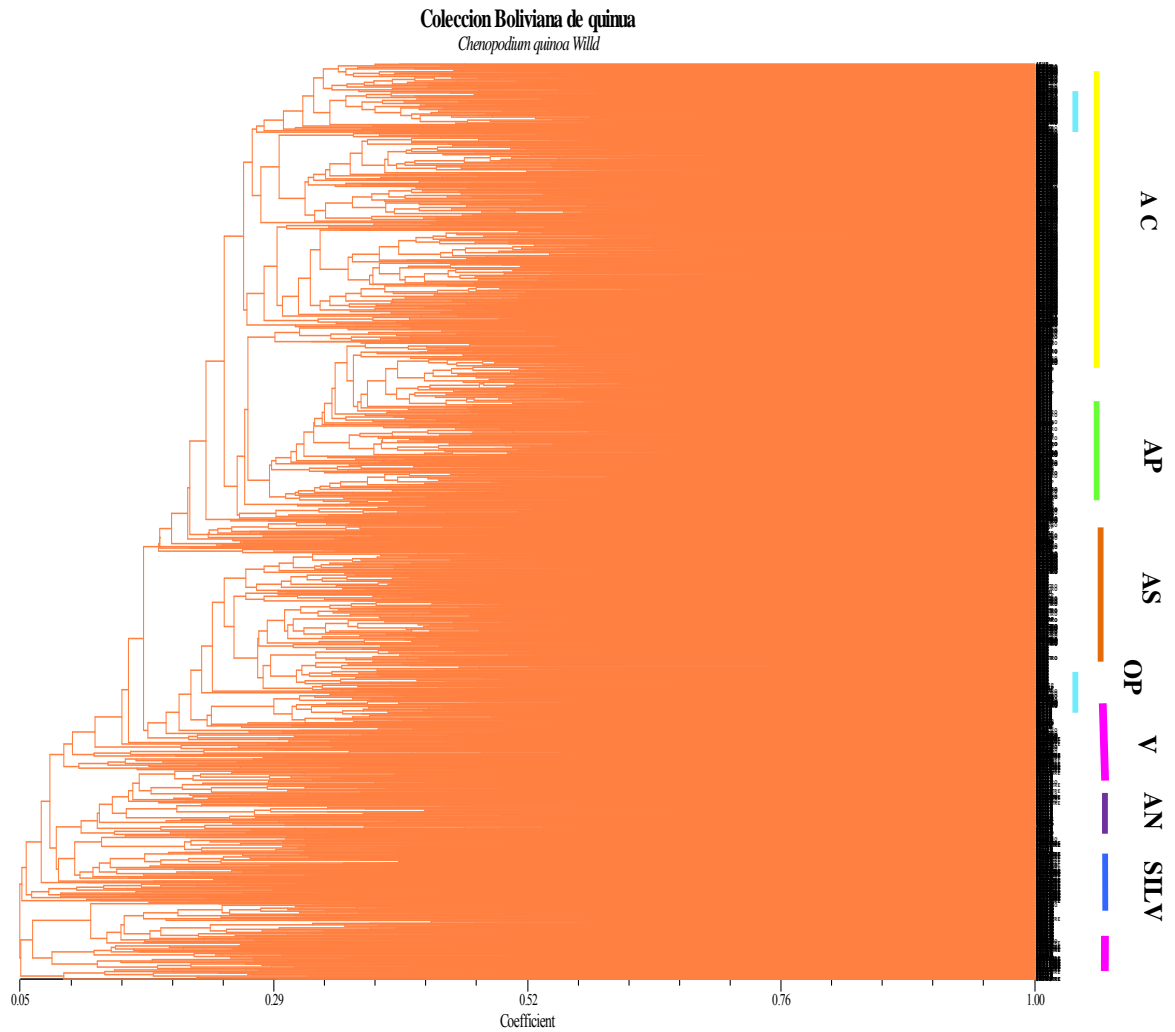


Fig.2. Dendrograma generado por el programa NTSYS PC 2.10 mediante el análisis de UPGMA y coeficiente de similitud de Jaccard a partir de datos de 8 marcadores microsátélites en 2515 accesiones de quinua (*Chenopodium quinua* Willd) :**AC**: Altiplano Centro (827 accesiones); **AS**: Altiplano Sur(434); **AN**: Altiplano Norte (138); **V**: Valles (325); **Silv**: Silvestre (133); **AP**: Altiplano del Perú (562); **OP**: Otros Países (96).

Se logró identificar también la presencia de ocho accesiones duplicadas distribuidas en 4 ramas (Sigarroa *et al.*, 2002) del dendrograma: BOL0305 y BOL0306, BOL2003 y BOL2006, BOL2004 y BOL2005 y por último BOL1528 y BOL1529.

En la Figura 3 se puede observar que las accesiones de la colección núcleo están distribuidas a lo largo de todo el dendrograma, de las cuales 43 accesiones provienen del altiplano sur, 51 del altiplano centro, 15 de altiplano norte, 28 de valles, 41 de norte Peru y 11 del grupo denominado otros países; por lo que es posible concluir que la colección núcleo es representativa de la diversidad genética. Al respecto Brown (1989), recomienda que la colección núcleo debe contener un 10% de colección total, entonces es posible aumentar individuos a la colección núcleo actual, la que cuenta con 189 accesiones.

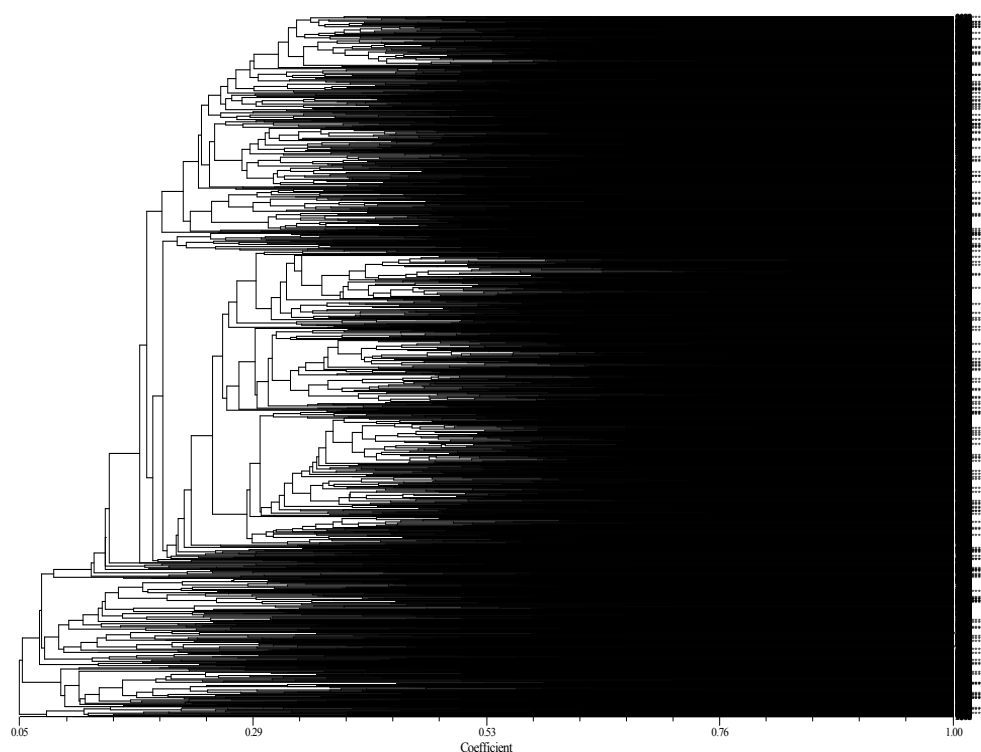


Fig.3. Dendrograma generado por el programa NTSys-pc 2.10 por método UPGMA y Coeficiente de Similitud de Jaccard, con las 189 accesiones (en asteriscos) que conforman la colección núcleo.

CONCLUSIONES

- La información generada por los ocho loci analizados en geles de poliacrilamida permitieron asignar un perfil molecular a cada una de las 2515 accesiones de la colección de germoplasma de quinua.
- Los microsatélites utilizados son altamente polimórficos ya que presentan un elevado índice de contenido polimórfico con valores de 0.73 a 0.95 lo que permite evidenciar la gran capacidad discriminadora que poseen estos microsatélites.
- Los microsatélites permitieron generar un gran número de alelos que van de 5 (QCA006) a 30 (QAAT 022) alelos por locus y con un rango de tamaño de 111 pb a 239 bp.
- El dendrograma generado a partir de la información obtenida con los ocho microsatélites (QCA-006, QATG-019, QAAT-051, QCA-058, QAAT-050, QAAT-074, QAAT-076 y QAAT-022) utilizando el método de agrupamiento de UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard, permitió la formación de grupos con accesiones en su mayoría de la misma región, como observamos en la Figura 2.
- Se identificó la presencia de ocho accesiones duplicadas distribuidas en 4 ramas BOL0305 y BOL0306, BOL2003 y BOL2006, BOL2004 y BOL2005 y por último BOL1528 y BOL1529.
- Se logró contribuir en la conformación de una colección núcleo de quinua, con 189 accesiones representativas de la colección total.

Agradecimientos

Este trabajo fue llevado a cabo en el marco del proyecto “Manejo, conservación y uso sostenible de granos altoandinos” del Sistema Nacional de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura (SINARGEAA) y el proyecto Quinua apoyado por la Fundación McKnight.

Agradecemos también las contribuciones de las siguientes personas: Dr. Jorge Rojas Beltrán, Abel Turumaya, Pilar Gutierrez, Rocio Maldonado, Lucia Perez, Lilian Pinto y Masiel Ocando

BIBLIOGRAFIA

- Bonifacio A. 2001 *Chenopodium* sp., recursos genéticos, etnobotánica y distribución geográfica. En QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ancestral cultivo Andino, Alimento del presente y futuro. Jacobsen SE., Izquierdo J., Marathe JP. Editores (FAO).
- Brown, A.H.D. 1989. The case for core collections. In: Frankel, O.H., Marshall, D.R. and Williams, J.T. (Eds.). *The use of Plant Genetic Resources*, IBPGR, 1989.
- Chauhan, G.S., N.A.M. Eskin y R. Tkachuk 1992. Nutrients and anti-nutrients in quinoa seed. *Cereal Chemistry* 69 (1):85-88.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1):13-15
- Fuentes, A., Martinez, P., Hinrichsen, E., Jellen, N., Maughan, J. 2008. Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. *conserv genet*.
- Gandarillas, H. 1979. Genética y origen de la quinoa.. En: Tapia, M.E. (ed.). *Quinoa y Kanihua, Cultivos Andinos*. IICA, Bogotá. values for harvested forest plants in Madre de Dios, Perú: towards a more contextualised. pp 45-64
- Hajeer, A.; Worthington, J. and John, S. 2000. SNP and microsatellite genotyping: Markers for genetic analysis. En: *Biotechniques: Molecular laboratory methods series*. Eaton Publishing, Manchester, U.K. Jaccard, P. 1901 *Bulletin del la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 37,241-272.

- Mason SL, Stevens MR, Jellen EN, Bonifacio A, Fairbanks DJ, Coleman CE, McCarty RR, Rasmussen AG, Maughan PJ. 2005. Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Sci* 45:1618–163.
- Maughan J, Bonifacio A, Jellen E, Stevens M, Coleman C, Ricks M, Mason S, Jarvis D, arduña B, Fairbanks D. 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. *TheorAppl Genet* 109:1188–1195.
- Pejic, I.; Ajmone, P.; Morgante, M.; Kozumplick, V.; Castiglioni, P.; Taramino, G. and Motto M. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among inbred maize lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *TheorAppl Genet* **97**: 1248-1255.
- PROMEGA. 1993. SILVER SEQUENCE™ DNA Sequencing System Technical Manual. <http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/pro/tm023.html>.
- Ramakrishna, W; Chowdari, K.; Lagu, M.; Gupta, V. and Ranjekar, P. 1995. DNA fingerprinting to detect genetic variation in rice using hypervariable DNA sequences. *Theor. Appl. Genet.* 90 :1000-1006
- Sigarroa, A, Cornide MT. 2002. Procesamiento estadístico e interpretación del polimorfismo. En M.T. Cornide, A Arencibia, V Berovides, D Calvo, E Canales, O Coto, C Gonzáles, M Rodríguez, JE Sánchez, A Sigarroa, X Xiques, eds, *Marcadores Moleculares en la genética y la selección de las plantas*, 1 ed. Félix Varela, La Habana – Cuba, pp 147 - 202.
- Simmonds NW. 1971. The breeding system of *Chenopodium quinoa*. I. Male sterility. *Heredity* 27:73–82.
- Sokal, R., Sneath, P. 1963. *Principles of Numerical Taxonomy*. Freeman & Co., San Francisco

- Torrez ME, Moreno S. 2001. Caracterización mediante marcadores moleculares basados en ADN. En F González – Andrés, J Pita Villamil, eds, Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos, 1ed. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Agrícola I.N.E.A., Valladolid – España, pp 235 - 253.
- Ward SM. 2000. Allotetraploid segregation for single-gene morphological characters in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) *Euphytica* 116:11–16
- Rojas, W. 2001. Distribución geográfica de la colección de germoplasma de quinua. Informe anual 2001/2002. Proyecto Mcknight. Fundación PROINPA. 5p.
- Rojas, W. 2003. Multivariate analysis of genetic diversity of Bolivian quinoa germplasm. *Food reviews International*, 19(1-2):9-23.
- Rojas, W. (ed.) 2008. Manejo, conservación y uso sostenible de los recursos genéticos de granos altoandinos, en el marco del SINARGEAA. Informe Fase 2003-2008, Fundación PROINPA. La Paz, Bolivia. 49 p
- Rojas, W. 2010. Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia, en el marco del proyecto IFAD-NUS I yII para Bolivia. 2001-2010, Fundación PROINPA. La Paz, Bolivia.
- Van Hintum ThJL, Brown AHD, Spillane C, Hodgkin T (2003) Colecciones núcleo de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico No. 3 del IPGRI. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.
- Zambrano, A.Y; J.R. Demey; F. Fuenmayor; V. Segovia; Z. Gutiérrez. 2003. Diversidad genética de una colección de yuca a través de marcadores moleculares RAPDS. *Agronomía Trop.*, Venezuela 2 (53): 155-174.