

DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i6.4063

Caracterización molecular de la cañihua (*chenopodium Pallidicaule* aellen) usando marcadores moleculares issr
(inter simple sequence repeats)

Eric Rosales-Espinoza

erosalesespinoza@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-9071-3391>

Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Jorge Jimenez-Dávalos

jjimenezd@lamolina.edu.pe

jjimenezd@lamolina.edu.pe

Programa de Cereales y Granos Nativos.

Universidad Nacional Agraria La Molina-Lima-Perú.

Angela F. Sota-Cano

asotac@utea.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0003-2757-7259>

Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental y Recursos Naturales.

Universidad Tecnológica de los Andes-Cusco-Perú.

Ana I. Cáceres-Vizarreta

acaceresv@utea.edu.pe

<https://orcid.org/0000-0003-3216-6083>

Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental

y Recursos Naturales. Universidad Tecnológica de los Andes-Cusco-Perú.

Correspondencia: asotac@utea.edu.pe

Artículo recibido 26 de noviembre 2022 Aceptado para publicación: 26 de diciembre 2022

Conflictos de Interés: Ninguna que declarar

Todo el contenido de **Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar**, publicados en este sitio están disponibles bajo

Licencia [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) 

Cómo citar: Rosales-Espinoza, E., Jimenez-Dávalos, J., Sota-Cano, A. F., & Cáceres-Vizarreta, A. I. (2022). Caracterización molecular de la cañihua (*chenopodium Pallidicaule* aellen). *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(6), 9149-9165. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i6.4063

RESUMEN

Se realizó una estandarización del método de extracción de ADN para cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) y la caracterización molecular mediante marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Se utilizaron hojas de 40 accesiones de cañihua tomadas del banco de germoplasma del Programa de Cereales y Granos Nativos de la UNALM provenientes de dos provincias de Puno. Se realizó la extracción del ADN mediante el método CTAB. La agregación de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y del etanol 96% permitieron la extracción de ADN de buena calidad. Obtenido el ADN, se realizó la amplificación PCR, PAGE y tinción con nitrato de plata. Se evaluó el porcentaje de loci polimórficos, contenido de información polimórfica y análisis de variancia molecular. Se seleccionaron 7 cebadores que produjeron 52 locus polimórficos de 144 marcadores ISSR, siendo los más informativos 841, 812, 810, 834 y BOR2. Una alta diferenciación genética entre poblaciones fue detectada basada en el AMOVA ($F_{st} = 0.1544$). Esto hace suponer que, la posición geográfica marca la diferenciación genética entre poblaciones de diferentes provincias.

Palabras clave: cañihua; *Chenopodium pallidicaule*; issr; marcadores moleculares; CTAB.

Molecular characterization of the cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) using ISSR molecular markers (inter simple sequence repeats)

ABSTRACT

A standardization's method of DNA extraction for canihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) and molecular characterization using ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) molecular markers was performed. Leaves of 40 accessions of canihua from the UNALM Cereals and Native Crops Programme germplasm bank that they came from Puno were used. CTAB extraction of DNA was carried out. The use of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) and ethanol 96% produced good quality of DNA extraction. After DNA isolation; PCR amplification, PAGE and silver staining were done. Percentage of polymorphic loci, polymorphic information content and analysis of molecular variance were studied. Seven selected primers yielded 86 polymorphic loci from 144 ISSR markers, from which 841, 812, 810, 834 y BOR2 produced the major information. High genetic difference between populations was detected for AMOVA ($F_{st} = 0.1544$). As a consequence, the geographic position could be an important factor in genetic difference between different populations from cities.

Keywords: cañihua; *Chenopodium pallidicaule*; ISSR; molecular markers; CTAB.

INTRODUCCIÓN

El género *Chenopodium* ha sido cultivado desde hace siglos como una planta para follaje principalmente y en segundo plano para el aprovechamiento de sus granos en diferentes partes del mundo (Taopanta., 2016). Recientemente el género *Chenopodium* ha despertado interés debido a sus características nutricionales que lo hacen una herramienta poderosa para la lucha contra la malnutrición en muchas partes del mundo (Torreblanca., 2015). La cañihua tiene alto contenido proteico con adecuado nivel de aminoácidos esenciales, destacando la presencia de lisina (Zuñiga, 2014). Las proteínas que contiene este cultivo son de fácil asimilación tal es así, que puede compensar la falta de proteína animal (Quispe, 2018). Los agricultores andinos reconocen en la cañihua un cultivo de gran importancia, debido a su mayor tolerancia a las heladas. Sin embargo, el tamaño pequeño de sus granos, sus bajos rendimientos en kg/Ha (Mayta, 2016) y la falta de maquinaria en la cosecha limitan la expansión de su cultivo (Arnillas et al. 2017). El mismo autor señala que, por décadas la superficie de cultivo de esta especie está alrededor de los 5000 a 7000 has localizadas casi en su totalidad en Puno y su producción no ha superado las 6000 toneladas anuales. Si deseamos aprovechar este recurso genético debemos estudiarlo, conservarlo y seleccionarlo para obtener el máximo beneficio. Por tanto, resulta necesario más conocimiento acerca de las potencialidades de este cultivo, de su entorno y sobre todo su diversidad genética para que, aunado con los estudios agronómicos que se tienen, poder promocionar su cultivo y consumo como recurso alimentario andino.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Marcadores Moleculares y tinglado del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron 40 accesiones del Banco de germoplasma del Programa de Cereales y Granos Nativos de UNALM, provenientes de las provincias de Azángaro y Atuncolla del departamento de Puno. Las accesiones crecieron en las instalaciones del Programa de Cereales y Granos Nativos a 240 m.s.n.m. Las accesiones provenientes de Atuncolla fueron 22 y las restantes 18 de Azángaro (tabla 1).

ANALISIS MOLECULAR

1. Extracción de ADN

Las semillas seleccionadas para este estudio fueron sembradas en macetas pequeñas con una combinación de arena y tierra vegetal para crecer en el tinglado a condiciones ambientales. Después de 14 días, se colectaron las hojas jóvenes apicales de las accesiones para ser secadas con Silica Gel (Sigma) durante 30 días. Pasado este periodo, se trasladó el tejido seco a tubos Eppendorf de 2.2 ml de capacidad para ser molidos, con ayuda de perlas de acero y con el molino marca MM200 Retsch. En las muestras molidas se aplicó el método de Doyle and Doyle (1987) modificado para la extracción del ADN (Rosales, 2013). Se ajustaron todas las entradas a 20 ng/ μ L diluyendo el stock con agua miliQ (agua millipore).

Caracterización molecular de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen)
usando marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)

Tabla 1. Datos pasaporte de las 40 accesiones de *Chenopodium pallidicaule* usados en el presente estudio

COLECCIÓN	DPTO	PROV.	DIST.	PREDIO	M.S.N.M.	L.S.	L.O.	AGRICULTOR	FECHA	COLOR DE GRANO	COLOR DE PLANTA
PUCNN004	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN006	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN007	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN008	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN009	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Granate Claro	Rosado
PUCNN010	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN011	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN012	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN013	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Granate Claro	Rosado
PUCNN014	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Rojizo	Rosado
PUCNN015	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Claro	Anaranjado
PUCNN016	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron amarillento	Anaranjado
PUCNN020	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron amarillento	Anaranjado
PUCNN021	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron	Anaranjado
PUCNN029	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron oscuro	Amarillo
PUCNN030	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Granate oscuro	Amarillo
PUCNN031	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron	Amarillo
PUCNN033	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron oscuro	Amarillo
PUCNN034	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron oscuro	Amarillo
PUCNN039	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron Claro	Pardo
PUCNN046	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron	Pardo
PUCNN051	Puno	Puno	Atuncolla	Moro	3822	15° 41' 03"	70° 01' 18"	Juan Curo Huacane	08/05/2007	Marron amarillento	Purpura
PUCNN063	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron Claro	Purpura
PUCNN066	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Negro	Purpura
PUCNN068	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron Claro	Purpura
PUCNN070	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Negro	Purpura
PUCNN087	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron oscuro	Pardo
PUCNN088	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron Claro	Pardo
PUCNN090	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron oscuro	Pardo
PUCNN091	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron Claro	Pardo
PUCNN093	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron oscuro	Pardo
PUCNN094	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Negro	Pardo
PUCNN098	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron amarillento	Pardo
PUCNN099	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron amarillento	Pardo
PUCNN101	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron oscuro	Rosado
PUCNN105	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Negro	Verde
PUCNN107	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Marron oscuro	Verde
PUCNN108	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Negro	Verde
PUCNN115	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Negro	Amarillo
PUCNN116	Puno	Azangaro	Azangaro	San Paulino	3589	14° 54' 24"	70° 11' 36"	Paulino Hinofuente Quispe	24/05/2007	Granate oscuro	Verde Lila

2. Medida de la pureza y concentración del ADN

La determinación de la pureza y concentración del ADN se realizó con ayuda de un Biofotómetro (Eppendorf) midiendo las tasas de absorbancias a 260 nm sobre 280 nm para estimar la pureza del ADN extraído. La concentración del ADN extraído (ng/μl) se obtuvo directamente del Biofotómetro (Eppendorf) mediante la siguiente fórmula empírica: $A_{260} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{factor de dilución}$ (198 μl/ 2 μl). Donde 50 ng/μl es por regla general la concentración de ADN cuando se tiene $A_{260} = 1.0$ (Kashinskaya et al, 2017).

3. Medida de la calidad del ADN

Fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El ADN fue visualizado y se capturó su imagen en el Gel Doc 2000 (BIO-RAD) por medio del programa Quantity One.

4. Principio de los ISSR y protocolo

El protocolo consiste en la preparación del coctel de reacción (tabla 2) para proceder a las amplificaciones en el Termociclador Mastercycler gradient Eppendorf 5331 bajo condiciones específicas (tabla 3).

Tabla 2. Coctel de reacción empleado en la detección de marcadores ISSR en Cañihua.

REACTIVOS	CONCENTRACION	TOTAL (μL)
Buffer	10X	1
MgCl ₂	25 mM	1.2
dNTPs	5 μM	0.4
Cebador	10 mM	0.4
BSA	10 mg/mL	0.5
Taq-Pol	1 U/μL	3.5
Agua miliQ	-	0.5
ADN	20 ng/μL	2.5

Tabla 3. Programa de amplificación utilizado para Cañihua

Program Amplif.	Fases del programa de amplificación					Nº ciclos
	Denat. Inicial	Denaturación	Hibridación	Extensión	Extensión final	
	94 °C, 2'	94 °C, 1'	40 °C, 1'	72 °C, 1'	72 °C, 7'	34

Evaluación estadística de los datos moleculares

Para cada genotipo, se amplificaron usando los ISSR y los datos fueron tratados como caracteres únicos. Los datos fueron obtenidos en matrices binarias (1 para presencia y 0

para ausencia). El software usado fue el NTSYS-PC (Rohlf, 2004) para el análisis de las matrices de similitud basado en el coeficiente de Jaccard.

1. Porcentaje de polimorfismo El porcentaje de loci polimórficos se estimó mediante la división del número de loci polimórficos entre el número total de loci por 100 (Nei, 1973)

2. PIC (Índice de contenido polimórfico) Es una medida de diversidad alélica, es decir, que nos da información de un marcador en la población de acuerdo a la frecuencia de los alelos. Este índice es calculado de acuerdo a la estadística de Nei (da Silva et al., 2016):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$$

Donde f_i es la frecuencia del i -ésimo alelo detectado y n es el número de alelos analizados en la población. El valor PIC provee un estimado del poder discriminatorio de un marcador en la población.

3. Análisis de diferenciación genética

La distancia genética provee una forma de medir la probabilidad de encuentro de alelos iguales (endogamia). Uno de los índices estadísticos usados es el F_{ST} el cual mide el grado de diferenciación genética entre las poblaciones, en función de las frecuencias alélicas. Para calcular el valor F_{ST} recurrimos al programa Arlequin ver 3.1 (Vilches et al. 2012).

Los valores de F_{ST} muestra una numeración que va desde cero (no existe divergencia genética) hasta 1 (fijación para alelos alternos en diferentes subpoblaciones). La interpretación de estos valores se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 4. Rangos asignados para la diferenciación genética (IPGRI y Cornell University, 2004)

<i>Si F_{ST} va desde</i>	<i>Denominación de la diferenciación genética:</i>
0 a 0.05	Pequeña
Mayor a 0.05 a 0.15	Moderada
Mayor a 0.15 a 0.25	Grande
Mayor a 0.25	Muy grande

4. Coeficiente de similitud

Para este estudio, se utilizó el coeficiente de Jaccard, el cual está definido por:

$$J = \frac{a}{a + b + c}$$

Donde “a” representa los 1,1; “b” representa las combinaciones 1,0; “c” las combinaciones 0,1.

El coeficiente de Jaccard omite las ausencias conjuntas. La idea de usar este coeficiente radica en que la ausencia de bandas polimórficas puede deberse a diversos factores y no necesariamente refleja diferencias entre las muestras evaluadas, mientras que el concepto básico es una medida de diferencias (similitudes o disimilitudes) por medio de la ocurrencia de bandas polimórficas (presencia de alelos).

5. Análisis de agrupamiento (Cluster)

El análisis de cluster es un método que permite descubrir asociaciones y estructuras en los datos que no son evidentes a simple vista, pudiendo ser útiles una vez que se han encontrado. La finalidad de esta técnica es formar grupos de muestras, poblaciones, individuos u OTUs que tengan similitud entre sí y diferencias entre los OTUs de los otros grupos. El criterio para la formación de grupos es agrupamientos jerárquicos, es decir, dada la matriz de distancias o de similitudes se desea clasificar los elementos en una jerarquía en donde los elementos son sucesivamente asignados a los grupos.

6. El dendrograma o árbol jerárquico

Es una representación gráfica del resultado del proceso de agrupamiento en forma de árbol. El término dendrograma agrupa a los fenogramas y cladogramas (Morales, 2019). Para la elaboración del dendrograma se recurrió al método de agrupamiento basado en distancias UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages), para ello se utilizó el programa NTSYS pc 2.0. Roca, 2015, manifiesta que el UPGMA es una metodología típicamente usada para el análisis genético al usar marcadores moleculares dominantes (RAPDs, ISSR y AFLP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y cuantificación de ADN

La diferencia entre el método usado en esta investigación y el original de Doyle y Doyle (1987) consiste en la utilización del Cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) como solvente orgánico adicionado por segunda vez y prescindir del isopropanol (que actúa como agente precipitante junto con el NaCl), en su lugar se utilizó alcohol etílico a dos porcentajes, el de 96% y de 70%. Con estas modificaciones, se obtuvo un precipitado de coloración blanquecina después de someter cada genotipo al protocolo descrito. Los valores cuantitativos de concentración de ADN y rango de pureza se muestran en el cuadro 7, donde la lectura en el espectrofotómetro indica valores en un rango de 497 a 7683 ng/uL de concentración de ADN; dando un promedio con todos los valores de 2300 ng/uL.

Pineda et al. (2021) manifiesta que en la determinación espectrofotométrica de la pureza del ADN el rango de lectura de la solución se debe realizar en 260/280 nm observándose un valor cercano a 1.8, ya que valores lejanos por encima de este número indicarían la presencia de ARN la cual se evalúa a su vez con una electroforesis en gel de agarosa. Por otro lado, valores por debajo de 1.8 frecuentemente indican la presencia de contaminantes como proteínas o fenol. De los resultados obtenidos (tabla 5) el 73 % de los valores obtenidos se encuentran en el rango de 1.8 a 2.0. El mismo autor manifiesta que el rango de lectura 260/280 determina la cantidad de contaminación orgánica, ya que si las lecturas de absorbancias de las muestras están dentro del rango de 1.80 a 2.00 son consideradas como libres de contaminantes. Zhang et al. 2013, indica que el cociente DO 260/280 no es exclusivo indicador de la pureza del ADN sino que se complementa con la concentración del material genético obtenido.

Tabla 5. Valores obtenidos de concentración de ADN y rango de pureza en la lectura con el Biofotómetro a λ : 260-280 nm

Muestra	ng/ μ L	Rango de Pureza	Muestra	ng/ μ L	Rango de Pureza
PUCN Ñ004	3552	1.94	PUCN Ñ046	1741	1.87
PUCN Ñ006	1077	1.92	PUCN Ñ051	4323	1.91
PUCN Ñ007	2877	1.97	PUCN Ñ063	2155	1.92
PUCN Ñ008	1268	1.71	PUCN Ñ066	677	1.62
PUCN Ñ009	4292	1.92	PUCN Ñ068	541	2.01
PUCN Ñ010	2391	2.02	PUCN Ñ070	659	1.64
PUCN Ñ011	2065	1.89	PUCN Ñ087	733	1.95
PUCN Ñ012	2685	2.05	PUCN Ñ088	3307	1.95
PUCN Ñ013	1363	1.99	PUCN Ñ090	3496	2.03
PUCN Ñ014	939	1.98	PUCN Ñ091	4604	2.01
PUCN Ñ015	7683	2.18	PUCN Ñ093	2486	1.94
PUCN Ñ016	1493	1.84	PUCN Ñ094	4275	2.01
PUCN Ñ020	1081	1.93	PUCN Ñ098	3415	1.94
PUCN Ñ021	1165	1.84	PUCN Ñ099	6646	1.96
PUCN Ñ029	2613	1.99	PUCN Ñ101	1293	1.85
PUCN Ñ030	4930	1.99	PUCN Ñ105	497	1.92
PUCN Ñ031	1884	1.95	PUCN Ñ107	1837	1.93
PUCN Ñ033	1844	1.89	PUCN Ñ108	717	1.95
PUCN Ñ034	1872	1.92	PUCN Ñ115	1750	1.89
PUCN Ñ039	2007	1.51	PUCN Ñ116	925	1.98

Selección de cebadores De los 65 cebadores ISSR existentes en el programa de Cereales y Granos Nativos de la UNALM, se determinó que el 11 % (7 cebadores) presentaron polimorfismo en las amplificaciones, estos cebadores fueron: 810, 812, 825, 834, 835, 841 y BOR2. En la tabla 6 se presenta la secuencia de los cebadores usados en esta investigación.

Tabla 6. Secuencia de los iniciadores usados en la detección de polimorfismo en Cañihua.

Iniciador	Secuencia	
810	(GA) ₈ T	GAGAGAGAGAGAGAGAT
812	(GA) ₈ A	GAGAGAGAGAGAGAGAA
825	(AC) ₈ T	ACACACACACACACT
834	(AG) ₈ YT	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
835	(AG) ₈ YC	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
841	(GA) ₈ YC	GAGAGAGAGAGAGAGAYC
BOR 2	CTG(AG) ₈	CTGAGAGAGAGAGAGAGAG

Evaluación estadística de los datos moleculares

I. Porcentaje de polimorfismo

La lectura de los geles de poliacrilamida fue de 200 – 2000 bp (Alcázar et al. 2019) para la obtención de los valores de presencia y ausencia de bandas polimórficas. Los genotipos evaluados de *Chenopodium pallidicaule* muestran la cantidad de bandas amplificadas (tabla 7) las cuales van desde 11 hasta 33, siendo el total de bandas 144 las detectadas con los marcadores ISSR, de las cuales 52 loci fueron polimórficos.

El porcentaje de polimorfismo de las accesiones evaluadas van desde 20% hasta 63.64% para cada cebador ISSR. El promedio de polimorfismo es de 38.82%. En la tabla 7, se observa que el cebador 825 generó mayor porcentaje de polimorfismo con 63.64%, le sigue el cebador 810 con 61.11%.

Jiménez (2006) en su evaluación genética de la cañihua usando AFLP obtuvo un porcentaje de polimorfismo inter-accesión de 33% y 27%, intraaccesión respectivamente, con estas dos evaluaciones el autor indica una alta tasa de polinización cruzada en este cultivo.

II. PIC (Índice de contenido polimórfico)

La obtención del Índice de contenido polimórfico se observa en la tabla 7. En donde los valores del PIC variaron desde 0.18 para el cebador 835 hasta 0.57 para el cebador 841. Un mayor valor del PIC indica un marcador ISSR más informativo. Según este índice los cebadores 841, 812, 810, 834 y BOR2 podrían ser usados en futuras caracterizaciones del germoplasma de cañihua. Terzopoulos et al., (2008) muestran en sus estudios que cada cebador amplifica diferente patrón obteniendo diferente número de bandas polimórficas; así por ejemplo, los cebadores 810 y 825 ambos con temperatura de anclaje (annealing) de 51 °C fueron seleccionados como polimórficos en el estudio de variación genética de especies de Angustifoliata (Bednarskaya et al. 2014). El cebador 835 fue seleccionado como polimórfico para análisis en *Chenopodium quinoa*, una especie arbórea en peligro de extinción (Tamayo, 2010)

Tabla 7. *Total de bandas (polimórficas y monomórficas) y valor PIC para cada cebador usados en Cañihua.*

CEBADOR	N° de bandas	Bandas polimórficas		PIC
		N°	(%)	
835	15	3	20.00%	0.18
812	15	6	40.00%	0.43
810	18	11	61.11%	0.41
825	11	7	63.64%	0.27
BOR2	33	12	36.36%	0.38
841	30	7	23.33%	0.57
834	22	6	27.27%	0.40
Total	144	52		
Promedio	20.57	7.43	38.82%	0.38

III. Medida de la diferenciación regional

Se utilizó el software Arlequín ver 3.1 para la evaluación de las poblaciones de Puno y Azángaro, encontrándose que el valor F_{st} para 1000 permutaciones es de 0.1544 indicando moderada diferenciación genética entre las poblaciones evaluadas.

IV. Análisis multivariado

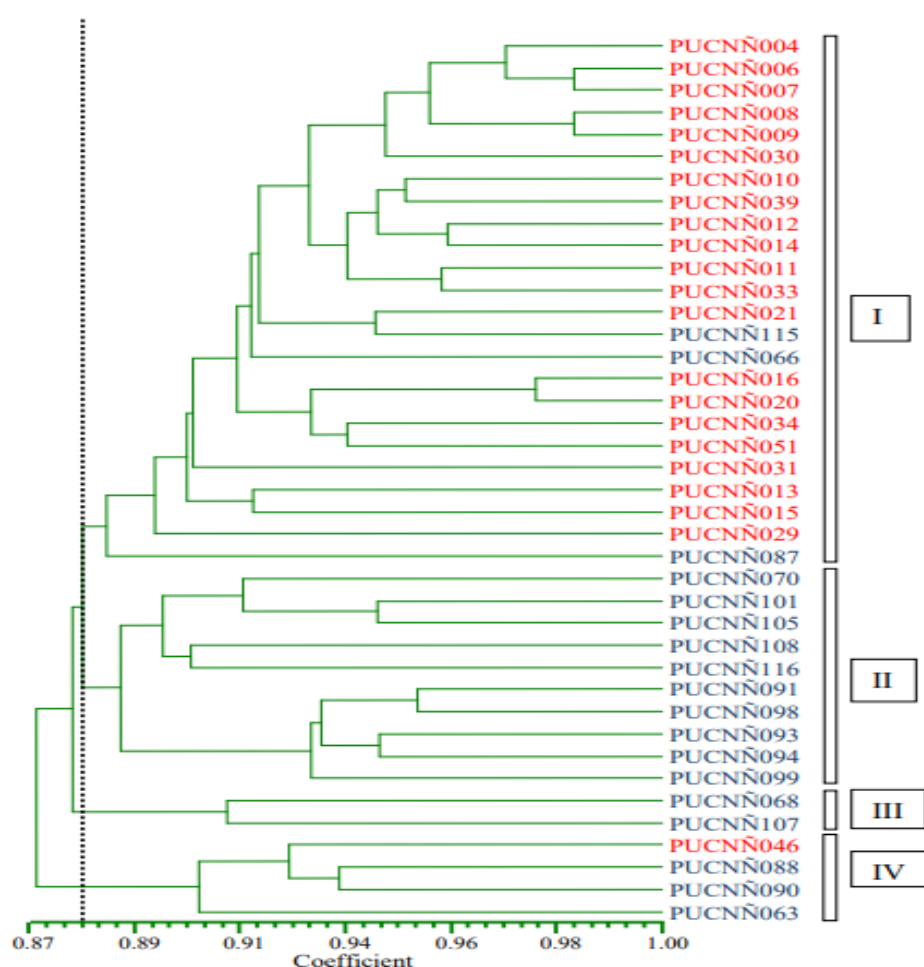
IV.I. Análisis de agrupamiento (Cluster)

De acuerdo al fenograma inter accesión (figura 1), en su mayoría, las muestras se agruparon de acuerdo a su distribución geográfica. Se observó a una similitud de 0.88 una clara distinción de 4 conglomerados (I, II, III, IV) Al formar 4 grupos se observa que el conglomerado I posee 24 muestras, de las cuales 21 pertenecen a Atuncolla. El segundo grupo (conglomerado II) lo conforman 10 muestras pertenecientes todas ellas a Azángaro. Las accesiones PUCNÑ 68 y PUCNÑ 107 que pertenecen a Azángaro forman el tercer conglomerado. Finalmente, el último grupo (IV) con 4 accesiones tiene genotipos tanto de Atuncolla (PUCNÑ 46) como de Azángaro (PUCNÑ 88, PUCNÑ 90 Y PUCNÑ 63). Probablemente, la razón por la cual en el conglomerado I existan 3 accesiones pertenecientes a Azángaro de una mayoría que pertenece a Atuncolla sea el intercambio de semillas que puede darse en ferias locales o simple intercambio entre predios. La misma razón podría explicar que exista una accesión de Atuncolla en un grupo donde predominan las accesiones provenientes de Azangaro en el conglomerado IV.

Considerando que las accesiones se agruparon según distribución geográfica (conglomerado I pertenece a Atuncolla y los conglomerados II, III y IV a Azángaro), podríamos indicar que existe diferenciación genética entre las poblaciones de Atuncolla

y Azángaro tratándose del mismo cultivo. Jin et al., (2007) manifiestan que para poblaciones pequeñas distribuidas en ambientes como riscos o valles que tienen pobres condiciones de crecimiento se dan 2 consecuencias genéticas: el incremento de la deriva génica y la endogamia. Esto implica que las barreras naturales pueden provocar el inicio de una diferenciación genética; en nuestro estudio, el distrito de Azángaro se encuentra en un valle que difiere de aproximadamente 88 kilómetros hasta el distrito de Atuncolla.

Figure 1. *Dendrograma del análisis cluster basado en el coeficiente de similitud de Jaccard usando el método UPGMA para las 40 accesiones de Cañihua.*



IV.II. Dendrograma

Los resultados obtenidos aplicando el coeficiente de similitud de Jaccard, se muestran en la figura 2. El coeficiente de similitud máximo entre las muestras de Atuncolla es de 0.983, de la misma manera, el de Azángaro es de 0.953. Indicándonos que las muestras de Azángaro muestran mayor diversidad. De igual manera, estos resultados indican que los marcadores ISSR son herramientas poderosas para detectar bajos niveles de

variación genética entre accesiones (Castañeda-Cardona et al., 2021) inclusive entre valores de coeficiente de similitud cercanos (0.983 y 0.953).

CONCLUSIONES

-La utilización del Cloroformo – Alcohol isoamílico (24:1) en una segunda oportunidad como solvente orgánico así como el reemplazo en el uso del isopropanol por etanol 96% y 70%, permiten la obtención de alta concentración y buen rango de pureza del ADN extraído en *Chenopodium pallidicaule*.

-Con los marcadores ISSR se pudo evaluar las diferencias entre las accesiones analizadas, mostrando baja diversidad entre grupos geográficamente diferentes.

-Los cebadores ISSR 841, 812, 810, 834 y BOR2 pueden ser usados en posteriores estudios para *Chenopodium pallidicaule*, ya que presentan un PIC entre 0.38 y 0.57.

-El valor F_{st} usando el programa Arlequin indicó que existe diferenciación genética entre las poblaciones de Azángaro y Atuncolla

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcázar, P. G. G. (2019). Diversidad genética de la colección de *Opuntia ficus indica* “tuna” del INIA. *Investigación*, 27(1), 93-98.

Arnillas, C., Carranza, C., Mesones, C., Moretti, M., & Bueno, O. (2017). Plan estratégico de la cañihua (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Católica del Perú-CENTRUM Católica (Perú)).

Astarini I., Plummer J., Lancaster R. & Yan G. 2006. Genetic diversity of Indonesian cauliflower cultivars and their relationships with hybrid cultivars grown in Australia. *Scientia Horticulturae* 108: 143-150.

Bednarskaya, I. A., Popov, V. N., Dugar, Y. N., Akinina, G. E., & Dolgova, T. A. (2014). ISSR analysis of some species of Angustifoliate Fescue. *Cytology and genetics*, 48(6), 364-370.

Castañeda-Cardona, C. C., Portela-Puerta, R., & Morillo-Coronado, Y. (2021). Caracterización molecular con marcadores ISSR de la colección de cítricos de la Universidad de los Llanos. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 12(2), 67-84.

da Silva, B. M., Rossi, A. A. B., Dardengo, J. D. F. E., de Araujo, V. A. A. C., Rossi, F. S., de Oliveira, L. O., & Clarindo, W. R. (2016). Genetic diversity estimated using inter-

- simple sequence repeat markers in commercial crops of cupuassu tree. *Ciência Rural*, 46(1), 108.
- Doyle J. and Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Jiménez, J. 2006. Biodiversity of traditional seed propagated crops cultivated in Peruvian highland. Departments of Genetics UNIVERSITY of SILESIA.
- Jin, Z., Li, J. 2007. Genetic differentiation in endangered *Heptacodium miconioides* Rehd. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. *Forest Ecology and Management* 245: 130-136
- Kashinskaya, E. N., Andree, K. B., Simonov, E. P., & Solov'yev, M. M. (2017). DNA extraction protocols may influence biodiversity detected in the intestinal microbiome: a case study from wild Prussian carp, *Carassius gibelio*. *FEMS microbiology ecology*, 93(2), fiw240.
- Mayta Anco, M. E. (2016). Dosimetría de rayos gamma para la inducción de mutación en cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen).
- Morales Segovia, J. M. (2019). Expresión génica de flavanona 3-hidroxilasa y p-cumaril ester 3-hidroxilasa en el fruto de *Solanum caripense* Dunal mediante RT-PCR y RT-qPCR.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the national academy of sciences*, 70(12), 3321-3323.
- Pineda, N. F., Marin-Suarez, J., Forero-Ulloa, F. E., & Gómez-Palacio, A. (2021). Extracción de ADN bacteriano a partir de cuerpos de agua de uso agrícola. *Ciencia y Agricultura*, 18(1), 36-45.
- Quispe, J. P. C. (2018). Procedimiento para elaborar chorizos de pollo, fortificado con proteína de Quinoa (*Chenopodium quinoa*): Jhuly Paola Chiri Quispe. *Revista Estudiantil AGRO-VET*, 2(2), 242-254.
- Roca Infante, L. A. (2015). Análisis de la diversidad genética de papas nativas de la zona suroeste del departamento de Junín mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.
- Rohlf, J. 2004. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, NY.

- Rosales Espinoza, E. (2013). Caracterización molecular de la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) usando marcadores (No. F30. R68-T). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Perú).
- Tamayo Contreras, H. L. (2010). Caracterización molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (quinua) mediante la técnica de ISSR.
- Toapanta Sánchez, I. D. P. (2016). *Duración de las etapas fenológicas y profundidad radicular del cultivo de quinua (Chenopodium quinoa), var. Tunkahuán en el sector Querochaca, catón Cevallos, provincia Tungurahua* (Bachelor's thesis).
- Torreblanca, N. N. (2015). La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) Alternativa de seguridad alimentaria para zonas desérticas. *Ciencia & Desarrollo*, (19), 19-24.
- Vilches, C., Pradenas, J., Quiñones, A., & Brante, A. (2012). Asociación de *Crepidula coquimbensis* con *Pagurus edwardsi*: efecto sobre el potencial de dispersión y diferenciación genético poblacional. *Revista de biología marina y oceanografía*, 47(2), 327-331.
- Zhang, L.; Wang, B.; Pan, L.; Peng, J. 2013. Recycling isolation of plant DNA, a novel method. *Journal of Genetics and Genomics* 40: 45 - 53.
- Zúñiga Quispe, C. (2014). Efecto de la temperatura expandido sobre la concentración de aminoácidos esenciales en granos de *amaranthus caudatus* (kiwicha), variedad oscar blanco.