

Universidad Peruana Cayetano Heredia
Facultad de Ciencias y Filosofía
"Alberto Cazorla Talleri"



Estudio poblacional y diversidad genética de los
cultivos primarios de *Chenopodium quinoa* en
Ayacucho, Perú

Tesis para optar por el título de licenciado en Biología

Francisco Miguel Menéndez Burns

Lima, Perú

2016

A la familia y la amistad

Agradezco al fondo de promoción de ciencia y tecnología por el financiamiento; a Germán de la Cruz por las muestras; a Edgar Neyra por el apoyo técnico y encausadas discusiones; a Giuliana Donayre por el ADN, apoyo técnico, dedicación al proyecto y su compañía durante las interminables horas en el laboratorio; a Carlos Merino por proporcionarme un lugar en el laboratorio; Emi Murata por ser la primera en leer mi borrador de tesis; a mis amigos que abnegadamente me han respaldado en incontables momentos ya sea con unas palabras o escapando de la realidad que nos aqueja a todos y finalmente a mi madre que sin ella nada de esto hubiese sido posible.

Asesor de Tesis: Carlos Merino Méndez, PhD

Aprobado siendo jurado:

Presidente: José Espinoza Babilón, PhD

Vocal: Daniel Guerra Giraldez, PhD

Secretaria: Irene Delgado de la Flor Montauban, MSc

Resumen

La quinua es una especie nativa del altiplano peruano y boliviano. Variantes nativas de los graneros de la región Ayacucho fueron colectados y sembrados en un campo experimental. Se tomaron muestras de ADN y genotipificaron mediante 13 marcadores codominantes SSR en 88 accesiones (N=88). Se evaluó la diversidad mediante H y se identificaron dos genotipos mediante el análisis exploratorio PCA y un árbol UPGMA. Se evaluó si la pertenencia a una provincia y el nivel de intercomunicación vial en la región afectaban los patrones de reproducción de la especie en la región. Se encontró que el germoplasma analizado es el más diverso de todos aquellos que han sido estudiados mediante marcadores SSR. Los resultados muestran que los alelos se distribuyen de independientemente de los patrones políticos. El efecto de estar separado por una red vial incompleta parece influir en la distribución de los genotipos encontrados.

Abstract

Quinoa is native to the Peruvian and Bolivian highlands. Land-races were collected from granary's throughout the Ayacucho region and were grown in a experimental field. DNA samples where taken and 88 samples (N=88) were genotyped with 13 SSR codominant markers. Diversity was measured through H and two genotypes were identified with the exploratory analysis PCA and an UPGMA tree. The region's germplasm was found to be the most diverse one studied through SSR markers to date. The effect of a socio-economic separation as produced by a lack of roads in the region on the reproductive patterns was put to test. We found that the separation caused by the lack of sound road infrastructure influenced the distribution of the two genotypes found.

Índice general

I.	Introducción	1
II.	Hipótesis	7
III.	Objetivos	9
IV.	Marco teórico	11
	IV.1. Equilibrio Hardy-Weinberg	11
	IV.2. Heterocigocidad	11
	IV.3. F_{ST}	12
	IV.4. Prueba t de Student	12
	IV.5. Prueba de rango con signo de Wilcoxon	13
	IV.6. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk	13
	IV.7. Prueba de homogeneidad de varianzas de Barlett	14
	IV.8. Método de regresión local	14
	IV.9. Distancia genética de Nei	14
	IV.10. Distancia euclideana	14
	IV.11. Prueba de Mantel	15
	IV.12. Análisis de componentes principales (PCA)	15
	IV.13. Árbol UPGMA	16
	IV.14. Bootstrap	16
	IV.15. Análisis Molecular de Varianza	16
V.	Materiales y métodos	17
	V.1. Material vegetal	17
	V.2. Aislamiento de ADN	17
	V.3. Revisión de la calidad y concentración de ADN	18
	V.4. Amplificación mediante PCR	18

V.5.	Visualización y escoreo de bandas	19
V.6.	Herramientas informáticas	19
VI.	Resultados	21
VI.1.	Diversidad	21
VI.2.	Alelos privados	24
VI.3.	Prueba de Mantel	24
VI.4.	PCA	25
VI.5.	AMOVA	25
VI.6.	F_{ST}	29
VI.7.	Árbol UPGMA	29
VII.	Discusión	33
VIII.	Conclusiones y recomendaciones	37
	Apéndices	45

Índice de figuras

1.	Mapa de Ayacucho	3
2.	H observada v esperada	22
3.	Tamaño de muestra y número de alelos	22
4.	PCA de las accesiones de la región Ayacucho	26
5.	Árbol UPGMA	31
6.	Modelos jerárquicos de estructuración genética	35

Índice de tablas

1.	Producción de <i>C. quinoa</i> en toneladas de las principales regiones del país del 2005 al 2013	6
2.	Provincias por zona	6
3.	Concentraciones de los reactivos para PCR	19
4.	Lista de Marcadores	20
5.	Diversidad por marcador	21
6.	Diversidad por provincia	23
7.	Diversidad por zona	24
8.	AMOVA provincia/zona	27
9.	Prueba de significancia provincias/zona	27
10.	AMOVA provincia/grupo	28
11.	Prueba de significancia provincias/grupo	28
12.	F_{ST} pareado entre provincias de Ayacucho	30
13.	F_{ST} por locus	30

I. Introducción

La quinua (*Chenopodium quinua*) es una especie cultivada en el altiplano andino desde hace miles de años. Gracias a su perfil nutricional, amplia biodiversidad y resistencia a condiciones de estrés salino e hídrico (1, 2) ha tomado lugar como cultivo alternativo de alto valor. Actualmente se cree que el centro de origen y lugar de domesticación es el altiplano de Perú y Bolivia, donde se concentra la mayor diversidad de la especie y la de sus parientes silvestres (3). Otros lugares de América donde se cultiva son Chile, Argentina y Ecuador. Existen pruebas de cultivo realizadas en otros países de Asia y África, donde se espera remplazar los cultivos menos nutritivos y ampliar los frentes agrícolas en lugares áridos y con alta salinidad (4).

El contenido proteico de la semilla varía de 12 % a 23 % del peso seco (5). Es comparable con el trigo (15.4 % del peso seco) pero con la ventaja de no contener gluten y poseer un perfil de aminoácidos completo, principalmente por el elevado contenido de lisina, muchas veces limitante en otros cereales (5). Es una buena fuente de vitaminas y minerales, pigmentos y químicos con potencial uso industrial (5).

Se estima que la domesticación de la quinua sucedió alrededor del año 5000 AEC en el altiplano de Perú y Bolivia (3, 6). Desde ahí se expande en rango hasta lo que es hoy en día Chile y Argentina y por el norte hacia lo que luego se convertiría en Ecuador y Colombia, siguiendo los movimientos migratorios de los pueblos indígenas americanos (7). El poblamiento de América sucede hace de 14.1 a 14.6 ka (8). La domesticación es el proceso por el cual los seres humanos toman el control sobre la reproducción de un organismo, modificándolo para sus propios fines (9). La domesticación de plantas depende en la capacidad del humano de recolectar la semilla, el hábitat natural de la especie y modo de crecimiento de la misma (10).

Hasta el momento, se han identificado 8 distintos ecotipos de quinua, basadas en diferencias en comportamiento, fenología, morfología, tecnología de cultivo, uso y resistencia a factores bióticos y abióticos (7). Estas responden al lugar de donde provienen. Estas son: quinua del altiplano, quinua de salares, quinua de valle inter-

andinos, quinua de zonas áridas y secas, quinua de puna, quinua costera, quinua de jungla y zonas tropicales y quinua de alta lluvia y humedad (7).

El Perú es actualmente el mayor productor de esta semilla a nivel mundial (11), seguido por Bolivia y Ecuador. En el Perú la producción de las regiones en orden descendiente es: Puno, Arequipa, Ayacucho, Junin y Cuzco (Tabla 1). El orden de las mismas por promedio producido en los últimos 10 años es: Puno, Ayacucho, Cuzco y Junin (Tabla 1).

En Ayacucho existen 11 provincias. Estas están separadas en 3 distintas zonas: norte, sur y centro. La separación es causada por la falta de comunicación vial existente entre ellas (12). La zona norte y sur ambas tienen una vía asfaltada que las atraviesa de este a oeste. Las provincias del centro se diferencian del resto teniendo únicamente trochas y vías afirmadas que las unen entre sí y a las demás provincias de la región (Ver figura 1). El cultivo de quinua en la región se caracteriza por estar organizado en comunidades campesinas compuestas de familias agricultoras. Estas comunidades mantienen y desarrollan los cultivos primarios de la especie en la región; la semilla es usada para fines comerciales y de autoconsumo (12).

En el altiplano encontramos una estructura ancestral agrícola que sirve para mantener la biodiversidad de una familia de especies: los aynokas. Esta estructura son parcelas con múltiples especies de la familia *Chenopodium*, mantenidas con el fin de siempre tener un pool genético diverso de donde alimentar las variedades cultivadas (13). No está claro si hoy en día se mantiene en todo el país principalmente debido a la erosión de las prácticas ancestrales a causa de la adopción de nuevas técnicas de cultivo (3). Generar y mantener una especie domesticada requiere de colecciones de variedades conservadas en material vegetal vivo, ya sea como una planta o semilla. Trazando un paralelo entre los aynokas y los germoplasmas, ambos buscan retener la mayor cantidad de variación posible sirviendo como herramientas para mantener la diversidad de los cultivos (13, 10).

Entre los meses de septiembre de 2012 y enero de 2013, bajo el marco del proyecto PROCYT 359-2012: “Seguridad alimentaria para el agricultor andino: La diversidad genética de *Chenopodium quinoa* (Quinoa) de la región sur de Ayacucho”, la Universidad San Cristóbal de Huamanga, colectó 135 accesiones de semillas en todas las provincias de Ayacucho. Estas fueron sembradas en el campo expe-

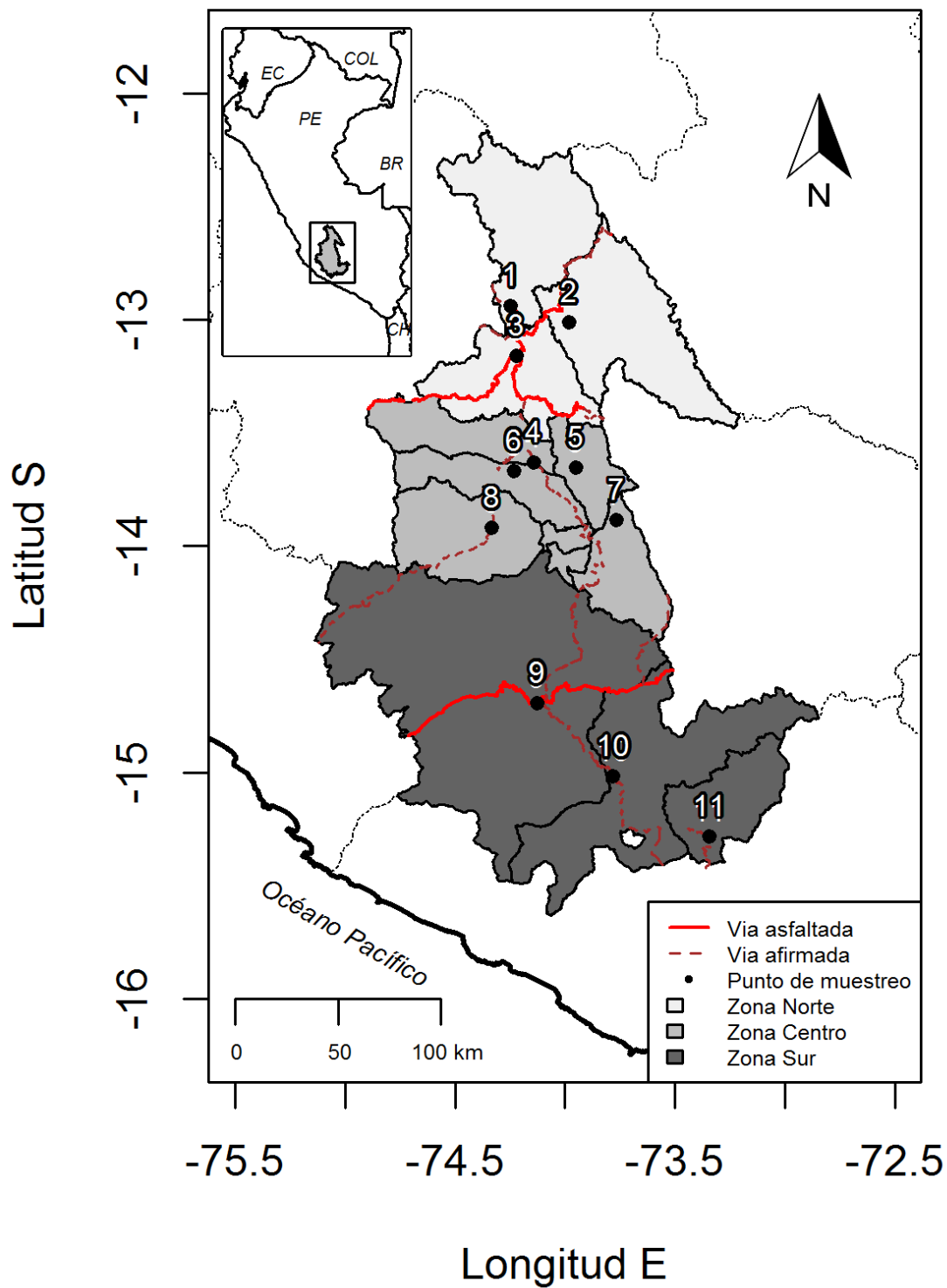


Figura 1: Mapa de Ayacucho. La ubicación de los graneros están marcadas con puntos y numeradas de norte a sur: 1) Huanta, 2) La Mar, 3) Huamanga, 4) Cangallo, 5) Vilcashuaman, 6) Víctor Fajardo, 7) Sucre, 8) Huancasancos, 9) Lucanas, 10) Parinacochas y 11) Paucar de Sara Sara.

rimental Canaán en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. De estas accesiones se tomaron 88 muestras y genotipificaron mediante marcadores *simple sequence repeat* (SSR). Tradicionalmente las variedades son adquiridas mediante la selección de características fenotípicas. En este estudio se describirá el germoplasma mediante sus características genéticas y lugar de procedencia.

La genética de poblaciones es el estudio de las frecuencias alélicas en una población. Se puede entender como una generalización del equilibrio Hardy-Weiberg pero a nivel poblacional (10). Una población es un grupo de individuos de una misma especie que comparten alelos mediante reproducción sexual. La diferenciación de poblaciones ocurre cuando existen barreras reproductivas entre ellas. Estas barreras pueden ser de distintos tipos. En el caso de la quinua en Ayacucho, región que se encuentra dividida por la falta de intercomunicación vial, se puede esperar que la movilización de un alelo desde un extremo de la región hasta el otro es un evento raro, especialmente si se considera que la especie es principalmente autógama; la especie muestra un nivel alto de autofecundación, alrededor de 80% (comunicación personal con Germán de la Cruz, Universidad Nacional San Critóbal de Huamanga). Aunque propiamente dicho, la genética de poblaciones estudia especies silvestres, se pueden aplicar varias de las técnicas a especies domesticadas, como se puede ver en casos previos (14, 15, 16). Al analizar estos resultados hay que tener en cuenta que siempre habrá un componente humano fuerte en los cambios de frecuencias alélicas.

Una manera de medir la diversidad es mediante la heterocigocidad (H). Resultados previos en quinua provenientes de otras poblaciones y germoplasmas muestran valores de H que varían de 0.2 a 0.9 con una media de 0.57 (17); 0.07 a 0.9 con una media de 0.65 (18); de 0.12 a 0.9 con una media de 0.57 (19); y de 0.45 a 0.94 con una media de 0.75 (20).

Hasta el momento, no se ha estudiado la diversidad genética y estructura poblacional de la quinua en Ayacucho. Para evaluarla se utilizó marcadores *Simple sequence repeat* (SSR). Los marcadores utilizados en este estudio fueron desarrollados específicamente para quinua (21, 19). La elección del marcador fue basado en la facilidad de uso e interpretación y su uso extendido en estudios en quinua

(18, 19, 20).

Un marcador genético es una región en un cromosoma que permite identificar alguna característica heredable en un individuo. Los marcadores SSR son secuencias cortas (2-4 bp) repetitivas que pueden variar en el número de repeticiones encontradas. Su mecanismo de mutación es común entre todos los tipos de regiones repetitivas del genoma y produce numerosas variantes del marcador en poco tiempo (22). Los marcadores SSR tienen la particularidad de expandirse y contraerse en tamaño entre generaciones dependiendo de su tamaño (23). Estos loci son amplificados mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante este proceso de clonación ocurren deslizamientos de la DNA polimerasa lo que produce bandas con menos repeticiones; Estas bandas que acompañan a los alelos verdaderos son llamadas bandas fantasma, o en inglés *stutter bands* (24).

La quinua es una especie alotetraploide que exhibe herencia disómica (25). La quinua se originó de dos especies distintas. Tiene dos copias de cada una de estas dos especies ancestrales lo que la hace que su genoma completo es igual a 4 copias ($2n=4x$). Por otro lado, al exhibir segregación disómica, la recombinación solo sucede entre cromosomas de la misma especie ancestral, logrando que solo se expresen 2 copias a lo sumo de una característica (26). Esto se extiende a los SSR en tal que no existe recombinación entre cromosomas no homólogos, observándose solo 2 bandas a lo sumo cuando se amplifican.

Tabla 1: Producción de *C. quinoa* en toneladas de las principales regiones del país del 2005 al 2013

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Promedio
Nacional	32589,9	30427,91	31823,87	29866,95	39396,63	41078,5	41181,69	44212,6	52129,77	38078,65
Junín	949	1049,13	1096,15	1145,49	1453,65	1585,66	1448,3	1881,91	3852,26	1606,84
Huancavelica	122,25	148,1	172,8	274,79	411,8	357,85	429,28	500,96	671,25	343,23
Arequipa	257,36	267,9	280,5	264,18	473,02	650,44	1012,81	1683,22	5326,45	1135,1
Ayacucho	1031	1368	1209	1721	1771	2368	1444	4188	4925	2225
Apurímac	585,02	893,76	933,74	903,53	960,09	1212,2	1261,9	2095,07	2009,96	1206,14
Abancay	386,09	320,07	267,3	223,48	257,53	351,06	350,45	427,95	532,89	346,31
Andahuaylas	198,93	573,69	666,44	680,05	702,56	861,14	911,45	1667,12	1477,07	859,83
Cusco	796	1075,05	1492,63	1776,2	2027,65	1890,35	1796,4	2231	2817,88	1767,02
Puno	27719	24652	25667	22691	31160	31951	32740,25	30179	29331,3	28454,51

Fuente: MINAGRI 2013

Tabla 2: Provincias por zona

Zona	Provincia
Sur	Lucanas, Parinacochas, Paucar de Sara Sara
Centro	Cangallo, Huancasancos, Victor Fajardo, Sucre, Vilcashuaman
Norte	Huamanga, Huanta, La Mar

II. Hipótesis

La hipótesis del presente estudio es: Existe estructuración poblacional en la región de Ayacucho.

III. Objetivos

El objetivo general del estudio es:

- Evaluar la diversidad y estructura poblacional de las accesiones de quinua de la región Ayacucho.

Los objetivos específicos del mismo son:

1. Cuantificar la diversidad genética en los cultivos primarios de la región mediante marcadores SSR.
2. Evaluar la estructuración poblacional en la región mediante la cuantificación de distancias genéticas.

IV. Marco teórico

IV.1. Equilibrio Hardy-Weinberg

El equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) describe el comportamiento de las frecuencias alélicas en un escenario neutral. La formula general para 2 alelos es:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Donde p y q representan las frecuencias de dos alelos en un locus bi-alélico. El HWE nos provee de un modelo nulo donde podemos poner a prueba distintos supuestos. Algunos de estos son:

- Panmixia
- Población infinita
- Migración nula
- La tasa de mutación de ambos alelos es similar

Rara vez se encuentran poblaciones que estén en equilibrio (27).

IV.2. Heterocigocidad

La heterocigocidad esperada H_S es la proporción de alelos heterocigotos. Esta se depende al despejar la proporción de heterocigotos de la ecuación de HWE: $2pq = 1 - (p^2 + q^2)$. La misma se calcula de manera generalizada mediante la siguiente fórmula

$$H = 1 - \sum_{i=1}^{m(k)} p_i^2$$

(28)

Donde p_i representa la frecuencia de una variante alélica y $m(k)$ es el número total de variantes de k alelos. Otra manera de ver el valor de H es como la probabilidad de que un locus cualquiera tenga un individuo heterocigoto. Sirve como una medida

de diversidad. El promedio de heterocigocidad para todos los locus de un individuo se calcula sumando todos los locus y promediando la heterocigocidad, tal que

$$H = \frac{1}{k} \sum_{k=1}^k \left(1 - \sum_{i=1}^{m(k)} p_i^2\right)$$

(27)

La heterocigocidad observada es simplemente la frecuencia de heterocigotos encontrados en la muestra (27).

IV.3. F_{ST}

El índice de fijación alélica F_{ST} mide la reducción de H debido a la divergencia de frecuencias alélicas en una subpoblación. Es la diferencia entre la heterocigocidad total (H_T) y la heterocigocidad esperada (H_S) promedio entre subpoblaciones.

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

(28)

La H_T es la multiplicación del promedio de cada frecuencia alélica por 2, donde las frecuencias alélicas son calculadas de todos los individuos como una población única. En la situación ideal de panmixia, la frecuencia de cada alelo debería ser igual sin importar la pertenencia a una subpoblación. La diferencia de estos dos valores es causada por frecuencias alélicas distintas en cada subpoblación. Varía de -1 a 1; valores negativos significan que la divergencias alélicas entre subpoblaciones ha causado un exceso de heterocigotos, según lo que podría esperarse en HWE; valores positivos significan un déficit de heterocigotos, un escenario causado por la fijación alélica. Adicionalmente, puede entenderse como la probabilidad de que dos alelos muestreados al azar de una subpoblación sean idénticos dado que dos alelos muestreados de la población total sean idénticos (27).

IV.4. Prueba t de Student

La prueba t de Student es una prueba de hipótesis estadística que sigue la distribución de Student. Sirve para comparar la medida de tendencia central de dos

grupos experimentales. En el presente estudio se trabajó con grupos con varianzas no homogéneas y tamaños distintos. Para ese caso el estadístico t se calcula de modo:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

donde

$$s_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2} = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

Es el estimador parcial de la varianza. s es la varianza; n es el número de individuos en la muestra; \bar{X} es el promedio estimado. Los grados de libertad (gl) se calculan de modo:

$$gl = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{(s_1^2/n_1)^2/(1 - n_1) + (s_2^2/n_2)^2/(1 - n_2)}$$

(29)

IV.5. Prueba de rango con signo de Wilcoxon

La prueba de Wilcoxon compara a medida de tendencia central de grupos de forma no paramétrica. Se utiliza en la comparación de dos grupos similares o emparentados, para probar si los rangos de la media poblacional son diferentes. Los supuestos son: 1) las muestras son aleatorias e independientes; 2) la variable a comparar es continua; 3) Los valores medidos tienen la propiedad de ser al menos de carácter ordinal (29).

IV.6. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

La prueba de Shapiro-Wilk calcula un estadístico W que permite probar si una muestra aleatoria proviene de una distribución normal. La hipótesis nula en esta prueba es de que la distribución de la muestra mantiene una distribución normal (30, 31).

IV.7. Prueba de homogeneidad de varianzas de Barlett

La prueba de Barlett permite comparar si k muestras independientes provienen poblaciones con varianzas similares. La hipótesis nula es que las varianzas de las k muestras son similares; la hipótesis alternativa es que por lo menos una de las muestras proviene de una población con varianza distinta (32, 33).

IV.8. Método de regresión local

Para describir el comportamiento entre dos variables de manera gráfica se utilizó el método de regresión local (LOESS). Este método no paramétrico no toma supuestos sobre la regresión al ajustar distintos modelos de regresión sobre distintos segmentos de los datos. Para determinar los subconjuntos de datos que se usan para cada ajuste se toma subconjuntos determinados por un algoritmo de *nnearest neighbors* (34, 35).

IV.9. Distancia genética de Nei

Según Nei (36): sea x_i e y_i , la frecuencia del alelo i en una población X o Y respectivamente. La probabilidad de identidad es $j_X = \sum x_i^2$ en una población X y $j_Y = \sum y_i^2$ en una población Y . La probabilidad de identidad entre un locus X y Y es $j_{XY} = \sum x_i^2 y_i^2$. La identidad normalizada entre un gen X e Y es:

$$I_j = j_{XY} / \sqrt{j_X j_Y}$$

Para todos los loci:

$$I = J_{XY} / \sqrt{J_X J_Y}$$

Donde J_{XY} , J_X y J_Y son las medias aritméticas de las frecuencias j_{XY} , j_X y j_Y respectivamente. La distancia es definida como:

$$D = -\ln I$$

IV.10. Distancia euclídeana

La distancia euclídeana está definida tal como el largo de un segmento de línea que une dos puntos p y q (\overline{PQ}) en un espacio euclídeano. En un espacio n

dimensional mediante la fórmula de Pitágoras:

$$d(p, q) = \sqrt{\sum_{i=1}^n (p_i - q_i)^2}$$

(37)

IV.11. Prueba de Mantel

La prueba de Mantel es una prueba estadística que permite evaluar la correlación entre dos matrices. Estas deben ser del mismo rango (número de columnas) y sus vectores pertenecen a los mismos objetos. En el caso estudiado, los objetos son las poblaciones estudiadas. La correlación se basa en permutaciones que cambian el orden de las columnas. La significancia es obtenida de la proporción de las permutaciones que aumentan el coeficiente de correlación. La hipótesis nula es que la modificación del orden debería producir correlaciones mayores y menores de manera indistinta. (38, 39).

IV.12. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales es una transformación lineal ortogonal, que resulta en un set de datos en el cual la mayor variación recae en el eje principal y la segunda mayor variación recae en el segundo eje. Sirve como herramienta de reducción de dimensionalidad. El proceso general es:

1. La normalización y escalamiento de la data
2. La construcción de una matriz de covarianza
3. El cálculo de los autovalores (*eigenvalues*) y los autovectores (*eigenvectors*)
4. La transformación de la data original con los autovectores retenidos
5. El ploteo de la nueva data con dimensiones reducidas

Este tipo de análisis tiene muchos usos pero genera información que es poco interpretable. Es mejor ver el resultado como un agrupamiento de tendencias y comportamientos de las variables en conjunto (40).

IV.13. Árbol UPGMA

Los árboles *Unweighted Pair Group with Arithmetic mean* (UPGMA) son un método exploratorio que agrupa jerárquicamente individuos basados en las similitudes pareadas entre grupos. El resultado es un árbol filogenético basado en una matriz de similitud. Es sin ponderación (*unweighted*) ya que todas las distancias contribuyen de igual modo al árbol; tiene grupos pareados (*paired*) ya que siempre se generan grupos en pares y utiliza la media aritmética (*arithmetic mean*) para ir encontrando las nuevas distancias entre los pares. Los árboles construidos mediante este método son ultramétricos ya que asumen una tasa de mutación constante entre todos los individuos (41).

IV.14. Bootstrap

Los métodos *Bootstrap* son métodos de re-muestreo con remplazo iterativos. Este método estadístico puede ser utilizado para otorgar intervalos de confianza a un árbol filogenético. En este caso se crea una gran cantidad de copias de las muestras y toma una cantidad de eventos, creando grupos del mismo tamaño de la muestra original con la esperanza de encontrar la distribución original de la población de la cual fue tomada la muestra (42).

IV.15. Análisis Molecular de Varianza

El AMOVA es la prueba que permite cuantificar la variación molecular de una población, mediante un formato parecido al análisis de varianza tradicional. Este produce estimadores de la varianza y análogos al F_{ST} . Estos estimadores reflejan una correlación entre la diversidad de haplotipos y los distintos niveles de subdivisión (43).

V. Materiales y métodos

V.1. Material vegetal

El material vegetal fue gentilmente provisto por Germán de la Cruz, jefe del laboratorio de genética y biotecnología vegetal y profesor de la UNSCH, para la elaboración del presente estudio. Para la colecta se realizaron varios viajes a las diferentes provincias de la región Ayacucho, entre septiembre de 2012 hasta enero de 2013. Las semillas colectadas fueron lavadas y almacenadas temporalmente hasta su llegada al campo experimental Canaan de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNSCH. Se colectó material vegetal fresco el cual fue llevado a la unidad de genómica de la UPCH donde se procedió con la extracción de ADN. Se tomaron 88 accesiones (N=88) para el presente estudio, las mismas abarcan 10 provincias de la región (Huamanga, Huanta, La Mar, Cangallo, Huancasancos, Victor Fajardo, Sucre, Vilcashuaman, Lucanas y Parinacocha). El registro pasaporte se puede encontrar en el apéndice C.

V.2. Aislamiento de ADN

Para la extracción de ADN se separó 100 mg de material vegetal los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido y trituradas hasta lograr un polvo fino el cual fue llevado a un tubo de centrifuga de 2 ml. Al mismo se le adicionó 700 μ l de tampón de extracción (CTAB 2X, 1.4 mol NaCl, 20 mmol EDTA, 100 mmol TrisHCL pH=8 y PVP 1%) y 2 μ l de β -mercaptoetanol para luego homogenizar suavemente. Se dejó incubar una hora a 65 °C. Pasado el tiempo de incubación se le adicionó un volumen igual (700 μ l) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Después se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, creando 2 fases, una polar (acuosa) y una apolar. Se procedió a separar cuidadosamente la fase acuosa y transferirla a un tubo nuevo de 1.5 ml, a cual se le adicionaron 50 μ l de tampón de precipitación (CTAB 10X, 0.7 mol NaCl, 20 mmol EDTA, 100 mmol TrisHCL pH=8) y se homogenizó volteando el tubo suavemente. Luego se adicionó un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos, pasado los cuales se separó nuevamente la capa acuosa superior a un nuevo tubo de

1.5 ml. A este se le adicionó 500 μl de isopropanol y se dejó a -20°C por 12 horas. Pasado el tiempo de precipitación, se centrifugó a 14000 rpm creando un *pellet* de ADN en el fondo del tubo. El líquido sobrenadante se descartó y se procedió a realizar dos pasos de lavado con etanol (80 % y 90 %) centrifugando el tubo cada vez a 14000 rpm por 10 minutos. El etanol se descartó y el *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente para luego disolverlo en 100 μl de agua tipo 1. El ADN disuelto se incubó con 2 μl de RNAsa a 37°C por una hora. Luego de haber revisado la calidad de los mismos se prepararon alícuotas a una concentración de $100\text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ para su uso en PCR. Las muestras pueden ser almacenados a -20°C por 6 meses o a -80°C para almacenar a largo plazo (recomendado para la solución *stock*).

V.3. Revisión de la calidad y concentración de ADN

Las muestras de ADN fueron evaluadas mediante espectrofotometría, determinando la concentración de nucleótidos mediante la absorbancia a 260 nm. Se observó a su vez la relación 260/280; una relación 260/280 en el rango de 1.8 a 2 es considerada ADN puro (44). Para comprobar la integridad del ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % mediante trans-iluminación con bromuro de etidio. Para darle mayor viscosidad a la muestra de DNA se mezcló 2 μl de la misma con 4 μl de *loading dye* ($0.5\text{ } \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$). Cada gel tuvo un pocillo dedicado a un marcador de peso molecular (GeneRuler®1Kb DNA Ladder).

V.4. Amplificación mediante PCR

Los iniciadores de los marcadores fueron sintetizados por *Integrated DNA Technologies* (IDT). Los cebadores forward llevan una secuencia adicional M13 (Li-Cor), 5' - CACGACGTTAAAACGAC - 3', que permite la unión del fluorógeno IRDye 700/800nm (Li-Cor). La temperatura de *annealing* y la concentración del MgCl_2 fueron provistas por Giuliana Donaire Tataje (Universidad Nacional Agraria La Molina) mediante una comunicación personal. En la tabla 3 se pueden ver las concentraciones de los reactivos para una reacción de PCR.

Los marcadores utilizados provienen de 3 referencias distintas (ver tabla 4). Estos fueron elegidos en base a su representatividad en el genoma, según su grupo

Tabla 3: Concentraciones de los reactivos para PCR

Componente	Concentración	Volumen/reacción (μ l)
H ₂ O	-	3.5
PCR buffer	1X	2
MgCl ₂	2.5 mmol	1
dNTP	0.2 mmol	0.2
Cebador forward	0.3 μ mol	0.3
Cebador reverse	0.3 μ mol	0.3
M13-800/700	0.02 nmol	0.6
Taq polimerasa	0.05 U	0.1
ADN	10 ng	2

de ligamiento y por los valores de H, además de la experiencia previa de grupo de trabajo de quinua de la unidad de genómica de la UPCH (comunicación personal con Giuliana Donaire Tataje). Cada reacción fue controlada con un pocillo negativo. El perfil de amplificación fue de 94 °C por 45s, temperatura de *annealing* (TA) °C por 30s (ver TA en la tabla 4), 72 °C por 1 min y finalmente un paso de extensión a 72 °C por 10 min.

V.5. Visualización y escoreo de bandas

Para visualizar el ADN amplificado y determinar su peso molecular se utilizó el sistema Li-Cor DNA Analyser 4300. Este instrumento utiliza un gel de poliacrilamida que permite detectar diferencias de hasta 1 bp. El análisis está acoplado al programa SAGA Generation versión 3.2 (Li-Cor, Lincoln, NE) que otorga tamaños a las bandas de manera semi-automatizada.

V.6. Herramientas informáticas

El análisis de datos fue llevado a cabo usando el lenguaje de programación R (45). Adicionalmente se usaron los paquetes *adegenet* (46, 47), *poppr* (48, 49),

Tabla 4: Lista de Marcadores

Loci	Motivo	TA °C	Cebador forward	Cebador reverse	Referencia
KAA007	(AAT) ₃₀	60	aggtacaggcgcaaggatac	cggtagcatagcacagaacg	(19)
QCA14	(GT) ₂₁ (GA) ₁₂	60	gcttctctgagctgattatcaaaggac	cctcttgcgagatttctgct	(20)
QGA001	(GAA) ₆₅	60	ttgtatctcggttccact	aaccagagagatgaagaacatgc	(17)
QGA17	(TG) ₈ AAG(GA) ₁₆	60	ttacggttctcccggtctc	gcttcttgcacaacaagaagatgaag	(20)
KGA16	(GA) ₂₂	60	ccctgcttaatctcgtgaa	gcttctcgaaccaagactacgaaca	(20)
QAAT071	(ATT) ₃₀	60	catcaccgctgaatagacac	gcttcttaccctaatgccagattcc	(20)
QAAT084	(AAT) ₁₂	60	gtggatgtaaaagtggttt	acaacttattttagctagattatt	(17)
QAAT081	(AAT) ₁₇ (ACTATT) ₁₅ (ATT) ₅	60	accctctgcatcacaagctc	gctcccaccaatttctgt	(17)
KGA20	(CT) ₂₂	60	tcacctacctcggtaaaggaaa	ggagcagatgatgaacatgg	(19)
KCAA011	(ATT) ₅ AAC(AAT) ₅ ACT(AAT) ₄ ACT(AAT) ₁₃	60	tgaacccgctcaacaatg	ccttctcaaacctccaatcc	(19)
QAAT050	(AAT) ₁₇	60	ggcacgtgctgctactcata	gcttctatggcgaatggtaatttgc	(20)
QGA028	(AAT) ₂₂	60	ataaacctccgatggcaaa	cagccacctggcagttaga	(17)
QAAT012	(AAT) ₁₀	54	tcaagtgggatgctttaa	ccgacagacgaggagacaa	(17)

mmod (50), ape (51) y ade4 (52, 53, 54) para el análisis bioinformático, como el cálculo de H , F_{ST} , AMOVA, distancia genética y PCA; el árbol y el bootstrap acompañante fue creado con el paquete phangron (55) y ape; los gráficos fueron generados con el paquete ggplot2 (56); el mapa fue generado con rgdal (57) y rgeos (57); se utilizó el paquete plyr (58) para la manipulación y ordenamiento de datos.

VI. Resultados

Un electroferograma obtenido en el LI-COR® puede ser observada en el apéndice A. En la misma se pueden ver la presencia de amplicones “fantasma”. Las bandas con mayor intensidad son seleccionadas, hasta dos por individuo. La mayoría de loci amplificados en el experimento muestran dos alelos; las accesiones que mostraron mas de 2 alelos se eliminan, habiendo sucedido una polinización entre accesiones. Una tabla con los genotipos utilizados se muestra en el apéndice B.

VI.1. Diversidad

Uno de los principales objetivos fue el de determinar la diversidad de la región. La diversidad puede ser medida de varias maneras. De manera mas simple es un listado de las variantes, o la riqueza (Ver tabla 5). La riqueza alélica total es de 263 alelos entre las 82 accesiones. En promedio, el número de alelos por loci fue de 20, con un rango de 6 hasta 50 (QAAT081 y KAAT007 respectivamente). El rango de pares de bases promedio fue de 67 bp.

Tabla 5: Diversidad por marcador. Las columnas marcadas con (ref) muestran los resultados respectivos a los mismos.

Locus	Número de alelos	Rango de alelos	H_O	H_S	Número de alelos (ref)	Tamaño o rango (ref)	H_S (ref)	Referencia
QCA14	14	193-223	0.74	0.88	8	196-211	0.59	(20)
QGAA001	25	143-362	0.62	0.91	13	279	0.9	(17)
QGA17	21	180-206	0.35	0.92	8	145-164	0.52	(20)
KGA16	17	187-203	0.21	0.92	9	155-196	0.76	(20)
QAAT071	17	146-215	0.23	0.89	25	122-200	0.92	(20)
QAAT084	15	164-215	0.41	0.86	8	163	0.85	(17)
QAAT081	6	206-216	0.35	0.66	9	249	0.83	(17)
KGA20	29	168-230	0.97	0.95	2	177	0.44	(19)
KCAA011	22	205-263	0.28	0.91	9	225	0.84	(19)
QAAT050	14	214-256	0.23	0.88	27	158-246	0.98	(20)
QGA028	18	194-232	0.19	0.88	5	195	0.79	(17)
QAAT012	15	189-240	0.23	0.83	8	188	0.81	(17)
Promedio	20	67	0.40	0.88				

En la tabla 5 se muestran los valores obtenidos de H_S , el rango de los alelos en pares de bases (bp) y el número de alelos encontrados en la población estudiada,

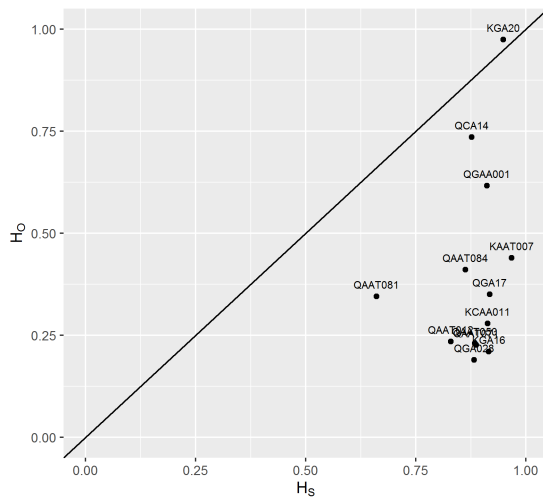


Figura 2: H observada v esperada. La línea traza la correlación perfecta de 0 a 1. En una situación de equilibrio los puntos caerían sobre la línea. Se puede observar que la mayoría de puntos yacen debajo de la línea, esto refleja la baja H_O .

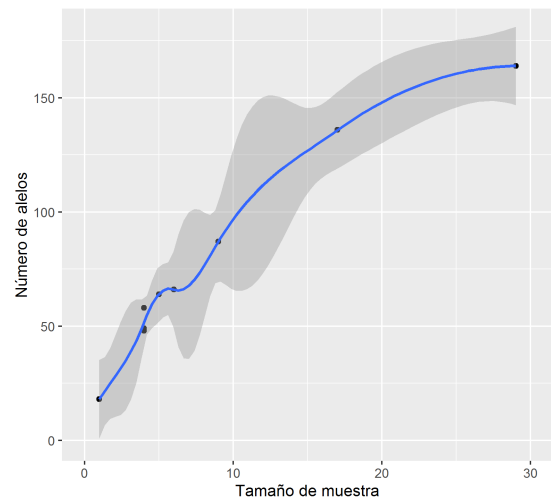


Figura 3: Tamaño de muestra y número de alelos. Se ha ajustado una curva LOESS a la dispersión. Se puede ver que la cantidad de alelos está correlacionada con la cantidad de individuos por punto de muestreo.

tanto del actual estudio como el de las referencias de donde se obtuvieron los marcadores. Se puede ver que en solo 3 de los marcadores (QAAT071, QAAT081 y QAAT050) hay una mayor cantidad de alelos. Únicamente en el estudio hecho por Mason et al. (17) se reportaron los rangos, mientras que en los otros dos se reportó un tamaño esperado. En la mayoría de los casos se puede ver que los tamaños reportados caen dentro del rango encontrado en el presente estudio, con la excepción de los loci QAAT084 donde el tamaño reportado por Christensen et al. (20) esta fuera por un nucleótido y QAAT050 donde se reportan alelos desde 154 bp, mientras que en Ayacucho los alelos de menor tamaño para ese locus fueron de 214 bp. La H_S es similar con la excepción del loci KGA20 y QCA14 donde fueron considerablemente menores (0.44 vs. 0.95 y 0.59 vs. 0.88, respectivamente).

La H_O fue en general menor a la H_S , con una media de 0.4 (prueba Wilcoxon con signo, $V = 90$, $p = 0.0002441$) ver figura 2. No se hallaron diferencias entre la cantidad de alelos encontrados en los marcadores con repeticiones de tres nucleóti-

Tabla 6: Diversidad por provincia

Provincia	Número de muestras	Número de alelos	H
Sucre	17	136	0.84
Huamanga	29	164	0.84
Huancasancos	4	49	0.66
La Mar	5	64	0.72
Cangallo	5	64	0.73
Huanta	1	18	0.19
Víctor Fajardo	4	58	0.71
Vilcashuaman	4	48	0.63
Lucanas	9	87	0.76
Parinacochas	6	66	0.68
Promedio	8	75	0.676

dos (promedio 20.5, $n=8$) y los de dos nucleótidos (promedio 19.5, $n=5$) (prueba t no pareada con varianzas distinta, $t=0.1316$, $gl=10.225$, $p=0.8978$).

El muestreo obtuvo una cantidad promedio de 8 individuos por provincia con un rango de 1 individuo hasta 29 (Huanta y Huamanga respectivamente). La cantidad de alelos incrementa con la cantidad de individuos en la muestra (figura 3).

La diversidad encontrada por provincia fue en promedio 0.675. Se puede ver que los valores mas altos de H se encuentran en las provincias con mayor número de alelos. Según los resultados de la tabla 6 se puede ver que las provincias con la mayor diversidad son Sucre y Huamanga (0.84 para ambos); Sucre se encuentra en el centro mientras que Huamanga se encuentra al norte y es además la capital de la región.

Si repartimos a las accesiones por zonas encontramos una H promedio de 0.83. La zona con mayor H y número de alelos es la zona centro, mientras que la que tiene mayor número de individuos es la zona norte (ver tabla 7). El efecto Wahlund nos dice que en poblaciones subdivididas el promedio de H es menor que la H total. En nuestros resultados podemos ver que el promedio de H al dividir las accesiones

Tabla 7: Diversidad por zona

Zona	Número de muestras	Número de alelos	H
Centro	34	194	0.87
Norte	35	181	0.85
Sur	15	113	0.77
Promedio	28	162,67	0.83

por provincia es de 0.676 mientras que al dividir las en zonas la H es de 0.83. Esta reducción de H sucede porque en poblaciones subdivididas hay un déficit de heterocigosis comparado con poblaciones en panmixia (27). Al estar menos subdividida la H aumenta.

VI.2. Alelos privados

Se identificaron los alelos privados de las provincias. La única provincia que presentó alelos privados fue Sucre, 5 para el locus QAAT071 y 7 para el locus QAAT012.

VI.3. Prueba de Mantel

La distancia es siempre un factor que tomar en cuenta cuando se analiza la probabilidad de que dos individuos se reproduzcan. Ayacucho tiene campos y graneros alejados entre si, siendo los mas extremos La Mar (norte) y Parinacochas (sur). Para evaluar si esta separación geográfica influye en la divergencia genética se realizo una prueba de correlación matricial, también conocido como la prueba de Mantel, entre una matriz de distancia física y otra de distancia genética. Esta prueba se interpreta como una regresión. Se calculó la distancia genética de Nei entre las provincias y la distancia lineal entre las mismas. Se encontró que la distancia genética entre las provincias no estaba correlacionada con la distancia geográfica. La prueba fue llevada a cabo 99999 veces arrojando una correlación fue de 0.166 y un valor p de 0.2.

Una segunda prueba fue llevada a cabo, agrupando las accesiones por zona y se encontró una correlación alta, pero poco significativa, entre la distancia genética y la distancia geográfica. Los puntos fueron creados promediando las coordenadas creando así un centroide para cada zona. La prueba fue llevada a cabo 99999 veces arrojando una correlación de 0.978 y un valor p de 0.166.

VI.4. PCA

Con la finalidad de poder definir la estructura del conjunto de alelos e individuos se realizó un análisis de componentes principales. El análisis de componentes principales logró resumir en total 8.54 % de la variación; el componente 1 (PC1) contiene 5.18 %; el componente 2 (PC2) contiene el 3.36 %. Los 5 alelos que contribuyen en mayor medida al PC1 son (léase *locus.alelo*) QAAT081.206, QAAT081.207, QAAT084.200, QGA17.198 y KCAA11.235. Los 5 alelos que contribuyen en mayor medida al PC2 son KGA16.203, QAAT012.201, QAAT071.173, QAAT012.207 y el QAT050.220.

Como se puede apreciar en la figura 4, el PC1 separa a los individuos en 2 grandes grupos. La distancia en un eje de componente está correlacionada con la divergencia genética (59). Esto entonces muestra a dos grupos genéticos que comparten una historia de vida (refiérase al grupo 1 y grupo 2). La pertenencia a una zona fue tomada en cuenta; los individuos de la zona centro y norte se encuentran en ambos grupos mientras que los que pertenecen a la zona sur únicamente se encuentran en el grupo 2.

VI.5. AMOVA

La estructuración poblacional fue puesta a prueba mediante un análisis molecular de varianza. La prueba de AMOVA nos permite poner a prueba la estructuración poblacional. Mediante comparaciones de índices de fijación se evalúa si una agrupación contiene la variación de manera no aleatoria. El primer nivel de estructuración puesto a prueba fue el de provincias. El efecto de la división por zonas fue evaluada también, poniéndose por encima de las provincias (ver tabla 8). La prueba realizada indica que la divergencia ocurre debido a estructuración

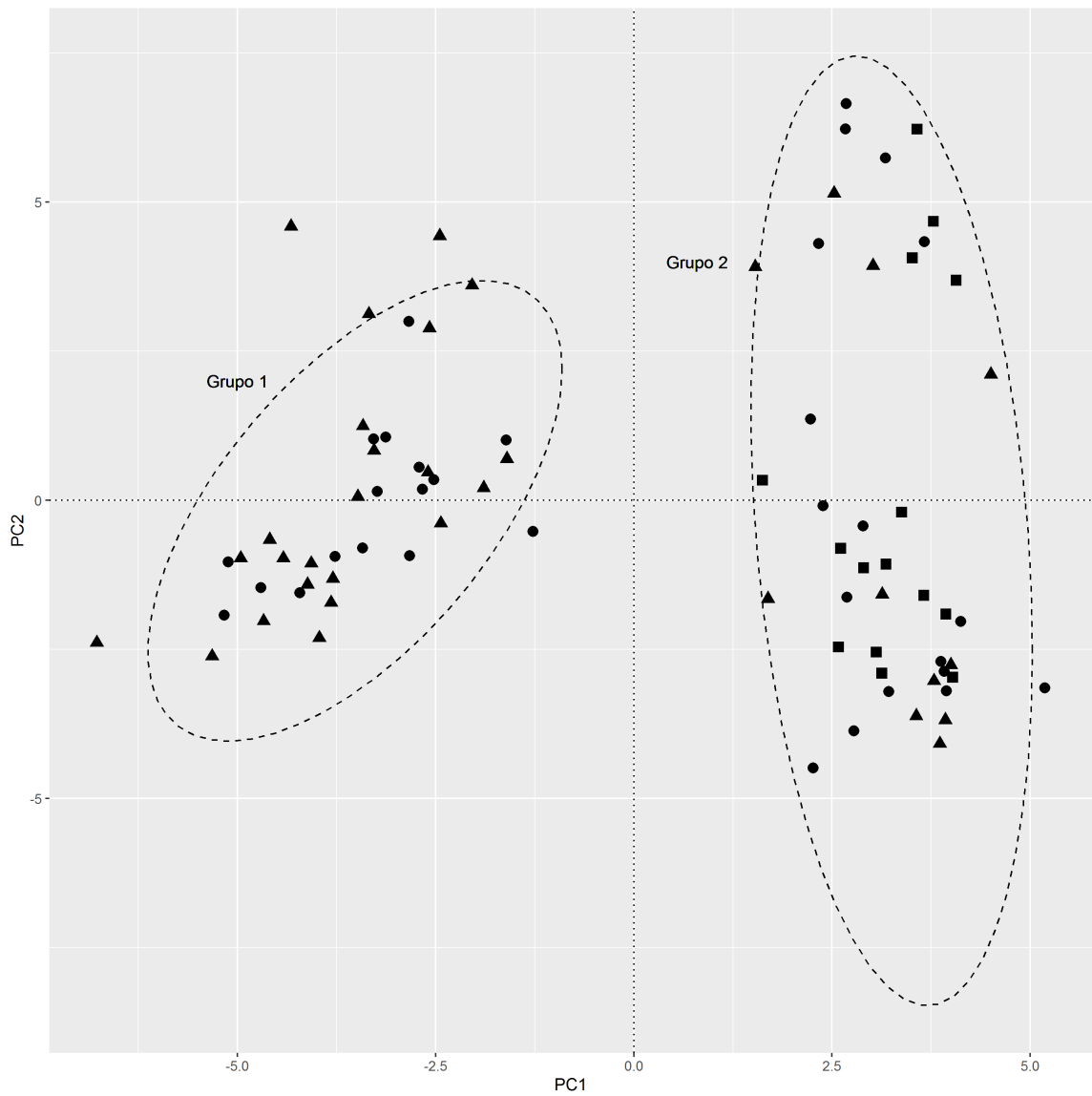


Figura 4: PCA de las accesiones de la región de Ayacucho. Cada punto representa a un individuo (■ sur, ▲ centro, ● norte). Los puntos se separan en dos grupos a lo largo del PC1 (grupo 1 y grupo 2). En los dos grupos se puede ver individuos del centro y norte pero únicamente el grupo 2 tiene individuos de la zona sur.

entre provincias. La mayor variación se encuentra entre las accesiones dentro de las provincias (57.8 %) seguido por la variación dentro de las accesiones (38.77 %). La prueba de permutación expuesta en la tabla 9 evalúa si de manera aleatoria la variación calculada mediante en las repeticiones (\bar{S}) es mayor o menor a la observada por la prueba (σ). Podemos ver que en todos los casos se puede afirmar que la variación que ocurre por en la muestra es distinta a la que se observa en las repeticiones (ver tabla 9).

Tabla 8: AMOVA provincia/zona. Se muestran los grados de libertad (gl), la suma de cuadrados (SC), el cuadrado medio (CM), la varianza (S), y el porcentaje de la varianza (S %)

Nivel jerárquico	gl	SC	CM	σ	S %
Entre provincias dentro de zonas	7	71,18	10,17	$9,88 \cdot 10^{-2}$	1,69
Entre accesiones dentro de provincia	74	667,2	9,02	3,38	57,88
Dentro de accesiones	84	190	2,26	2,26	38,77
Total	167	961,99	5,76	5,83	100

Tabla 9: Prueba de significancia provincias/zonas (999 réplicas). Se muestra la varianza observada (σ), la varianza calculada por as permutaciones (\bar{S}), la hipótesis alternativa (H_a) y la probabilidad de ver de manera fortuita un componente mas extremo de los valores observados (p).

Fuente de variación	σ	\bar{S}	H_a	p
Variación entre provincias	$9,88 \cdot 10^{-2}$	1,89	mayor	$4,2 \cdot 10^{-2}$
Variación entre accesiones	3,38	28,05	mayor	$1 \cdot 10^{-3}$
Variación dentro accesiones	2,26	-45,91	menor	$1 \cdot 10^{-3}$

Con el fin de poner a prueba los resultados encontrados en el PCA, se repitió la prueba pero agrupando las provincias según los grupos del PCA (ver tabla

10). Se encontró que nuevamente que la mayor cantidad de variación proviene de la divergencia entre los individuos de las provincias (51.02 %) seguido por la variación entre el nivel más básico, las accesiones (37.27 %). En este caso no se pudo probar que la variación causada por la divergencia entre las provincias es mayor a la causada en eventos aleatorios, mientras que los demás niveles de variación si probaron ser significativos (ver tabla 11).

Tabla 10: AMOVA provincia/grupo. Se muestran los grados de libertad (gl), la suma de cuadrados (SC), el cuadrado medio (CM), la varianza (S), y el porcentaje de la varianza (S %)

Nivel jerárquico	gl	SC	CM	σ	S %
Entre provincias dentro de grupos	15	134,8	8,99	$5 \cdot 10^{-2}$	0,89
Entre accesiones dentro de provincias	65	554,1	8,52	3,12	51,03
Dentro de accesiones	82	187	2,28	2,28	37,27
Total	163	939,56	5,76	6,12	100

Tabla 11: Prueba de permutación provincias/grupo (999 réplicas). Se muestra la varianza observada (σ), la varianza calculada por las permutaciones (\bar{S}), la hipótesis alternativa (H_a) y la probabilidad de ver de manera fortuita un componente mas extremo de los valores observados (p).

Fuente de variación	σ	\bar{S}	H_a	p
Variación entre provincias	$5,5 \cdot 10^{-2}$	1,19	mayor	0,12
Variación entre accesiones	3,12	23,39	mayor	$1 \cdot 10^{-3}$
Variación dentro de accesiones	2,28	-45,26	menor	$1 \cdot 10^{-3}$

VI.6. F_{ST}

El índice de fijación F_{ST} mide la reducción de heterocigocidad causada por la divergencia en frecuencias alélicas entre subpoblaciones. Con el fin de medir la divergencia entre las provincias de la región se calculó de manera pareada el índice (ver tabla 12). Las provincias con mayor nivel de divergencia entre si, mostrando valores por encima de 0.2, son Huanta con Vilcashuaman, Huancasancos y Víctor Fajardo; una provincia del norte con 3 provincias del centro. Luego, las provincias con valores mayores a 0.15 entre si son Huanta con Cangallo (norte y centro), La Mar con Vilcashuaman (norte y centro), Víctor Fajardo con Huancasancos (centro y centro), Vilcashuaman con Huancasancos (centro y centro) y finalmente Huanta con Parinacochas (norte y sur). En general se puede ver que los valores encontrados son fueron bajos. Interesantemente, la divergencia entre las provincias mas lejanas (Huanta y Parinacochas, 0.1536) fue similar a la que se encontró entre provincias del centro. Las provincias del centro parecen tener la mayor fijación, tanto entre si como con de las demás zonas.

Finalmente la tabla 13 nos muestra el valor de F_{ST} encontrado por locus. Los valores mas elevados muestran loci con mayor fijación alélica. Se puede ver que el locus QAAT081 tiene el valor más elevado (0.2458). Esto sumado a su baja diversidad ($H_O=0.35$) la hace el locus que menos alelos segrega. El locus que tiene el menor valor es KGA20 (0.014); tiene un valor de diversidad alto ($H=0.97$) lo que lo hace el locus que más alelos segrega.

VI.7. Árbol UPGMA

Para graficar la coalecencia entre los individuos de la muestra se calculó la distancia genética de Nei y se creó un árbol UPGMA (figura 5). El árbol separa a las accesiones en dos grandes grupos. Estos grupos tienen correspondencia con los grupos que aparecen en el PCA. El primer grupo tiene genotipos norte y centro; el segundo norte, centro y sur. El bootstrap muestra que el nodo inicial donde se separan los dos grupos se repite 100 % de las veces.

Tabla 12: F_{ST} pareado entre provincias de Ayacucho

Provincia	Huanta	La Mar	Huamanga	Cangallo	Víctor Fajardo	Vilcashuaman	Huancasancos	Sucre	Lucanas	10
La Mar	0,1346	0								
Huamanga	0,0283	0,0356	0							
Cangallo	0,1512	0,114	0,0346	0						
Víctor Fajardo	0,2059	0,1275	0,0324	0,1032	0					
Vilcashuaman	0,2504	0,1672	0,0456	0,1009	0,1373	0				
Huancasancos	0,2127	0,1157	0,0305	0,1247	0,1648	0,1838	0			
Sucre	0,048	0,0483	0,0215	0,0516	0,0522	0,0713	0,0462	0		
Lucanas	0,1072	0,1132	0,0477	0,0633	0,0706	0,0875	0,1092	0,0623	0	
Parinacochas	0,1536	0,1361	0,0494	0,0725	0,122	0,119	0,1379	0,0666	0,0572	0

Tabla 13: F_{ST} por locus

Locus	KAAT007	QCA14	QGAA001	QGA17	KGAI6	QAAT071	QAAT084	QAAT081	KGAA011	QAAT050	QGA028	QAAT012	Global
F_{ST}	0,1197	0,0767	0,1304	0,0482	0,0651	0,1438	0,1525	0,2458	0,0148	0,0949	0,1384	0,1318	0,1125

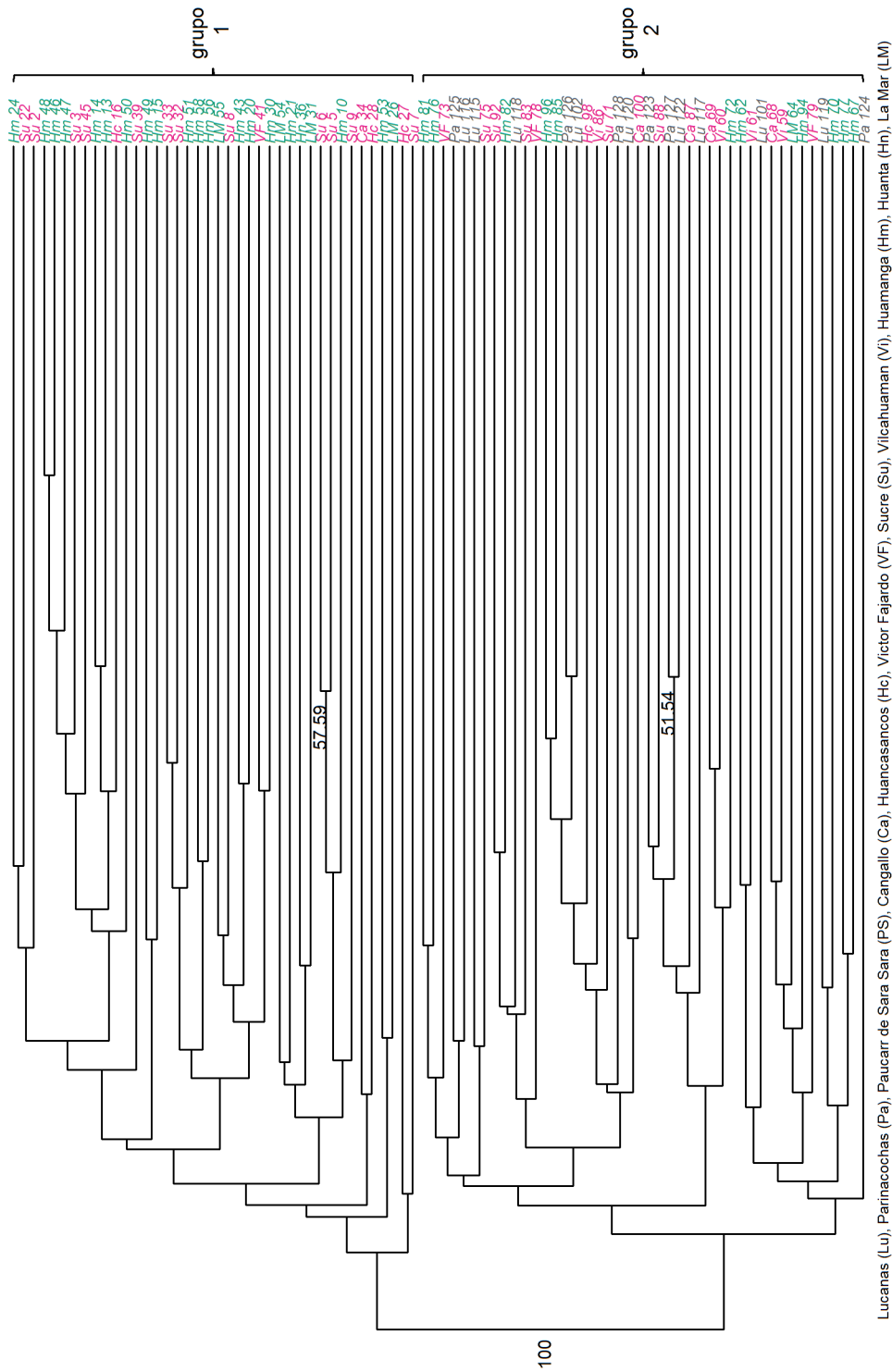


Figura 5: Los colores representan la una de las tres zonas, norte, centro o sur. Cada hoja tiene un código con la abreviatura de la provincia (mostrada en la parte inferior del árbol) y el número de accesión. Los corchetes agrupan según los resultados del PCA. En los nodos donde se obtuvo un valor de bootstrap mayor a 50, se ve rotulado. Nuevamente el primer grupo tiene un nivel mayor de mezcla mientras que el siguiente grupo nos muestra predominantemente genotipos de la zona norte.

VII. Discusión

La dinámica poblacional e historia de vida de una especie responde a varios factores; en especies domesticadas existe casi una completa dependencia en el hombre en cuanto a la reproducción, distribución y migración de la misma. Esto se ve reflejada en la quinua que originalmente proviene del altiplano de Perú y Bolivia, mas hoy en día se puede encontrar en lugares tan insólitos como la India (60). El Perú es una fuente importante de variedades y cultivos primarios. Estos cultivos son primordiales para la conservación de la diversidad de la quinua y el futuro de la misma. Entender como es que el poblador andino mantiene la diversidad de la especie es de suma importancia. Asimismo, estudiar los factores que puedan influir en el quehacer del agricultor y consiguientemente en el cultivo. El objetivo del estudio fue la caracterización de la diversidad y estructuración poblacional de los cultivos primarios de la región Ayacucho mediante marcadores SSR. Para explicarlo se puso a prueba dos situaciones de estructuración, una basada en la distribución de vías en la región y otra basada en los resultados que aparecieron en los análisis exploratorios.

La diversidad encontrada en la región, expresada tanto como riqueza alélica y H fue mayor a lo encontrado en estudios previos utilizando los mismos marcadores (como se pudo ver en la tabla 5). No obstante la quinua es una especie autógama, por lo que muestra una diversidad baja, con valores de H_O por debajo de lo esperado en una población en panmixia. Esto está de acuerdo ademas con lo esperado de una especie domesticada y lo visto en estudios previos. Se encontró que la cantidad de alelos incrementó con el número muestral; por lo visto en provincias con mayor número de alelos, en donde la cantidad de alelos aumentó con la cantidad de muestras analizadas, muy probablemente existe más alelos por descubrir, lo que nos indica que estamos ante una región de muy alta diversidad genética.

La estructuración poblacional de la región resulto ser principalmente determinada por las provincias, teniendo ademas un alto nivel de comunicación genética entre accesiones. Esto ademas de ser estudiado mediante la prueba de AMOVA, se puede ver en los resultados del índice de fijación alélica; sin embargo no se puede hablar de una fuerte estructuración, al haberse encontrado valores relativamente

bajos de fijación siendo el mas alto de 0.25 y en general por debajo de 0.15. Al estudiar el efecto de la separación física entre las poblaciones se observó que no hay un efecto muy pronunciado y que efectivamente la divergencia entre subpoblaciones no esta correlacionada con la distancia genética.

Mediante la prueba de AMOVA, a pesar de no encontrar resultados positivos entre todos los niveles jerárquicos estudiados, se ha podido ver algunos patrones claros que nos puedan indicar la naturaleza de la divergencia a nivel de provincias (ver modelo propuesto en la figura 6). El origen de estos patrones pueden ser varias. Los cultivos primarios encontrados en cada provincia pueden haber estado sujetos a un aislamiento por varios años. La manera en que llegaron los cultivos a estas provincias sumado a un aislamiento reproductivo podrían revelar mayor información sobre lo que está generando (o generó) esta divergencia a nivel de provincias. Esta divergencia probablemente no responda a una selección artificial de parte del campesino, al no tener un componente fenotípico al que podamos ligarlo (en el presente estudio no se han tomado en cuenta las características fenotípicas). En cualquiera de los casos el bajo número muestral puede esconder la verdadera situación genética de la especie en la región. Comparar estas muestras con aquellas provenientes de regiones como Puno, aclararía mucho el origen de estos patrones, ya que Puno es la región de donde provendrían las variedades de quinua encontradas en el Perú.

Considerando los resultados del análisis exploratorio podemos ver claramente dos grupos genéticamente distintos con una historia de vida en común que ha llevado a la divergencia de frecuencias alélicas. Esta diferenciación esta correlacionada con el origen geográfico de la muestra, habiendo encontrado un grupo que se encuentra distribuido en toda la región y otro que únicamente se encuentra en las provincias que, en este estudio y previos (12), se han determinado como norte y centro. El origen de este patrón no esta claro, pero puede responder a varias razones como actividad explicita de los agricultores de no sembrar las variedades del grupo 1 en la región del sur, o la manera en que se propagó la semilla en el la región. Sin lugar a duda analizar las características fenotípicas de las accesiones dará luz sobre el origen de este patrón.

La producción de variedades homogéneas es una parte clave del proceso de

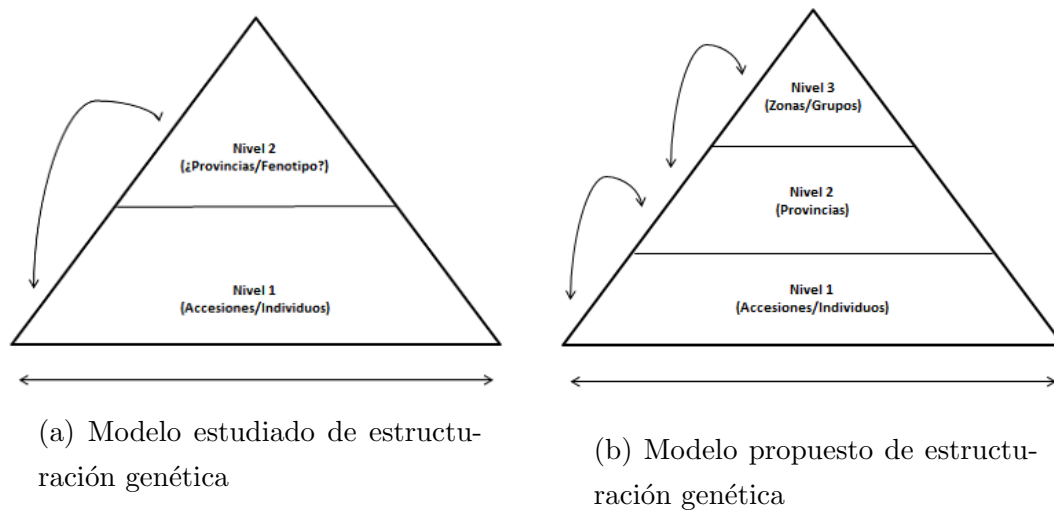


Figura 6: Modelos jerárquicos de estructuración genética

domesticación, por lo que no se puede encontrar una real dinámica poblacional sin tomar en cuenta el componente humano. En el Perú la quinua se cultiva desde hace miles de años y a pesar de la negligencia que ha existido hacia este cultivar por cientos de años, los pobladores andinos han podido preservar una gran cantidad de diversidad en la especie. El futuro de la quinua depende no solo de lo que se pueda lograr en cuanto a mejoras productivas con técnicas modernas si no también de lo que podemos aprender de los métodos ancestrales de cultivo de la misma. La especie aun está en los inicios de su proceso de comodificación, por lo cual es clave estudiar la variabilidad de la misma y protegerla para las futuras generaciones.

VIII. Conclusiones y recomendaciones

- La región de Ayacucho contiene una gran diversidad genética para la especie, siendo el germoplasma estudiado el que contiene mayor diversidad a nivel mundial.
- Los cultivos de quinua en la región tienen poca divergencia genética entre ellos determinada en su mayoría por la divergencia que ocurre entre las provincias. Esta divergencia no responde a la distancia física entre las provincias.
- Existen dos grupos genéticos distintos que se distribuyen de manera diferencial entre las provincias de la región. Uno de los grupos se encuentra en todas las llamadas zonas, sub-regiones causadas por la separación vial que existe en Ayacucho, el otro en tan solo dos.

Esta especie se presenta como una buena oportunidad de estudio al tener una alta diversidad, pertenecer a un sistema agronómico diverso con una gran cantidad de cultivos primarios y tener un futuro claro en la seguridad alimentaria mundial. Las herramientas moleculares son de uso reciente en la historia natural de la especie, su uso sumado a las técnicas ancestrales de los agricultores andinos es la mejor opción para la conservación de la diversidad de la especie. Este estudio se presenta como un primer paso hacia un manejo avanzado con miras a la sostenibilidad y preservación de la diversidad del cultivo en la región. Mientras mayor sea el conocimiento de la especie, tanto en la materia tratada en el presente estudio como en las costumbres y técnicas ancestrales de los agricultores andinos, mayores serán los beneficios para el agricultor y consumidor de la quinua. A futuro se recomienda:

- Aumentar la cantidad de accesiones estudiadas en las provincias del centro y sur, las cuales según lo visto sean las que más alelos tengan por descubrir.
- Seguir esta línea de investigación incluyendo las características fenotípicas de las accesiones y comparar lo encontrado con los resultados de este estudio, así como realizar nuevas pruebas que permitan asociar las características fenotípicas con las genéticas.

- Incluir accesiones de otras regiones donde halla presencia de cultivos primarios.

Bibliografía

- [1] Vacher JJ. Responses of two main Andean crops, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and papa amarga (*Solanum juzepczukii* Buk.) to drought on the Bolivian Altiplano: Significance of local adaptation. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1998;68(1-2):99–108.
- [2] Jacobsen SE. The Worldwide Potential for Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Food Reviews International*. 2003;19(1-2):167–177. Disponible de: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/FRI-120018883>.
- [3] Mujica A, Jacobsen Se. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 2006;p. 449–457. Disponible de: <http://www.beisa.dk/Publications/BEISABookpdfer/Capitulo27.pdf>.
- [4] PROINPA. La quinua : Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial; 2011.
- [5] Abugoch James LE. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties. vol. 58 of 09. 1st ed. Elsevier Inc.; 2009. Disponible de: [http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526\(09\)58001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1043-4526(09)58001-1).
- [6] Tapia M. La Quinua y la Kañiwa: Cultivos Andinos. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID), Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas (IICA); 1979. Disponible de: https://books.google.com.pe/books/about/La_{\}quinua_{\}y_{\}la_{\}ka{\%}C3{\%}B1iwa.html?id=wrdgAAAAMAAJ{\&}redir{_}esc=y.

- [7] Bazile D, Fuentes F, Mujica a. Historical Perspectives and Domestication. Quinoa: botany, production and uses. 2013; Disponible de: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20133324486.html>.
- [8] Waters MR, Forman SL, Jennings Ta, Nordt LC, Driese SG, Feinberg JM, et al. The Buttermilk Creek Complex and the Origins of Clovis at the Debra L. Friedkin Site, Texas. *Science*. 2011;331(6024):1599–1603. Disponible de: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1201855>.
- [9] Nesbit M, Samuel D. Ecogeographical distribution of hulled wheat species. In: Hulled wheats. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 4. Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats, 21-22 July 1995, Castelvecchio Pascoli, Tuscany, Italy. July; 1996. p. 40–101.
- [10] Acquaah G. Principles of plant genetics and breeding. 1st ed. Blackwell Publishing; 2007.
- [11] FAO. data.fao.org; 2015. Disponible de: www.fao.org/data/en/.
- [12] Allpa. Contexto Social, Económico e Institucional de la región Ayacucho; 2009.
- [13] Mujica A, Jacobsen SE, Canahua A. Los aynokas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) – un sistema de conservación de recursos genéticos estratégicos del altiplano peruano. In: Consorcio para el Desarrollo Sostenible de la Eco-region Andina; 2001. Disponible de: <http://www.condesan.org/e-foros/insitu2001/S.Jacobsen-spanish.htm>.
- [14] Del Castillo C, Winkel T, Mahy G, Bizoux JP. Genetic structure of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from the Bolivian altiplano as revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2007;54(4):897–905.
- [15] Djè Y, Forcioli D, Ater M, Lefèbvre C, Vekemans X. Assessing population genetic structure of sorghum landraces from North-western Morocco using allozyme and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 1999;99(1-2):157–163.

- [16] Doebley JF, Goodman MM, Stuber CW. Isozyme Variation in the Races of Maize from Mexico. *American Journal of Botany*. 1985;72(5):629–639.
- [17] Mason SL, Stevens MR, Jellen EN, Bonifacio a, Fairbanks DJ, Coleman CE, et al. Development and use of microsatellite markers for germplasm characterization in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Crop Science*. 2005;45(4):1618–1630.
- [18] Fuentes FF, Martinez Ea, Hinrichsen PV, Jellen EN, Maughan PJ. Assessment of genetic diversity patterns in Chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) germplasm using multiplex fluorescent microsatellite markers. *Conservation Genetics*. 2009;10(2):369–377.
- [19] Jarvis DE, Kopp OR, Jellen EN, Mallory Ma, Pattee J, Bonifacio a, et al. Simple sequence repeat marker development and genetic mapping in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Journal of Genetics*. 2008;87(1):39–51.
- [20] Christensen Sa, Pratt DB, Pratt C, Nelson PT, Stevens MR, Jellen EN, et al. Assessment of genetic diversity in the USDA and CIP-FAO international nursery collections of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) using microsatellite markers. *Plant Genetic Resources: Characterisation and Utilisation*. 2007;5(2):82–95. Disponible de: <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-34447128815&partnerID=40>.
- [21] Maughan PJ, Bonifacio a, Jellen EN, Stevens MR, Coleman CE, Ricks M, et al. A genetic linkage map of quinoa (*Chenopodium quinoa*) based on AFLP, RAPD, and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(6):1188–1195.
- [22] Schlötterer C. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nature reviews Genetics*. 2004;5(1):63–69.
- [23] Lai Y. The Relationship Between Microsatellite Slippage Mutation Rate and the Number of Repeat Units. *Molecular Biology and Evolution*. 2003;20(12):2123–2131. Disponible de: <http://mbe.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/molbev/msg228>.

- [24] Selkoe Ka, Toonen RJ. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 2006;9(5):615–629. Disponible de: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>.
- [25] Simmonds NW. *The Breeding System of Chenopodium Quinoa*. Scottish Plant Breeding Station; 1965.
- [26] Ward SM. Allotetraploid segregation for single-gene morphological characters in quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.). *Euphytica*. 2000;116(1):11–16.
- [27] Hamilton MB. *Population genetics*. 1st ed. Wiley; 2009.
- [28] Nei M. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978;p. 583–590.
- [29] Lowry R. *Concepts and applications of Inferential Statistics*. Vassarstats; 2015. Disponible de: <http://vassarstats.net/textbook/>.
- [30] Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*. 1965;52(3/4):591–611. Disponible de: [http://links.jstor.org/sici?sici=0006-3444\(196512\)52:3/4{\textless}591:AAOVTF{\textgreater}2.0.CO;2-B](http://links.jstor.org/sici?sici=0006-3444(196512)52:3/4{\textless}591:AAOVTF{\textgreater}2.0.CO;2-B).
- [31] Anderson-Darling and Shapiro-Wilk tests. NIST/SEMATECH; 2016.
- [32] Bartlett MS. Properties of Sufficiency and Statistical Tests. *Proceedings of the Royal Society of London Series A, Mathematical and Physical Sciences*. 1937;.
- [33] Bartlett's Test. NIST/SEMATECH; 2016. Disponible de: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>.
- [34] Cleveland WS, Grosse E. Computational methods for local regression. *Statistics and Computing*. 1991;1(1):47–62.
- [35] Cleveland WS, Grosse E, Shyu MJ. A Package of C and Fortran Routines for Fitting Local Regression Models. *Statistics and Computing*. 1992;.

- [36] Nei M. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*. 1972;106(949):283–292.
- [37] Weisstein EW. Distance; 2015. Disponible de: <http://mathworld.wolfram.com/Distance.html>.
- [38] Mantel N. Cancer Research. *Nature*. 1967;214(5088):637–637. Disponible de: <http://www.nature.com/doi/10.1038/214637b0>.
- [39] Diniz-filho JAF, Soares TN, Lima JS, Dobrovolski R, Landeiro VL, Pires M, et al. Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology*. 2013;36(4):475–485.
- [40] Shlens J. A tutorial on principal component analysis: derivation, discussion and singular value decomposition; 2003. Disponible de: www.sn1.salk.edu/~shlens/pca.pdf.
- [41] Sneath PH, Sokal RR. *Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. Freeman; 1973.
- [42] Efron B, Tibshirani R. Bootstrap Methods for standard Errors, Confidence Intervals, and Other Measures of Statistical Accuracy. *Statistical Science*. 1986;1(1):54–77.
- [43] Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 1992;131(2):479–491.
- [44] Kaeppler-Hanno K, Armbrecht-Ihle M, Kubasch R. *Troubleshooting Guide for the Measurement of Nucleic Acids with Eppendorf BioPhotometer® D30 and Eppendorf BioSpectrometer®*. Eppendorf; 2015. Online.
- [45] R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria; 2015. Disponible de: <https://www.r-project.org/>.
- [46] Jombart T, Lyon D, Biome LD. adegenet : a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. 2008;24(11):1403–1405.

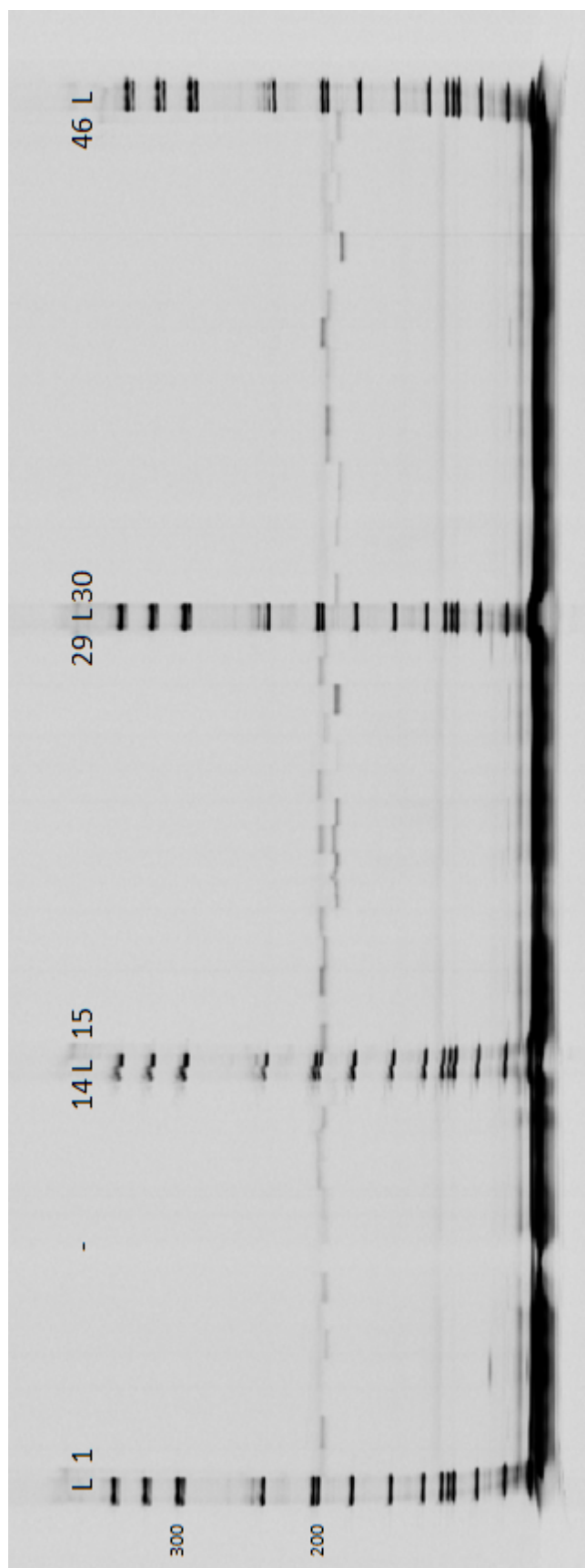
- [47] Jombart T, Ahmed I. adegenet 1.3-1 : new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*. 2011;27(21):3070–3071.
- [48] Kamvar ZN, Tabima JF, Gr NJ. Poppr : an R package for genetic analysis of populations with clonal , partially clonal , and / or sexual reproduction. *PeerJ*. 2014;p. 1–14.
- [49] Kamvar ZN, Brooks JC, Grünwald NJ. Novel R tools for analysis of genome-wide population genetic data with emphasis on clonality. *Frontiers in Genetics*. 2015;6(June):1–10.
- [50] Winter DJ. MMOD : an R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources*. 2012;.
- [51] Paradis E, Claude J, Strimmer K. APE : Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*. 2004;20(2):289–290.
- [52] Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J. The ade4 package - I : One-table methods. *RNews*. 2004;4(June):5–10.
- [53] King G, Greiner DJ, Lau O, Moore RT, Kellermann M, Dray S, et al. The ade4 Package — II : Two-table and K -table Methods. *RNews*. 2007;7(October):47–52.
- [54] Dray S, Dufour AB. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*. 2007;22(4).
- [55] Schliep KP. phangorn : phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 2011;27(4):592–593.
- [56] Wickham H. ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer New York; 2009.
- [57] Bivand R, Keitt T, Rowlingson B. rgdal: Bindings for the Geospatial Data Abstraction Library; 2015. Disponible de: <http://cran.r-project.org/package=rgdal>.

- [58] Wickham H. The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*. 2011;40(1).
- [59] Mcvean G. A Genealogical Interpretation of Principal Components Analysis. *PLoS Genetics*. 2009;5(10).
- [60] Bhargava A, Shukla S, Ohri D. *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. *Industrial Crops and Products*. 2006;23(1):73–87.

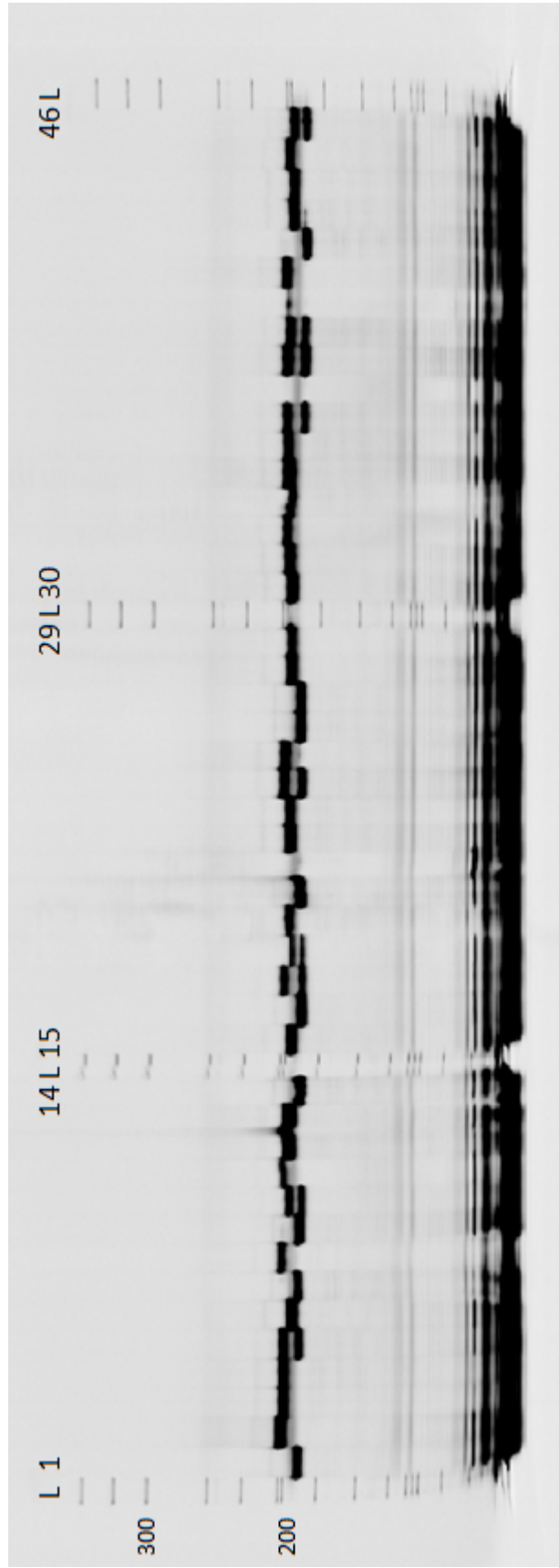
Apéndice

Apéndice A: imágenes de gel de poliacrilamida

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES



Electroforesis de poliacrilamida obtenida de LI-COR 4300 DNA Analyzer del locus KGA16 en 700 nm. La "L" indica el carril donde se colocó un marcador de peso molecular; el signo "-" indica el pocillo negativo.



Electroforesis de poliacrilamida obtenida de LI-COR 4300 DNA Analyzer del locus KGA16 en 800 nm. La "L" indica el carril donde se colocó un marcador de peso molecular.

Apéndice B: genotipos

Los genotipos se encuentran en: https://github.com/FranciscoMenendez/quinua_repo/blob/master/genotipos.csv

Accession	KAAT007	QCA14	QGAA001	QGA17	KGA16	QAAT071	QAAT084	QAAT081	KGA20	KCAA011	QAAT050	QGA028	QAAT012	Provincia
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SUCRE
2	225/225	205/205	NA	198/202	198/198	NA	176/176	206/206	214/224	NA	250/250	194/194	204/204	SUCRE
3	225/291	NA	NA	198/198	198/198	164/164	170/170	206/206	212/220	235/235	247/247	222/222	204/204	SUCRE
5	315/315	203/207	NA	NA	NA	NA	170/170	206/206	NA	NA	NA	220/220	198/198	SUCRE
6	255/255	203/207	143/206	NA	200/200	179/179	170/170	206/206	190/196	NA	223/223	220/220	198/198	SUCRE
7	261/276	205/207	200/206	194/200	194/194	179/179	176/176	206/209	206/214	247/247	217/220	196/196	222/222	SUCRE
8	NA	NA	206/236	194/202	200/200	NA	164/164	206/206	NA	NA	NA	202/214	189/231	SUCRE
9	294/294	NA	NA	NA	196/198	179/179	167/167	206/206	206/214	NA	217/241	198/198	201/201	SUCRE
10	342/342	207/207	245/266	196/196	NA	NA	173/173	206/206	190/196	NA	223/223	224/224	198/198	HUAMANGA
13	225/225	205/209	NA	NA	196/200	164/164	179/194	206/209	214/222	235/235	247/247	224/224	207/207	HUAMANGA
14	222/222	NA	NA	196/200	196/196	164/164	179/179	209/209	216/224	235/235	247/247	224/224	207/207	HUAMANGA
15	NA	205/207	NA	180/196	200/200	173/173	173/173	206/206	190/194	241/241	220/220	224/224	225/225	HUAMANGA
16	228/228	207/211	209/209	182/200	200/200	164/164	164/164	206/206	214/222	235/235	247/247	224/224	207/207	HUANCASANCOS
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	HUAMANGA
20	NA	NA	NA	184/198	196/196	167/167	164/164	206/206	220/226	229/229	250/250	208/218	207/222	HUAMANGA
21	210/210	193/207	206/212	NA	188/188	152/152	173/176	206/206	214/216	235/238	NA	226/226	NA	HUAMANGA
22	NA	203/209	260/260	196/198	196/198	NA	164/164	206/209	214/222	205/235	250/250	224/224	207/207	SUCRE
24	225/225	205/205	260/260	198/198	198/198	161/161	179/179	206/209	214/222	NA	223/247	224/224	207/216	HUAMANGA
26	300/345	207/215	263/263	198/202	200/200	161/161	164/164	206/206	214/222	229/229	235/235	218/218	231/231	LA MAR
27	216/216	203/207	209/209	200/200	188/188	158/158	NA	NA	214/222	244/244	220/220	228/228	NA	HUANCASANCOS
28	291/336	211/213	362/362	188/188	188/188	149/161	179/194	206/209	190/196	232/244	220/250	218/226	207/237	HUANCASANCOS
30	NA	NA	206/209	188/188	190/200	158/158	179/179	206/209	218/224	244/244	250/250	220/220	237/237	HUAMANGA
31	255/255	205/207	251/251	190/200	188/188	NA	NA	206/206	190/196	NA	220/247	226/226	201/201	LA MAR
32	NA	NA	200/212	202/202	202/202	158/158	173/179	206/209	NA	NA	226/226	218/218	207/225	SUCRE
33	NA	205/209	209/212	202/202	188/188	167/167	173/173	206/209	NA	NA	247/253	NA	207/207	SUCRE
34	282/282	211/219	NA	198/198	198/198	158/164	179/179	206/209	190/196	247/253	217/226	210/218	219/231	CANGALLO
36	252/252	207/217	206/218	188/190	188/190	173/173	179/179	206/206	190/196	253/253	217/217	200/200	201/201	HUANTA
39	228/228	195/205	NA	180/198	190/198	215/215	164/164	206/206	206/214	244/244	214/253	218/224	198/207	SUCRE

– continua de la pagina anterior

Accesión	KAAT007	QCA14	QGAA001	QGA17	KGA16	QAAT071	QAAT084	QAAT081	KGA20	KCAA011	QAAT050	QGA028	QAAT012	Provincia
41	NA	NA	206/215	198/202	190/190	167/170	179/179	206/206	222/230	NA	250/250	220/220	228/228	VICTOR FAJARDO
43	NA	NA	NA	190/202	188/188	167/167	NA	206/206	212/220	229/229	241/241	228/228	225/225	HUAMANGA
45	225/225	NA	209/215	188/204	188/188	167/182	164/173	206/206	212/220	235/235	247/247	224/224	207/207	SUCRE
46	228/228	NA	NA	198/198	198/198	167/167	164/164	206/206	212/220	235/235	247/247	224/224	207/207	HUAMANGA
47	228/297	207/209	NA	198/198	198/198	167/167	173/182	206/209	212/220	235/235	253/253	198/198	207/207	HUAMANGA
48	225/291	207/213	NA	198/198	198/198	167/167	NA	NA	212/220	235/235	247/247	224/224	207/207	HUAMANGA
49	291/342	209/217	NA	198/202	198/198	173/173	179/194	209/209	190/194	253/253	220/220	224/224	201/201	HUAMANGA
50	231/303	207/209	209/209	198/204	202/202	167/167	179/179	206/206	210/218	235/235	253/253	224/224	207/207	HUAMANGA
51	NA	209/211	209/209	202/202	198/198	NA	173/173	206/206	212/218	NA	247/247	218/232	228/231	HUAMANGA
53	291/291	209/221	209/209	198/202	NA	158/158	173/185	206/206	210/216	229/229	226/250	200/200	231/231	HUAMANGA
54	NA	207/211	221/248	NA	188/188	182/182	179/194	206/206	202/208	241/253	217/217	NA	204/204	LA MAR
55	NA	NA	NA	188/188	196/200	152/179	164/164	206/206	208/216	232/232	226/247	216/216	201/228	LA MAR
56	288/288	207/213	206/206	202/206	190/202	170/170	179/179	206/206	212/220	NA	223/223	NA	204/228	HUAMANGA
58	288/288	205/205	206/218	NA	190/192	NA	164/179	206/209	NA	NA	NA	NA	207/228	HUAMANGA
59	320/320	209/219	215/215	189/189	189/189	164/164	185/185	207/207	192/202	NA	244/244	216/216	237/237	VILCASHUAMAN
60	317/368	205/215	215/215	203/203	203/203	173/173	200/200	207/207	168/174	NA	217/217	222/222	198/198	VILCASHUAMAN
61	311/329	215/219	NA	201/201	201/201	173/173	NA	207/213	168/174	248/248	223/250	222/224	228/228	VILCASHUAMAN
62	320/371	205/215	NA	201/201	201/201	170/170	NA	207/207	170/176	NA	220/220	224/224	198/198	HUAMANGA
64	302/350	207/215	203/206	189/201	189/201	185/185	185/185	207/207	168/174	NA	226/256	216/218	228/228	LA MAR
67	308/308	205/213	206/209	195/195	193/193	167/167	NA	NA	194/202	260/260	223/223	200/218	228/228	HUAMANGA
68	NA	215/215	NA	189/189	189/189	164/164	185/191	207/207	194/200	NA	217/217	218/218	207/207	CANGALLO
69	317/317	NA	215/215	203/203	203/203	173/173	185/191	207/207	170/176	NA	220/220	226/226	201/201	CANGALLO
70	347/374	201/211	257/260	189/189	189/189	152/152	NA	207/207	192/200	233/233	241/241	210/210	201/201	HUAMANGA
71	215/215	201/211	203/206	187/197	187/197	152/164	200/200	207/207	192/200	245/245	238/238	228/228	207/207	SUCRE
72	320/320	205/215	242/251	203/203	203/203	170/170	194/194	207/210	176/176	NA	223/223	226/226	201/201	HUAMANGA
73	320/326	205/215	248/260	199/199	197/197	179/191	200/200	207/207	186/192	NA	223/229	198/198	228/234	VICTOR FAJARDO
75	302/365	209/217	251/275	197/197	197/197	161/182	200/200	207/207	196/202	248/248	220/220	224/224	204/204	SUCRE
76	215/215	217/217	242/260	189/189	189/189	167/167	200/212	207/207	176/188	242/248	220/220	212/228	201/228	HUAMANGA
77	311/311	215/219	206/209	195/195	195/195	164/164	NA	207/207	194/200	233/233	250/250	218/218	225/228	HUAMANGA
78	230/230	215/215	212/212	189/189	189/189	170/170	200/212	207/210	192/198	233/257	235/235	228/228	204/204	VICTOR FAJARDO
79	302/314	215/219	215/218	189/201	189/201	149/149	200/200	207/210	194/200	224/233	241/244	198/200	210/234	VICTOR FAJARDO
81	NA	217/217	239/248	199/199	199/199	167/167	200/212	207/210	188/192	NA	NA	NA	228/228	HUAMANGA
82	233/233	NA	NA	191/191	191/191	176/188	200/212	207/210	192/198	233/248	244/244	198/198	207/207	HUAMANGA

- continua de la pagina anterior

Accesión	KAAT007	QCA14	QGAA001	QGA17	KGA16	QAAT071	QAAT084	QAAT081	KGA20	KCAA011	QAAT050	QGA028	QAAT012	Provincia
83	308/356	203/213	215/227	193/195	195/195	158/179	200/212	207/210	198/206	233/233	247/247	210/210	204/207	SUCRE
84	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	HUAMANGA
85	239/365	207/215	NA	197/197	197/197	146/167	200/212	207/207	192/198	239/239	244/244	228/228	207/207	HUAMANGA
86	239/239	217/217	NA	199/199	199/199	155/155	194/194	207/210	192/200	239/239	244/244	228/228	207/207	VILCASHUAMAN
87	302/341	209/217	203/206	189/203	189/203	176/176	185/200	207/207	172/176	236/257	223/226	220/228	201/207	CANGALLO
88	323/323	207/215	206/206	201/201	203/203	161/176	200/200	207/207	172/176	248/248	217/217	228/228	201/201	SUCRE
92	335/335	211/217	215/218	191/191	191/191	164/179	200/212	207/210	200/206	233/233	250/250	200/200	207/207	SUCRE
94	296/344	215/223	218/221	189/189	189/189	179/179	194/194	207/207	194/202	233/233	244/244	220/220	228/228	HUAMANGA
96	227/302	215/223	218/218	197/197	197/197	167/167	200/200	207/207	192/198	233/239	247/247	226/226	207/207	HUAMANGA
98	NA	215/215	NA	197/197	197/197	155/164	188/194	207/213	NA	239/239	229/229	226/228	207/207	HUANCASANCOS
99	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	HUAMANGA
100	233/314	205/213	263/263	197/197	199/199	164/164	200/200	207/207	192/198	251/251	250/250	228/228	NA	CANGALLO
101	NA	219/219	218/218	199/199	201/201	185/185	NA	207/207	194/200	257/257	250/250	220/220	237/237	LUCANAS
102	233/233	NA	221/221	201/201	197/197	164/164	200/200	207/207	192/198	239/239	247/247	228/228	207/207	LUCANAS
115	230/293	209/217	209/257	197/197	201/201	185/185	200/200	207/210	192/202	251/254	229/229	220/220	210/231	LUCANAS
116	NA	217/217	221/221	201/201	201/201	179/179	200/212	207/210	182/186	254/254	214/238	198/198	204/204	LUCANAS
117	182/209	209/217	209/230	201/201	189/203	161/176	200/212	207/210	178/200	248/251	217/220	224/226	201/219	LUCANAS
118	230/233	NA	209/227	189/203	195/195	NA	200/212	207/210	186/194	248/251	220/220	228/228	207/207	LUCANAS
119	299/347	211/221	206/209	195/195	189/203	167/167	194/206	207/210	192/200	233/236	238/238	218/218	201/201	LUCANAS
120	NA	213/217	212/215	189/203	189/199	155/167	200/200	207/207	192/200	242/251	250/250	220/230	240/240	LUCANAS
122	323/323	217/217	NA	189/199	203/203	173/173	200/212	207/207	178/178	248/248	220/220	228/228	201/201	LUCANAS
123	341/341	207/217	200/200	203/203	203/203	164/176	200/212	207/210	172/176	248/248	220/220	226/226	201/201	PARINACOCHAS
124	308/356	219/219	209/212	203/203	187/187	164/164	185/185	207/207	196/204	230/233	247/253	222/222	228/228	PARINACOCHAS
125	311/356	217/217	257/260	187/187	199/199	179/179	200/215	207/207	196/204	260/260	217/217	200/200	204/204	PARINACOCHAS
126	230/233	217/217	260/260	199/199	197/197	164/164	185/200	207/207	192/200	239/239	247/247	226/226	207/207	PARINACOCHAS
127	341/341	217/217	203/206	197/197	201/201	173/173	200/212	207/207	172/178	239/239	220/220	228/228	201/201	PARINACOCHAS
128	341/341	217/217	317/320	201/201	189/199	164/164	NA	207/216	186/192	263/263	NA	226/226	207/207	PARINACOCHAS

Apéndice C: pasaporte

Los datos pasaporte se encuentran en: https://github.com/FranciscoMenendez/quinua_repo/blob/master/pasaporte.csv.

Accesion	Fecha	Pais	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	Fuente	Status	Mat. Viv. Col.
1	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	AYALCA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
2	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	CORRALPATA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
3	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	AYALCA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
5	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHILCAYOC	CHILCAYOC	3410	13.8825	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
6	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	CHALCOS	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
7	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHILCAYOC	CHILCAYOC	3410	13.8825	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
8	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHILCAYOC	JATUN RUMI	3410	13.8825	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
9	101012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHILCAYOC	JATUN RUMI	3410	13.8825	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
10	201112	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	HUAMANGA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
13	201112	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	CCECELAMBRAS	CCECELAMBRAS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
14	201112	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	CHONTACA	CHONTACA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
15	201112	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGUILLA	HUAMANGUILLA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
16	201112	PERU	AYACUCHO	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	3422	13.91916667	74.33388889	Almacén	Cult. primitivo	Grano
18	201112	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	VINHOS	VINHOS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
20	201112	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	HUAMANGA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
21	201112	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	ACOCRO	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
22	201112	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	AYALCA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
24	201012	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	ACOCRO	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
26	201012	PERU	AYACUCHO	LA MAR	TAMBO	TAMBO	3499	13.0125	73.98111111	Almacén	Cult. primitivo	Grano
27	201012	PERU	AYACUCHO	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	3422	13.91916667	74.33388889	Almacén	Cult. primitivo	Grano
28	201012	PERU	AYACUCHO	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	3422	13.91916667	74.33388889	Almacén	Cult. primitivo	Grano
30	201012	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	ACOCRO	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
31	201012	PERU	AYACUCHO	LA MAR	TAMBO	TAMBO	3499	13.0125	73.98111111	Almacén	Cult. primitivo	Grano
32	201012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	AYALCA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
33	201012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	CORRALPATA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
34	201012	PERU	AYACUCHO	GANGALLO	CHUSCHI	CHUSCHI	2570	13.62805556	74.14416667	Almacén	Cult. primitivo	Grano
36	201012	PERU	AYACUCHO	HUANATA	CCNIS	CCNIS	2642	12.93972222	74.2475	Almacén	Cult. primitivo	Grano
39	201012	PERU	AYACUCHO	SUCRE	QUEROBAMBA	QUEROBAMBA	3508	14.01361111	73.84083333	Almacén	Cult. primitivo	Grano

-continúa de la página anterior

Accesion	Fecha	Pais	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	Fuente	Status	Mat. Viv. Col.
41	201012	PERU	AYACUCHO	VICTOR FAJARDO	VICTOR FAJARDO	VICTOR FAJARDO	3102	13.66666667	74.23333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
43	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	VINCHOS	VINCHOS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
45	201212	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	AYALCA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
46	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	HUAMANGA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
47	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HAUMANGUILLA	HAUMANGUILLA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
48	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HAUMANGUILLA	HAUMANGUILLA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
49	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	VINCHOS	VINCHOS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
50	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	SACHABAMBA	SACHABAMBA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
51	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	ACOCRO	ACOCRO	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
53	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	CIRCAMARCA	CIRCAMARCA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
54	201212	PERU	AYACUCHO	LA MAR	SAN MIGUEL	PARIHUANCA	3499	13.0125	73.98111111	Almacén	Cult. primitivo	Grano
55	201212	PERU	AYACUCHO	LA MAR	SAN MIGUEL	PARIHUANCA	3499	13.0125	73.98111111	Almacén	Cult. primitivo	Grano
56	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	CIRCAMARCA	CIRCAMARCA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
58	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	VINCHOS	ROSPATA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
59	201212	PERU	AYACUCHO	VILCASHUAMAN	CARHUANCA	CARHUANCA	3470	13.65083333	73.95222222	Almacén	Cult. primitivo	Grano
60	201212	PERU	AYACUCHO	VILCASHUAMAN	CARHUANCA	CARHUANCA	3470	13.65083333	73.95222222	Almacén	Cult. primitivo	Grano
61	201212	PERU	AYACUCHO	VILCASHUAMAN	CARHUANCA	CARHUANCA	3470	13.65083333	73.95222222	Almacén	Cult. primitivo	Grano
62	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	ACOCRO	ACOCRO	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
64	201212	PERU	AYACUCHO	LA MAR	ANCO	ANCO	3499	13.0125	73.98111111	Almacén	Cult. primitivo	Grano
67	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	IGUAIN	MACACHACRA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
68	201212	PERU	AYACUCHO	CANGALLO	HUALLABAMBA	HUALLABAMBA	2570	13.62805556	74.14416667	Almacén	Cult. primitivo	Grano
69	201212	PERU	AYACUCHO	CANGALLO	HUALLABAMBA	HUALLABAMBA	2570	13.62805556	74.14416667	Almacén	Cult. primitivo	Grano
70	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGUILLA	HUAMANGUILLA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
71	201212	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	ANKARA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
72	201212	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	VINCHOS	VINCHOS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
73	201212	PERU	AYACUCHO	VICTOR FAJARDO	HUANCAPÍ	HUANCAPÍ	3102	13.66666667	74.23333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
75	201212	PERU	AYACUCHO	SUCRE	QUEROBAMBA	POTONGO	3508	14.01361111	73.84083333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
76	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	CCECELAMBRAS	CCECELAMBRAS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
77	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	LAMBARSPUQUJO	LAMBARSPUQUJO	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
78	300912	PERU	AYACUCHO	VICTOR FAJARDO	VICTOR FAJARDO	VICTOR FAJARDO	3102	13.66666667	74.23333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
79	300912	PERU	AYACUCHO	VICTOR FAJARDO	APONGO	APONGO	3102	13.66666667	74.23333333	Almacén	Cult. primitivo	Grano
81	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	PAQCHA	PAQCHA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano
82	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	SOCOS	AMPUQASA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult. primitivo	Grano

-continúa de la página anterior

Accesion	Fecha	Pais	Departamento	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud (m)	Latitud	Longitud	Fuente	Status	Mat. Viv. Col.
83	300912	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHILCAYOCC	CHILCAYOCC	3410	13.8825	73.75333333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
84	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	CCECELAMBRAS	CCECELAMBRAS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult.primitivo	Grano
85	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	CCECELAMBRAS	CCECELAMBRAS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult.primitivo	Grano
86	300912	PERU	AYACUCHO	VILCASHUAMAN	MILLPO	MILLPO	3470	13.65083333	73.92222222	Almacén	Cult.primitivo	Grano
87	300912	PERU	AYACUCHO	CANGALLO	NUEVA ESPERANZA	NUEVA ESPERANZA	2570	13.62805556	74.14416667	Almacén	Cult.primitivo	Grano
88	300912	PERU	AYACUCHO	SUCRE	CHALCOS	AYALCA	3649	13.84777778	73.75333333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
92	300912	PERU	AYACUCHO	SUCRE	QUEROBAMBA	QUEROBAMBA	3508	14.01361111	73.84083333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
94	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	HUAMANGA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult.primitivo	Grano
96	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	HUAMANGA	HUAMANGA	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult.primitivo	Grano
98	300912	PERU	AYACUCHO	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	HUANCASANCOS	3422	13.91916667	74.33888889	Almacén	Cult.primitivo	Grano
99	300912	PERU	AYACUCHO	HUAMANGA	VINCHOS	TICLLAS	2761	13.15722222	74.22277778	Almacén	Cult.primitivo	Grano
100	300912	PERU	AYACUCHO	CANGALLO	CANGALLO	CANGALLO	2570	13.62805556	74.14416667	Almacén	Cult.primitivo	Grano
101	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
102	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
115	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
116	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
117	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
118	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
119	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
120	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
122	10813	PERU	AYACUCHO	LUCANAS	PUQUIO	PUQUIO	3214	14.69222222	74.12583333	Almacén	Cult.primitivo	Grano
123	11013	PERU	AYACUCHO	PARINACOCCHAS	PARINACOCCHAS	PARINACOCCHAS	3178	15.01611111	73.78194444	Almacén	Cult.primitivo	Grano
124	11013	PERU	AYACUCHO	PARINACOCCHAS	CORACORA	CORACORA	3178	15.01611111	73.78194444	Almacén	Cult.primitivo	Grano
125	11013	PERU	AYACUCHO	PARINACOCCHAS	PARINACOCCHAS	PARINACOCCHAS	3178	15.01611111	73.78194444	Almacén	Cult.primitivo	Grano
126	11013	PERU	AYACUCHO	PARINACOCCHAS	PARINACOCCHAS	PARINACOCCHAS	3178	15.01611111	73.78194444	Almacén	Cult.primitivo	Grano
127	11013	PERU	AYACUCHO	PARINACOCCHAS	CORACORA	CORACORA	3178	15.01611111	73.78194444	Almacén	Cult.primitivo	Grano
128	11013	PERU	AYACUCHO	PARINACOCCHAS	CORACORA	CORACORA	3178	15.01611111	73.78194444	Almacén	Cult.primitivo	Grano