

**ORIGINAL ARTICLE /ARTÍCULO ORIGINAL****EVALUATION OF THE DNA POLYMORPHISM OF SIX VARIETIES OF  
*CHENOPODIUM QUINOA* WILLD, USING AFLP****EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO DE ADN DE SEIS VARIEDADES DE  
*CHENOPODIUM QUINOA* WILLD, UTILIZANDO AFLP**Oscar Nolasco<sup>1</sup>; Wilbert Cruz<sup>2</sup>, Carlos Santa Cruz<sup>3</sup>; Ana Gutiérrez<sup>4</sup><sup>1,2,3,4</sup>Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular - Facultad de Ciencias Naturales y Matemática (FCCNM) – Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima – Perú<sup>4</sup>anaisabelflor@gmail.com

The Biologist (Lima), 2013, 11(2), jul-dec: 277-286.

**ABSTRACT**

The grain of *Chenopodium quinoa* Willd. (Quinoa) is important worldwide for its high nutritional value, being the principal source of proteins of the settlers of the Peruvian Bolivian altiplano. In the process of the care and maintenance of the species in the germplasm banks for quinoa there have been programs developed to allow the evaluation of genetic variation to increase the quality of the grain, the resistance to diseases, and dryness tolerance and to modulate the content of saponins. A current question is to discriminate among the varieties using molecular sensitive technologies like the RAPDs, microsatellites, RFLP; our aim was to evaluate the polymorphism of six varieties of quinoa using AFLP's technology (Amplified Fragment Length Polymorphism). Varieties of quinoa: Quillahuaman INIA (Q), Mantaro (M), Hualhuas (H), Real Boliviana (B), Salcedo INIA (S) and Illpa INIA (I), were evaluated in combinations of five pairs of primers using adapters for EcoRI and MseI to determine their polymorphisms. Our results found three combinations of major polymorphism E33/M60, E32/M48 and E32/M61, that we were able to discriminate against the variety Mantaro (M) as a variety removed from the others of the southern Peruvian altiplano – Bolivian, according to UPGMA analysis. This combination of primers also discriminate the varieties Illpa INIA and Salcedo INIA as being varieties obtained by crossings for genetic improvement.

**Key words:** AFLP, *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa), variety Hualhuas, variety Illpa, variety Mantaro, variety Salcedo and variety Quillahuaman.

## ABSTRACT

El grano de *Chenopodium quinoa* Willd (quinua), es importante a nivel internacional por su alto valor nutricional, siendo la principal fuente de proteínas de los pobladores del altiplano Peruano Boliviano. En el proceso del cuidado y mantenimiento de las especies en los bancos de germoplasma para quinua se han elaborado programas que permiten evaluar la variedad genética que incluyen incrementar la calidad del grano, la resistencia a enfermedades, tolerancia a la sequedad y modular el contenido de saponinas. Actualmente se trata de discriminar las variedades con técnicas moleculares sensibles como los RAPDs, microsatélites, RFLP, por lo que nuestro objetivo fue evaluar el polimorfismo de seis variedades de quinua utilizando la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Así, variedades de quinua: Quillahuaman INIA (Q), Mantaro (M), Hualhuas (H), Real boliviana (B), Salcedo INIA (S) y Illpa INIA (I), fueron evaluadas en combinaciones de cinco pares de primers empleando adaptadores para EcoRI y MseI para determinar su polimorfismo. Nuestros resultados encontraron tres combinaciones de mayor polimorfismo E33/M60, E32/M48 y E32/M61, pudiendo discriminar la variedad Mantaro (M) como una variedad alejada de las variedades propias del sur del altiplano peruano- boliviano, de acuerdo al análisis de UPGMA. Esta combinación de cebadores también discriminó las variedades Illpa INIA y Salcedo INIA siendo estas variedades obtenidas por cruces de mejoramiento genético.

**Palabras clave:** AFLP, *Chenopodium quinoa* Willd (quinua), variedad Hualhuas, variedad Illpa variedad Mantaro, variedad Salcedo y variedad Quillahuaman.

## INTRODUCCIÓN

El grano de *Chenopodium quinoa* Willd (Amaranthaceae), comúnmente conocido como quinua, es un cultivo de importancia alimenticia por su alto valor nutricional, presenta ácidos grasos insaturados (linoleico y oleico) y su alto contenido de aminoácido (Peiretti *et al.* 2013), es considerada como una de las principales fuentes de proteínas de los pobladores de la región altoandina. Existe una gran diversidad genética del cultivo de quinua, El INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria) señala la presencia de 100 cultivares y alrededor de 3000 ecotipos, esta diversidad a la fecha no ha sido evaluada genéticamente, La diversidad genética puede ser evaluada por técnicas de polimorfismo genético como el AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, (Vos *et al.* 1995),

desarrollado por Keygene (Wageningen, Holanda). El AFLP combina las estrategias del RFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción) y el PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Esta técnica, se lleva a cabo en cuatro pasos: digestión del ADN con enzimas de restricción, ligación de adaptadores a los sitios cortados, amplificación por PCR de los fragmentos restringidos con cebadores que se unen a la secuencia del adaptador y los nucleótidos selectivos adyacentes y la separación de los fragmentos polimórficos a través de electroforesis en geles de poliacrilamida. Usualmente, las enzimas usadas para generar un gran número de fragmentos son la *EcoRI* y *MseI*, la amplificación por PCR con los cebadores específicos asegura la detección confiable y reproducible de los fragmentos restringidos y la electroforesis en gel de poliacrilamida es lo suficientemente sensible

para distinguir fragmentos que difieren en longitud en un único par de bases, permitiendo detectar un gran número de bandas con alta reproducibilidad (Mba & Tohme 2005).

El análisis AFLP ha sido aplicado a los genomas de muchas plantas, para construir mapas genéticos (*Hordeum vulgare*: Becker *et al.* 1995, Waugh *et al.* 1997; *Cucumis melo*: Wang *et al.* 1997, *Solanum tuberosum*: van der Voort *et al.* 1997; *Arabidopsis thaliana*: Alonso-Blanco *et al.* 1998) y para estudiar la relación filogenética y la diversidad genética entre cultivos (*Hordeum vulgare*: Russell *et al.* 1997 Schut *et al.* 1997; *Manihot esculenta*: Roa *et al.* 1997; *Ecualiptus globulus*: Gaiotto *et al.* 1997; *Humulus lupulus*: Hartl & Seefelder 1998; *Zea mays*: Marsan *et al.* 1998; *Triticum sativum*: Donini *et al.* 1997). En todos estos estudios, el AFLP ha detectado un gran número de polimorfismos más eficientemente que otras técnicas de análisis genético de multilocus, tales como RFLP y, RAPD (Polimorfismo de ADN aleatoriamente amplificado) (Christensen *et al.* 2006).

Debido a la variedad de cultivos peruanos y bolivianos de quinua, el objetivo de este trabajo fue encontrar marcadores de polimorfismo genético de AFLP para poder diferenciar las variedades de quinua. Para ello se han analizado seis variedades: La variedad Hualhuas (H) y la variedad Mantaro (M) propias de la región altoandina central del Perú, la variedad Illpa INIA (I), variedad de Quillahuaman (Q) y la variedad Salcedo INIA (S) propias de la región sur del Perú; y la variedad Real Boliviana (B) oriunda de la región Boliviana. La variedad Illpa INIA (I) fue obtenida de una cruce de una variedad de Sajama (netamente Boliviana) y la variedad Blanca de July de la región de Puno de Perú mientras que la variedad Salcedo INIA (S) es una variedad mejorada por cruces de la variedad Sajama y Real Boliviana ambas variedades propias de Bolivia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material genético

Se evaluaron seis variedades comerciales de quinua, de origen Boliviano, la variedad Real Boliviana (B) y de origen Peruano, dos variedades regionales de la zona altoandina centro: Mantaro (M) y Hualhuas (H) y tres variedades liberadas por el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA): Illpa (I), Quillahuaman (Q) y Salcedo (S). Las características de estas variedades se resumen en la Tabla 1. Se germinaron cuatro semillas por variedad en un medio Agar-agar, para su posterior extracción de ácidos nucleicos.

**Extracción de ácidos nucleicos (DNA).** El DNA genómico total fue extraído a partir de hojas jóvenes, para ello se utilizó la metodología CTAB (Saghai-Marooof *et al.* 1984; Doyle & Doyle 1990), con algunas modificaciones. En este proceso se trituró tres g de hojas frescas con nitrógeno líquido, posteriormente se adicionó una solución de CTAB 10% y 2% beta-mercaptoethanol y se incubó 65°C por 20 min, se adicionó cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 5000 rpm por 20 min. El sobrenadante fue sometido a una nueva extracción con CTAB 10% previamente atemperada a 65°C y extraído nuevamente con un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico. El sobrenadante fue precipitado con 1,5 volúmenes de CTAB (1% CTAB, 5 mM Tris HCl y 10 mM EDTA pH 8.0), la mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 20 min. El pellet obtenido fue resuspendido en buffer TE (1M NaCl, 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) a 65°C y se sometió a una digestión con RNasa (10 mg/mL) a 37°C durante 30 min. Los DNAs fueron precipitados con etanol, posteriormente resuspendidos en Buffer TE y almacenados hasta su posterior uso para la síntesis de AFLP.

## Protocolo de AFLP

La síntesis de AFLP fue realizada como fue descrita por Vos *et al.* (1995). Una alícuota de ADN genómico de las muestras (500 ng) fueron digeridas con las enzimas de restricción EcoRI y MseI, los fragmentos digeridos fueron ligados con los adaptadores EcoRI y MseI. La secuencia de los adaptadores y los cebadores de amplificación se muestran en la Tabla 2. La reacción de preamplificación se realizó con cebadores complementarios para cada adaptador sin ningún nucleótido adicional (E00 y M00). El producto de la preamplificación fue diluido 10 veces en buffer TE. Para la amplificación selectiva, se utilizó cinco combinaciones de cebadores con dos nucleótidos selectivos. Las amplificaciones preselecciones y selectivas, se realizaron en un termociclador (TECHNE MODEL PHC-3 PCR), empleando las condiciones de amplificación para la reacción preselección de 20 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 60 s, 72°C por 60 s y para la amplificación selectiva: 94°C por 30s, 65°C por 30s, 72°C por 60 s, por 23 ciclos. En este último la temperatura de hibridación fue disminuyendo en un grado en cada ciclo hasta 56°C (Vos *et al.* 1995, Ayad *et al.* 1997). Los productos de amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida al 6 % y fueron visualizados a través de la tinción en plata y el revelado por carbonato de sodio (Goldman & Merrill 1982, Bassam *et al.* 1991).

## Análisis de datos

Para cada combinación de cebadores se visualizó la presencia y ausencia de bandas en cada muestra y los datos fueron incorporados en una matriz binaria (1= presencia, 0= ausencia) (Paul *et al.* 1997, Yee *et al.* 1999) La similitud genética fue calculada mediante el índice cualitativo de Jaccard y el agrupamiento se realizó de acuerdo al método UPGMA (Unweighted pair group Method with arithmetic average), usando el programa

DARWin 5.0.158 (Perrier & Jacquemoud 2006). Para evaluar la diferenciación genética se realizó un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) a través del programa GenALEX 6.5 y su posterior visualización a través de un Análisis de Componentes Principales de varianza (ACoP) (Bonamico *et al.* 2004, Arnao *et al.* 2007, Peakall & Smouse 2012).

## RESULTADOS

### Análisis de AFLP

De las cinco combinaciones de cebadores empleados para los análisis de AFLP, se observó que las combinaciones con mayor número de bandas polimórficas fueron E<sub>32</sub>/M<sub>48</sub> (81%), E<sub>33</sub>/M<sub>60</sub> (64%), y E<sub>32</sub>/M<sub>61</sub> (64%), mientras que las combinaciones E<sub>38</sub>/M<sub>60</sub> (45%) y E<sub>38</sub>/M<sub>47</sub> (32%) presentaron un menor contenido polimórfico por lo que no fueron considerados para los análisis a pesar de contener un mayor número de bandas totales (Tabla 3).

Analizando las tres combinaciones más polimórficas E<sub>32</sub>/M<sub>48</sub>, E<sub>33</sub>/M<sub>60</sub> y E<sub>32</sub>/M<sub>61</sub> mediante el método de UPGMA, el coeficiente de discriminación fluctúa entre 0,55 a 0,97 para las seis variedades analizadas. Del análisis de agrupamiento las combinaciones empleadas permite la discriminación de las variedades, así mismo se pueden identificar tres grupos; el grupo conformado por la Mantaro, el segundo grupo conformado por la Quillahuaman y el tercer grupo formado por las variedades Hualhuas, Illpa, Salcedo y La Real Boliviana. Dentro del tercer grupo se puede observar las variedades de Illpa y Salcedo que se encuentran muy relacionadas, así mismo la Real Boliviana tiene guarda relación estrecha con estas dos variedades (Fig. 1).

Los resultados del análisis de varianza molecular, nos indica que un 44% de variación

genética, se encuentra relacionada con la variación intravarietal y el 56 % a las variedades. ( $Phit=0.560$ ;  $p=0,01$ )

El análisis de componentes principales de varianza (ACoP) muestra los principales componentes de variación, resaltándose la

variedad de Mantaro y la variedad de Quillahuaman, las variedades más alejadas genéticamente del grupo central formado por las variedades Hualhuas, La Real Boliviana, Illpa y Salcedo, donde estas dos últimas se muestran como una unidad (Fig. 2).

**Tabla 1.** Características de las seis variedades de *Chenopodium quinoa* (quinua) analizadas.

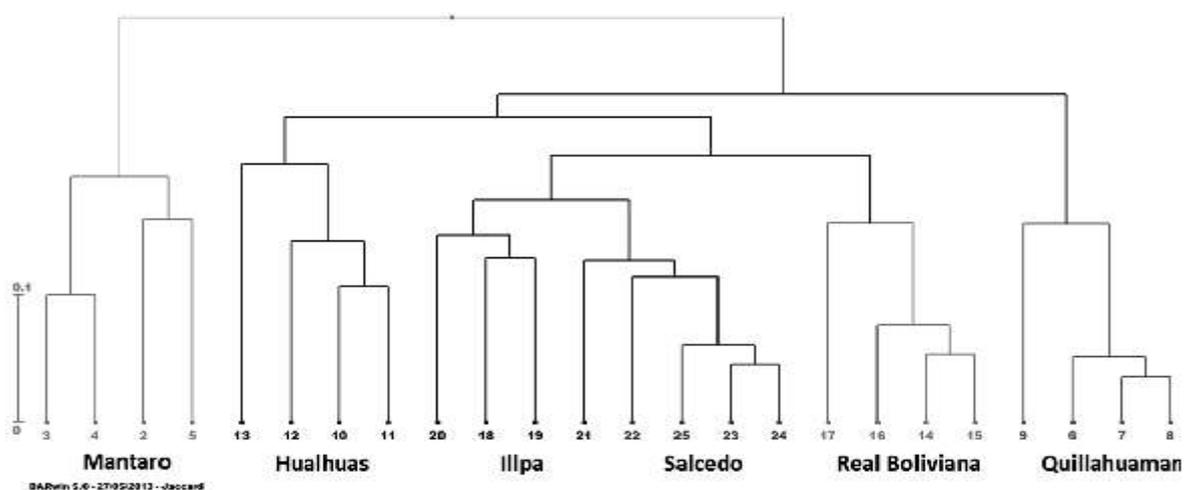
Variedad	Región de origen	País de origen	Institución encargada en la liberación	Descripción de la variedad
<b>Real Boliviana</b>		<b>Bolivia</b>		? Grano blanco perla, alto contenido de saponina. Hasta 2,5 mm de diámetro. Contenido de proteínas 13,82 %.
<b>Hualhuas</b>	Junín	<b>Perú</b>	Universidad Nacional del Centro (UNAC)	? Es la variedad registrada con la clave UNC -H 20 B-74, que tiene su origen en el UNC-H-20-P-69.
<b>Mantaro</b>	Junín		Universidad Nacional del Centro (UNAC)	? Grano de color blanco, bajo contenido de saponina. Contenido de proteínas 15.8%
<b>Illpa</b>	Puno		Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) EEA. Illpa	? Liberada en 1997, grano grande, de color blanco, considerada una quinua dulce (Saponina 0.02%). Contenido de proteínas 16.14%. Rendimiento potencial 3.1 t/ha. ? Tolerante a enfermedades y heladas.
<b>Salcedo</b>	Puno		Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) EEA. Illpa	? Liberada en 1995, grano de color grande, blanco y dulce. Considerada una quinua dulce (Saponina 0.014%).
<b>Quillahuaman</b>	Cusco		Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) EEA. Andenes	? Liberada en 1990. Grano mediano, color blanco - crema, bajo contenido de saponinas, con un rendimiento de 3.5 t/ha.

**Tabla 2.** Cebadores y adaptadores AFLP para EcoRI y MseI.

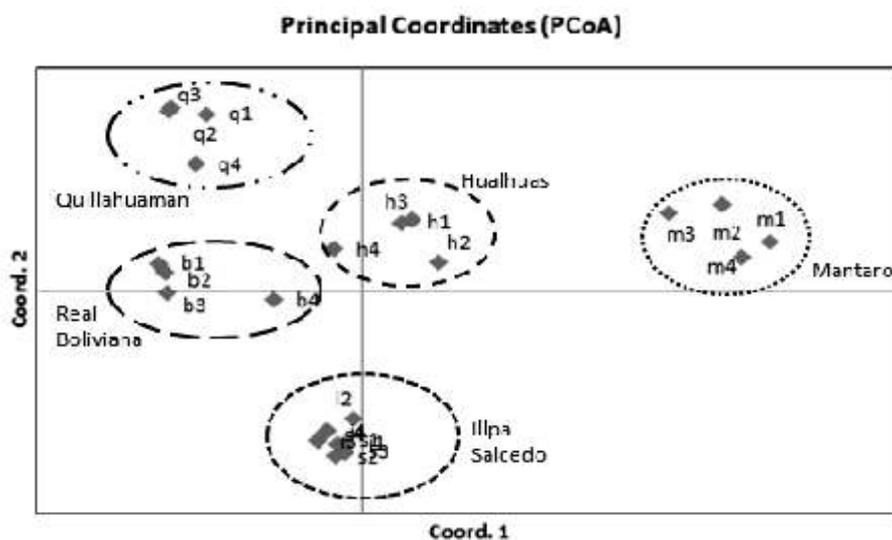
ADAPTADORES	Secuencia
Adaptadores para <i>EcoRI</i>	
<b>EcoA<sub>1</sub></b>	<b>5-CTC GTA GAC TGC GTA CC -3</b>
<b>EcoA<sub>2</sub></b>	<b>5-AAT TGG TAG GCA GTC -3</b>
Adaptadores para <i>MseI</i>	
<b>MseA<sub>1</sub></b>	<b>5-GAC GAT GAG TCC TGA G -3</b>
<b>MseA<sub>2</sub></b>	<b>5-TAC TAC GGA CTC AT -3</b>
<b>CEBADORES PRE-SELECTIVOS</b>	
<b>E<sub>00</sub></b>	<b>5-GAC TGC GTA CCA ATT C -3</b>
<b>M<sub>00</sub></b>	<b>5-GAT GAG TCC TGA GTA A -3</b>
<b>CEBADORES SELECTIVOS</b>	
<b>M<sub>47</sub></b>	<b>5-GAT GAG TCC TGA GTA AIC AA -3</b>
<b>M<sub>60</sub></b>	<b>5-GAT GAG TCC TGA GTA AIC TC -3</b>
<b>M<sub>61</sub></b>	<b>5-GAT GAG TCC TGA GTA AIC TG -3</b>
<b>M<sub>48</sub></b>	<b>5-GAT GAG TCC TGA GTA AIC AC -3</b>
<b>E<sub>38</sub></b>	<b>5-GAC TGC GTA CCA ATT CIA CT -3</b>
<b>E<sub>33</sub></b>	<b>5-GAC TGC GTA CCA ATT AIA AG -3</b>
<b>E<sub>32</sub></b>	<b>5-GAC TGC GTA CCA ATT AIA AC -3</b>

**Tabla 3.** Evaluación de las combinaciones de cebadores utilizados para los análisis de AFLP en las seis variedades de *Chenopodium quinoa* (quinua) analizadas.

Combinación de Iniciadores	N° Total de Bandas	Bandas Polimórficas	
		N°	Fracción polimórfica %
<b>E<sub>38</sub>/M<sub>47</sub></b>	44	14	32
<b>E<sub>33</sub>/M<sub>60</sub></b>	42	27	64
<b>E<sub>32</sub>/M<sub>48</sub></b>	16	13	81
<b>E<sub>32</sub>/M<sub>61</sub></b>	33	21	64
<b>E<sub>38</sub>/M<sub>60</sub></b>	<b>29</b>	<b>13</b>	45



**Figura 1.** Agrupamiento de las seis variedades de quinua analizadas mediante UPGMA (programa DARwin).



**Figura 2.** Análisis de Componentes principales (ACoP) de las seis variedades de quinua por su localidad.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio, se utilizó cuatro semillas por variedad para discriminar la variabilidad dentro de los cultivares en quinua. Bonamico *et al.* (2004) señalan que el estudio genético de un individuo en una variedad no es muy representativo por lo que es necesario el estudio de más de dos individuos para discriminar variedades, como registra Christiansen *et al.* (2006).

La variación intraespecífica en quinua es relativamente baja en comparación a otras especies, la principal fuente de variación se da a través de los transposones, los cuales han sido reportados en las angiospermas (Kolano *et al.* 2012). Esta variación dentro del cultivo de quinua genera implicancias agronómicas de importancia. Fuentes *et al.* (2009), indica que los ecotipos de las zonas altoandinas y de costa presentan diferentes respuestas como a la altitud, tolerancia a sequía, salinidad y sensibilidad a días largos. Estas adaptaciones se encuentran asociadas a la variabilidad genética del cultivo.

Con los marcadores AFLP se obtuvo suficiente polimorfismo para diferenciar las variedades de quinua, como en otras especies (Maughan *et al.* 2004, Arnao *et al.* 2007); esta técnica permite evaluar la diversidad genética intraespecífica en plantas (Gaudeul *et al.* 2004, Nybom 2004, Mba & Tohme 2005) y en cultivos (Shan *et al.* 2005, Wu *et al.* 2006), generando un gran número de marcadores distribuidos a través del genoma, los cuales permitiría identificar híbridos (Bonin *et al.* 2007). En el presente estudio se ha identificado variedades con un menor número de combinaciones de cebadores en comparación de los resultados de Maughan *et al.* (2004) quien reporta 88 combinaciones de cebadores para evaluar poblaciones de quinua, generando 597 bandas polimórficas, con coeficientes de similaridad entre 0,23 a 0,87,

con una capacidad de discriminación de variedades bolivianas, chilenas y peruanas.

Las variedades analizadas presentan un agrupamiento por las zonas geográficas; la variedad Mantaro es una variedad completamente diferente a las demás. Hualhuas es una variedad liberada por la Universidad Nacional del Centro cuyo origen es un material de la zona (UNC-H-20-P-69), esta variedad presenta cierto grado de asociación genética entre las variedades del sur (Illpa, Salcedo y Real Boliviana) lo que sugiere un mismo origen genético.

El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) nos señala la fuente de variación genética dentro de las poblaciones de quinua en estudio, siendo una mayor fuente de variación entre las variedades (56%), que la encontrada dentro de las variedades (44%) lo que determina una variabilidad genética moderadamente alta entre las variedades. Hamrick & Godt (1989) indican que las especies autóгамas poseen valores altos de variabilidad genética entre poblaciones. Este carácter es común en plantas cuya biología reproductiva es de tipo autógamma como es el caso de la quinua.

El análisis de ACoP, es un método de ordenamiento que centra a los genotipos en una nube de puntos preservando las relaciones de similitud establecidas en ello, con lo cual permite establecer un gráfico en dos o tres dimensiones, que refleja un agrupamiento similar al que se muestra en el dendrograma. Jhonson (2000) señala que la coincidencia de dos métodos (ordenamiento y agrupamiento) valida el agrupamiento obtenido para las variedades de estudio.

Los análisis de ACoP han permitido corroborar cinco grupos, de los cuales la variedad Quillahuaman y la variedad Mantaro se encuentran completamente separadas de los demás grupos, las otras variedades forman un grupo central donde la variedad Real Boliviana

y Hualhuas se encuentran relativamente cercanas y las variedades Salcedo e Illpa se encuentran superpuesta formando un solo grupo. La relación entre la variedad Salcedo e Illpa se puede explicar en relación a su origen, Illpa ha sido generado a partir del cruzamiento entre Samaja x Blanca de Juli y la variedad Salcedo a partir de la Real Boliviana x Samaja, ambas presentan un parental en común (Samaja); así mismo el dendrograma corrobora la estrecha distancia genética entre la Illpa y Salcedo.

Las combinaciones de cebadores empleadas en la realización del AFLP han permitido discriminar las variedades de quinua en base a su distribución geográfica, sin embargo las bandas polimórficas determinadas requieren de un análisis adicional para determinar la secuencia específica polimórfica y si los locus donde se encuentran estas bandas polimórficas son representativas y abarcan la totalidad del genoma.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Blanco, C.; Peeters, A. J.; Koornneef, M.; Lister, C. & Dean, C. 1998. Development of an AFLP based linkage map of *Ler*, Col and Cvi *Arabidopsis thaliana* ecotypes and construction of a *Ler*/Cvi recombinant inbred line population. *Plant Journal*, 14:259–271.
- Arnao, E.; Rodríguez, N.; Hinrinse, P.; Jayaro, Y.; Ramis, C. & Pérez-Almeida, I. 2007. Evaluación de la diversidad genética de subespecies de arroz utilizando marcadores microsatélites y AFLP. *Agronomía Tropical*, 57: 45-50.
- Ayad, W. G.; Hodgkin, T.; Jaradat, A. & Rao, V. R. 1997. *Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources* (report of an IPGRI workshop, 9-11 October 1995, Rome, Italy). International Plant Genetic Resources Institute. Rome.
- Bassam, B. J.; Caetano-Anollés, G. & Gresshoff, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 196: 80-83.
- Becker, J.; Vos, P.; Kuiper, M.; Salamini, F. & Heun, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular and General Genetics*, 249:65-73.
- Bonamico, N.; Aiassa, J.; Ibañez, M.; Di Rienzo, M.; Diaz, D. & Salerno, J. 2004. Caracterización y clasificación de los híbridos simples de maíz con marcadores SSR. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 33:129-144.
- Bonin, A.; Ehrich, E. & Manel, S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, 16: 3737-3758.
- Christensen, S.; Pratt, D.; Nelson, P.; Stevens, M.; Jellen, E.; Coleman, C.; Fairbanks, D.; Bonifacio, A. & Maughan, P. 2006. Assessments of genetic diversity in the USDA and CIP collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellites markers. *Plant Genetics Resources: Characterization and Utilization*, 5: 82-95.
- Donini, P.; Elias, M. L.; Bougourd, S. M. & Koebner, R. M. D. 1997. AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plants. *Genome*, 40: 521–526.
- Doyle, J. J. & Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Fuentes, F.; Maughan, J. & Jellen, E. 2009. Diversidad genética y recursos genéticos para el mejoramiento de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Revista Geográfica de Valparaíso*, 42: 20-33.
- Gaiotto, F. A.; Bramucci, M. & Grattapaglia, D. 1997. Estimation of outcrossing rate

- in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 95: 842-849.
- Gaudeul, M.; Till-Bottraud, I.; Barjon, F. & Manel, S. 2004. Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. Heredity, 92: 508-518.
- Goldman, D. & Merrill, C. R. 1982. Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels: Linearity and Effect of Fragment Size. Electrophoresis, 3:24.
- Hamrick, I. & Godt, W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: *Plant population genetics, breeding, and genetic resource*. Ed. By Brown D.D.; Clegg M.T.; Kahler A.L. & Weir B.S. Sinauer Associates. EEUU. 449p.
- Hartl, L. & Seefelder, S. 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. Theoretical and Applied Genetics, 96: 112-116.
- Johnson, D. E. 2000. *Métodos multivariados aplicados al análisis estadístico*. México. Ed. International Thomson Editores. p. 327.
- Kolano, B.; Siwinska, D.; Gomez Pando, L.; Szymanowska-Pulka, J. & Maluszynska, J. 2012. Genome size variation in *Chenopodium quinoa* (Chenopodiaceae). Plant Systematic Evolution, 298:251-255.
- Marsan, P. A.; Castiglioni, P.; Fusari, K.; Kuiper, M. & Motto, M. 1998. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 96: 219-227.
- Maughan, P.; Bonifacio, A.; Jellen, A.; Stevens, M.; Coleman, C.; Ricks, M.; Mason, S.; Jarvis, D.; Gardunia, B. & Fairbanks, D. 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 109:1188-1195.
- Mba, C. & Tohme, J. 2005. Use of AFLP markers in surveys of plant diversity. In: *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B* (eds Zimmer EA, Roalson EH), pp. 177-201. Academic Press, San Diego, California.
- Nyblom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology, 13, 1143-1155.
- Paul, S.; Wachira, F. N.; Powell, W. & Waugh, R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) revealed by AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 94:255-263.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. Bioinformatics, 28: 2537-2539.
- Peiretti, P.G.; Gai, F. & Tassone, S. 2013. Fatty acid profile nutritive value of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds and plants at different growth stages. Animal Feed Science and Technology, 183:56-61.
- Perrier, X. & Jacquemoud-Collet, J. P. 2006. D A R W I N software <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Roa, A. C.; Maya, M. M.; Duque, M. C.; Tohme, J. & Allem, A. C. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. Theoretical and Applied Genetics, 95: 741-750.
- Russell, J. R.; Fuller, J. D.; Macaulay, M.; Hatz, B. G. & Jahoor, A. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, AARs and RAPDs. Theoretical and Applied Genetics, 95: 714-722.
- Saghai-Marooof, K.; Soliman, M.; Jorgensen, R. A. & Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms in

- Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location, and Population Dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81:8014-8018.
- Schut, J. W.; Qi, X. & Stam, P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. Theoretical and Applied Genetics, 95: 1161–1168.
- Shan, F.; Clarke, H. C.; Plummer, J.A.; Yan, G. & Siddique, K. H. M. 2005. Geographical patterns of genetic variation in the world collections of wild annual *Cicer* characterized by amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 110: 381–391.
- van der Voort, J. R.; Wolters, P.; Folkertsma, R.; Hutten, R. & van Zandvoort, P. 1997. Mapping of the cyst nematode resistance locus *Gpa2* in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics, 95: 874–880.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M. & van de Lee, T. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407–4414.
- Wang, Y. H.; Thomas, C. E. & Dean, R. A. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Theoretical and Applied Genetics, 95: 791–798.
- Waugh, R.; Bonar, N.; Baird, E.; Thomas, B. & Graner, A. 1997. Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. Molecular and General Genetics, 255: 311–321.
- Wu, B.; Liu, N. & Zhao, H. 2006. PSMIX: an R package for population structure inference via maximum likelihood method. BMC Bioinformatics, 7: 317–326.
- Yee, E.; Kidwell, K. K.; Sills, G. R. & Lumpkin, T. A. 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. Crop Science, 39:268-275.

Received August 6, 2013.  
Accepted October 3, 2013.