

Conformación de la colección núcleo de *Chenopodium quinoa* Willd. (quinua) de Bolivia con datos morfológicos y moleculares

Silene Veramendi; Ximena Cadima; Milton Pinto; Wilfredo Rojas

Trabajo financiado por: SIBTA, Fundación McKnight, Fundación PROINPA

E mail: x.cadima@proinpa.org

Resumen. La colección núcleo es una colección representativa de la diversidad genética de un cultivo dirigida a promover un uso más eficiente de los materiales conservados en los Bancos de Germoplasma. El objetivo de este trabajo fue conformar una colección núcleo de quinua con datos morfológicos y moleculares y evaluar su representatividad, de forma que la entidad responsable de la custodia de la *Colección Boliviana de Quinua*, cuente con información necesaria para facilitar la toma de decisiones en cuanto al uso y evaluación de la diversidad genética del germoplasma de quinua. Se utilizó la *Estrategia M* o de *Maximización de la Diversidad* para la selección de los materiales representativos que conforman la colección núcleo, utilizando el programa informático PowerCore®. El estudio se realizó en la *Colección Boliviana de Quinua* conformada por materiales provenientes del altiplano, los valles interandinos y materiales silvestres que contaban con datos completos de caracterización morfológica y molecular. Se identificaron dos escenarios de colección núcleo: 1) 31% de la colección total que representa el 100% de la diversidad genética y 2) 24% de la colección total representando el 80% de la diversidad genética. La comparación de índices de diversidad, entre la colección total y la colección núcleo, corroboró la representatividad de diversidad genética de ésta última.

Palabras clave: Diversidad genética; Microsatélites; Banco de Germoplasma

Summary. Formation of the *Chenopodium quinoa* Willd. (Quinoa) core collection in Bolivia with morphological and molecular data. The core collection is a representative collection of a crop genetic diversity aimed to promote a more efficient use of materials preserved in the Germplasm Banks. The aim of this study was to form a core collection of quinoa with morphological and molecular data and evaluate their representativeness, so that the entity in charge of the *Bolivian Quinoa Collection* custody, can have the necessary information to facilitate decisions-making regarding the use and evaluation of the genetic diversity of quinoa germplasm. It was used the *M* or *Maximizing Diversity Strategy* for the selection of representative materials that form the core collection, by using the PowerCore® software. The study was conducted in the *Bolivian Quinoa Collection* with materials from the altiplano, the interandean valleys and wild materials that had complete data on morphological and molecular characterization. Two scenarios of core collection were identified: 1) 31% of the total collection representing 100% of the genetic diversity and, 2) 24% of the total collection representing 80% of the genetic diversity. By comparing the indexes diversity between the total collection and core collection, it was confirmed the representativeness of the latter genetic diversity.

Keywords: Genetic Diversity; Microsatellites; Germplasm Bank

Descripción del problema y las acciones del Proyecto

La *Colección Boliviana de Germoplasma de Quinua* tiene una amplia variabilidad genética con más de 3.000 accesiones de materiales cultivados y silvestres, recolectadas en diferentes zonas agroecológicas del país y que corresponden a los departamentos de La Paz, Oruro, Potosí, Cochabamba, Chuquisaca y Tarija. Asimismo, la colección cuenta con germoplasma proveniente de Perú, Ecuador, Colombia, Argentina, entre otros (Rojas *et al.*, 2010).

Cuando las colecciones de germoplasma son amplias, en cuanto al número de accesiones, se dificulta el uso del material genético y por ello se recomienda implementar colecciones núcleo.

Según Jaramillo y Baena (2000), una colección núcleo consiste en un subconjunto de accesiones de germoplasma, que representan entre 10% a 15% del total de número de accesiones, y a la vez este sub-conjunto debe representar al menos entre el 70% a 80% de la variabilidad genética.

Las colecciones núcleo son importantes entonces para que los usuarios de los bancos de germoplasma, por ejemplo fitomejoradores, usen de forma más apropiada y frecuente, la rica variabilidad conservada en los bancos, para buscar fuentes y genes valiosos de resistencia a factores abióticos y bióticos, y de calidad, para luego incorporarlas a nuevas variedades en los procesos de mejora genética para adaptación al cambio climático, y para la selección de materiales de mayor calidad y/o con aptitud de usos agroindustriales.

Para iniciar este estudio se verificó previamente la disponibilidad de:

- Información de datos morfológicos y moleculares de las accesiones del germoplasma de quinua. La información morfológica fue generada desde la década de los años noventa (Rojas 2003, Rojas *et al.*, 2001), la información molecular y parte de la información morfológica en la primera década del año 2000, cuando la Fundación PROINPA estuvo a cargo de la administración del Banco Nacional de Granos Altoandinos por delegación del Gobierno Boliviano (Rojas 2008).
- Herramientas bioinformáticas que puedan ser aplicadas en la identificación de la colección núcleo, como es el caso del programa PowerCore® que utiliza la *Técnica M de Maximización* en la búsqueda de accesiones representativas (van Hintum *et al.*, 2003; Kyu - Won *et al.*, 2007; PASW, 2009).

Metodología

Selección de accesiones en base a datos morfológicos y moleculares

La información a nivel molecular se obtuvo de la caracterización realizada a la *Colección Boliviana de Quinua* con ocho marcadores microsatélites (Cuadro 1). Estos marcadores son relevantes porque presentan ventajas como: codominancia, multiallelismo y tienen alta heterocigosidad, los mismos fueron seleccionados de una librería de microsatélites (SSR) por presentar un alto nivel de polimorfismo (Maughan *et al.* 2004).

Cuadro 1. Características de los microsatélites utilizados en la caracterización molecular de la *Colección Boliviana de Quinua*

Nro.	Microsatélite	Motivo repetido	Secuencia directa del iniciador (5'-3')	Secuencia inversa del iniciador (5'-3')	TH * (°C)
1	QCA006	(CA)15CG(CA)4	gctctattaaggaatgaggttca	gccattcaattcagcaaagg	51
2	QATG019	(ATC)12	ccaaacaaagacaataag-gaaacc	cgagggtgaaggagattcca	60
3	QAAT051	(AAT)14	ccttcagacaaggtccatta	cgtccatagtggaggcattt	53
4	QCA058	(GT)17	ctcgaccagcagggtctg	ctagctaggcgttgccctgac	60
5	QAAT050	(AAT)17	ggcacgtgctgctactcata	tggcgaatggttaatttgc	51
6	QAAT074	(ATT)14	atggaacacccatccgataa	atgcctatcctcatcctcca	55
7	QAAT076	(ATT)30	gctcatgtgtataaaatgccaat	tctcggtcctccactaatttt	55
8	QAAT022	(TTA)29	tggtcgatatagatgaaccaa	ggagcccagattgtatctca	53

*: TH: Temperatura de hibridación

La caracterización molecular permitió obtener índices de diversidad como el *Contenido de Información Polimórfica* (PIC) y *Heterocigosidad* (H), para cada conjunto de muestras de las regiones, siendo las quinuas del Altiplano Centro (AC) y del Altiplano Sur (AS) las más abundantes, pero también las más diversas del altiplano (cuadros 2 y 3).

Para el presente estudio, los datos de los alelos (en pares de bases) de cada microsatélite, fueron transformados en datos binarios y dispuestos en una matriz denotando la presencia de un alelo como 1 y la ausencia como 0. La información, a nivel morfológico, se obtuvo de la evaluación realizada en la colección de germoplasma, de donde se seleccionaron 48 variables que incluyeron datos de: coloración en el vástago, arquitectura de planta, tallo, hoja, inflorescencia y/o panoja, características del grano, saponina, rendimiento, fenología y tolerancia a factores abióticos (heladas) y bióticos (mildiu).

Las quinuas de cada región tienen un patrón agromorfológico que las distinguen entre ellas. En el Altiplano Centro

crecen de 0.5 a 1.2 m, con hábito de crecimiento de ramas cortas, el tipo de panoja que prevalece es la glomerulada, el ciclo fenológico de 168.40 ± 14.05 días.

En el Altiplano Sur tienen el grano de mayor tamaño (2.20 a 2.67 mm de diámetro), con alto contenido de saponina; la panoja que prevalece es la amarantiforme.

En el Altiplano Norte tienen una altura de 0.8 a 1.5 m, la panoja que prevalece es la glomerulada, el grano es de tamaño pequeño a mediano y de color blanco, el ciclo de cultivo es medianamente tardío a tardío (175 días).

En los valles interandinos pueden alcanzar hasta 2.5 m o más de altura, con ramas que alcanzan el segundo tercio de la planta y hojas muy dentadas, el ciclo fenológico es tardío (188 a 205 días), las panojas amarantiformes son las que predominan, el tamaño del grano es mediano (2 ± 0.13 mm) y tiene alto contenido de saponina (Rojas y Pinto 2013, Bonifacio *et al.* 2012; Rojas 2003; Rojas *et al.* 2001).

Para el presente estudio los datos morfológicos anteriormente mencionados se dispusieron en una matriz donde se indicaron los nombres de las accesiones y los descriptores morfológicos con varios niveles por descriptor (3 a 11).

En base a la información disponible de caracterización molecular y morfológica, del total de accesiones de la colección de quinua, se seleccionaron 1672 accesiones bolivianas, provenientes de cinco regiones: Altiplano Norte, Altiplano Centro, Altiplano Sur y valles interandinos y de hábitats naturales para el caso de las quinuas silvestres (ajaras) (Cuadro 2).

Análisis estadístico: Conformación de la colección núcleo de quinua

Para la conformación de la colección núcleo, se hizo una matriz con los datos moleculares y morfológicos, que fue introducida en el programa PowerCore[®], el cual permite realizar un muestreo mediante la *Estrategia M de Maximización* (van Hintum *et al.* 2003). Esta estrategia consiste en el uso de datos que indican la magnitud de la diversidad de marcadores utilizados en la caracterización del germoplasma, es decir que garantiza la inclusión de la máxima riqueza alélica para los *loci*/marcadores empleados y toma en cuenta directamente, en esos *loci*, la magnitud de la variación y la divergencia respecto al modelo o patrón. Es importante indicar que la *Estrategia M* no sólo define el número de accesiones que debe provenir de grupos diferentes, sino que identifica también las accesiones que se quieren incluir (Brown y Schoen, 1994; Schoen y Brown, 1995; Cortez 2011). De esta forma, con las accesiones seleccionadas por el programa, se generó un

dendrograma de la colección núcleo, utilizando el programa NTSYSpc versión 2.1.10[®] y se comparó su estructura con el dendrograma de la colección total. También se compararon índices de diversidad entre ambas colecciones, para comprobar la representatividad de la colección núcleo (Rohlf 2000; Zambrano *et al.* 2003).

Logros

Los datos del análisis, con un nivel de representatividad del 100% de la diversidad genética, generaron un subconjunto de 486 accesiones que corresponde al 31% de la colección total. Aplicando un nivel de representatividad del 80% de la diversidad genética, sugerido por bibliografía (Frankel *et al.*, 1984; Jaramillo y Baena, 2000; Ozer *et al.*, 2004), se alcanzó un subconjunto de 410 accesiones, que son el 24% de la colección total (Cuadro 2).

El Cuadro 2 muestra también el número de accesiones de la colección núcleo por región. Se observa que el porcentaje de las accesiones de cada región es variable, esto denota la mayor o menor redundancia (material duplicado o genéticamente muy similar) de accesiones al interior de cada región.

Es el caso de los materiales del Altiplano Norte, donde un mayor porcentaje de accesiones ha sido considerado tanto al 80% como al 100% de representatividad (46% y 57%, respectivamente) en comparación con las otras regiones, es porque en esta región existe menor redundancia, por lo tanto la mayor parte de las accesiones son genéticamente diferentes entre sí.

Cuadro 2. Número de accesiones de la colección núcleo por región, seleccionadas a través de la maximización de la colección total para 80% y 100% de representatividad

Región	Accesiones totales	80% de representatividad genética		100% de representatividad genética	
		Colec. núcleo	%	Colec. núcleo	%
Altiplano Centro	791	117	14	146	18
Altiplano Sur	372	108	29	135	36
Altiplano Norte	111	50	46	63	57
Valles interandinos	269	114	42	142	53
Hábitats naturales	129	22	17	27	21
Total	1.672	411	25	513	31

Situación similar, de poca redundancia, se observa también en los materiales de los valles interandinos, y es notable que el número de accesiones identificadas para la colección núcleo de esta región, sea mayor a las del Altiplano Sur y muy cercano a las del Altiplano Centro, lo que implica que aunque el número de accesiones totales de las regiones del Altiplano Centro y Sur es mucho mayor a las de los valles interandinos, en éstas dos regiones del altiplano, se recolectaron probablemente, varios materiales genéticamente similares entre sí.

La comparación de la colección núcleo, con la colección total, mediante la visualización de los dendrogramas originados con los datos de cada colección, muestra que la colección núcleo conserva la estructura de la colección original.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo para el caso de los materiales del Altiplano Norte, donde la estructura genética (conformación de las accesiones en grupos y subgrupos) de ambas colecciones (total y núcleo) es la misma.

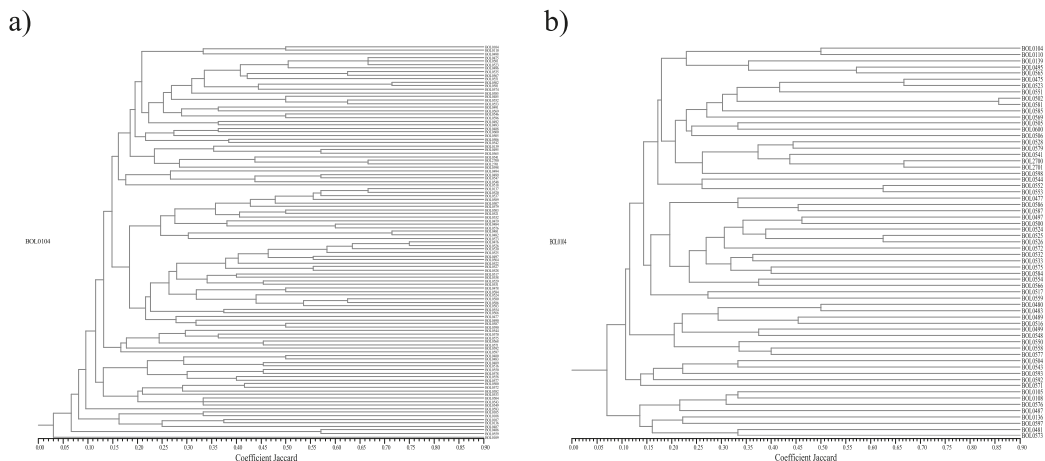


Figura 1. Comparación de dendrogramas para visualizar la estructura genética de:
a) Colección total del Altiplano Norte (111 accesiones)
b) Colección núcleo de la misma región (63 accesiones)

En el Cuadro 3 se comparan los datos de PIC por región, de la colección total, con los datos de PIC de la colección núcleo. Los índices de diversidad de la colección núcleo son ligeramente superiores a los de la colección original, porque se han reducido las redundancias, por lo tanto, las frecuencias alélicas son mayores.

Sin embargo, se puede apreciar que la representatividad de la colección núcleo, es consistente, considerando que la *Colección Boliviana de Quinoa* tiene una estructura tan diversa y compleja. La diversidad genética en la colección núcleo se mantiene y se ha reducido la redundancia al mínimo.

Conclusiones

- La metodología aplicada en este estudio, permitió identificar las accesiones de quinoa más representativas, es decir el grupo de accesiones en el que se mantuvo la ampli-

tud de la diversidad genética encontrada en la colección total, en base a marcadores microsatélites, descriptores agromorfológicos y evaluaciones de tolerancia a mildiu y heladas. La calidad y cantidad de información considerada en este estudio, para conformar la colección núcleo de quinoa, permite asegurar una amplia diversidad de accesiones para considerarlas en futuras evaluaciones para selección de materiales genéticos, ya sea con características particulares agromorfológicas o con tolerancia a mildiu y heladas.

- Es importante mencionar que la conformación de una colección núcleo es dinámica, en futuras investigaciones se podrían involucrar las demandas del contexto actual, como el cambio climático que exige variedades precoces o tolerantes a la sequía, o el mercado que exige variedades con cualidades nutricionales y agroindustriales.

Cuadro 3. Valores de PIC para los ocho microsatélites por región para la colección total y la colección núcleo

Locus	Valor de PIC por Región CT					Valor de PIC por Región CN				
	AC	AS	AN	VI	Silv.	AC	AS	AN	VI	Silv.
QCA006	0.72	0.69	-	-	-	0.74	0.71	-	-	-
QATG019	0.69	0.66	-	-	-	0.70	0.67	-	-	-
QAAT051	0.68	0.79	0.52	0.75	0.79	0.69	0.80	0.51	0.75	0.78
QCA058	0.76	0.81	-	-	-	0.76	0.82	-	-	-
QAAT050	0.88	0.83	0.75	0.79	0.88	0.89	0.83	0.76	0.79	0.87
QAAT074	0.92	0.92	0.88	0.93	0.91	0.92	0.91	0.88	0.93	0.91
QAAT076	0.88	0.90	0.90	0.86	0.89	0.88	0.90	0.90	0.87	0.89
QAAT022	0.92	0.92	0.87	0.94	0.92	0.92	0.92	0.87	0.94	0.92
Promedio	0.81	0.82	0.78	0.85	0.88	0.81	0.82	0.78	0.86	0.87

Referencias: AC: Altiplano Centro; AS: Altiplano Sur; AN: Altiplano Norte; VI: Valles interandinos; PIC: Contenido de Información Polimórfica; CT: =Colección Total; CN=Colección Núcleo

Entidades involucradas

La información agromorfológica y molecular que fue utilizada en este estudio, fue generada 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.

Las siguientes personas contribuyeron en el levantamiento de los datos moleculares, en los periodos de ejecución de los proyectos mencionados: Jorge Rojas Beltrán, Abel Turumaya, Pilar Gutiérrez, Rocío Maldonado, Lucía Pérez, Lilian Pinto y Masiel Ovando.

La información agromorfológica ha sido generada por el equipo técnico de la Regional Altiplano de la Fundación PROINPA.

Referencias citadas

- Bonifacio, A., Aroni G., Villca, M. 2012. Catálogo Etnobotánico de la Quinua Real. Cochabamba, Bolivia. 123 p.
- Brown, A., Schoen, D. 1994. Optimal sampling strategies for core collections of plant genetic resources. **In:** V. Loeschke, J. Tomiuk y S. Jain (Eds.). *Conservation genetics*. BirkhäuserVerlagBasel, Suiza. pp. 357-369.
- Cortez, F. 2011. Construcción de una colección núcleo de *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* conservada en el banco nacional de tubérculos y raíces andinas en base a marcadores morfológicos y moleculares. Tesis de Maestría. Posgrado FCAP-UMSS. Cochabamba, Bolivia.
- Frankel, O., Brown, A. 1984. Plant genetic resources today: A critical appraisal. **In:** Holden, J., Williams, J. (Eds.). *Crop Genetic Resources: Conservation and evaluation*. Allen and Unwin. London, UK.
- Jaramillo, S., Baena, M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia. 210 p.
- Kyu-Won, K., Chung, K., Cho, H., Chandrabalan, D., Jae-Gyun, G., Kim, T, Eun G., Yong-Jin, P. 2007. PowerCore: A program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets. *Bioinformatics* 23 (16):2155-2162.
- Maughan, J., Bonifacio, A., Jellen, E., Stevens, M., Coleman, C., Ricks, M., Mason, S., Jarvis, D., Ardunia, B., Fairbanks, D. 2004. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. *Theor Appl Genet* 109:1188-1195.
- Ozer, A., Suárez, R., Abadie, T. 2004. Elaboración de una colección núcleo de germoplasma de maíz de la raza blanco dentado. *Agrocienca* Vol. VIII Nro. 1. pp. 1-10.
- PASW. 2009. Predicción de resultados e identificación de relaciones en los datos categóricos. PASW® Categories 18 – Especificaciones. 8 p.
- Rojas, W., Pinto M. 2013. La diversidad genética de quinua de Bolivia. **En:** Vargas, M. (Ed.). *Congreso Científico de la Quinua (Memorias)*. La Paz, Bolivia. pp. 77 - 92.

- Rojas, W., Pinto, M., Soto, J. 2010. Distribución geográfica y variabilidad genética de los granos andinos. **En:** Rojas W., Pinto M., Soto J., Jagger M. y Padulosi S. (Eds.). Granos Andinos: Avances, logros y experiencias desarrolladas en quinua, cañahua y amaranto en Bolivia. Bioversity International, Roma, Italia. pp. 11- 23.
- Rojas, W. (Editor). 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., Cayoja, M., Espindola, G. 2001. Catálogo de la colección de quinua conservada en el Banco Nacional de Granos Altoandinos. Fundación PROINPA, MAGDER, PPD-PNUD, SIBTA-UCEPSA, IPGRI, IFAD. La Paz, Bolivia. 129 p.
- Rohlf F. 2000. NTYSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.10e. Appl. Biostatistics, Inc., New York.
- Schoen, D., Brown, A. 1995. Maximising genetic diversity in core collections of wild relatives of crop species. pp. 55-76. **In:** Core collections of plant genetic resources (T. Hodgkin, A. Brown, Th. van Hintum y E. Morales, eds.). John Wiley and Sons, Reino Unido.
- van Hintum, Th., Brown, A., Spillane, C., Hodgkin, T. 2003 Colecciones núcleo de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico Nro. 3 del IPGRI. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.
- Zambrano, A., Demey, J., Fuenmayor, F., Segovia, V., Gutiérrez, Z. 2003. Diversidad genética de una colección de yuca a través de marcadores moleculares RAPDS. *Agronomía Trop. Venezuela* 2 (53):155-174.

Trabajo recibido el 12 de junio de 2014 - Trabajo aceptado el 19 de junio de 2014

Editor:

Centro de Investigación en Forrajes "La Violeta"
CIF-UMSS

Año de publicación: 2014

Memoria electrónica del Primer Encuentro Internacional de la Tuna para Forraje como una Medida de Adaptación al Cambio Climático en Bolivia. Documento que presenta todos los trabajos expuestos y enviados para la reunión realizada en Cochabamba, en el mes de mayo de 2014. Además de los textos académicos, presenta videos ilustrativos sobre la utilización de la tuna con fines forrajeros. También presenta libros completos de la FAO, SEBRAE e ICARDA, sobre la tuna en especial y las zonas áridas en general. La publicación de la Memoria fue realizada con el apoyo de GIZ PROAGRO y el auspicio del Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras y el Vice Ministerio de Desarrollo Rural Agropecuario, a través del Instituto de Innovación Agropecuaria y Forestal.



Mayor información:

Centro de Investigación en Forraje "La Violeta"
www.agr.umss.edu.bo
Telf. 4316856, Fax 4315706
(Cochabamba, Bolivia)