

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) PRODUCIDOS EN LOS MUNICIPIOS DE
BOYACÁ Y TURMEQUÉ (BOYACÁ) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSATÉLITES**



MADELEYNE PARRA FUENTES

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA APLICADA
BOGOTÁ D.C.
2018**

**VARIABILIDAD GENÉTICA DE SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA
(*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) PRODUCIDOS EN LOS MUNICIPIOS DE
BOYACÁ Y TURMEQUÉ (BOYACÁ) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSATÉLITES**



MADELEYNE PARRA FUENTES

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de
Master en Biología**

**Director: Javier Adolfo Hernández Fernández, cPhD
Profesor Asociado II
Universidad Jorge Tadeo Lozano**

**UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
MAESTRÍA EN BIOLOGÍA APLICADA
BOGOTÁ D.C.
2018**

ACUERDO 0066 DE 2003

“Por el cual se expiden normas relacionadas con la presentación de tesis y trabajos de grado”

“El autor autoriza a la Universidad Militar “Nueva Granada” la reproducción total o parcial de este documento, con la debida cita de reconocimiento de la autoría y cede a la misma universidad los derechos patrimoniales con fines de investigación, docencia e institucionales consagrados en el artículo 72 de la ley 23 de 1982 y las normas que lo constituyan o modifiquen”

Esta investigación hace parte del proyecto: “Conservación, valoración y uso de la agrobiodiversidad de la arracacha en la Provincia de Marquéz, Boyacá”, financiado por Colciencias (Contrato RC 705-2011) y ejecutado por la Corporación PBA y la UJTL.

AGRADECIMIENTOS

A Hernán Pinzón, quien siempre ha sido mi maestro. Gracias por su cariño y respeto.

A Milena, Luis Eli, Pedro, Carlos y a cada uno de los agricultores que estuvieron atentos y siempre disponibles a los requerimientos de semilla, a aprender, a enseñar a sonreír o a ofrecer todo lo mejor de ellos en las jornadas de colecta.

Al profesor Javier Adolfo Hernández, por su acompañamiento y asesoría en este extenso proceso. Gracias por la paciencia, perseverancia e insistencia.

A la Universidad Jorge Tadeo Lozano, al Centro de Bio-Sistemas, a Genbimol, especialmente por las personas que me ayudaron y enseñaron durante esta experiencia: Hugo, Paula, Julio, Gerson, Laura.

A mis amigos, Luis Burbano y María Josefina por el amor brindado. ¡Es recíproco!

A Stephanie, por ser siempre una amiga tan especial y generosa.

A mis amigos y compañeros del grupo de entomología y del Centro de Investigación Caribia (Agrosavia): Lumey, Carlitos, Francisco, Ángela, Gloria, Alfonso y Rommel, por la voz de apoyo recibida y por alegrar mis días mientras investigamos, por la amistad y el calor familiar. ¡Los quiero!

A mis padres por su inmenso amor.

A mis hermanos: Uriel Yesith, Katusca y Edwin.

A mi sobrino Juan Sebastián y a Isabella María por dejarme disfrutar su vida y llenar la mía de brillo y recuerdos que siempre perduran.

A todos los que le han dado a mi vida buena energía.

“Es tan lindo saber que Usted existe”

(Benedetti, 1998)

A mi esposo, Juan Camilo Gómez Correa.

A mis padres, Galo Uriel y Rosalía

A la ciencia.

A la vida.

A Dios.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
<i>Objetivo general</i>	5
<i>Objetivos Específicos</i>	5
1. <i>Arracacia xanthorrhiza</i>	6
1.1 <i>GENERALIDADES DEL CULTIVO DE ARRACACHA</i>	6
1.1.1 Origen del cultivo de arracacha	6
1.1.2 Taxonomía de <i>Arracacia xanthorrhiza</i>	8
1.1.3 Filogenética del clado <i>Arracacia</i>	9
1.1.4 Nivel de ploidía de arracacha	11
1.1.5 Materiales genéticos de arracacha	12
1.1.6 Importancia económica de la arracacha	15
1.2 <i>ANTECEDENTES GENÉTICOS</i>	16
1.2.1 Mejoramiento genético en arracacha.....	16
1.2.2 Estudios de variabilidad genética en arracacha.....	16
1.3 <i>LOS MICROSATÉLITES COMO MARCADORES MOLECULARES</i>	19
1.4 <i>POTENCIAL DEL ESTUDIO DE VARIABILIDAD GENÉTICA</i>	21
<i>REFERENCIAS</i>	22
2. SELECCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR'S) PARA EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>)	28
<i>RESUMEN</i>	28
2.1 <i>INTRODUCCIÓN</i>	28
2.2 <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	29
2.2.1 Material vegetal	29
2.2.2 Extracción de ADN	30
2.2.3 Análisis de marcadores microsatélites.....	30
2.2.4 Separación electroforética en poliacrilamida	31
2.3. <i>RESULTADOS</i>	32
2.3.1 Calidad y concentración del ADN	32
2.3.2 Amplificación de loci según Morillo <i>et al.</i> (2004).....	32
2.3.3 Electrofóresis en diferentes concentraciones de poliacrilamida.....	34

2.3.4 Estandarización de PCR.....	34
2.4. <i>DISCUSIÓN</i>	37
2.5. <i>CONCLUSIONES</i>	38
<i>REFERENCIAS</i>	38
3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (<i>Arracacia xanthorrhiza</i>).....	40
<i>RESUMEN</i>	40
3.1 <i>INTRODUCCIÓN</i>	41
3.2 <i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	45
3.2.1 Material vegetal	45
3.2.2 Extracción de ADN.	45
3.2.3 Caracterización de marcadores microsatélites.	46
3.3.1 Análisis de alelos.	47
3.3 <i>RESULTADOS</i>	48
3.3.1 Riqueza alélica	48
3.3.2 Variabilidad genética	50
3.3.3. Distancia genética	53
3.3.4 Análisis factorial de correspondencia múltiple	56
3.4 <i>DISCUSION</i>	57
3.4.1 Riqueza alélica	57
3.4.2 Variabilidad genética	59
3.4.3 Estructura genética.....	60
3.5. <i>CONCLUSIONES</i>	61
<i>REFERENCIAS</i>	62
ANEXOS.....	75

LISTA DE TABLAS

1. *Arracacia xanthorrhiza*

Tabla 1. Análisis filogenético del Clado *Arracacia* (Danderson, 2011) 10

Tabla 2. Características del color en los principales órganos de los cultivares de estudio. 15

2. SELECCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR'S) PARA EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza*)

Tabla 1. Oligonucleótidos evaluados en este estudio para revelar la variabilidad genética en arracacha (Morillo *et al.*, 2004). 31

Tabla 2. Condiciones estandarizadas para cada locus microsatélites de arracacha. 36

3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza*)

Tabla 1. Información geográfica de las zonas de muestreo de plantas de arracacha evaluadas en este estudio. 45

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de regiones microsatélites en la determinación de la variabilidad genética en arracacha (Morillo, 2006). 46

Tabla 3. Diversidad alélica generada con nueve marcadores microsatélites en 56 accesiones de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) 48

Tabla 4. Variabilidad genética en nueve marcadores microsatélites en arracacha. 50

Tabla 5. Variabilidad genética de siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) analizados con nueve marcadores microsatélites. 52

Tabla 6. Contenido de información polimórfica (*PIC*) de siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) analizados con nueve marcadores microsatélites. 52

Tabla 7. Valores de *Gis* y Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para nueve marcadores microsatélites en los siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia). 54

Tabla 8. Distancias genéticas (Dice, 1945) para siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) analizados con nueve marcadores microsatélites. 54

LISTA DE FIGURAS

1. *Arracacia xanthorrhiza*

Figura 1. Características morfológicas de una planta de arracacha. 7

Figura 2. Experimentos de ploidía en *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. 13

Figura 3. Características de los diferentes cultivares de arracacha producidos en Boyacá y Turmequé, Boyacá (Alvarado & Ochoa, 2010). 14

2. SELECCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR'S) PARA EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza*)

Figura 1. Electroforesis de ADN genómico de arracacha. 32

Figura 2. Amplificación de los marcadores AxD55 y AxC87. 33

Figura 3. Loci amplificados según los parámetros reportados por Morillo *et al* (2004). 33

Figura 4. Observación de alelos en el Locus AxD72. 34

Figura 5. Revelado del locus AxD85 en poliacrilamida. 35

3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza*)

Figura 1. Perfil alélico de nueve marcadores microsatélites en siete cultivares de *arracacha* de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia). 49

Figura 2. Frecuencias alélicas de nueve marcadores microsatélites en siete cultivares de *arracacha* de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia). 51

Figura 3. Dendograma mediante el modelo Neighbor Joining (Unweight) del perfil alélico de 56 individuos de *arracacha* de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia). 55

Figura 4. Análisis Factorial de Correspondencia Múltiple del perfil alélico de 56 individuos de *arracacha* de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia). 56

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Distribución alélica presente en 7 cultivares de arracacha analizados con 9 marcadores microsatélites.	75
Anexo B. Modificaciones realizadas a los parámetros de amplificación por PCR para cada uno de los 14 microsatélites evaluados.	76
Anexo C. Identificación de las muestras de plantas de arracacha caracterizadas en el presente estudio.	77
Anexo D. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata	78
Anexo E. Tamaño y frecuencia genética de los alelos amplificados con 9 locus microsatélite en 7 cultivares de <i>A. xanthorrhiza</i>	79
Anexo F. Frecuencia genética de los alelos amplificados con 9 locus microsatélite en <i>A. xanthorrhiza</i>	80
Anexo G. F_{ST} de 7 cultivares de arracacha analizados con 9 marcadores microsatélites.	80
Anexo H. G_{ST} , D_M , R_{ST} y de Jost's D 7 cultivares de arracacha analizados con 9 marcadores microsatélites.	82

INTRODUCCIÓN

Este trabajo se presenta en tres capítulos: el primer capítulo abarca una descripción general sobre la arracacha (*A. xanthorrhiza*). El segundo capítulo presenta el artículo publicado sobre la estandarización y selección de los marcadores microsatélites para el análisis de variabilidad genética de arracacha. Finalmente, el capítulo 3 aborda el estudio de la diversidad genética de siete cultivares de la arracacha de Boyacá.

Capítulo I: *Arracacia xanthorrhiza*.

Este capítulo presenta la arracacha, *Arracacia xanthorrhiza*, especie andina perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae) y considerada un producto con gran potencial productivo y comercial debido a la calidad de sus nutrientes y su versatilidad. Entre las nueve especies menores de raíces y tubérculos andinos, la arracacha es el cultivo más promisorio, y se caracteriza por poseer una amplia gama de usos (Hermann, 1997) gastronómicos, nutricionales, medicinales y en alimentación animal, (Zarate *et al.*, 2008). Gastronómicamente, la arracacha en estado fresco se utiliza para preparaciones caseras de sopas, purés, pasteles y dulces, así mismo, se han desarrollado productos transformados como harina, arracacha frita, arracacha precocida, sopas instantáneas y alimentos infantiles (Rodríguez *et al.*, 2000), siendo recomendado su uso en dietas alimenticias infantiles (ICBF, 1988; Noguera & Pacheco, 2000).

Las raíces reservantes de la arracacha, nutricionalmente, se caracterizan por un elevado contenido de almidón (Hermann, 1997) de sabor agradable, de fácil digestibilidad y rico en vitamina A (León *et al.*, 2011), niacina, hierro, fósforo (Amaya & Julca, 2006) y betacaroteno. Tiene un alto contenido de calcio y ácido ascórbico (Hermann, 1997; Biondi *et al.*, 2009).

La producción comercial de arracacha se concentra en Suramérica, especialmente, en Brasil (Gupta *et al.*, 2003), Colombia, Venezuela y Ecuador, seguidos de Perú y Bolivia (Albano, Franco, & Telis, 2014). El establecimiento de la arracacha como cultivo comercial sólo se ha logrado en Brasil, primer productor mundial de arracacha (Knudsen *et al.*, 2006). El programa brasilero de mejoramiento de arracacha propuso la combinación de la variabilidad genética de todas las especies de *Arracacia* y la selección de clones promisorios con características deseadas (Hermann, 1997).

En Colombia, la producción de arracacha se realiza en departamentos de la región Andina, principalmente, en Tolima, Boyacá, Norte de Santander, Huila y Antioquia (Agronet, 2017). En el Departamento de Boyacá, los municipios de Tibaná, Viracacha, Ramiriquí, Boyacá y Turmequé son los principales productores de arracacha (Agronet, 2017). En los municipios de Boyacá y Turmequé (Boyacá), la semilla se ha transferido de generación en generación, entre vecinos y parientes (Zeven, 1998).

Capítulo II: Marcadores microsatélites para el análisis de variabilidad genética de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*).

En Colombia no existen programas o estudios de mejoramiento de la arracacha (Vásquez *et al.*, 2004) que ofrezcan material reproductivo de alta calidad o con características agronómicas y productivas de interés para los agricultores, factor que limita la decisión de siembra a algunas de los cultivares disponibles en las localidades o zonas de producción (Alvarado & Ochoa, 2010). La caracterización mediante taxonomía morfológica es una herramienta que no tiene suficiente sustento, por eso las herramientas genéticas pueden ser la línea base de bajo costo que permitan la caracterización rápida y eficiente que ayuden en su identificación y clasificación. Así mismo, caracterizar genéticamente la arracacha ayudaría a fomentar la conservación, preservación y a establecer acciones para el mejoramiento de los cultivares. El uso de herramientas moleculares como

marcadores nucleares han permitido la caracterización de diversas especies debido a que se centran en la determinación y medición de la variación existente, intra e interespecífico de los individuos de una población (Aranguren *et al.*, 2005). Los microsatélites como marcadores moleculares de ADN que se han utilizado con éxito en estudios de genotipificación de individuos, estudios de genética de poblaciones y análisis de diversidad genética de cultivares (Guzmán, 2007) pueden ser una herramienta útil para el conocimiento del germoplasma de arracacha.

Capítulo III: Diversidad genética de siete cultivares de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*).

La arracacha es una especie nativa andina considerada como susceptible o vulnerable a procesos de erosión genética, debido a factores limitantes como: poca disponibilidad de semillas, condiciones climáticas adversas, suelos infértiles, riego deficiente, altos costos de producción y manejo del cultivo (Caetano *et al.*, 2015). Además, las exigencias de producción del mercado también afectan la pérdida de la biodiversidad de la arracacha, representada por las características agronómicas, el potencial de uso y aprovechamiento en procesos de producción y transformación agroindustrial de los diferentes cultivares de esta especie (Alvarado & Ochoa, 2010). Los agricultores de Boyacá han identificado siete cultivares de arracacha de acuerdo con los caracteres fenotípicos que las plantas exhiben, especialmente, color, forma y estructura de la raíz, y las han denominado: Paliverde, Palirusia, Palinegra, Yema de Huevo, Blanca de Tarro, Amarilla de Tarro y Yucatana (Alvarado & Gaona, 2010). Actualmente, en el municipio de Boyacá (Boyacá) la producción comercial de arracacha esta enfatizada en los cultivares Yema de Huevo, Paliverde y Blanca de tarro, mientras que en el municipio de Turmequé (Boyacá) se cultiva, con preferencia, Palinegra.

Como consecuencia, los agricultores siembran los mismos cultivares durante diferentes ciclos, aspecto que puede generar consecuencias desfavorables para la

diversidad genética de la especie por el establecimiento de monocultivos genéticos o cultivos sin diversidad genética, por lo tanto, con nula o baja posibilidades de que las plantas generen mecanismos de defensa a plagas, enfermedades o condiciones adversas (Wormald, 1995) que afectan la producción y la permanencia de la especie. Colombia tiene un banco de germoplasma de arracacha de origen nacional con cerca de 80 accesiones (Aguirre, 2017), conservadas bajo condiciones de campo y clasificadas como variedades de agricultor (Valencia, Lobo & Ligarreto, 2010), es decir, “*son semillas adaptadas a las condiciones de crecimiento locales a través de la adaptación natural sin selección intencional*” (Berg, 2009). El potencial genético del banco de germoplasma de arracacha puede representar la materia prima de un programa de mejoramiento para producir material élite de gran potencial agronómico del cultivo en condiciones ambientales y de manejo óptimos (García-Carrión, 2008). Este estudio ayuda a romper la brecha existente entre las necesidades del cultivo de arracacha y la escasa investigación desarrollada sobre biología, taxonomía, caracterización molecular y diversidad genética de la especie (Kundsen *et al.*, 2004; Blas, 2009), principalmente en Colombia.

Como parte del fortalecimiento del proceso de investigación participativa desarrollado en las localidades de Boyacá y Turmequé con el proyecto: “Conservación, valoración y uso de la agrobiodiversidad de la arracacha en la provincia de Márquez, Boyacá”, se incluyó el análisis genético mediante marcadores moleculares de los siete cultivares identificadas por los productores. Este estudio permitió determinar mediante marcadores microsatélites (SSR - Simple Sequence Repeats) la diversidad genética en los siete cultivares de arracacha producidos en dos localidades de Boyacá a fin de determinar y medir la variación existente entre y dentro de los individuos de las poblaciones de estudios.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar la variabilidad genética de siete cultivares de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) producidos en los municipios de Boyacá y Turmequé, Boyacá, utilizando marcadores microsatélites

Objetivos Específicos

Determinar la heterocigosidad y la riqueza alélica de los microsatélites en los siete cultivares de los municipios de Boyacá y Turmequé en 56 individuos de arracacha.

Identificar los alelos privados y raros en los 56 individuos analizados con marcadores microsatélites provenientes de las dos localidades: Turmequé y Boyacá.

Estimar la diversidad genética de siete cultivares de arracacha de los municipios de Boyacá y Turmequé.

Realizar el primer estudio en Colombia con marcadores microsatélites en arracacha que permita la complementación de estudios agronómicos que propendan por el aprovechamiento de su diversidad para el mejoramiento y diversificación de los sistemas de producción en el país.

1. *Arracacia xanthorrhiza*

1.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO DE ARRACACHA

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es una especie perenne perteneciente a la familia Apiaceae, cultivada por el alto valor nutricional y alimenticio de sus raíces tuberosas reservantes que contienen un almidón de fácil digestibilidad (Hermann, 1997; Jiménez, 2005; Martins *et al.*, 2007; Slíva *et al.*, 2010, Adarve-Cobo & Mejía-Giraldo, 2012), y es uno de los cultivos más antiguos en la región andina, precediendo, inclusive, a la papa y al maíz (Bukasov, 1981; Amaya & Julca, 2006). *Arracacia*, que se deriva de la palabra quechua "racacha", significa raíz, y "*xanthorrhiza*," que proviene del griego, significa raíz amarilla, como uno de los tres colores de las raíces que tiene este cultivo (Morillo, 2006). La especie *Arracacia xanthorrhiza* es conocida comúnmente como "arracacha" en Perú, Bolivia y Colombia, en Ecuador se le llama "zanahoria blanca", en Venezuela "apio criollo" (Reyes, 1974), y en Brasil es conocida como "mandioquinha salsa" o "pastinaca" (Amaya & Julca, 2006; Morillo, 2006).

Las plantas de arracacha son de porte bajo y puede alcanzar hasta 1,5 m de altura. Entre el tallo y las raíces se presenta la corona o cepa, la cual da origen a la parte aérea y a las raíces tuberosas (Figura 1), principal producto de la planta que almacena la mayor parte del almidón y los nutrientes (Amaya & Julca, 2006). El tallo, cormo o "colino" es un tronco corto, cilíndrico, vertical y rizomatoso que se utiliza como esqueje o material de propagación vegetativa (Slíva *et al.*, 2010). Una planta de arracacha produce entre 10 a 30 colinos y presenta hojas con tres a cuatro folíolos laterales opuestos y uno terminal, su coloración varía de verde a rojo, de acuerdo con la variedad (Gupta *et al.*, 2003; Morillo, 2006).

1.1.1 Origen del cultivo de arracacha. Los Andes americanos se han considerado un importante centro de origen y diversidad de diferentes especies

vegetales nativas (Piperno, 2011; Gepts, 2014), principalmente de raíces y tubérculos (Morillo, 2006, Morillo *et al.*, 2016). La determinación precisa del área de origen de la arracacha no se ha establecido aún, aun cuando, se restringe a la parte norte o septentrional de los andes de Sur América (Bukasov, 1981; Hernández & León, 1994; Knudsen *et al.*, 2006; Benalcázar, 2011; Muñoz & Alvarado, 2015). La dispersión de la arracacha se ha relacionado con la época pre-inca (Amaya y Julca, 2006; Alvarado & Ochoa, 2010), inca (Montaldo, 1991) o precolombina, y el desarrollo del cultivo fue reportado durante la conquista de América en áreas que pertenecen a Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Morillo, 2006; Hermann, 1997).

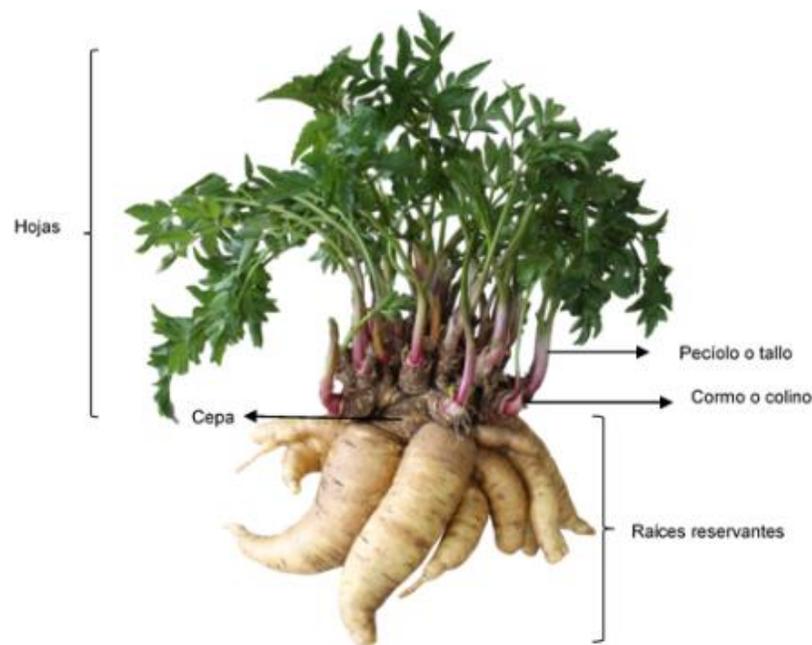


Figura 1. Características morfológicas de una planta de arracacha. En la parte aérea se observan: los colinos o cormos, el tallo o pecíolo y las hojas. En el centro, la corona o cepa, y en la parte inferior, las raíces tuberosas o reservantes.

Aunque se ha reportado las tierras altas del sur de Colombia como centro de origen (Bukasov, 1981; Hodge, 1949), también se ha indicado que el centro de origen de la arracacha podría estar en aquellas zonas donde se ha dado la presencia de especies silvestres afines (Rodríguez *et al.*, 2000; Benalcázar, 2011). Estas especies se han reportado, principalmente, en Perú y Ecuador (Hermann,

1997; Knudsen, 2003, Gupta *et al.*, 2003; Blas *et al.*, 2008; Morillo, Knudsen & Sécond, 2017), y es en Ecuador donde el género *Arracacia* presentan la mayor variabilidad genética (Poma, 2014). Colombia, también está incluida dentro del grupo de países considerados centro de diversidad primaria del género *Arracacia* y el sur de Colombia se ha considerado un antiguo centro de dispersión de la arracacha dado su intenso cultivo por los indígenas, a lo largo de la cordillera central (Vásquez *et al.*, 2004). Sin embargo, el centro de diversidad de un género no es necesariamente su centro de origen (Contreras, Luna & Morrone, 2001).

1.1.2 Taxonomía de *Arracacia xanthorrhiza*. Dentro de la familia Apiaceae (Umbelliferae) que presenta 455 géneros y entre 3.600 a 3.750 especies, se encuentra la subfamilia Apioideae, la cual incluye 413 géneros con 3.131 a 3.260 especies, en la cual se ubica la tribu Selineae con el clado *Arracacia* que está conformado por 12 géneros y 111 especies heterogéneas morfológicamente (Downie *et al.*, 2010; Danderson, 2011; Danderson *et.at.*, 2018). Uno de los géneros más grandes del clado es el género *Arracacia* (Danderson, 2011), endémico del Nuevo Mundo y descrito inicialmente por *Bancroft* en 1825 (Morillo, 2006; Amaya & Julca, 2006), el cual comprende de 30 (Mathias & Constance, citado por Knudsen, 2006; Blas *et al.*, 2008) a 45 especies (Sánchez, 2004; Danderson, 2011). La distribución de las especies se presenta desde México y Centroamérica hasta Perú y Bolivia, entre los 600 y 3.600 msnm (Blas, 2009), con la presencia de 10 (Blas *et al.*, 2008) a 12 (Sánchez, 2004) de estas especies en países de los andes suramericanos.

En el género *Arracacia* se encuentra la especie *Arracacia xanthorrhiza*, única umbellífera nativa domesticada y cultivada en Suramérica (Bukasov, 1981; Hermann, 1997; Morillo *et al.*, 2004; Blas *et al.*, 2008; Danderson, 2018), clasificada botánicamente dentro de las plantas con flores por Cronquist (1968). De acuerdo con el National Center for Biotechnology Information (NCBI), el linaje de *Arracacia xanthorrhiza*, referenciado en la base de datos taxonómica del grupo

con el código: NCBI: txid264540, esta descrito así: Organismos celulares; Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Streptophytina; Embryophyta; Tracheophyta; Euphyllophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Mesangiospermae; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; asterids; campanulids; Apiales; Apiineae; Apiaceae; Apioideae; apioid superclado; Selineae; Arracacia clado; *Arracacia*

1.1.3 Filogenética del clado Arracacia. El análisis de 53 secuencias del gen matK de cloroplasto del género *Apiaceae* identificó que gran parte de la subfamilia *Apioideae* es monofilética (Plunkett, 1996), dentro de la que se incluye al clado *Arracacia* (Downie *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios a partir de ADN de cloroplasto (cpDNA) y de secuencias de transcripción interna (ITS) han confirmado que los géneros *Arracacia*, *Coaxana*, *Coulterophytum*, *Prionosciadium* y *Rhodosciadium* del clado *Arracacia* son polifiléticos (Downie *et al.*, 2001; Downie *et al.*, 2010, Danderson *et al.*, 2018). El clado *Arracacia* presenta factores filogenéticos como baja divergencia entre secuencias, árboles filogenéticos polinómicos, alta frecuencia de poliploidía, entre otros aspectos, los cuales indican una rápida radiación de las especies (Longo *et al.*, 2017; Danderson *et al.*, 2018), es decir, que hay una formación rápida de nuevas especies a partir de un único ancestro y éstas se caracterizan por tener pocas diferencias entre ellas (Grumer *et al.*, 2018).

El análisis filogenético (bayesiano y de máxima parsimonia) del Clado *Arracacia* (92 especies de 12 géneros) permitió la identificación de nueve clados principales y un grado (Tabla 1), siendo el Clado 2 denominado el Grupo *Arracacia xanthorrhiza*, donde se encontraron relaciones hermanas entre las especies, mientras que las relaciones en los otros clados no se resolvieron (Danderson, 2011). Este estudio, también permitió la confirmación del parentesco cercano de las especies *A. ecuatorialis* (Ecuador) con *A. andina* (Bolivia) y *A. xanthorrhiza* (Constance, 1949; Hodge, 1949).

Tabla 1. Análisis filogenético del Clado Arracacia (Danderson, 2011)

Clado	Especies por Clado
Clado 1: Grupo de "verdadero" <i>Rhodosciadium</i>	<i>Arracacia hemsleyana</i> , <i>Arracacia longipedunculata</i> , <i>Arracacia quadrifida</i> y <i>Arracacia tolucensis</i> . 11 especies de <i>Rhodosciadium</i> y 12 especies del <i>Prionosciadium</i> . (BS < 50%, PP = 0.99)
Clado 2: Grupo <i>Arracacia xanthorrhiza</i>	Especies domesticada y tipo del género, <i>Arracacia xanthorrhiza</i> , poblaciones silvestres policárpicas, <i>Arracacia xanthorrhiza</i> , poblaciones silvestres monocárpicas, <i>Arracacia andina</i> y <i>Arracacia ecuatorialis</i> . (BS = 52%, PP 1.0)
Clado 3: Grupo verdadero <i>Prionosciadium</i>	<i>Prionosciadium madreense</i> y <i>Prionosciadium acuminatum</i> . (BS = 61%, PP = 0.97).
Clado 4: <i>Donnellsmithia</i>	14 especies del género <i>Donnellsmithia</i> (BS < 50%, PP = 1.0). Grupo monofilético
Clado 5: Grupo Coulterophytum	<i>Arracacia brandegei</i> y <i>Arracacia ternata</i> . <i>Enantiophylla heydeana</i> y 4 especies de <i>Coulterophytum</i> . (BS = 54%, PP = 1.0).
Clado 6: Grupo <i>Coaxana</i>	<i>Arracacia ebracteata</i> , <i>Coaxana purpurea</i> , <i>Coaxana bambusioides</i> , <i>Arracacia moschata</i> , <i>Arracacia hintonii</i> y <i>Arracacia schneideri</i> . (BS = 50%)
Clado 7: Grupo <i>Myrrhidendron</i>	<i>Arracacia bracteata</i> , <i>Arracacia rigida</i> , <i>Arracacia elata</i> , <i>Arracacia molseedii</i> , <i>Arracacia nelsonii</i> , <i>Arracacia pringlei</i> y <i>Arracacia ravenii</i> . <i>Myrrhidendron donnell-smithii</i> , <i>Myrrhidendron galucescens</i> , <i>Myrrhidendron maxonii</i> y <i>Myrrhidendron pennellii</i> Clado (PP = 0.98)
Clado 8: Grupo <i>Arracacia atropurpurea</i>	<i>Arracacia atropurpurea</i> , <i>Arracacia aegopodioides</i> , <i>Arracacia edulis</i> , <i>Arracacia macvaughii</i> y <i>Arracacia vaginata</i> (BS <50%)
Clado 9: Grupo <i>Mathiasella</i>	<i>Mathiasella bupleuroides</i> y <i>Arracacia anomala</i> . <i>Prionosciadium humile</i> y <i>Prionosciadium simplex</i> (BS <50%)
Clado Relaciones diversas del clado <i>Arracacia</i>	<i>Arracacia filipes</i> , <i>Dahliaphyllum almedae</i> , <i>Arracacia compacta</i> , <i>Arracacia fruticosa</i> , <i>Neonelsonia acuminata</i> , <i>Prionosciadium. Cuneatum</i> , <i>Prionosciadium serratum</i> , <i>Prionosciadium thapsoides</i> , <i>Prionosciadium watsonii</i> , " <i>Prionosciadium. gomez-pompai</i> " (ined.), <i>Rhodosciadium diffusum</i> y <i>Rhodosciadium nelsonii</i>
Grado: Grupo <i>Niphogeton/Cotopaxia</i>	Los géneros <i>Cotopaxia</i> , <i>Niphogeton</i> y <i>Perissocoeleum</i> .

1.1.4 Nivel de ploidía de arracacha. De acuerdo con estudios de cariotipo del patrón cromosómico, la arracacha cultivada tiene 44 cromosomas, el mismo número que poseen especies silvestres y no silvestres del género *Arracacia* (Constance *et al.*, 1976; Blas, 2005; Morillo, 2006). La arracacha ha sido considerada una especie diploide con conformación de $2n = 2x = 44$, para un número base de $n=22$ (Constance *et al.*, 1976), también se ha sugerido que es una especie tetraploide (Hermann, 1997) con un número base de $n = 11$ y una conformación de $2n = 4x = 44$ cromosomas (Blas *et al.*, 1997; Salazar, 1997; Morillo *et al.*, 2004; Santayana, 2012).

La poliploidía como característica del genoma vegetal (Tate, 2005) se ha determinado, también en la familia Apiacea (Danderson *et al.*, 2018), al menos en un 10% de las especies que la integran (Wood *et al.*, 2009). El nivel de ploidía de una especie puede establecerse mediante análisis molecular al identificar el número de alelos, sin embargo, en especies poliploides, no es fácil determinar la dosis alélica (Kalinowski, 2004) debido a la presencia de genotipos heterocigotos parciales no identificables, a la dificultad para establecer la frecuencia de alelos nulos y a la observación de artefactos (bandas tartamudas) que se generan durante el proceso de amplificación (Dufresne *et al.*, 2014), ya que, la poliploidía es una de las causas de la observación de múltiples alelos (Dalton *et al.*, 2017). Con el análisis de marcadores moleculares tipo microsatélite, el patrón alélico de los SSR permite determinar la ploidía en cada variedad (Ponce, 2013; Morillo, 2017), especialmente en genotipos con uno y cuatro alelos, sin embargo, en los genotipos con dos o tres alelos existe el riesgo de asignar una ploidía equivocada (Kozub, 2017).

La hipótesis de diploidía en *A. xanthorrhiza* fue asumida en el estudio de la diversidad genética con 14 marcadores SSR de 72 accesiones cultivadas en Ecuador y Perú, las cuales revelaron la amplificación de 1 ó 2 alelos con 11 loci. Morillo (2006), aunque no confirmó el nivel de ploidía de *A. xanthorrhiza*, consideró

que es “una especie diploide derivada de un género que comprende solo especies diploides conocidas”, compatible con un antiguo tetraploide diploidizado, ya que, en la tetraploidía, las secuencias flanqueantes duplicadas o las quimeras somáticas pueden explicar perfiles de SSR con la amplificación de 3 y 4 bandas. Recientemente, el estudio genético con marcadores de microsatélites sobre las relaciones genéticas entre la arracacha cultivada (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) y sus parientes silvestres cercanos, también, se realizó bajo el supuesto de diploidía de *A. xanthorrhiza*, debido al perfil diploide clásico que presentaron los marcadores SSR (Morillo, 2017), y a que es posible esperar hasta cuatro alelos en la amplificación de microsatélites de una especie autotetraploide¹, como la arracacha (Ishiki *et al.*, 2001). En comunicación escrita reciente con el Dr. Eduardo Morillo, respecto al nivel de ploidía de *Arracacia xanthorrhiza*, él manifestó que: “Efectivamente se trata de una especie tetraploide, pero posiblemente diploidizada, por lo que mi recomendación sería analizar los datos como si fuese un verdadero diploide”.

Para este estudio, el perfil alélico de cada locus microsatélite determinó la tetraploidía (4x) de todas los cultivares de arracacha, donde 45 individuos de arracacha mostraron perfil tetraploide (4x) (Anexo A), mientras que 11 individuos (cultivares Blanca de Tarro, Palirusia y Amarilla de Tarro) mostraron perfiles triploides (3x). Experimentalmente, se confirmó el número de cromosomas y el nivel de ploidía mediante las técnicas de observación de cromosomas metafásicos en raíces y el conteo del número de cloroplastos en células guarda, (Figura 2)

1.1.5 Materiales genéticos de arracacha. Se utilizan diferentes conceptos para referirse o identificar el germoplasma de arracacha, con frecuencias los autores los denominan cultivar (Seminario, 2006; Morillo, 2006; Amaya & Julca, 2006), forma hortícola (Morillo, 2006; Hermann, 1997; Higuira, 1977), accesión (Vásquez

¹ Son especies autoploiploides o con múltiples dotaciones de cromosomas que se originaron a partir de una especie (Hernández, 2001), generadas por la duplicación espontánea o inducida de un complemento $2n$ a $4n$.

et al., 2004), clon (Amaya & Julca, 2006), o genotipo (Elsayed *et al.*, 2010), variedad (Lozano *et al.*, 1998; Soto, 2004, Palacios, Morales & Arias, 2011; Muñoz, Almanza-Merchán & Alvarado, 2015), entre otros. Sobre el uso de un concepto u otro, Arévalo *et al.* (2006), precisa en el estudio de la agroterminología en caña de azúcar, que es necesario hacer un adecuado uso de las diferentes definiciones.

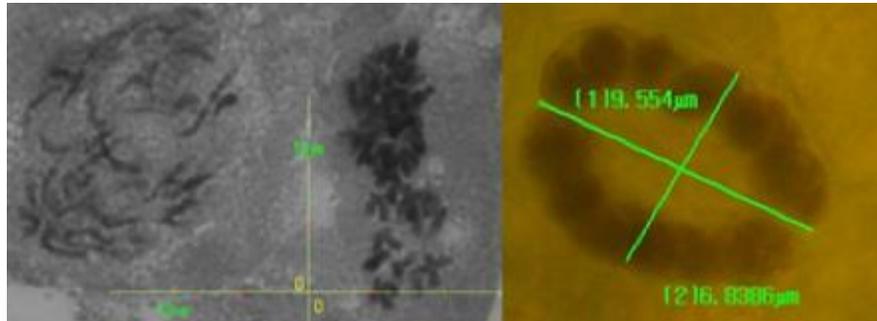


Figura 2. Experimentos de ploidía en *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Izquierda: cromosomas metafásicos en raíces. Derecha: Conteo de cloroplastos en células guarda.

Así, genotipo “es un grupo de individuos de igual constitución genética” y clon es “un conjunto de individuos genéticamente uniformes, que tuvieron su origen de un único individuo, por medio de propagación vegetativa”. El término cultivar, neologismo de *cultivated variety*, se utiliza para aquellas plantas cultivadas que el hombre selecciona por medio de técnicas agrícolas y que poseen caracteres permanentes, morfológicos, fisiológicos, citológicos, químicos. El término variedad hace referencias a aquel grupo de plantas que la naturaleza selecciona por adaptación de la especie ante cambios accidentales y naturales en el hábitat (Arévalo *et al.*, 2006; Barnes & Beard, 1992). Aunque para algunos autores aun no se tiene claridad respecto al uso del concepto de variedad en el cultivo de arracacha (Alvarado & Ochoa, 2010),

En arracacha, el concepto forma hortícola es una caracterización altamente discriminatoria y de fácil registro, basada en el color externo e interno de la raíz, y que permite la clasificación de la arracacha en tres grandes grupos: blanca,

amarilla y morada (Higuita, 1977; Valderrama & Seminario, 2004; Palacios *et al.*, 2011, Rivera, 2015), no obstante, tanto la evaluación fenotípica como la genotípica, en conjunto, son importantes para la adecuada identificación de la diversidad de una especie (Berdugo-Cely *et al.*, 2017) y la caracterización de la forma hortícola no lo permite. Así mismo, el término material genético, que hace referencia a “un grupo de plantas que a simple vista se pueden agrupar por los rasgos de color, forma de sus estructuras y características agronómicas” (Alvarado & Ochoa, 2010), tampoco aborda las características genéticas del cultivo de arracacha.

En esta investigación, y en las derivadas de la misma, se utilizó el término *Cultivar* para identificar los 7 materiales vegetales de estudio, los cuales los productores del municipio de Boyacá y Turmequé denominaron: Paliverde, Palirusia o Palimorada, Palinegra, Yema de Huevo o Cartagenera, Blanca de Tarro, Amarilla de Tarro y Yucatana (Figura 3).

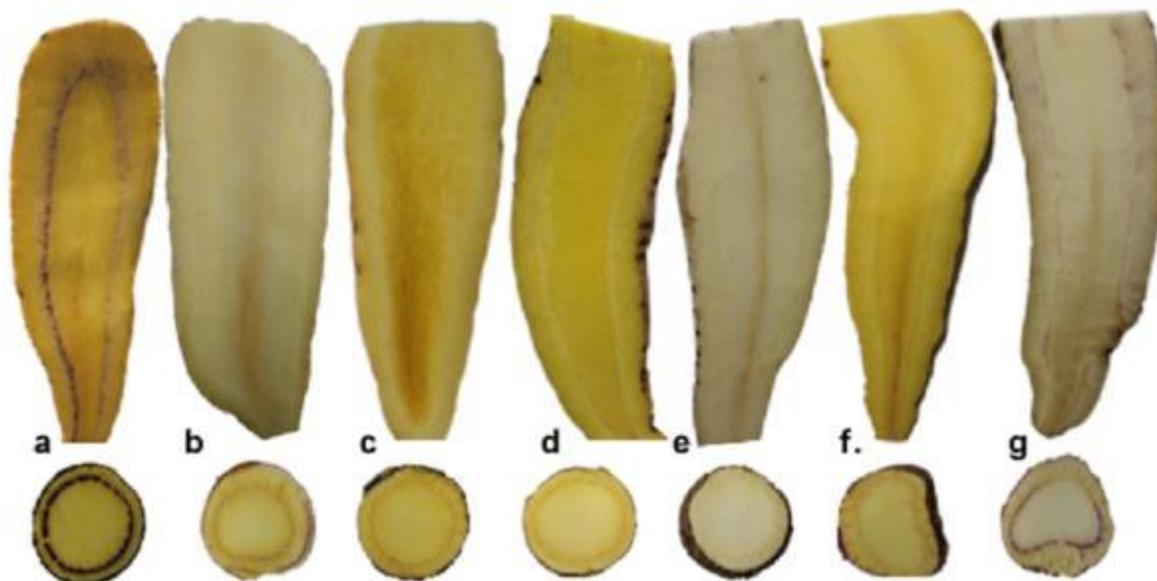


Figura 3. Características de los diferentes cultivares de arracacha producidos en Boyacá y Turmequé, Boyacá (Alvarado & Ochoa, 2010). a. Paliverde, b. Palirusia, c. Palinegra, d. Yema de Huevo, e. Blanca de Tarro, f. Amarilla de Tarro y g. Yucatana.

Esta designación fue basada en las características fenotípicas, como el color de las hojas, los tallos y las raíces, así como en la forma y estructura de la raíz, diferenciando por estas últimas los cultivares en cultivares de tarro (con mayor tamaño de la cepa y menor número de raíces reservantes) o de apio (con escaso o nulo desarrollo de la cepa y mayor número de raíces reservantes) (Tabla 2). Los materiales Blanca de Tarro, Amarilla de Tarro y Palinegra son cultivados en Boyacá desde 1950, mientras que los materiales Palirusia y Paliverde fueron introducidos desde Cajamarca (Tolima), al igual que Yema de Huevo, introducida como cultivo en Boyacá en el 2000, aproximadamente (Alvarado & Ochoa, 2010).

Tabla 2. Características del color en los principales órganos de los cultivares de estudio.

Nombre común	Color de la hoja	Color del tallo	Color predominante en la raíz	Raíz con anillo morado
De Tarro				
Amarilla de Tarro	Verde	Verde	Amarillo	No
Blanca de Tarro	Verde	Verde	Blanco	*
Yucatana	Morado oscuro	Morado suave	Blanco	Sí
De Apio				
Paliverde	Verde	Verde	Amarillo	Sí
Palirusia	Verde	Morado suave	Amarillo	No
Palinegra	Verde-Morado	Morado	Amarillo	No
Yema de Huevo	Verde	Verde	Amarillo	No

Fuente: Alvarado & Ochoa, 2010.

1.1.6 Importancia económica de la arracacha. Actualmente, el país con mayor área de cultivo de arracacha es Brasil, seguido por Colombia, Ecuador y Perú. En el 2002, Colombia era el primer productor mundial de arracacha, con una producción anual de más de 100.000 toneladas (Ministerio de Agricultura, 2002). Entre 2002 y 2009 se presentó una disminución en la producción de arracacha en el país, obteniéndose sólo 49.591 toneladas (t). En 2017 se cultivaron un total de 8.870 hectáreas (ha) de arracacha en Colombia, siendo Tolima el principal productor con 43.273 t, seguido por Boyacá con 14.010 t, Norte de Santander con

10.727 t y Santander con un 7.492 t. Antioquia presenta el mejor rendimiento de producción con 15 t/ha (Agronet, 2017).

En el Departamento de Boyacá, el municipio de Tibaná fue en 2017 el primer productor de arracacha con 4.838 t, seguido por el municipio de Viracacha con 2.831 t, Ramiriquí 1.498 y Boyacá con 1.040 t. Turmequé produjo sólo 109 t. La producción anual promedio de arracacha alcanzó las 2.500 t (Agronet, 2017), las cuales se comercializan en los mercados locales de Tunja, Boyacá, Turmequé y Bogotá (Rojas & Barreto, 2016). En los municipios de Boyacá y Turmequé, la principal fuente de ingresos está basada en el sector agrícola, produciendo principalmente arracacha, papa, haba, maíz, arveja y frutales, donde la tecnología aplicada al desarrollo del cultivo es baja, característica que genera un incremento en el ciclo del cultivo de la arracacha (12 y 18 meses) y en el costo de la producción (Alvarado, 2010; Rojas & Barreto, 2016).

1.2 ANTECEDENTES GENÉTICOS

1.2.1 Mejoramiento genético en arracacha. En Colombia no existen programas o estudios de mejoramiento de la arracacha (Vásquez *et al.*, 2004). En cambio, Brasil en 1987 creó el primer y único programa de mejoramiento de arracacha con el desarrollo de un material adaptado a diferentes ambientes. Este programa de mejoramiento genético de arracacha ha obtenido clones derivados por autofecundación del material mejorado, que presentan diversas características de interés, tales como vigor de la planta, raíces de pigmentación amarilla y forma cilíndrica, al ser propagados por semilla.

1.2.2 Estudios de variabilidad genética en arracacha. Mathias & Constance (1944, 1968 y 1973) realizaron las primeras investigaciones de identificación, designación y descripción sobre la diversidad genética del género *Arracacia* en Centro y Norte América (Elsayed *et al.*, 2010). En 1993, Mazon usó patrones isoenzimáticos en la colección de 72 entradas de arracacha del Ecuador,

estableciendo una baja variabilidad genotípica entre las accesiones y explicando la variabilidad fenotípica del cultivo como resultado de mutaciones somáticas.

En 1997, en el IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos se presentó la investigación denominada: “Caracterización molecular de 29 morfotipos de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) de la colección ecuatoriana”, realizada con marcadores RAPD's (Castillo, 1997), estableciendo una baja variabilidad genotípica en las accesiones de arracacha del Ecuador. Valderrama y Seminario (2004) analizaron la variabilidad morfológica y la distribución geográfica de 186 entradas de arracacha cultivada en 4 departamentos de Perú con 17 descriptores cualitativos. Mediante el análisis de agrupamiento de germoplasma determinaron 76 morfotipos y cuatro formas hortícolas, entre los cuales el 59% fueron duplicados.

En Colombia, Vásquez *et al.* (2004) estudiaron la variabilidad de 62 accesiones de la colección colombiana de arracacha de los departamentos del Tolima, Huila, Boyacá y Cauca mediante caracterización morfológica a través de 28 descriptores cualitativos y 13 cuantitativos discriminativos, y determinaron que hay una amplia variabilidad cualitativa con polimorfismo en la totalidad de las características, así como, una amplia variabilidad cuantitativa, con núcleos de agrupamiento relacionados con las zonas geográficas de los sitios de colecta. La amplia variabilidad de las accesiones les da valor como material genético base para programas de mejoramiento de la especie *A. xanthorrhiza*.

Morillo *et al.* (2004) usó ADN de cultivares de arracacha de raíz blanca de Ecuador y Perú para desarrollar la primera biblioteca enriquecida de 18 microsatélites para arracacha (*A. xanthorrhiza* B), de los cuales 14 fueron polimórficos para detectar diversidad genética entre especies cultivadas y silvestres relacionadas. La investigación determinó que, aunque la diversidad alélica en especies cultivadas es baja, hay una buena transferibilidad de los microsatélites a formas silvestres

estrechamente relacionadas. Morillo (2006), también observó que la forma cultivada tiene una diversidad alélica menor mientras que es mayor en las formas silvestres. Además, estudió la diversidad genética de 72 accesiones de *A. xanthorrhiza* con marcadores SSR y usó siete pares de AFLP y ADN del cloroplasto secuenciado (CpADN) para caracterizar 27 accesiones de *A. acuminata*, *A. incisa*, *A. elata*, *A. moschata* y *A. xanthorrhiza*, encontrando que las especies no tuberosas, *A. acuminata*, *A. elata* y *A. moschata*, son las formas silvestres menos relacionadas con arracacha (*A. xanthorrhiza*), mientras que *A. incisa*, forma tuberosa silvestre, es la especie más alejada de *A. xanthorrhiza* y no puede ser considerada un ancestro directo de arracacha cultivada.

Blas *et al.* (2005 y 2008) estudiaron la diversidad genética mediante 5 oligonucleótidos AFLP y 100 descriptores morfológicos en 4 especies del género *Arracacia* de Perú. Esta investigación permitió considerar 28 caracteres morfológicos como discriminatorios y útiles en la identificación de las especies andinas de arracacha y estimaron la diversidad intraespecífica (25,8%) e interespecífica (24,6%). La variación (49,5%) encontrada fue atribuida a las diferencias entre las especies. Los marcadores morfológicos y moleculares usados les permitieron la identificación botánica de las especies *A. xanthorrhiza*, *A. alata* y *A. incisa*. En cambio, consideraron que la especie *A. equatorialis* podría ser reagrupada con *A. xanthorrhiza* como una misma especie.

Biondi *et al.* (2009) investigó la diversidad genética a través de 5 oligonucleótidos AFLP en 334 accesiones de arracacha procedentes de cinco bancos de germoplasma del Perú. Fue posible obtener 148 marcadores AFLP polimórficos con alta resolución. Los resultados mostraron que las accesiones de arracacha del Perú son muy variadas, siendo las cinco colecciones significativamente diferentes entre ellas y sin duplicados. También establecieron, de acuerdo con los patrones de distribución geográfica, que la diversidad de arracacha es mayor en el norte del Perú, donde la mayoría de las accesiones son del Instituto Nacional de Innovación

Agraria y de la Universidad Nacional de Cajamarca, siendo la colección del Centro Internacional de la Papa la más representativa del centro de Perú al presentar un alto índice de diversidad teniendo un bajo número de accesiones.

La reciente secuenciación del genoma circular del cloroplasto de *A. xanthorrhiza*, determinó el tamaño del genoma, el contenido de G+C, las regiones que lo componen y los genes que codifican proteínas y ARNr y ARNt. También encontró que, estructuralmente, los genomas de cloroplasto de las especies apiáceas *Daucus carota* y *A. xanthorrhiza*, son similares (Alvarado *et al.*, 2017).

1.3 LOS MICROSATÉLITES COMO MARCADORES MOLECULARES

Los microsatélites son secuencias con motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem, normalmente incrustado dentro de fragmentos de ADN (Litt & Luty, 1989), presentes en todos los eucariotas y, en menor medida, en procariontes (Tautz & Renz, 1984; Vashakidze & Prangishvili, 1987), con una mayor frecuencia en secuencias no codificantes del ADN genómico (Morgante *et al.*, 2002). Los microsatélites también son llamados motivos de secuencias simples - SSMS (Smeets *et al.*, 1989), secuencias simples repetidas - SSRs, repeticiones cortas en tándem - STRs (Edwards *et al.*, 1991), polimorfismos de longitud de secuencias simples - SSLPs (Dietrich *et al.*, 1992), entre otros. Las repeticiones en tándem de mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos son los principales tipos de microsatélites, sin embargo, repeticiones de cinco (penta) o seis (hexa) nucleótidos, también, se clasifican como microsatélites (Ellegren, 2004).

De acuerdo con la estructura de los motivos, los microsatélites se clasifican en: puro ((CA)₁₂), puro interrumpido ((CA)₈ - (CT) - (CA)₃), compuesto ((CA)₉ - (GAA)₅), compuesto interrumpido ((CA)₉ - (CAA) - (GAA)₄) y complejo ((CA)₄ - (T)₇ - CAAT - (CTT)₃) (Buschiazzo & Gemmel, 2006). El motivo dinucleótido A-T el más abundante en la mayoría de las plantas (Vargas *et al.*, 2008).

Con el desarrollo de la PCR (Mullis *et al.*, 1986) se inicia el uso de los microsatélites como marcadores polimórficos y aunque los microsatélites fueron desarrollados en humanos (Tautz, 1989; Litt & Luty, 1989), el potencial como marcadores útiles en estudios con plantas fue rápidamente reconocido, y aplicado en especies como arroz, cebada, trigo y forestales como eucalipto y roble, (Rossetto *et al.*, 1999). Los marcadores moleculares permiten estudiar polimorfismos en el ADN, origen de toda la variación genética, y constituyen una aproximación más fiable para determinar las diferencias entre variedades o especies (Vélez, 2007; Alcántara, 2007; Arif & Khan 2009 Kuma *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2015).

Los microsatélites se caracterizan por estar abundante y uniformemente dispersos en el genoma, por presentar herencia codominante y multiallelismo con una heterocigosidad esperada, frecuentemente, por encima de 0.7 (Brondani *et al.*, 1998), son altamente transferibles entre poblaciones, se pueden automatizar fácilmente y ser eficaces al ser analizados por un ensayo rápido y sencillo de PCR, requieren una cantidad mínima de ADN y pueden ser intercambiados entre los laboratorios y (Brondani *et al.*, 1998; Goncalvez & Rubiano, 2011). Los microsatélites son hipervariables (Gómez, 2012), altamente polimórficos y permiten la discriminación de individuos íntimamente relacionados (Brondani *et al.*, 1998). presentan un mayor polimorfismo que los RAPD y RFLP (Provan *et al.*, 1996; Blair *et al.*, 2007), con un poder de discriminación siete veces mayor que los RAPD (Kraic *et al.*, 1998).

El desarrollo de marcadores SSR es muy laborioso debido a que deben identificarse y secuenciarse regiones genómicas concretas, aunque una vez conseguido presenta un sistema muy informativo (Azofeifa-Delgado, 2006). La desventaja de los microsatélites se relaciona con la especificidad requerida que está asociada a la temperatura de acoplamiento, las combinaciones de las reacciones, la concentración del cebador y del magnesio (Martínez *et al.*, 2015).

Como uno de los marcadores genéticos más versátiles, los microsatélites se utilizan en un número impresionante de aplicaciones biológicas (Buschiazzo & Gemmel, 2006), tales como: identificación individual y pruebas de paternidades, mapas genéticos y genómica comparativa, asignación de individuos a raza, estudios de genética poblacional, análisis de variabilidad genética, análisis de la estructura poblacional y análisis de diferenciación genética (Aranguren *et al*, 2006). Así mismo, se reconoce su potencial como una técnica disponible para estudiar la diversidad genética vegetal que incluye estudios de caracterización individual hasta mapeo genómico (Muñoz *et al.*, 2008).

1.4 POTENCIAL DEL ESTUDIO DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Este estudio, el primero en Colombia, a nivel molecular sobre la determinación de la diversidad genética de cultivares de arracacha, permitiría la posibilidad de identificar y establecer el potencial de variabilidad de la especie al caracterizar la diversidad genética, evaluar la erosión genética y establecer estrategias de gestión y conservación del recurso genético (Morillo *et al*, 2017), especialmente, al desarrollar o mantener materiales de alta calidad vegetativa, de interés agroeconómico y comercial, que posicione la arracacha como cultivo en la región.

Con este estudio se puede contribuir al desarrollo de un programa de mejoramiento integral de la especie, con la implementación de estrategias que incentiven el aprovechamiento de la arracacha, así como la posibilidad de conocer las características genéticas para la generación de nuevos cultivares con características de interés que pueden incidir en el aumento del consumo, aun cuando, modificar las preferencias actuales de consumo en la canasta familiar es un reto que es necesario asumir, no solo para el cultivo de arracacha, sino para todas las especies menores de raíces y tubérculos andinos. Destacar los importantes atributos gastronómicos, nutricionales y medicinales que posee la arracacha (Zarate *et al.*, 2008) como alimento nutracéutico, ayudaría con este fin.

REFERENCIAS

Adarve-Cobo, M. A., Mejía-Giraldo, L. M. 2012 Obtención y caracterización físico-química de almidón fermentado de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Vitae, 19(1), S255-S257.

Agronet. 2017. Cadena productiva arracacha - área, producción y rendimiento. Recuperado [febrero, 10, 2018] on-line database, <https://www.datos.gov.co/d/q5m2-je3u/visualizacion#>

Alcaldía de Turmeque. 2015. Recuperado [noviembre, 2, 2015] on-line database, <http://www.turmeque-boyaca.gov.co/>

Alvarado G., Á., & Ochoa, L. 2010. Local technologies of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) production at Boyacá, department of Boyacá. Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica, 13(1), 125-133.

Alvarado, J. S., López, D. H., Torres, I. M., Meléndez, M. M., Batista, R. A., Raxwal, V. K., & Arun, A. 2017. Sequencing and De Novo Assembly of the Complete Chloroplast Genome of the Peruvian Carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Genome announcements, 5(7), e01519-16.

Amaya, J., Julca, J., 2006. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Gerencia Regional de Recursos Naturales y Conservación del Medio Ambiente. Gobierno Regional La Libertad. Perú, p. 15.

Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Arch. Latinoam. Prod. Anim, 13(1): 1-6.

Arévalo, R. A., Bertocini, E. I., Guirado, N., & Chaila, S. 2006. Los términos cultivar o variedad de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). Revista Chapingo Serie Horticultura, 12(1).

Benalcázar R., B. M. 2011. Determinación de las características físicas y químicas de la Zanahoria Blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) proveniente de la Zona de San José de Minas Provincia de Pichincha (Bachelor's thesis).

Berdugo-Cely J, Valbuena RI, Sánchez-Betancourt E, Barrero LS, Yockteng R 2017 Genetic diversity and association mapping in the Colombian Central Collection of *Solanum tuberosum* L. Andigenum group using SNPs markers. PLOS ONE 12(3): e0173039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173039>

Berg, T. 2009. Landraces and folk varieties: a conceptual reappraisal of terminology. Euphytica, 166(3), 423-430.

Biondi, J., Zorrilla, C., Manrique, I., Arbizu, C., Roca, W., Medina, T., Seminario, J., Quispe, J., Tay, D. & Blas, R. 2009. Genetic diversity of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) in Peru. En 15th Triennial ISTRC Symposium.

Blas, R. 2005. Diversity of *Arracacia* species in Peru. Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique. Faculte Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux.

Blas, R. 2009. Problemática del cultivo y valor agregado de la arracacha.

Blas, R., Arbizu, C. & Rodríguez, G. 1997. Número de cromosomas de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Universidad Nacional Agraria La Molina. Anales Científicos 32: 44-54.

Blas, R., Ghislain, M., del Rosario Herrera, M., & Baudoin, J. P. 2008. Genetic diversity analysis of wild *Arracacia* species according to morphological and molecular markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 55(5): 625-642.

Blas-Sevillano, R., Julca-Otiniano, A., & Baudoin, J. P. 2006. Inducción floral de *Arracacha* (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Idesia (Arica), 24(1), 31-36.

Bukasov, S. M. 1930. *Arracacha*. Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE, Turrialba. 173 p.

Caetano, C. M., Peña, R. D., Maigual, J. L., Vásquez, L. N., Caetano Nunes, D., & Pazdiora, B. R. C. 2015. Mejoramiento participativo: herramienta para la conservación de cultivos subutilizados y olvidados. *Acta Agronómica*, 64.

Castillo, R. 1997. Caracterización molecular de 29 morfotipos de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) de la colección ecuatoriana, IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco, Libro de Resúmenes, p. 42.

Constance, L. 1949. The South American species of *Arracacia* (Umbelliferae) and some related genera. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 76(1), 39-52.

Constance, L., Chuang, T. I., & Bye, R. A. 1976. Chromosome numbers in Chihuahuan Umbelliferae. Botanical Museum Leaflets, Harvard University, 24(8), 241-247.

Constance, L., Chuang, T., & Bell, C. 1976. Chromosome numbers in Umbelliferae. V. American Journal of Botany, 63(5), 608-625.

Contreras, M., I. Luna & J. Morrone. 2001. Conceptos Biogeográficos. Elementos 41: 33-37.

Danderson, C. A. 2011. A phylogenetic study of the Arracacia clade (Apiaceae) (Doctoral dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign).

Danderson, C. A., Downie, S. R., & Hermann, M. 2018. Rampant polyphyly in the Arracacia clade (Apiaceae) and an assessment of the phylogenetic utility of 20 noncoding plastid loci. *Molecular phylogenetics and evolution*, 118, 286-305.

Downie, S. R., Plunkett, G. M., Watson, M. F., Spalik, K., Terentieva, E., Troitsky, A. & Lahham, J. 2001. Tribes and clades within Apiaceae subfamily Apioideae: the contribution of molecular data. *Edinburgh Journal of Botany*, 58(02): 301-330.

Downie, S.R., K. Spalik, D.S. Katz-Downie, & J.-P. Reduron. 2010. Major clades within Apiaceae subfamily Apioideae as inferred by phylogenetic analysis of nrDNA ITS sequences. *Pl. Divers. Evol.*, 128: 111–136.

Elsayed, A., Granate, MJ. & da Silva, DJH. 2010. Developing a core collection of Brazilian arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Banc.) based on morphological and agronomic descriptors character of Brazil. *Gene Conserve*, 9: 1-10.

García-Carrión, L.F. 2008.- Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en Perú. M & O Consulting S.A.C.

Gepts, P. 2014. The contribution of genetic and genomic approaches to plant domestication studies. *Current opinion in plant biology*, 18, 51-59.

Gupta, K., G. Talwar, V. Jain, K. Dhawan & S. Jain, 2003. Salad Crops Root, Bulb and Tuber Crops. In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*,

Hermann, M. 1997. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). En: M. Hermann & J. Heller (eds.). *Andean Roots and Tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon*. International Plant Genetic Resources Institute, Roma. pp. 75-172.

Hernández, J. E., & J. León. 1994. Cultures marginalisées. 1492. Une autre perspective. *FAO: Production végétale et protection des plantes*, 26.

Hodge, W. H. 1949. La arracacha comestible. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 10(35), 232-254.

http://www.telecentros.pe/img_upload/3ebf28670cc26d6c98d026abe0126c40/Problem_tica_del_cultivo_de_la_arracha.pdf

Jiménez, F. 2005. Características nutricionales de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y sus perspectivas en la alimentación. Red Peruana de Alimentación y Nutrición.

Knudsen, S., Ørting, B. y Sørensen, M. 2006. Multiplicación y conservación de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) y ajipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi). En: Moraes, M; B. Øllgaard, B; Kvist, P; Borchsenius, F; Balslev H. (ed.) Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. pp. 483-508.

Longo, S. J., Faircloth, B. C., Meyer, A., Westneat, M. W., Alfaro, M. E., & Wainwright, P. C. 2017. Phylogenomic analysis of a rapid radiation of misfit fishes (Syngnathiformes) using ultraconserved elements. *Molecular phylogenetics and evolution*, 113, 33-48.

Lozano, D. A., Espinosa, E. R., Valbuena, E., Ligarreto, G. A., & Reyes, L. M. 1998. Establecimiento in vitro de diez variedades de la colección colombiana de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* bancroft). *Revista Comalfi (Colombia)* v. 25 (1-3) p. 12-17, 0120-0682.

Martins, C. A. D. C., Portz, A., Brasil, F. D. C., Silva, E. M. R. D., Lima, E., & Zonta, E. 2007. Pre-rooting of rhizomes of peruvian carrot in different trays and substrates with arbuscular micorrhizal fungi. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(1), 106-112.

Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. San José de Costa Rica: Agroamérica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 408p.

Morillo, E., & Sécond, G. 2017. Tracing the domestication of the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.): a molecular survey confirms the selection of a wild form apt to asexual reproduction. *Plant Genetic Resources*, 15(5), 380-387.

Morillo, E., Knudsen, S. R., & Sécond, G. 2017. Assessment of genetic relationships between cultivated arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) and its wild close relatives in the area of domestication using microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 18(6), 1267-1275.

Morillo, E. 2006. Origine de la diversité de plantes domestiquées par la reproduction végétative en Amérique du Sud: reproduction sexuée résiduelle et introgression d'espèces sauvages éloignées. Exemples del' arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr., Apiaceae) et du manioc (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae). Thèse de Doctorat. ENSAM, Montpellier. 170p.

Morillo, E., Second, G., Pham, J.L. y Risterucci A.M. 2004. Development of DNA microsatellites markers in the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Banc.). *Molecular Ecology Notes*, 4: 680-682.

Muñoz, A. L., Almanza-Merchán, P., & Alvarado, G. 2015. Caracterización preliminar del cultivo de arracacha *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft en el departamento de Boyacá. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 32(1), 3-11.

National Center for Biotechnology Information. *Arracacia xanthorrhiza*. Recuperado [noviembre, 2, 2015] on-line database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=264540&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Palacios, R., Morales, M., & Arias, G. C. 2011. Evaluación químico bromatológica de tres variedades de *Arracacia xanthorrhiza* "Arracacha". *Ciencia e Investigación*, 14(2): 12-14.

Piperno, D. R. 2011. The origins of plant cultivation and domestication in the New World tropics: patterns, process, and new developments. *Current anthropology*, 52(S4), S453-S470.

Plunkett, G. M., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. 1996. Evolutionary patterns in Apiaceae: inferences based on matK sequence data. *Systematic Botany*, 477-495

Rivera V., J. J.; Garnica M., J. P.; Rubio B., S. C.; Lozano T., M. D.; Rosero E, J. A.; T. C., L. Y. y Herrera S., Y. A. 2015. Recomendaciones tecnológicas para la producción de semilla de calidad de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft): manejo fitosanitario de la semilla vegetativa de arracacha. Bogotá: Corpoica. 72 p

Rodríguez B., G. A., García Bernal, H. R., Camacho Tamayo, J. H., Arias Guerrero, F. L., Rivera Varón, J. J., & De la Torre Duque, F. 2000. La harina de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Manual técnico para su elaboración.

Rojas Cruz, D. L., & Barreto Bernal, P. C. 2016. Diagnostic of competitiveness of the producer sector of *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Case municipality of Boyacá (Colombia) 2014. *Apuntes del CENES*, 35(62), 245-278.

Salazar C. 1997. Evaluación y caracterización citogenética de veinte entradas ecuatorianas de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Banc.). Tesis Ing. Agr. Universidad Central, Quito, Ecuador. p. 56

Sánchez, I. 2004. Parientes silvestres de *Arracacia xanthorrhiza*, Bancroft: Apiaceae, Apioideae. En: Seminario, J. (ed.). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-

2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. p. 215-221.

Santayana Rivera, M. L. 2012. Caracterización citogenética y molecular de las especies cultivadas del género *Pachyrhizus* Richard ex DC.

Seminario, J. 2004. Origen de las Raíces Andinas. En: Seminario, J. (ed.). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. p. 1-38.

Seminario, J. 2006. Descriptores para la caracterización de germoplasma de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). En: Manual para caracterización In situ de cultivos nativos: Conceptos y Procedimientos. Ministerio de Agricultura, INIA, Fondo Mundial del Medio Ambiente-FMAM, Cooperación Italiana y PNUD. Lima, Perú, 61-68.

Soto, K. 2004. *Características del almidón de las variedades amarilla, blanca y morada de arracacha (Arracacia xanthorrhiza)* (Doctoral dissertation, Tesis de Ingeniero en Industrias Alimentarias, Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo-Perú).

Tautz, D., & Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10), 4127–4138.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res.*, 17: 6463–6471

Valderrama, M., & Seminario, J. 2004. Conservación ex situ de germoplasma de cuatro raíces andinas: Chago, yacón, achira y arracacha. *Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento ya la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)*, (4): 65-176.

Vásquez, N., Medina, C., & Lobo, M. 2004. Caracterización morfológica de la colección colombiana (Tolima, Huila, Boyacá, Cauca) de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento ya la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)*, (6): 165-178.

Zeven, A. C. 1998. Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104(2), 127-139.)

2. SELECCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR'S) PARA EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza*)²

Madeleyne Parra Fuentes, Paula Quintero Munévar, Javier Hernández Fernández

RESUMEN

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) es una Apiaceae con raíces tuberosas reservantes ricas en un fino y nutritivo almidón. Los microsatélites o SSR's, secuencias simples de ADN con motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem, poseen características útiles para estudiar la diversidad genética de una población. En el municipio de Boyacá, Boyacá, los agricultores identificaron mediante diferencias fenotípicas siete cultivares de arracacha. Esta investigación busca identificar los loci polimórficos y reproducibles para siete cultivares nativos de arracacha entre un conjunto de 14 loci SSR's diseñados a partir de un cultivar ecuatoriano. Se amplificó y evaluó el ADN de los cultivares de arracacha con diferentes concentraciones de MgCl₂ y temperaturas de anillamiento para cada locus microsatélite. Los productos amplificados se separaron en geles de poliacrilamida al 6, 10 y 12%. La estandarización para cada locus logró reducir las bandas inespecíficas en un 80% y evidenciaron una resolución óptima de las bandas en poliacrilamida al 12%. Se detectó que 5 loci no son aptos para el análisis de la variabilidad de arracacha debido a que loci son monomórficos, mientras que 1 locus polimórfico presenta exceso de bandas inespecíficas. Se identificaron fragmentos polimórficos reproducibles en 9 loci microsatélites y se confirmó su uso para el análisis de la variabilidad genética de los cultivares nativos de arracacha: paliverde, Palirusia, palinegra, yema de huevo, blanca de tarro, yucatana y amarilla de tarro.

Palabras claves: estandarización, microsatélites, cultivares, PCR, arracacha, polimórficos

2.1 INTRODUCCIÓN

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) pertenece a la familia Apiaceae y es cultivada por sus raíces tuberosas reservantes ricas en un fino y nutritivo almidón. Es considerada un cultivo promisorio en Colombia (Idarraga, Tocora, Camacho &

² Artículo publicado: Parra, M., Quintero, P. & Hernández-Fernández J. (2015). Selección de marcadores microsatélites (SSR's) para el análisis de variabilidad genética en siete cultivares de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Revista Mutis 5(2); págs. 39-45. **Recibido:** Agosto 28, 2015. **Aceptado:** Octubre 25, 2015. **Publicado en línea:** Diciembre 31, 2015.

Silva, 2011) que se caracteriza por un sabor agradable, alto contenido de calcio, vitamina A y niveles adecuados de niacina, hierro, ácido ascórbico y fósforo (Amaya & Julca, 2006), siendo indicada para dietas alimenticia infantiles (ICBF, 1998). Entre las nueve especies menores de raíces y tubérculos andinos, la arracacha tiene la más amplia gama de usos gastronómicos para dar textura y sabor a los platos (Hermann & Heller, 1997). El cultivo de arracacha es el segundo en el reglón de importancia en el municipio de Boyacá (Boyacá). Los agricultores locales identificaron siete cultivares de arracacha mediante diferencias fenotípicas como: color de las hojas, de los tallos y de las raíces. Los cultivares son identificados como: Paliverde, palirusia o Palimorada, Palinegra, Yema de Huevo o Cartagenera, Blanca de Tarro, Amarilla de Tarro y Yucatana (Alvarado & Ochoa, 2010a).

La caracterización a través marcadores moleculares es una herramienta valiosa que tiene varias ventajas, como su independencia del medio ambiente y el alto nivel de polimorfismo que se puede encontrar distribuido por el genoma (Fonseca-Trujillo *et al.*, 2009). Los microsatélites o SSR's, secuencias simples de ADN con motivos de 1 a 6 nucleótidos repetidos en tándem, se usan como marcadores y poseen características útiles para estudiar la diversidad genética de una población. Este estudio pretendió identificar los loci microsatélites polimórficos y reproducibles para siete cultivares nativos de arracacha entre un conjunto de 14 loci SSR's diseñados a partir de cultivares ecuatorianos (Morillo *et al.*, 2004).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal. Los cultivares utilizados en este análisis fueron: paliverde (PV), Palirusia o palimorada (PR), palinegra (PN), yema de huevo o cartagenera (YH), blanca de tarro (BT), amarilla de tarro (AT) y yucatana (YT). Se colectaron hojas jóvenes en buen estado y en buenas condiciones fitosanitarias de los cultivares de arracacha ubicados en Boyacá, Boyacá. Las hojas se almacenaron en tubos falcon con agua estéril destilada y se transportaron en nevera de icopor

refrigerada a 4 °C hasta su traslado al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano en Bogotá.

2.2.2 Extracción de ADN. El ADN se extrajo de 1 gr de tejido foliar joven empleando el kit UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation (MoBio Laboratories) siguiendo el protocolo de la casa comercial. La elución final del ADN se realizó en 75 µl de buffer libre de EDTA. La calidad y pureza de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v con solución TBE 0.5X, con tinción de bromuro de etidio (2 mg/µl) en una cámara horizontal Gel XL UltraV-2 (LabNet International, Inc. New Jersey, EE. UU.) a 100 voltios durante 15 minutos. Las bandas fueron observadas bajo luz ultravioleta y se registró con el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System (UVP, Upland, EE. UU). La imagen digital se analizó con el programa VisionWorks®LS Image Acquisition and Analysis Software (Imaging System, EE. UU.). La concentración del ADN se cuantificó en Nanodrop 1000 Spectrophotometer mediante el programa ND-1000 V3.7.1 (ThermoScientific, EE. UU.).

2.3 Análisis de marcadores microsatélites. Se seleccionaron 14 loci microsatélites desarrollados por Morillo *et al.* (2004) para arracacha (Tabla 1). La amplificación vía PCR se realizó en un termociclador de bloque TC9600-G MultiGene Gradient Thermal Cycler (Edison, NJ, EE. UU.), a un volumen final de 15 µL. La mezcla de reacción incluyó 1X Tampon de PCR, 0.2 mM de dNTP's, 2.5 mM de MgCl₂, 0.3 µM de cada uno de los cebadores, 1U de Taq ADN polimerasa y 20 ng de ADN. Los ensayos se iniciaron con la evaluación de la temperatura de anillamiento reportada por los autores para cada uno de los pares de cebadores. Posteriormente, se evaluó el aumento en la temperatura de anillamiento desde 1 a 3 °C y se evaluó la concentración de MgCl₂ entre 1.4 a 2.5 mM con cada uno de los cebadores hasta determinar las condiciones óptimas para la amplificación (Anexo B).

El programa de la PCR incluyó una denaturación inicial de 1 min a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a la temperatura de anillamiento de cada cebador (Tabla 1) y 60 s de extensión a 72 °C, finalizando con una extensión final de 72 °C por 7 min. Los productos de la PCR se mezclaron con 5 µl de buffer de carga (30 % glicerol y 0,05 % azul de bromofenol p/v) y luego se verificaron 10 µl del producto en electroforesis de agarosa al 2.5% teñida con bromuro de etidio (2 mg/µl) en TBE 0.5X.

Tabla 1. Oligonucleótidos evaluados en este estudio para revelar la variabilidad genética en arracacha (Morillo *et al.*, 2004).

Locus	Accesión GenBank	Secuencia (5'-3')	Motivo	Temperatura Anillamiento (°C)
AxC27	AY530811	F: AAGTTCGTATTGTGCTGCTGTAT R: ATTGTGGCGTGATGTGAAAAG	(GT) ₈	58
AxC85	AY530813	F: TTGGGACTGGAAC TTTGT R: GTGTGCGTGATGTAATAAT	(GT) ₈ N ₁₂ (GT) ₁₀	58
AxC29	AY675513	F: GCCCAATAGCCACAAG R: GAAATATCTGCTGGAAAGAGC	(CT) ₁₃ (TA) ₇	58
AxD43	AY530815	F: AATGGTGGTGTAGGTTTGAAG R: AATTGTTATCTGAGTGCGTTGGTA	(CA) ₁₅	58
AxD72	AY530816	F: GATACCAATAGCGAAAGGAG R: AGGGGTGGAGTAGCAATGTT	(TA) ₆ (GT) ₈	58
AxD82	AY530817	F: TGGAGAGGCTAATGCAAAAATACT R: ATAAGCAGAACGCAAAACGACAT	(GT) ₁₂ (GA) ₁₁	58
AxC87	AY530820	F: CTCGCAGATCATCTCATAAAGT R: TTAACCTGCAAAGGAGCAC	(CT) ₁₃	58
AxC8	AY675512	F: GATCATTTTCGCAAGGTA ACTCTC R: AGTCACCTTATGAAAATGTTCTGTA	(CT) ₁₂	58
AxD55	AY675514	F: AACCCGACTGAAATCCC AAAAT R: GCAAAAAGACCGCACAATCAA	(GT) ₈	54
AxD34	AY530814	F: AAGCTACGGATATTTACTACAT R: AGCGGGTCTGATTTGAG	(GA) ₁₃	50
AxC38	AY530812	F: TAAAGCCTATAAACATCAAAA R: ACCCTCTCCCATCATAAC	(GT) ₈	48
AxD85	AY530818	F: TGCACGCATTGTAGAACT R: CAAATGGACGTGGTATGT	(GA) ₈	48
AxD13	AY675515	F: AACTTTGAACATGGTCTATTACTT R: TGATGCCACGACAAAAGATA	(CA) ₈	48
AxC64	AY530819	F: GAAATGATCTGCAACTGGAT R: TCCCATCCTTCTTACATAT	(CT) ₂₀	48

2.4 Separación electroforética en poliacrilamida. Los productos verificados se separaron por electroforesis de poliacrilamida en un gel de 7.5 cm x 8.5 cm en una cámara Powerpac HV Power Supply (Biorad Laboratories, Inc., EE. UU.) por hora y media entre 150 y 200 voltios. Se evaluaron geles al 8, 10 y 12 % de

poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 38:2). Los geles se tiñeron con nitrato de plata para revelar las bandas. El tamaño de las bandas se estimó con el marcador de peso molecular Hyperladder V (Bioline Inc., California, EE. UU.).

2.3. RESULTADOS

2.3.1 Calidad y concentración del ADN. El análisis cualitativo del ADN extraído permitió obtener una banda definida de alta calidad, con algunas trazas de ARN o DNA degradado (Figura 1), con concentraciones entre 136 a 565 ng/ ml y una relación A260/A280 calculada entre 1.78 a 1.93 estableciéndose que todas las extracciones presentaban una calidad óptima (Teare *et al.*, 1997). Se usó en la mezcla de reacción una concentración de ADN de 20 ng/ μ L, concentración descrita por Morillo *et al.* (2004).

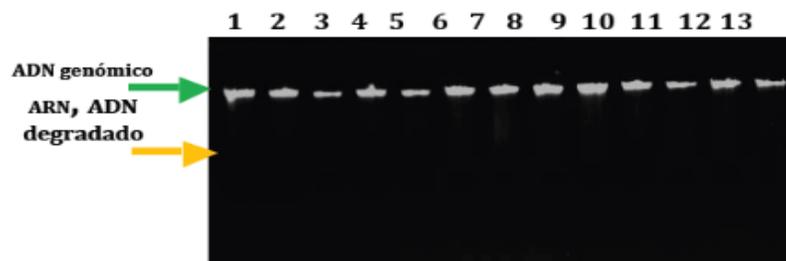


Figura 1. Electroforesis de ADN genómico de arracacha. Carriles 1 – 5: Paliverde, Carriles 6 – 7: Yema de Huevo, Carriles 8 – 9: Palinegra y Carriles 10 – 13: Individuos de Blanca de Tarro. Electroforesis en agarosa al 1%, teñida con bromuro de etidio.

2.3.2 Amplificación de loci según Morillo *et al.* (2004). El ADN de los siete cultivares fue amplificado con los 14 loci según los parámetros publicados por Morillo *et al.* (2004). Los productos revelados en agarosa al 2.5 %, presentan bandas específicas o alelos esperados para cada oligonucleótido, así como bandas inespecíficas, las cuales se encuentran inclusive fuera del área del marcador de peso molecular (Figura 2). Los productos revelados en geles de poliacrilamida mostraron un alto porcentaje de bandas inespecíficas y, en algunos casos, bandas poco definidas, lo que no permitía evidenciar el polimorfismo (Figura 3c).

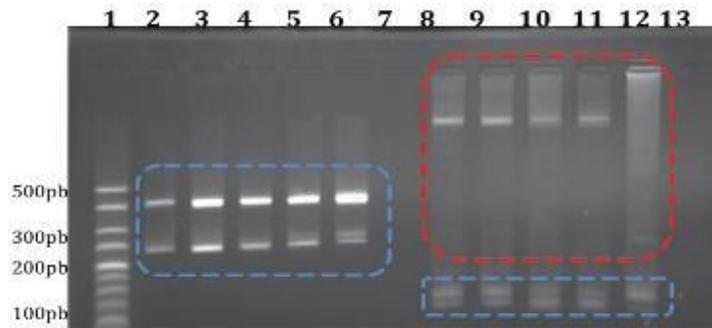


Figura 2. Amplificación de los marcadores AxD55 (Carril 2-7) y AxC87 (Carril 8-13). Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 8: PV, Carril 9: YH, Carril 10: PN, Carril 11: BT y Carril 12: PR. Carriles 13 y 7: Control negativo. Recuadro rojo: Bandas inespecíficas y recuadro azul: Bandas específicas. Electroforesis en agarosa al 2.5%, teñida con bromuro de etidio.

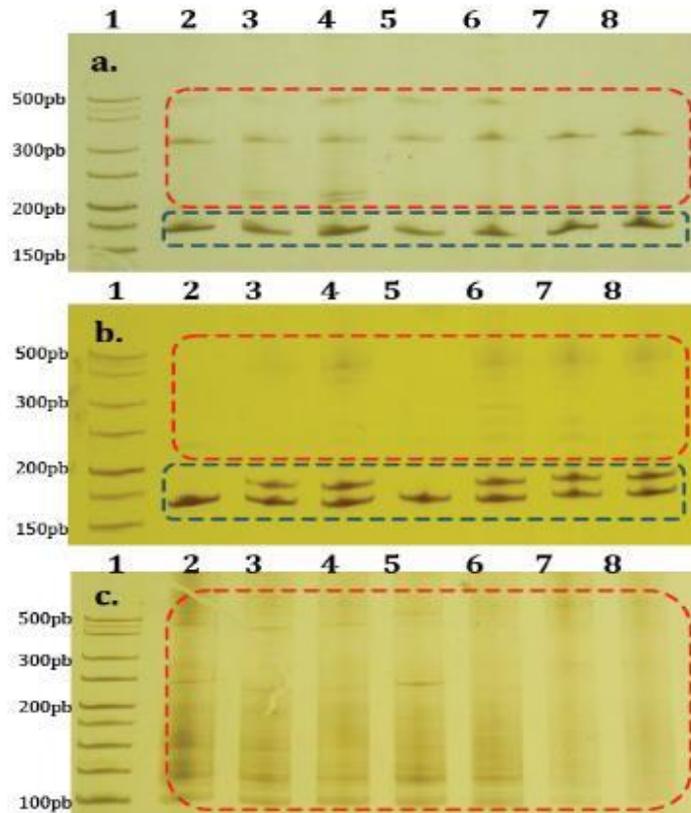


Figura 3. Loci amplificados según los parámetros reportados por Morillo *et al* (2004) a. Loci AxD13, b. Loci AxD85 y c. Loci AxC87. Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 7: AT y Carril 8: YT. Recuadro rojo: Bandas inespecíficas y recuadro azul: Bandas específicas. Electroforesis en poliacrilamida al 10% teñida con nitrato de plata.

2.3.3 Electroforesis en diferentes concentraciones de poliacrilamida. Cuando dos o más bandas alélicas tienen una diferencia de 5-10 pb, se encuentran muy unidas, llegando incluso a solaparse visualizando una única banda al observar en un gel de agarosa al 2.5 %. Además, las bandas inespecíficas, en muchos casos, no pueden evidenciarse (Figura 4a). Los geles de poliacrilamida, sin embargo, presentan una mayor resolución de las bandas al permitir una mejor definición y separación (Figura 4b).

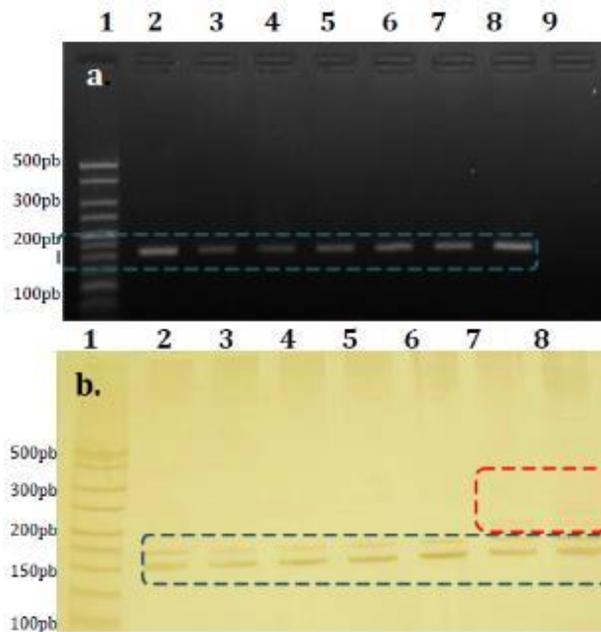


Figura 4. Observación de alelos en el Locus *AxD72*. a. En gel de agarosa 2.5%. b. En gel de poliacrilamida 12%. Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 7: AT y Carril 8: YT. Carril 9: Control negativo. Recuadro rojo: Bandas inespecíficas y recuadro azul: Bandas específicas.

El revelado de los productos amplificados en diferentes concentraciones determinó qué geles de poliacrilamida del 12 % permiten obtener con una mayor definición y resolución las bandas alélicas (Figura 4b y 5c).

2.3.4 Estandarización de PCR. Los resultados obtenidos con la evaluación de los loci bajo las condiciones de amplificación indicadas por Morillo *et al.* (2004),

permitieron evidenciar la necesidad de modificar temperaturas de anillamiento y concentración de $MgCl_2$. La Tabla 2 muestra que la amplificación de los loci **AxC27**, **AxC38**, **AxD43**, **AxD85**, **AxC85**, **AxC29**, **AxD72** y **AxD13** no se requirió modificar la temperatura de anillamiento reportada, sin embargo, las concentraciones de $MgCl_2$ para una adecuada amplificación variaban de acuerdo al locus, y debían ser menores a 2.5 mM para una mejor definición de las bandas, siendo los rangos entre 1.5 a 2.0 mM los más adecuados para dar especificidad a la reacción.

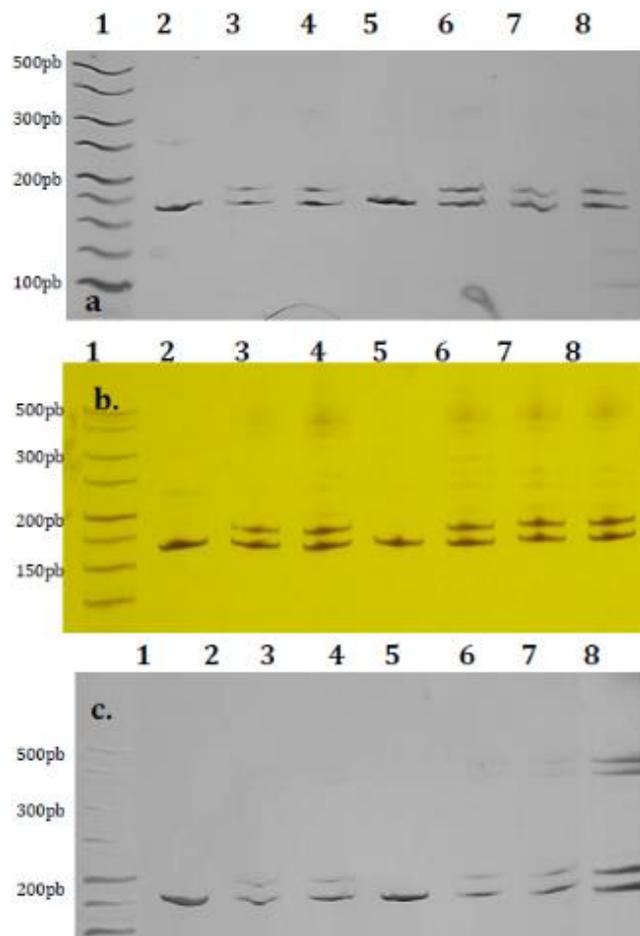


Figura 5. Revelado del locus *AxD85* en poliacrilamida. a. Gel de poliacrilamida al 8%, b. Gel de poliacrilamida al 10 % y c. Gel de poliacrilamida al 12 %. Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 7: AT y Carril 8: YT.

Para los loci **AxD34** y **AxC87** la mayor especificidad de las bandas alélicas se logró con el aumento de 1 °C en la temperatura de anillamiento (de 50 a 51 °C y de 58 a 59 °C, respectivamente), y el requerimiento de ambos loci de 1.8 mM de MgCl₂. Para la amplificación de las bandas específicas en el locus **AxD82** fue necesario disminuir un 1 °C la temperatura de anillamiento (de 58 a 57 °C) y utilizar 2.0 mM de MgCl₂. En el caso del locus **AxC64** se observó que un aumento de 2 °C en la temperatura de anillamiento (de 48 a 50 °C) con 1.5 mM de MgCl₂ permitía la amplificación específica de las bandas alélicas, mientras que para el loci **AxD55** se requirió un aumento de 3 °C en la temperatura de anillamiento (de 48 a 50 °C) y 1.5 mM de MgCl₂.

Tabla 2. Condiciones estandarizadas para cada locus microsatélites de arracacha.

<i>Locus</i>	T_m (°C)	MgCl₂ (mM)	Temperatura anillamiento (°C)
AxC27	54.7 56.3	1.4	58
AxC29	53.6 51.3	1.4	60
AxC64	50.5 46.9	1.5	50
AxC85	51.2 47.7	1.8	58
AxC87	52.2 53.0	1.6	60
AxD34	48.7 51.8	1.6	51
AxD43	52.9 54.6	1.6	58
AxD55	55.0 54.8	1.4	60
AxD85	51.9 49.7	1.5	48

Estas condiciones permitieron la eliminación de más del 80 % de las bandas inespecíficas y la observación de las bandas alélicas específicas en 13 de los 14 loci, sin embargo, en el loci **AxC8** las diferentes amplificaciones con aumento desde 1 a 5 °C en la temperatura de anillamiento y concentraciones de MgCl₂

entre 1.6 a 2.5 mM solo permitió eliminar entre el 10 y 20 % de las bandas inespecíficas, siendo difícil la observación de las bandas específicas debido a poca definición o claridad en su expresión. La estandarización de la PCR permitió establecer que los loci **AxC38**, **AxD82**, **AxD72** y **AxD13** generan alelos monomórficos, no siendo aptos para su uso en la determinación de variabilidad de los cultivares de arracacha nativos.

2.4. DISCUSIÓN

En esta investigación se evaluaron las condiciones de amplificación de 14 loci microsatélites de arracacha: **AxC8**, **AxC27**, **AxC29**, **AxC38**, **AxC64**, **AxC85**, **AxC87**, **AxD13**, **AxD34**, **AxD43**, **AxD55**, **AxD72**, **AxD82** y **AxD85**, reportados por Morillo *et al.* (2004) con el fin de determinar los parámetros adecuados de amplificación para cada locus y seleccionar aquellos loci con un comportamiento polimórfico en el bandedo para los siete cultivares nativos del estudio, los cuales permitirán determinar la variabilidad genética presente en estos cultivares.

La determinación de la temperatura de anillamiento óptima para la amplificación permite la unión específica de las dos cadenas sencillas complementaria de ADN. Ante una temperatura de anillamiento demasiado baja se presenta inespecificidad en el producto (Rychlik *et al.*, 1990), mientras que una temperatura de anillamiento alta aumenta la especificidad, sin embargo, una temperatura demasiado alta reduce o impide la posibilidad de anillamiento al limitar la unión de los oligonucleótidos con los sitios complementarios (Blanco, 2011). Las temperaturas de anillamiento para los loci evaluados variaron entre 48 a 60 °C y en el caso de 8 loci no se modificó la temperatura de anillamiento. Es necesario tener presente que en los 9 loci seleccionados la diferencia entre la temperatura de *melting* y la de anillamiento de los cebadores varió entre -2.8 y 9.2, siendo solo en un locus (**AxD85**) menor la temperatura de anillamiento a la de *melting*.

2.5. CONCLUSIONES

La selección de los loci polimórficos: AxC27, AxC29, AxC64, AxC85, AxC87, AxD34, AxD43, AxD55 y AxD85 entre 14 marcadores polimórficos analizados evidenció que la proporción de loci polimórficos en este estudio fue del 64%. Los nueve loci que permitirán analizar la variabilidad genética en siete cultivares de arracacha provenientes de los municipios de Boyacá y Turmequé, Boyacá. Las condiciones de amplificación varían para cada uno de los pares de oligonucleótidos reportados por Morillo *et al.* (2004), encontrándose, por lo general, que la temperatura óptima es igual a la reportada por el autor y que sus modificaciones se han hecho aumentando entre 1 y 3 °C. Por otro lado, se encontró que el requerimiento en la concentración de MgCl₂ para la amplificación de bandas específicas es menor a 2.0 mM.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación hace parte del proyecto “Conservación, valoración y uso de la agrobiodiversidad de la arracacha en la Provincia de Marquéz, Boyacá”, financiado por Colciencias (Contrato RC 705-2011) y ejecutado por la Corporación PBA y la UJTL.

REFERENCIAS

- Alvarado G., A., & Ochoa F., L. 2010. Tecnologías locales de producción de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) en el municipio de Boyacá. Departamento de Boyacá local technologies of arracacha. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 125-133.
- Alvarado G., A., & Ochoa F., L. 2010. *Cultivo de arracacha (Arracacia xanthorrhiza Bancroft) en los municipios de Turmequé y Boyacá (Boyacá, Colombia)*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC).
- Amaya, J., & Julca, J. 2006. Arracacha, *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. *Gerencia Regional de Recursos Naturales y Conservación del Medio Ambiente. Gobierno Regional La Libertad. Perú. 15p.*
- Blanco C., N. C. 2011. Estandarización del sistema PCR-RFLP-HpyCH4V de la región LCR-E6 para la detección y tipificación del VPH en muestras de pacientes

con lesiones intraepiteliales de alto grado. Tesis de grado. Universidad de los Andes, Venezuela.

Fonseca-Trujillo, N., Márquez-Cardona, M. D. P., Moreno-Osorio, J. H., Terán-Pérez, W., & Schuler-García, I. 2009. Caracterización molecular de materiales cultivados de gulupa (*Passiflora edulis* f. *edulis*). *Universitas Scientiarum*, 14(2), 135-140.

Hermann, M., & Heller, J. (Eds.). 1997. *Andean roots and tubers: ahipa, arracacha, maca and yacon* (Vol. 21). International Potato Center.

ICBF, F. N. (1998). Perfiles Nutricionales.

Idarraga, D. A. M., Tocora, M. R. A., Camacho, N. A. S., & Silva, J. F. B. 2011. Calidad de la harina de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) a partir del método de secado por conducción. *RIAA*, 2(1), 23-28.

Morillo, E., Second, G., Pham, J. L., & Risterucci, A. M. 2004. Development of DNA microsatellite markers in the Andean root crop arracacha: *Arracacia xanthorrhiza* Banc. (Apiaceae). *Molecular Ecology Notes*, 4(4), 680-682.

Teare, J. M., Islam, R., Flanagan, R., Gallagher, S., Davies, M. G., & Grabau, C. 1997. Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques*, 22(6), 1170- 1174.

Rychlik, W. J. S. W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412.45.

3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE SIETE CULTIVARES DE ARRACACHA (*Arracacia xanthorrhiza*)

RESUMEN

Colombia es uno de los países considerados centro de origen y centro de dispersión de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*), raíz tuberosa andina promisorio de gran valor para los productores en la región de Boyacá por sus características nutraceuticas y comerciales, parte de una tradición ancestral. El análisis mediante marcadores moleculares microsatélites (SSR's) permitirán la caracterización de la diversidad genética de arracacha y brindará elementos para la conservación del germoplasma en programas de mejoramiento genético. El objetivo de este trabajo fue determinar la variabilidad de siete cultivares de arracacha (56 individuos) originarios de los municipios de Boyacá y Turmequé, mediante SSR's. Nueve loci microsatélites amplificaron 97 alelos, con un promedio de 10,78 alelos por locus, identificando 22 alelos privados, 62 comunes, 35 frecuentes, 26 escasos y 9 raros. El contenido de información polimórfica ($PIC = 0,82$), la heterocigocidad observada ($H_o = 0,76$), la heterocigocidad esperada ($H_e = 0,69$) y la heterocigocidad total ($H_T = 0,84$), establecieron que los diferentes loci son altamente polimórficos. Los índices de diversidad F_{ST} (0,069 – 0,165) y G_{ST} (0,073 - 0,172) indican que la variabilidad es debida a diferencias dentro de los cultivares de arracacha. La distancia genética promedio entre los cultivares fue de 0,76 y los resultados entre el árbol Neighbor Joining y el AFCM muestran una gran correlación en la agrupación de los cultivares, en ocho grupos genéticamente diversos, con baja estructuración. Finalmente, es necesario determinar las características genéticas y la variabilidad de la especie en el país, validando estos resultados y con el fin de establecer estrategias complementarias de gestión y conservación de este recurso genético.

Palabras claves: microsatélites, Colombia, raíz andina, *Arracacia xanthorrhiza*, tetraploide, índices de diversidad.

3.1 INTRODUCCIÓN

La arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) es una especie andina tetraploide ($2n = 44$) (Hermann, 1997; Blas *et al.*, 1997; Salazar, 1997; Morillo *et al.*, 2004; Santayana, 2012), perteneciente a la familia Apiaceae (Umbelliferae), considerada un producto de gran potencial productivo y comercial debido a la calidad de sus nutrientes y su versatilidad. Entre las nueve especies menores de raíces y tubérculos andinos, la arracacha es el cultivo más promisorio, se caracteriza por poseer una amplia gama de usos gastronómicos, nutricionales, medicinales y alimentación animal, (Hermann, 1997; Zarate *et al.*, 2008).

Brasil es el país con mayor área cultivada (23.000 ha) y el primer productor de arracacha en el mundo (250.000 t), seguido por Colombia, Ecuador y Perú (Biocomercio, 2013). En Colombia se cultivan cerca de 8.800 ha de arracacha. El mayor productor nacional es el departamento del Tolima (43.273 t), seguido por Boyacá (14.010 t), Norte de Santander (10.727 t) y Santander (7.492 t). En el Departamento de Boyacá, el principal productor de arracacha es el municipio de Tibaná (4.838 t), seguido por Viracacha (2.831 t), Ramiriquí (1.498) y Boyacá (1.040 t) (Agronet, 2017).

La clasificación de la variabilidad de *Arracacia xanthorrhiza* mediante análisis genético con marcadores moleculares es una herramienta versátil en la caracterización genética de las poblaciones. Mathias & Constance (1944, 1968 y 1973) realizaron las primeras investigaciones de identificación, designación y descripción sobre la diversidad genética del género *Arracacia* en Centro y Norte América (Elsayed *et al.*, 2010). El análisis con patrones isoenzimáticos de la colección de 72 entradas de arracacha del Ecuador estableció que la variabilidad fenotípica del cultivo es resultado de mutaciones somáticas (Mazon, 1993) y, además, esta colección presentó baja variabilidad genotípica utilizando marcadores moleculares RAPDs (Castillo, 1997). En Colombia, Vásquez *et al.* (2004) estudiaron la variabilidad de 62 accesiones de la colección colombiana de

arracacha de los departamentos del Tolima, Huila, Boyacá y Cauca mediante caracterización morfológica a través de 28 descriptores cualitativos y 13 cuantitativos discriminativos, y determinaron que hay una amplia variabilidad cualitativa con polimorfismos en la totalidad de las características, así como, una amplia variabilidad cuantitativa, con núcleos de agrupamiento relacionados con las zonas geográficas de los sitios de colecta. La amplia variabilidad de las accesiones les da valor como material genético base para programas de mejoramiento de la especie *A. xanthorrhiza*.

Con el desarrollo de la primera biblioteca enriquecida de 18 microsátélites para arracacha se determinaron 14 microsátélites polimórficos con buena transferibilidad a formas silvestres estrechamente relacionadas y se determinó que la diversidad alélica es menor en las formas cultivadas que en las formas silvestres (Morillo *et al*, 2004). El estudio de la diversidad genética de 72 accesiones cultivadas de *A. xanthorrhiza* de Ecuador y Perú con 11 con marcadores SSR mostró una variación genética significativa dentro de la forma cultivada de *A. xanthorrhiza* (Morillo, 2006).

El estudio de la diversidad genética utilizando cinco oligonucleótidos AFLP y 100 descriptores morfológicos en cuatro especies del género *Arracacia* de Perú, permitió encontrar 28 caracteres morfológicos como discriminatorios y útiles en la identificación de las especies andinas de arracacha, así como estimar la diversidad intraespecífica (25,8%) e interespecífica (24,6%). La variación encontrada (49.5%) fue atribuida a las diferencias entre las especies. Los marcadores morfológicos y moleculares usados permitieron la identificación botánica de las especies *A. xanthorrhiza*, *A. alata* y *A. incisa*, sin embargo, la especie *A. equatorialis* podría ser reagrupada con *A. xanthorrhiza* como una misma especie (Blas *et al.*, 2005 y 2008).

En la investigación de Biondi *et al.* (2009) sobre diversidad genética utilizando cinco oligonucleótidos AFLP en 334 accesiones de arracacha procedentes de cinco bancos de germoplasma del Perú, se obtuvieron 148 marcadores AFLP polimórficos con alta resolución. Estos resultados mostraron que las accesiones de arracacha del Perú son muy variadas, siendo las cinco colecciones significativamente diferentes entre ellas. También establecieron, de acuerdo con los patrones de distribución geográfica, que la diversidad de arracacha es mayor en el norte del Perú, sin embargo, la colección del Centro Internacional de la Papa fue la más representativa del centro de Perú al presentar un alto índice de diversidad con bajo número de accesiones.

En otro estudio en Perú, la diversidad genética entre la arracacha cultivada y las formas silvestres utilizando 11 loci microsátélites, mostró una diversidad alélica significativamente mayor de los loci en las formas silvestres de arracacha. La arracacha cultivada presentó diferenciación genética de las formas silvestres, estando más relacionada con las formas policárpicas silvestres que con las monocárpicas. Este estudio destaca en las poblaciones silvestres de arracacha una gran diversidad genética esencial en el diseño de programas de mejoramiento, teniendo gran interés la introgresión de genes silvestres con características de resistencia a sequía y descomposición de raíces de almacenamiento (Morillo, Knudsen & Sécond, 2017). Un elemento importante para el estudio de la diversidad de *A. xanthorrhiza* y de especies silvestres relacionadas, fue la secuenciación del genoma circular del cloroplasto de *A. xanthorrhiza*, estudio que determinó el tamaño del genoma, el contenido G+C, las regiones estructurales y los genes codificantes de proteínas y ARNr y ARNt.

A la fecha, en Colombia no se han realizado investigaciones de caracterización molecular de la especie *A. xanthorrhiza* o de especies silvestres del género *Arracacia* con algún tipo de marcador genético. Éste sería el primer estudio en abordar la temática de la diversidad genética en cultivares de arracacha, y puede

contribuir al desarrollo de estrategias para reducir la erosión genética al incentivar el aprovechamiento de la arracacha, conocer la diversidad de cultivares regionales y favorecer la identificación de la variabilidad, elementos que influirán positivamente en la generación de un programa de mejoramiento para la especie (Hermann, 1997). Sobre todo, porque la arracacha cultivada en Colombia “contienen genes importantes de adaptación que permiten diferentes combinaciones de características cualitativas y se conservan aislados genéticamente de los demás de la zona” (Vásquez *et al.*, 2004).

El cultivo de arracacha es el segundo en el renglón de importancia en el municipio de Boyacá (Boyacá). Los productores de arracacha en esta región de Colombia identifican los cultivares de acuerdo con las características fenotípicas de color de las hojas, del tallo y la pulpa de la raíz como: Paliverde, Palirusia o Palimorada, Palinegra, Yema de Huevo o Cartagenera, Blanca de Tarro, Amarilla de Tarro y Yucatana (Alvarado & Ochoa, 2010). El desarrollo local del sistema productivo de arracacha es una herencia ancestral (Pinto, Parra & Escobar, 2015), sin embargo, la priorización y preferencia comercial de 1 ó 2 cultivares (Yema de huevo y Blanca de Tarro para Boyacá, y Palinegra en Turmequé) ha propiciado la pérdida de agrobiodiversidad (Alvarado & Gaona, 2010) y la erosión o homogeneidad genética de la especie, debido a la desaparición temporal de cultivares no sembrados (Ej. Amarilla de tarro), establecimiento de monocultivos, o la sustitución de cultivos locales de arracacha por otras especies, así como la introducción de cultivos comerciales mejorados.

Con este estudio se analizó por primera vez en Colombia la diversidad genética de siete cultivares de arracacha de Boyacá con nueve marcadores microsatélites con el fin de brindar elementos sobre el conocimiento de su diversidad y herramientas genéticas en el desarrollo de programas de mejoramiento.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal. Las muestras para el análisis de la diversidad genética de la arracacha se obtuvieron de 56 plantas pertenecientes a siete cultivares denominadas: Paliverde (PV), Palirusia (PR), Palinegra (PN), Yema de Huevo (YH), Blanca de Tarro (BT), Amarilla de Tarro (AT) y Yucatana (YT) (Anexo C). Las muestras fueron colectadas en los municipios de Boyacá y Turmequé, ubicados en el Departamento de Boyacá a 05°27'15.1" de latitud norte y 73°21'48.6" de longitud oeste, y 05°18'0.0" de latitud norte y 73°30'0.0" de longitud oeste, respectivamente, con una temperatura promedio entre 14°C y 18°C, y una altitud entre 2.200-2.900 msnm (Tabla 1).

Tabla 1. Información geográfica de las zonas de muestreo de plantas de arracacha evaluadas en este estudio.

Municipio	Vereda	Latitud	Longitud	Muestras	Cultivares
Turmequé	Teguaneque	5°19'22.3"N	73°32'37.8"W	21	PV (5), YH (7). PN (2), BT (4), PR (3)
Boyacá	Huerta Chica	5°27'04.7"N	73°23'47.8"W	8	PR (3), AT (2), YT (3)
Boyacá	Riqué	5°26'36.4"N	73°23'18.0"W	17	PV (3), YH (1). PN (6), BT (4), PR (3), AT (5)
Boyacá	Pachaquirá	5°27'06.0"N	73°23'11.1"W	5	YT
Boyacá	Riqué	5°26'44.7"N	73°21'38.3"W	5	AT

3.2.2 Extracción de ADN. El ADN se obtuvo a partir de tejido foliar joven, con el kit para ADN genómico, UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation (MoBio Laboratories, EE. UU), usado en la etapa de estandarización. El ADN extraído se almacenó a -80°C hasta su utilización. La elución final del ADN se realizó en 75 µl de buffer libre de EDTA. La calidad y pureza de ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v en TBE 0,5X, con tinción de bromuro de etidio (2 mg/ml) en una cámara horizontal Gel XL UltraV-2 (LabNet International, Inc. New Jersey, EE. UU.) corrida a 100 voltios durante 15 minutos. Las bandas fueron observadas bajo luz ultravioleta y registradas con el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System (UVP, Upland, EE. UU). La imagen digital se analizó con el programa VisionWorks®LS Image Acquisition and Analysis

Software (Imaging System, EE. UU.). La concentración del ADN se cuantificó en Nanodrop 1000 Spectrophotometer mediante el programa ND-1000 V3.7.1 (ThermoScientific, EE. UU.).

3.2.3 Caracterización de marcadores microsatélites. Nueve marcadores microsatélites reportados por Morillo *et al.* (2004) para arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) se amplificaron en un volumen final de 15 μ l con 1X buffer PCR (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 50% glicerol), 0,3 μ M de oligonucleótidos directo y reverso, 0,2 mM de dNTP's, 1,4 a 1,8 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerasa (Bioline, USA) y 10-20 ng de ADN. La reacción de PCR se realizó en el termociclador PTC-100TM Programable Thermal Controller (MJ Research, Madison, EE. UU). Las condiciones de las reacciones de PCR reportadas por Morillo (2006) fueron modificadas, así: una denaturación inicial a 94°C por 5 min y 30 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min, anillamiento entre 48-60°C por 1 min, de acuerdo con el oligonucleótido utilizado (Tabla 2), extensión a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 7 min.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de regiones microsatélites en la determinación de la variabilidad genética en arracacha (Morillo, 2006).

Locus	Accesión GenBank		Secuencia (5'-3')	Motivo	MgCl ₂ (mM)	Temperatura anillamiento (°C)
AxC27	AY530811	F:	AAGTTCGTATTGTGCTGCTGTAT	(GT) ₈	1.4	58
		R:	ATTGTGGCGTGGATGTGAAAAG			
AxC29	AY675513	F:	GCCCCAATAGCCACAAG	(CT) ₁₃ (TA) ₇	1.4	60
		R:	GAAATATCTGCTGGAAAGAGC			
AxC64	AY530819	F:	GAAATGATCTGCAACTGGAT	(CT) ₂₀	1.5	50
		R:	TCCCATCCTTCTTACATAT			
AxC85	AY530813	F:	TTGGGACTGGAACCTTTGT	(GT) ₈ N ₁₂ (GT) ₁₀	1.8	58
		R:	GTGTGCGTGATGTAATAAT			
AxC87	AY530820	F:	CTCGCAGATCATCTCATAAAGT	(CT) ₁₃	1.6	60
		R:	TTAACCTGCAAAGGAGCAC			
AxD34	AY530814	F:	AAGCTACGGATATTTACTACAT	(GA) ₁₃	1.6	51
		R:	AGCGGGTCTGATTTGAG			
AxD43	AY530815	F:	AATGGTGGTGTAGGTTTGAAG	(CA) ₁₅	1.6	58
		R:	AATTGTTATCTGAGTGCGTTGGTA			
AxD55	AY675514	F:	AACCCGACTGAAATCCCAAAT	(GT) ₈	1.4	60
		R:	GCAAAAAGACCGCACAAATCAA			
AxD85	AY530818	F:	TGCACGCATTGTAGAACT	(GA) ₈	1.5	48
		R:	CAAATGGACGTGGTATGT			

El producto amplificado se analizó por electroforesis estándar en gel de agarosa al 2,5% (TBE 0,5X), con tinción de bromuro de etidio en una cámara horizontal Gel XL UltraV-2 (LabNet International, Inc. New Jersey, EE. UU.) corrida a 100 voltios durante 25 a 40 minutos. El gel se observó bajo luz ultravioleta y se registró en el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System (UVP, Upland, EE. UU.). Finalmente, 5 µl del producto amplificado se separó en una cámara PowerPac HV power supply (Biorad Laboratories, Inc, EE. UU.) por 90 min a 200 voltios mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (acrilamida:bisacrilamida 38:2). Los geles se tiñeron con nitrato de plata para revelar las bandas (Anexo D) y se registraron con cámara digital. Las imágenes se analizaron con los programas VisionWorks®LS Image Acquisition and Analysis Software (Imaging System, EE. UU.) y GelAnalyzer (Lazar & Lazar, 2010) con el fin de determinar el tamaño de las bandas alélicas. El marcador de peso molecular usado fue Hyperladder V (Bioline Inc., California, EE. UU.).

3.3.1 Análisis de alelos. La información alélica de cada individuo se registró en una matriz binaria (ausencia = 0 y presencia = 1). Mediante el análisis de los alelos, en cada matriz, se estimó: el porcentaje de heterocigotos, la heterocigosidad observada (H_O), la cantidad de los alelos raros, alelos privados y alelos comunes. La frecuencia alélica y los índices de diversidad genética: heterocigosidad esperada (H_E) o diversidad genética según Nei (1987), heterocigosidad esperada corregida, (H_{EC}), índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') e índice de diversidad de Shannon-Wiener corregido (H'_c) utilizando del programa Atetra 1.2. El valor promedio ponderado de la heterocigosidad esperada (H_S) y la heterocigosidad total (H_T) se determinó con el programa GenoDive.

El contenido de información polimórfica (PIC), la tasa de polimorfismo (P_j), la proporción de loci polimórficos (P) y el número efectivo de alelos (A_e) se determinaron utilizando el paquete de R “Polysat” (Crack & Jasieniuk, 2011) y el

programa GenoDive. La prueba de equilibrio de Hardy Weinberg y la distancia genética entre los cultivares, de acuerdo con el coeficiente de similitud de Nei & Li (1979), fueron estimados con el programa GenoDive. Se realizó un análisis de agrupamiento con el algoritmo Neighbor Joining sin ponderar (Unweight) con un bootstrap de 30.000 repeticiones, según el índice de Sokal & Michener (1958) y se realizó un análisis factorial de correspondencia múltiple (AFCM) para todos los individuos de los cultivares de arracacha con el programa DARwin (dissimilarity analysis and representation for windows) Version 5.0.148 (<http://darwin.cirad.fr/darwin>) (Perrier & Collet 2006).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Riqueza alélica. El análisis de diversidad alélica de 56 muestras de cultivares de *Arracacia xanthorrhiza* de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) con nueve marcadores microsatélites polimórficos permitió la identificación de un número total (Na) de 97 alelos y un número medio de alelos por locus (A) de 10,78, con presencia de 8-16 alelos por locus, un número efectivo de alelos por locus (Ae) de 3, 20 (Tabla 3) y un solo alelo homocigoto (**AxC27** (GT)₈ – 136) (Anexo E). El perfil alélico de cada locus microsatélite en los 56 individuos de arracacha permitió observar e identificar los individuos homocigotos y heterocigotos, así como la riqueza alélica (Figura 1).

Tabla 3. Diversidad alélica generada con nueve marcadores microsatélites en 56 accesiones de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia)

Locus	Accesión GenBank	Motivo marcador microsatélite	Alelos por locus	Número efectivo de alelos	Alelos privados (Kalinowski, 2004)	Alelos escasos (f = 5 - 1%)	Alelos raros (f = <1)	Alelos comunes (Bostein et al, 1980)	Alelos frecuentes (f > 10%)
AxC27	AY530811	(GT) ₈	11	3,00	4	4	2*	4	3
AxC29	AY675513	(CT) ₁₃ (TA) ₇	8	3,58	0	1	0	7	5
AxC64	AY530819	(CT) ₂₀	10	3,76	1	2	0	8	6
AxC85	AY530813	(GT) ₈ N ₁₂ (GT) ₁₀	16	2,53	7	4	2	9	2
AxC87	AY530820	(CT) ₁₃	12	3,61	2	4	1	7	4
AxD34	AY530814	(GA) ₁₃	8	2,86	2	3	0	5	4
AxD43	AY530815	(CA) ₁₅	10	3,18	1	2	2*	6	4
AxD55	AY675514	(GT) ₈	14	3,94	3	4	2	8	5
AxD85	AY530818	(GA) ₈	8	2,36	2	2	0	5	3
Total			97	-	22	26	9	59	36
Promedio			10,78	3,20	22,70%	26,80%	9,30%	60,8%	37,10%

* Presenta un alelo raro con frecuencia <0,5% (Cavalli-Sforza & Bodner, 1981)

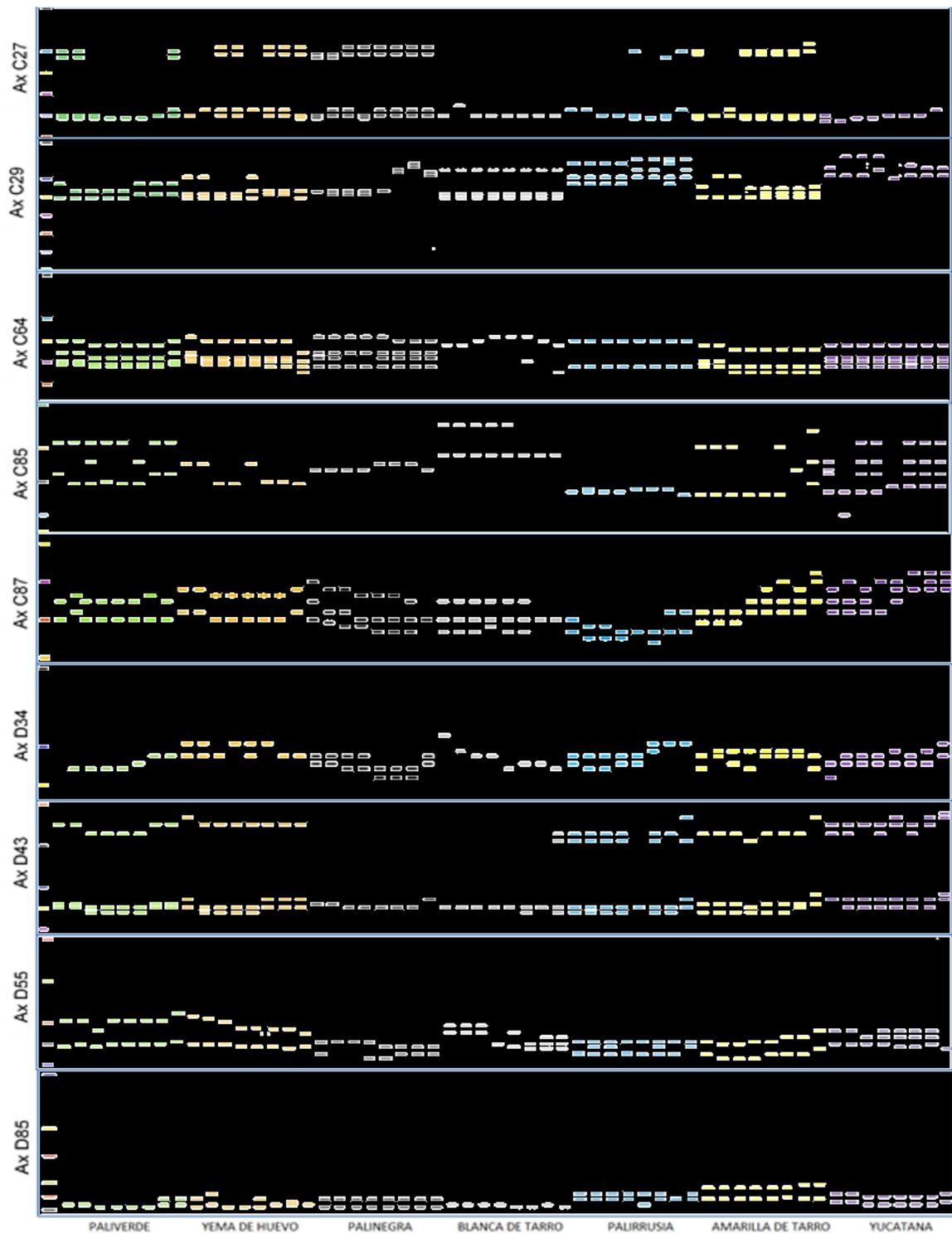


Figura 1. Perfil alélico de nueve marcadores microsatélites en siete cultivares de *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia).

Las frecuencias alélicas oscilaron entre 0,0045 **AxC27** (GT)₈ – 0,400 (**AxD43**) (Figura 2 y Anexo F) y se identificaron 22 alelos privados, 62 alelos comunes, 35 alelos frecuentes, 26 alelos escasos y 9 alelos raros. Los alelos privados se observaron en ocho de los nueve loci analizados, donde el locus **AxC85** (GT)₈N₁₂(GT)₁ mostró siete alelos privados (Tabla 3). Los alelos privados se evidenciaron en todos los cultivares, a excepción de Palinegra; en Paliverde se observaron dos alelos privados, en Yema de Huevo uno, en Palirusia seis, en Amarilla de Tarro dos, en Blanca de Tarro seis y en Yucatan cinco.

3.3.2 Variabilidad genética. La heterocigocidad observada ($H_O = 0,76$), la heterocigocidad esperada ($H_E = 0,69$), el valor promedio ponderado de la heterocigocidad esperada ($H_S = 0,72$) y la heterocigocidad total ($H_T = 0,84$) son indicadores de una alta diversidad genética entre los cultivares (Tabla 4), siendo el cultivar Yucatan el que presentó los mayores valores ($H_E = 75,4$ y $H_S = 78,3$) (Tabla 5). El valor promedio de PIC fue 0,82, y en los loci osciló entre 0,75 (Locus **AxC27**) y 0,90 (Locus **AxC85**) (Tabla 4), mientras que para los cultivares su valor varió entre 0,29 (Blanca de Tarro - Locus **AxC27**) y 0,85 (Yema de Huevo - Locus **AxD55**) (Tabla 6). El índice de diversidad de Shannon Wiener mostró valor H' de 1,33 y $H'c$ de 1,5 y la uniformidad (*Evenness*) presentó un valor promedio de 0,454 (Tabla 4).

Tabla 4. Variabilidad genética en nueve marcadores microsatélites en arracacha.

Locus SSR	Nº	Motivo	Frecuencia	PIC	HE	HEc	HO	H'	H'c	Even	Hs	Ht
	Accesión GenBank	Marcador microsatélite	máxima de un alelo									
AxC27	AY530811	(GT) ₈	0,378	0,75	0,67	0,69	0,51	1,32	1,61	0,44	0,71	0,78
AxC29	AY675513	(CT) ₁₃ (TA) ₇	0,167	0,83	0,73	0,75	0,76	1,42	1,45	0,47	0,76	0,85
AxC64	AY530819	(CT) ₂₀	0,226	0,85	0,73	0,76	0,89	1,46	1,53	0,53	0,77	0,87
AxC85	AY530813	(GT) ₈ N ₁₂ (GT) ₁₀	0,168	0,90	0,62	0,64	0,46	1,13	1,25	0,38	0,66	0,91
AxC87	AY530820	(CT) ₁₃	0,199	0,86	0,74	0,76	0,92	1,49	1,73	0,51	0,76	0,87
AxD34	AY530814	(GA) ₁₃	0,196	0,76	0,67	0,69	0,58	1,24	1,26	0,41	0,71	0,78
AxD43	AY530815	(CA) ₁₅	0,400	0,76	0,66	0,68	0,73	1,32	1,74	0,44	0,69	0,78
AxD55	AY675514	(GT) ₈	0,190	0,88	0,75	0,78	0,94	1,56	1,77	0,55	0,79	0,89
AxD85	AY530818	(GA) ₈	0,250	0,77	0,59	0,61	0,69	0,99	1,05	0,32	0,62	0,79
	Promedio		0,242	0,821	0,688	0,710	0,726	1,330	1,534	0,454	0,72	0,84

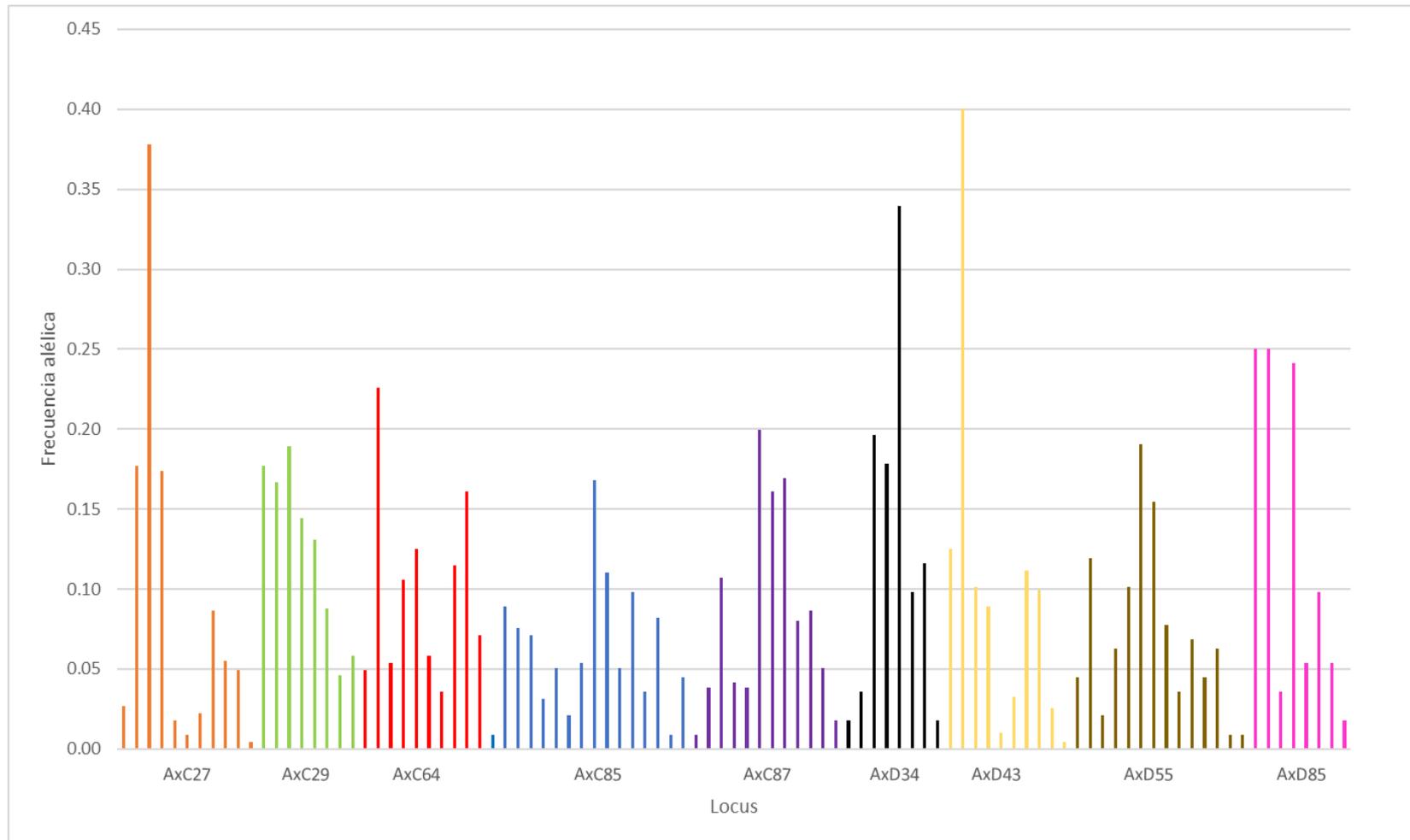


Figura 2. Frecuencias alélicas de nueve marcadores microsatélites en siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia).

Tabla 5. Variabilidad genética de siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) analizados con nueve marcadores microsatélites.

Cultivar	(He)	(Hec)	(H')	(H'c)	(Even)	(Hs)
Paliverde	0,7018	0,7244	1,3592	1,5769	0,4513	0,732
Yema de Huevo	0,7140	0,7370	1,4074	1,7115	0,4947	0,742
Palinegra	0,6760	0,6978	1,3024	1,5279	0,4580	0,715
Blanca de Tarro	0,5709	0,5893	1,0419	1,2425	0,3537	0,613
Palirusia	0,6705	0,6921	1,2395	1,2664	0,4104	0,698
Amarilla de Tarro	0,7293	0,7528	1,4679	1,7887	0,4869	0,705
Yucatana	0,7545	0,7788	1,4920	1,6222	0,5262	0,783

Tabla 6. Contenido de información polimórfica (*PIC*) de siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) analizados con nueve marcadores microsatélites.

Cultivar	AxC27	AxC29	AxC64	AxC85	AxC87	AxD34	AxD43	AxD55	AxD85
Paliverde	0,600	0,694	0,818	0,682	0,582	0,605	0,744	0,693	0,511
Yema de Huevo	0,685	0,671	0,801	0,601	0,685	0,371	0,703	0,854	0,642
Palinegra	0,766	0,714	0,743	0,359	0,838	0,685	0,468	0,667	0,375
Blanca de Tarro	0,294	0,593	0,687	0,337	0,677	0,746	0,262	0,727	0,359
Palirusia	0,689	0,743	0,375	0,511	0,733	0,708	0,705	0,632	0,456
Amarilla de Tarro	0,725	0,763	0,708	0,618	0,689	0,618	0,744	0,805	0,582
Yucatana	0,694	0,701	0,703	0,805	0,751	0,636	0,772	0,728	0,685
Del total	0,76	0,84	0,85	0,91	0,86	0,76	0,76	0,88	0,77

El índice de fijación (F_{ST}) presentó valores entre 0,069-0,165 (Anexo G). El coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) presentó valores bajos de diferenciación (0,073 - 0,171) para los locus y los cultivares de arracacha analizados (Anexo H). Dada la naturaleza hipervariable y las altas tasas de mutación de los marcadores microsatélites (Heller & Siegismund, 2009; Whitlock, 2011), también se estimó la diferenciación entre cultivares con diversos estadísticos que reflejaron que la relación entre Yema de Huevo-Palinegra obtuvo el menor valor para todos los índices: G_{ST} (0,07), D_m (0,1), R_{ST} (0,16), F_{ST} (0,07) y $Jost's D$ (0,29), mientras que la relación Palirusia-Blanca de Tarro alcanzó los valores más altos de G_{ST} (0,17), D_m (0,25), R_{ST} (0,44) y F_{ST} (0,17) (Anexo G y Anexo H).

El coeficiente de endogamia (Gis) presentó desviaciones significativas ($p < 0.01$) del equilibrio de Hardy-Weinberg en 4 de los 9 marcadores microsatélites, evidenciando un exceso de heterocigotos en los locos (**AxC29**, **AxC64**, **AxC87** y **AxD55**), también se encontró un total de 44 desviaciones significativas repartidas entre todos los loci y cultivares, donde 43 revelan un exceso de heterocigotos o exogamia en los cultivares, mientras que el cultivar Blanca de Tarro evidenció, significativamente ($p < 0,05$), un déficit de heterocigotos en el locus **AxD34**. En total, se encontró desviación significativa en la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg como resultado del exceso de heterocigotos presentado (-0.016 , $p < 0,01$) para todos los loci y cultivares (Tabla 7).

3.3.3. Distancia genética. La distancia genética (Nei, 1979) promedio fue moderada (0,63), para los 56 individuos de los siete cultivares de arracacha analizados. Las mayores distancias se presentaron entre los cultivares Amarilla de Tarro y Blanca de Tarro (0,98), Palirusia y Blanca de Tarro (0,96), Paliverde y Palirusia (0,87), Yucataná y Palinegra (0,84), mientras los individuos de Palinegra y Yema de Huevo (0,24) mostraron ser menos distantes, presentando mayor homogeneidad entre los individuos de arracacha evaluados (Tabla 8).

En el dendograma generado por el método *Neighbour Joining* sin ponderar (Unweighted) los individuos se agruparon en tres grandes conglomerados poco consolidados (bootstraps < 50) en las ramas externas. El primer conglomerado en una rama agrupa a todos los individuos de Yucataná (bootstrasp = 93) y el 50% de los individuos de Paliverde (bootstraps = 54). Otra rama agrupa los individuos de Blanca de Tarro (bootstrasp = 85) y el 50% restante de los individuos de Paliverde (bootstraps = 93). El segundo conglomerado agrupó los cultivares Yema de Huevo y Palinegra, y el último conglomerado, los individuos de Amarilla de Tarro (bootstraps = 83), y Palirusia (bootstraps = 88) (Figura 3). El valor de correlación copenética ($r = 0,9428$, $\rho < 0,001$) reveló un muy buen grado de ajuste del modelo (Rohlf, 1988), donde el análisis del conglomerado representa la matriz de similitud y ratifica la estructuración de la distancia genética de los cultivares.

Tabla 7. Valores de *G_i* y Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg para nueve marcadores microsatélites en los siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia).

	AxC27	AxC29	AxC64	AxC85	AxC87	AxD34	AxD43	AxD55	AxD85	Total
Paliverde	0,373	-0,263**	-0,156***	-0,295**	-0,446***	1,000	-0,232***	-0,277**	0,648	0,032
Yema de Huevo	0,221	-0,295**	-0,175***	-0,400***	-0,277**	0,313	-0,284***	-0,081*	0,377	-0,075***
Palinegra	-0,216***	0,114	-0,243***	1,000	-0,122*	-0,277**	1,000	0,052	-0,875***	0,017
Blanca de Tarro	0,700	-0,437***	0,704	-0,219*	-0,321***	1,000*	0,554	-0,056*	1,000	0,318
Palirusia	0,550	-0,235***	-0,875***	0,612	-0,224**	0,078	-0,107	-0,364***	-0,458***	-0,084***
Amarilla de Tarro	-0,085	-0,197**	-0,278***	0,145	-0,275***	-0,379***	-0,232**	-0,132*	-0,446***	-0,206***
Yucatana	0,850	-0,134*	-0,292***	-0,027	-0,216**	-0,364**	-0,202***	-0,108	-0,277**	-0,078***
Total	0,320	-0,200***	-0,145***	0,085	-0,262***	0,213	0,017	-0,134***	0,008	-0,016***

Valores en negrita presentan significancia de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,01$.

Tabla 8. Distancias genéticas (Nei, 1979) para siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) analizados con nueve marcadores microsatélites.

Cultivar	Paliverde	Yema de Huevo	Palinegra	Blanca de Tarro	Palirusia	Amarilla de Tarro	Yucatana
Paliverde	0,00000						
Yema de Huevo	0,38706	0,00000					
Palinegra	0,42095	0,24139	0,00000				
Blanca de Tarro	0,35530	0,57929	0,63849	0,00000			
Palirusia	0,87319	0,70691	0,57356	0,96510	0,00000		
Amarilla de Tarro	0,62847	0,76887	0,56511	0,98677	0,52929	0,00000	
Yucatana	0,50840	0,56930	0,84703	0,79141	0,65186	0,74538	0,00000

Valores en negrita son >70 .

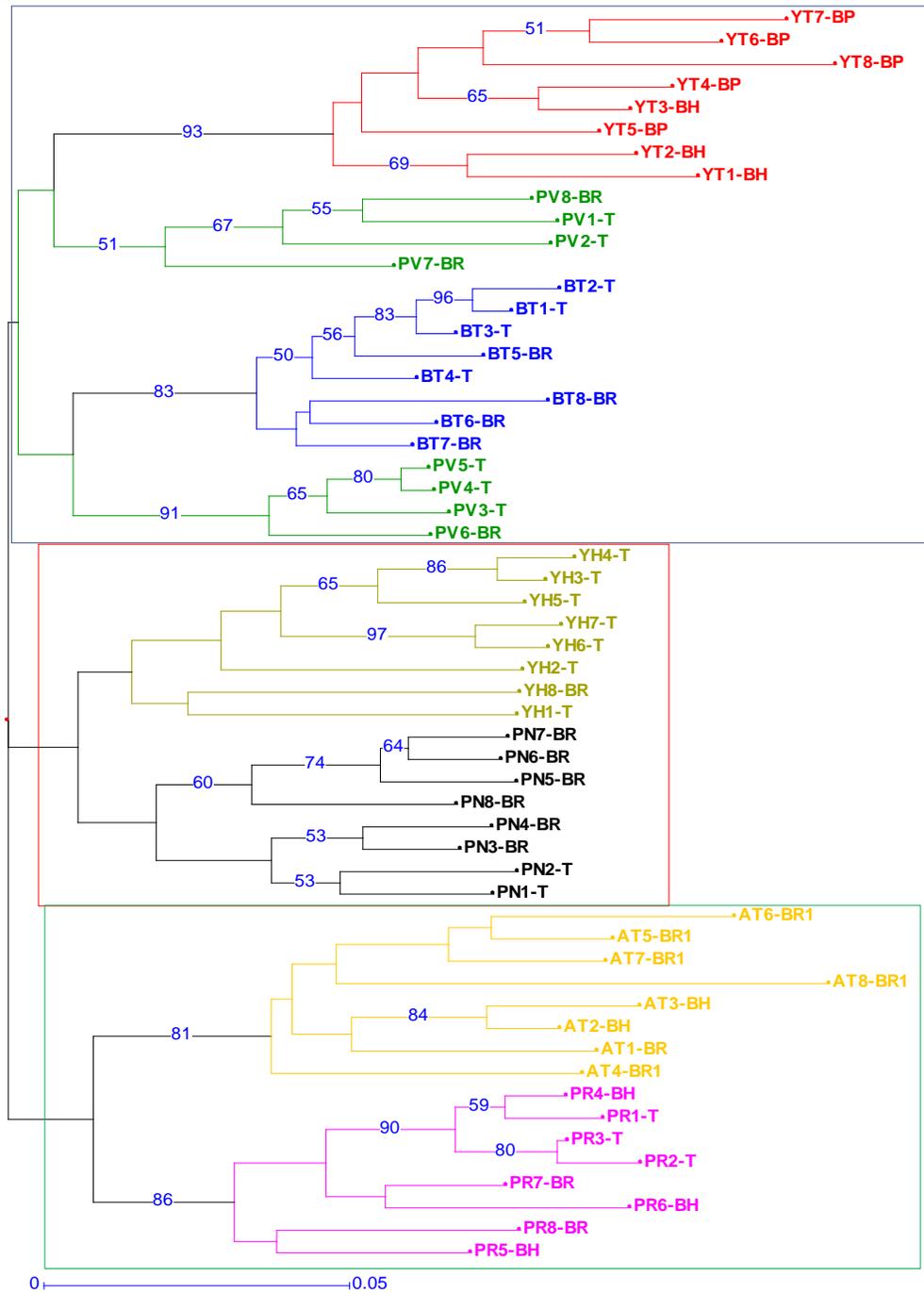


Figura 3. Dendograma mediante el modelo Neighbor Joining (Unweight) del perfil alélico de 56 individuos de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia). (Sólo bootstraps >50 son mostrados).

3.3.4 Análisis factorial de correspondencia múltiple. Los cinco factores del análisis factorial de correspondencia múltiple representan una inercia total de 52,6%, donde el primer y segundo eje muestran una variación total de 28,33%. El AFCM muestra una fuerte estructuración de los individuos del cultivar Yucataná, mientras que los otros seis cultivares formaron tres conjuntos segregados en grupos mixtos completos o parciales. El primer grupo, ligeramente mezclado, fue conformado por los individuos de Amarilla de Tarro y Palirusia. El segundo y tercer grupo son de carácter mixto y parcial, formado uno por los individuos de Blanca de Tarro y el 62.5% de individuos de Palinegra, y el otro, por todos los individuos del cultivar Paliverde y el 37.5% de los individuos de Yema de Huevo. Finalmente, se formaron dos grupos parciales con los individuos restantes de las cultivares Yema de Huevo y Palinegra (Figura 4).

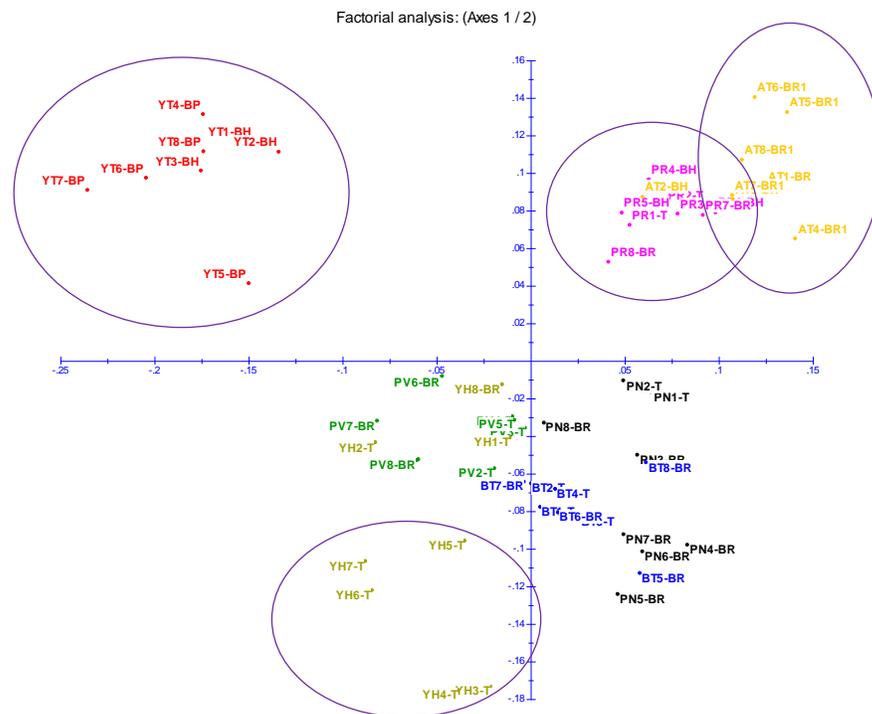


Figura 4. Análisis Factorial de Correspondencia Múltiple del perfil alélico de 56 individuos de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia).

3.4 DISCUSION

3.4.1 Riqueza alélica. Con nueve marcadores microsatélites polimórficos (Morillo *et al.*, 2004) para *A. xanthorrhiza* se revelaron 97 alelos con una riqueza alélica $A = 10,78$ y la presencia de 8 alelos en los locus **AxC29** (CT)₁₃(TA)₇, **AxD34** (GA)₁₃ y **AxD85** (GA)₈, mientras que el locus **AxC85** (GT)₈N₁₂(GT) fue el más polimórfico (16 alelos), es posible que el número de alelos por locus sea explicado por el número de fragmentos repetidos que presentan las secuencias microsatélites analizadas (Bakoumé *et al.*, 2007). Los resultados encontrados son similares a los obtenidos por Morillo (2006) en el análisis de diversidad de 178 formas cultivadas y silvestres de *Arracacia xanthorrhiza* con seis loci comunes (**AxC27** (GT)₈, **AxD34** (GA)₁₃, **AxD43**, **AxD55** y **AxD85** (GA)₈), quien describió para estos seis locus la presencia de 66 alelos, identificando 5-14 alelos por locus, sin embargo, sólo 19 de los 66 alelos estuvieron presentes en las formas cultivadas de *A. xanthorrhiza*. En esta investigación se encontró que los seis loci revelaron 67 alelos en siete cultivares de *Arracacia xanthorrhiza*. Dos locus presentaron un mayor número de alelos diferentes (**AxC27** (GT)₈ y **AxC85** (GT)₈N₁₂(GT)) que las formas cultivadas y silvestres de arracacha ecuatoriana, y tres locus mostraron un menor número de alelos (**AxD34**, **AxD43**, **AxD55**), siendo posible que haya una relación directa entre el aumento o disminución del número de alelos diferentes por locus y la variabilidad genética (Ramey *et al.*, 2006) en los cultivares analizados. El número de alelos efectivos por locus permite realizar estudios de comparación cuando se observa que el número y la distribución de los alelos varían enormemente (Ojango *et al.*, 2011), en este estudio se evidenció que para alcanzar la misma heterocigosidad esperada en el análisis de la diversidad genética de cultivares de arracacha, en promedio, se requiere un número efectivo de alelos por locus de 3,20.

La presencia de alelos privados o exclusivos (22,7%) puede permitir la identificación de expresiones alélicas propias de un cultivar y puede ser relevante en la caracterización genética de los cultivares de arracacha: Amarillo de Tarro,

Blanca de Tarro y Yucatana presentaron, cada uno, más del 20% de alelos privados (6, 6 y 5 respectivamente). El alelo exclusivo del cultivar Blanca de Tarro, 290-**AxC85**, presentó una frecuencia ($q = 9,8$) cercana al 10%, evidenciando diferenciación genética a nivel cuantitativo (Donoso *et al.*, 2004), debido a que la frecuencia de los alelos privados está relacionada con el grado de diferenciación entre los cultivares (Ramey *et al.*, 2007), sin embargo, también permiten identificar cuánto se diferencian las accesiones unas de otras, sin importar la frecuencia que presenten (Kalinowski, 2004).

Bernal, Ocampo & Hernández (2014), en su estudio de diversidad del granadilla encontraron la presencia 10,3% alelos privados y 58,6% de alelos con una frecuencia $\leq 10\%$, determinando que esta riqueza alélica es un reservorio genético en programas de mejoramiento que incluyan selección, caracterización y conservación de genotipos, así mismo, relacionan los alelos de baja frecuencia con mecanismos de supervivencia y adaptabilidad al medio ambiente o enfermedades. En este estudio se encontró que el 62,3% de los alelos presentaron baja frecuencia y el 36,4% de los alelos privados fueron alelos raros, es decir, alelos con una frecuencia alélica menor al 1% (Kimura, 1983) y el 50,0% fueron alelos escasos, ($q = 1 - 5\%$).

Los alelos raros pueden tener importancia en el cultivo de arracacha, ya que pueden reflejar la tasa de mutación total mucho más fielmente que los alelos comunes (Kimura, 1983), por lo tanto, pueden mostrar la mutación como un proceso evolutivo que influye en el aumento de la diversidad genética (Magallán *et al.*, 2009). Los alelos escasos (26,8%) presentaron mayor abundancia que los alelos raros (9,3%), favoreciendo una distribución uniforme de los alelos comunes ($q > 5\%$, Botstein *et al.*, 1980) y frecuentes en los cultivares de arracacha. El cultivar Blanca de Tarro presentó la menor presencia de alelos comunes y frecuentes ($q = 10 - 5\%$), pero evidenció una alta proporción de alelos privados y escasos, mostrando una diferenciación alélica, respecto a los otros cultivares

3.4.2 Variabilidad genética. La heterocigosidad, basada en las frecuencias alélicas, es el método más adecuado para medir la variación genética (Dice, 1945). El análisis de la heterocigosidad observada ($H_O = 0,76$) y esperada ($H_E = 0,69$) en los diferentes loci microsatélites indicó un alto poder de discriminación de los loci utilizados, así como un alto grado de polimorfismo de los cultivares de arracacha evaluadas, dado por la alogamia de la especie *A. xanthorrhiza*, cuya descendencia sexual heterogénea sugiere un alto nivel de heterocigosidad en la forma cultivada (Hermann 1997). El alto valor del promedio ponderado de la heterocigosidad esperada ($H_S = 0,72$) y la heterocigosidad total ($H_T = 0,84$) muestran que es posible un nivel favorable de heterocigosidad, en caso de cruzamientos al azar entre los cultivares (Alzate *et al.*, 2010).

El índice de contenido de información polimórfica (PIC) indica la efectividad de los microsatélites, al permitir la determinación del grado de polimorfismo o la capacidad de discriminación de los microsatélites, donde un valor de PIC mayor a 0,5 es altamente informativo y revelan que hay heterocigosidad (Viera *et al.*, 2016), un valor PIC entre 0,25 y 0,5 es medianamente informativo y menor a 0,25 es ligeramente informativo. Un PIC cercano a uno (1) indica un marcador microsatélite más informativo y polimórfico (Xin-Sheng *et al.*, 2008). En este estudio, el valor promedio PIC (0,82) fue altamente informativo (Botstein *et al.*, 1980), aunque se encontraron valores PIC medianamente informativos, especialmente en el cultivar Blanca de tarro (locus **AxD85**). Los marcadores con un mayor número de alelos por locus presentaron un PIC mayor, debido a la distribución de las frecuencias alélicas (Hildebrand *et al.*, 1992; Zambrano *et al.*, 1998), resultado que hace confiables y efectivos los locus evaluados como medidores de diversidad genética en arracacha. Morillo *et al.* (2017) encontró PIC altamente informativos en los locus analizados, sin embargo, la arracacha cultivada mostró un PIC medianamente informativo (0,37), debido quizá al efecto de la reproducción asexual en la domesticación de la especie arracacha (Morillo & Sécond 2016).

El índice de diversidad de Shannon Wiener (H') evidenció que el cultivar Amarilla de Tarro presentó una mayor diversidad de los alelos ($H'c = 1,78$), mientras que la uniformidad promedio (*Evenness*) fue de 0,454, es decir, hubo una distribución irregular de los diferentes alelos en los cultivares, sin el dominio de un sólo genotipo (Everhart, Kamvar, & Grünwald, 2017), pero fue el cultivar Yucataná el que presentó una mayor similitud de las frecuencias de los diferentes alelos entre los individuos (*Even* = 0,526).

Según la escala para F_{ST} de Wright (1978), las relaciones entre los cultivares Blanca de Tarro-Amarilla de Tarro y Blanca de Tarro-Palirusia, F_{ST} fue mayor a 0,15, indicando una excelente diferenciación genética, mientras que las demás relaciones entre cultivares mostraron una diferenciación genética moderada ($F_{ST} < 0,15$). En este estudio, el índice G_{ST} identificó que la variabilidad se debe en un 83-93% a diferencia dentro de los cultivares y confirma la relación entre los valores bajos de G_{ST} y los valores altos de heterocigosidad ($H_E = 0,69$).

3.4.3 Estructura genética. Los siete cultivares de arracacha mostraron una distancia genética promedio moderada de 0,635. Los 56 individuos generaron un dendograma con tres grupos bien soportados en las ramas internas (Bootstraps >50) con una disimilitud máxima de 42,2% y que evidencian la agrupación de los individuos por cultivares. Tanto el árbol Neighbor Joining como el análisis factorial de correspondencia múltiple muestran una gran correlación en la agrupación genética y fenotípica de los individuos, pero no geoespacial, especialmente de los cultivares Yucataná, Amarilla de Tarro y Palirusia. Por otro lado, aunque se correlacionan los valores de distancia genética y la agrupación del cultivar Paliverde en dos ramas del dendograma, una compartida con Blanca de Tarro y otra con Yucataná, aún es necesario identificar cuáles son los factores genéticos, fenotípicos o ambientales que se relacionan con esta estructuración, y si se mantiene en otros individuos del cultivar, siendo útil analizarlos con nuevos microsatélites.

3.5. CONCLUSIONES

Los nueve marcadores microsatélites evaluados mostraron polimorfismo y revelaron 97 alelos, entre los que sólo se evidenció un alelo homocigoto (**AxC27** - 136). La presencia de un 22,3% de alelos privados muestra un buen grado de diferenciación entre los cultivares analizados (Ramey *et al.*, 2007), herramienta a validar para su utilización en la identificación de materiales regionales o nacionales.

La riqueza alélica detectada en *Arracacia xanthorrhiza* es la base para un programa de conservación, selección, mejoramiento de la especie y diversificación de los sistemas de producción en el país.

Este estudio estableció una variabilidad alta ($He = 0,69$ y $PIC = 0,82$) para 7 cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia), mostrando indicadores para el desarrollo de investigaciones que permitan seleccionar genotipos productivos y con características de resistencia a diferentes plagas, enfermedades o condiciones ambientales adversas.

La variabilidad genética presente en siete cultivares de arracacha de la región de Boyacá y Turmequé (Colombia) se explica por la naturaleza alógama de la especie que revela polimorfismos y genotipos heterocigotos con el uso de marcadores microsatélites.

Este estudio muestra que existe una gran variabilidad genética en los cultivares de arracacha cultivada en Boyacá, Colombia, dado por la alta correspondencia entre la caracterización tradicional realizada por los agricultores y la diversidad alélica (genética) de los cultivares. El aprovechamiento de la diversidad de la arracacha generará logros exitosos o con prospección agrícola para esta especie catalogada como susceptibles o vulnerables a procesos de erosión genética (Caetano *et al.*, 2015).

Se realizó el primer estudio en Colombia con marcadores microsatélites en arracacha que permitirá la complementación de estudios para el aprovechamiento de su diversidad.

REFERENCIAS

Adarve-Cobo, M. A., Mejía-Giraldo, L. M. 2012. Obtención y caracterización físico-química de almidón fermentado de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). *Vitae*, 19(1), S255-S257.

Agronet. 2017. Cadena productiva arracacha - área, producción y rendimiento. Recuperado [febrero, 10, 2018] on-line database, <https://www.datos.gov.co/d/q5m2-je3u/visualizacion#>

Alcaldía de Turmeque. 2015. Recuperado [noviembre, 2, 2015] on-line database, <http://www.turmeque-boyaca.gov.co/>

Alcántara, M. R. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 541-566.

Alvarado G., Á., & Ochoa, L. 2010. Local technologies of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) production at Boyacá, department of Boyacá. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 125-133.

Alvarado, J. S., López, D. H., Torres, I. M., Meléndez, M. M., Batista, R. A., Raxwal, V. K., & Arun, A. 2017. Sequencing and De Novo Assembly of the Complete Chloroplast Genome of the Peruvian Carrot (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Genome announcements*, 5(7), e01519-16.

Alzate, A. M., Vallejo Cabrera, F. A., Ceballos Lascano, H., Pérez, J. C., & Fregene, M. (2010). Variabilidad genética de la yuca cultivada por pequeños agricultores de la región Caribe de Colombia. *Acta agronómica*, 59(4).

Amaya, J., Julca, J., 2006. Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Gerencia Regional de Recursos Naturales y Conservación del Medio Ambiente. Gobierno Regional La Libertad. Perú, p. 15.

Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 13(1): 1-6.

Arévalo, R. A., Bertoncini, E. I., Guirado, N., & Chaila, S. 2006. Los términos cultivar o variedad de caña de azúcar (*Saccharum* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 12(1).

Arif, I. A., & Khan, H. A. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9-17.

Asuar, L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. In L. Eguiarte, V.Souza & X. Aguirre (ed.), *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 574p.

Ayşe B.demir, Hayat Topçu, Mehmet Yavuz Paksoy, Elmira Ziya Motalebipour & Salih Kafkas 2017 First microsatellite markers for *Scaligeria lazica* Boiss. (Apiaceae) by nextgeneration sequencing: population structure and genetic diversity analysis, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 535-543, DOI: 10.1080/13102818.2017.1301784

Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2).

Bakoumé, C., Wickneswari, R., Rajanaidu, N., Din, A. K., Amblard, P., & Billotte, N. 2007. Diversidad alélica de poblaciones naturales de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) detectada por marcadores microsatelitales: Implicación en conservación. *Revista Palmas*, 28(especial,), 149-158.

Benalcázar R., B. M. 2011. Determinación de las características físicas y químicas de la Zanahoria Blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) proveniente de la Zona de San José de Minas Provincia de Pichincha (Bachelor's thesis).

Berdugo-Cely J, Valbuena RI, Sánchez-Betancourt E, Barrero LS, Yockteng R. 2017. Genetic diversity and association mapping in the Colombian Central Collection of *Solanum tuberosum* L. Andigenum group using SNPs markers. *Plos One* 12(3): e0173039. Recuperado [febrero, 3, 2018] on-line database <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173039>

Berg, T. 2009. Landraces and folk varieties: a conceptual reappraisal of terminology. *Euphytica*, 166(3), 423-430.

Bernal-Parra, N., Ocampo-Pérez, J., & Hernández-Fernández, J. 2014. Characterization and analysis of the genetic variability of sweet passion fruit (*Passiflora ligularis* juss.) in Colombia using microsatellite markers. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(3), 586-597.

Biocomercio. 2013. Análisis sectorial arracacha y tubérculos andinos en Colombia 2012-2013. Recuperado [enero, 20, 2015] on-line database <http://www.biocomerciocolombia.com>

Biondi, J., Zorrilla, C., Manrique, I., Arbizu, C., Roca, W., Medina, T., Seminario, J, Quispe, J., Tay, D. & Blas, R. 2009. Genetic diversity of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) in Peru. En 15th Triennial ISTRC Symposium.

Blas, R. 2005. Diversity of *Arracacia* species in Peru. Dissertation originale presentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique. Faculte Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux.

Blas, R. 2009. Problemática del cultivo y valor agregado de la arracacha.

Blas, R., Arbizu, C. & Rodríguez, G. 1997. Número de cromosomas de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). Universidad Nacional Agraria La Molina. *Anales Científicos* 32: 44-54.

Blas, R., Ghislain, M., del Rosario Herrera, M., & Baudoin, J. P. 2008. Genetic diversity analysis of wild *Arracacia* species according to morphological and molecular markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(5): 625-642.

Blas-Sevillano, R., Julca-Otiniano, A., & Baudoin, J. P. 2006. Inducción floral de Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). *Idesia* (Arica), 24(1), 31-36.

Botstein D, White RL, Skolnick M, and Davis RW, 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314–331.

Briceño, A. 1974. Evaluación de material clonal de Apio Criollo (*Arracacha xanthorrhiza* Banc) en los Andes Venezolanos. Mérida. *Revista de la Facultad de Agronomía* (LUZ), 3(4): 67-72.

Brondani, R. P. V., Brondani, C., Tarchini, R. & Grattapaglia, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5-6): 816-827.

Bukasov, S. M. 1930. Arracacha. Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba. 173 p.

Buschiazzo, E. & Gemmel, N. 2006. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*, 28: 1040-1050.

Caetano, C. M., Peña, R. D., Maigual, J. L., Vásquez, L. N., Caetano Nunes, D., & Pazdiora, B. R. C. 2015. Mejoramiento participativo: herramienta para la conservación de cultivos subutilizados y olvidados. *Acta Agronómica*, 64.

Carrillo, J., Candia, M., Lugo, R., Espinoza, E., & Noriega, J. 2013. Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE). *Invurnus*, 8(1), 19-2.

Castillo, R. 1997. Caracterización molecular de 29 morfotipos de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) de la colección ecuatoriana, IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco, Libro de Resúmenes, p. 42.

Clark, L. V. & M. Jasieniuk. 2011. Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis, *Molecular Ecology Resources*. (11): 562–566

Constance, L. 1949. The South American species of *Arracacia* (Umbelliferae) and some related genera. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 76(1), 39-52.

Constance, L., Chuang, T. I., & Bye, R. A. 1976. Chromosome numbers in Chihuahuan Umbelliferae. *Botanical Museum Leaflets*, 24(8), 241-247.

Constance, L., Chuang, T., & Bell, C. 1976. Chromosome numbers in Umbelliferae. V. *American Journal of Botany*, 63(5), 608-625.

Contreras, M., I. Luna & J. Morrone. 2001. Conceptos Biogeográficos. Elementos 41: 33-37.

Cretazzo E., Velasco L., Alcalá M.J., Serrano M.J., Pérez Ortiz J.A. Gutiérrez Escobar R. 2016. Identificación de Variedades de Vid mediante Caracterización Genética por Microsatélites. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Málaga. 1-16 p. Formato digital (e-book).

Dalton, N. J., Horsburgh, G. J., & Dawson, D. A. 2017. The characterisation of microsatellite markers reveals tetraploidy in the Greater Water Parsnip, *Sium latifolium* (Apiaceae). *BMC research notes*, 10(1), 204.

Danderson, C. A. 2011. A phylogenetic study of the *Arracacia* clade (Apiaceae) (Doctoral dissertation, University of Illinois at Urbana-Champaign).

Danderson, C. A., Downie, S. R., & Hermann, M. 2018. Rampant polyphyly in the *Arracacia* clade (Apiaceae) and an assessment of the phylogenetic utility of 20 noncoding plastid loci. *Molecular phylogenetics and evolution*, 118, 286-305.

De Haan, S., Núñez, J., Bonierbale, M., Ghislain, M., & Van Der Maesen, J. 201). A simple sequence repeat (SSR) marker comparison of a large in-and ex-situ potato landrace cultivar collection from Peru reaffirms the complementary nature of both conservation strategies. *Diversity*, 5(3), 505-521.

Dietrich, W., Katz, H., Lincoln, S., Shin, H. S., Friedman, J., Dracopoli, N. C. & Lander, E. S. 1992. A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*, 131(2): 423-447.

Donoso, C, A. Premoli, L. Gallo y R. Ipinza (eds.). 2004. Variación Intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria, Santiago, Chile. 420 p.

Downie, S. R., Plunkett, G. M., Watson, M. F., Spalik, K., Terentieva, E., Troitsky, A. & Lahham, J. 2001. Tribes and clades within Apiaceae subfamily Apioideae: the contribution of molecular data. *Edinburgh Journal of Botany*, 58(02): 301-330.

Downie, S.R., K. Spalik, D.S. Katz-Downie, & J.-P. Reduron. 2010. Major clades within Apiaceae subfamily Apioideae as inferred by phylogenetic analysis of nrDNA ITS sequences. *Pl. Divers. Evol*, 128: 111–136.

Dufresne F, Stift M, Vergilino R, Mable BK. 2014. Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Mol Ecol*, 23:40–69. doi: 10.1111/mec.12581.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6): 435-445.

Elsayed, A., Granate, MJ. & da Silva, DJH. 2010. Developing a core collection of Brazilian arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Banc.) based on morphological and agronomic descriptors character of Brazil. *Gene Conserve*, 9: 1-10.

Everhart, S.E., Kamvar, Z.N. & Grünwald, N.J. 2017. Genotypic richness, diversity, and evenness. In:Grünwald, N., Kamvar, Z., Everhart, S., Tabima, J.F. & Knaus, B. Population genetics and genomics in R. Recuperado [Febrero, 2, 2018] on-line https://grunwaldlab.github.io/Population_Genetics_in_R/index.html

Flórez, J. E. M., Coronado, A. C. M. & Coronado, Y.M. 2008. Microsatélites Amplificados al Azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4): 219-226.

Fusari, C. M. 2010. Mapeo por asociación en girasol: diversidad nucleotídica, desequilibrio de ligamiento e identificación de genes involucrados en la resistencia a la podredumbre húmeda del capítulo (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

García-Carrión, L.F. 2008.- Estudio de caracterización del potencial genético del cacao en Perú. M & O Consulting S.A.C.

- Gepts, P. 2014. The contribution of genetic and genomic approaches to plant domestication studies. *Current opinion in plant biology*, 18, 51-59.
- Gonçalves-Vidigal, M. C. & Rubiano, L. B. 2011. Development and application of microsatellites in plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 11: 66-72.
- González, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.
- Grant, V. 1981. Especiación vegetal. Limusa: México.
- Grummer, J. A., Morando, M. M., Avila, L. J., Sites Jr, J. W., & Leaché, A. D. 2018. Phylogenomic evidence for a recent and rapid radiation of lizards in the Patagonian *Liolaemus fitzingerii* species group. *Molecular phylogenetics and evolution*.
- Gupta, K., G. Talwar, V. Jain, K. Dhawan & S. Jain, 2003. *Salad Crops Root, Bulb and Tuber Crops*. In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition,
- Guzman D, F. A. 2007. *Desarrollo de una herramienta molecular para el estudio de la diversidad genética de germoplasma del género Capsicum*. Tesis (Magíster en Biología) [en línea] (Doctoral dissertation, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencias-Biología).
- Henríquez, P. 2002. *Glosario de términos útiles para el manejo de los recursos filogenéticos*. IICA Biblioteca Venezuela.
- Hermann, M. 1997. *Arracacha (Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). En: M. Hermann & J. Heller (eds.). *Andean Roots and Tubers: Ahipa, Arracacha, Maca and Yacon*. International Plant Genetic Resources Institute, Roma. pp. 75-172.
- Hernández, H. (Ed.). 2001. *Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad*. UNAM.
- Hernández, J. E., & J. León. 1994. *Cultures marginalisées 1492: Une autre perspective*. FAO: Production végétale et protection des plantes, 26.
- Hincapié, M. L., GIL, A., Pico, A. L., Gusmao, L., Rondón, F., Vargas, C. I., & Castillo, A. 2009. Análisis de la estructura genética en una muestra poblacional de Bucaramanga, departamento de Santander. *Colombia Médica*, 40(4).
- Hodge, W. H. 1949. La arracacha comestible. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 10(35), 232-254. Recuperado [octubre, 8, 2013] on-line database http://www.telecentros.pe/img_upload/3ebf28670cc26d6c98d026abe0126c40/Prob_lem_tica_del_cultivo_de_la_arracha.pdf

Ignacio, S., Camarena, F., Baudoin, J., & Blas, R. 2017. Ethno-Botany and in-situ conservation of the genetic diversity of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), yacon (*Smallanthus sonchifolius* H. Robinson), and wild relatives. *Peruvian Journal of Agronomy*, 1(1), 21-31.

Heller, R. & Siegismund, H. R. 2009. Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , D_{EST} and G'_{ST} : how wrong have we been? *Molecular Ecology*, 18: 2080-2083.

Jiménez, F. 2005. *Características nutricionales de la arracacha (Arracacia xanthorrhiza) y sus perspectivas en la alimentación*. Red Peruana de Alimentación y Nutrición.

Jimenez-Mejias, P., & Vargas, P. 2015. Taxonomy of the tribe Apieae (Apiaceae) revisited as revealed by molecular phylogenies and morphological characters. *Phytotaxa*, 212(1), 57-79.

Kay, D.E (Revised by Gooding, E.G.B). 1987. Crop and Product Digest No 2- Root Crops, second Edition. London: Development and Research Institute, xv 380 p.

Knudsen, S., Ørting, B. y Sørensen, M. 2006. Multiplicación y conservación de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) y ajipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi). En: Moraes, M; B. Øllgaard, B; Kvist, P; Borchsenius, F; Balslev H. (ed.) Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. pp. 483-508.

Kozub, P. C., Barboza, K., Galdeano, F., Quarin, C. L., Cavagnaro, J. B., & Cavagnaro, P. F. 2017. Reproductive biology of the native forage grass *Trichloris crinita* (Poaceae, Chloridoideae). *Plant Biology*, 19(3), 444-453.

Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., & Pandey, B. K. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2(4), 141.

Kvist, P; Borchsenius, F; Balslev H. (ed.) Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. pp. 483-508.

Lazar, I., & Lazar, I. 2010. Gel Analyzer 2010a: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software. Recuperado [abril, 14, 2014] on-line database <http://www.gelanalyzer.com/>

Leon, J. 1976. Origin, evolution, and early dispersal of root and tuber crops [tropics]. En: 4. Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. Cali (Colombia).

Longo, S. J., Faircloth, B. C., Meyer, A., Westneat, M. W., Alfaro, M. E., & Wainwright, P. C. 2017. Phylogenomic analysis of a rapid radiation of misfit fishes (Syngnathiformes) using ultraconserved elements. *Molecular phylogenetics and evolution*, 113, 33-48.

Lozano, D. A., Espinosa, E. R., Valbuena, E., Ligarreto, G. A., & Reyes, L. M. 1998. Establecimiento in vitro de diez variedades de la colección colombiana de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* bancroft). *Revista Comalfi (Colombia)* v. 25 (1-3) p. 12-17, 0120-0682.

Ma, L., Ji, Y. J., & Zhang, D. X. 2015. Statistical measures of genetic differentiation of populations: Rationales, history and current states. *Current Zoology*, 61(5), 886-897.

Magallán H., F., Martínez, M., H. S., L., & O., K. 2009. Estructura Genética de poblaciones de *Eriocaulon bilobatum* (Eriocaulaceae): una especie amenazada de humedades temporales. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (85), 81-88. Recuperado [marzo, 10, 2015] on-line database http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-21282009000200008&lng=es&tlng=es.

Martínez, B., Infante, D., & Peteira, B. 2015. Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30.

Martins, C. A. D. C., Portz, A., Brasil, F. D. C., Silva, E. M. R. D., Lima, E., & Zonta, E. 2007. Pre-rooting of rhizomes of peruvian carrot in different trays and substrates with arbuscular micorrhizal fungi. *Ciência e Agrotecnologia*, 31(1), 106-112.

Maw, A. A., Shimogiri, T., Riztyan, K. K., Kawamoto, Y., & Okamoto, S. 2012. Genetic diversity of Myanmar and Indonesia native chickens together with two Jungle Fowl species by using 102 Indels polymorphisms. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25(7), 927.

Mazón, N. 1993. Análisis de la variación morfológica e isoenzimática de la colección ecuatoriana de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft), Tesis, Facultad de Ingeniería Agronómica, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador 135 p.

Mburu, D., & Hanotte, O. 2005. A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI, Nairobi, Kenya.

Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. San José de Costa Rica: Agroamérica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 408p.

Morgante, M., Hanafey, M., & Powell, W. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature genetics*, 30(2), 194-200.

Morillo, E., & Sécond, G. 2017. Tracing the domestication of the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.): a molecular survey confirms the selection of a wild form apt to asexual reproduction. *Plant Genetic Resources*, 15(5), 380-387.

Morillo, E., Knudsen, S. R., & Sécond, G. 2017. Assessment of genetic relationships between cultivated arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) and its wild close relatives in the area of domestication using microsatellite markers. *Conservation Genetics*, 18(6), 1267-1275.

Morillo, E. 2006. Origine de la diversité de plantes domestiquées par la reproduction végétative en Amérique du Sud: reproduction sexuée résiduelle et introgression d'espèces sauvages éloignées. Exemples del' arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Banc., Apiaceae) et du manioc (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae). Thèse de Doctorat. ENSAM, Montpellier. 170p.

Morillo, E., Second, G., Pham, J.L. y Risterucci A.M. 2004. Development of DNA microsatellites markers in the Andean root crop arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Banc.). *Molecular Ecology Notes*, 4: 680-682.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Munnier González, N. A. 2015. Identificación y validación de Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) distribuidos en el genoma de *Eucalyptus globulus* (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales).

Muñoz, A. L., Almanza-Merchán, P., & Alvarado, G. 2015. Caracterización preliminar del cultivo de arracacha *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft en el departamento de Boyacá. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 32(1), 3-11.

Muñoz, J. E., Morillo, A. C., & Morillo, Y. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4), 219-226.

National Center for Biotechnology Information. *Arracacia xanthorrhiza*. Recuperado [noviembre, 2, 2015] on-line database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=264540&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Ojango J.M., Mporu, N., Marshall, K. & Andersson-Eklund L. 2011. Quantitative methods to improve the understanding and utilisation of animal genetic resources In: Animal Genetics Training Resource, version 3, 2011. Ojango, J.M., Malmfors, B. & Okeyo, A.M. (Eds). International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya, and Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

Palacios, R., Morales, M., & Arias, G. C. 2011. Evaluación química bromatológica de tres variedades de *Arracacia xanthorrhiza* "Arracacha". *Ciencia e Investigación*, 14(2): 12-14.

Peakall, R. & Smouse P.E. 2006 GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.

Perrier, X., Flori, A. & Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier. pp: 43 - 76.

Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P. 2006. Recuperado [diciembre, 12, 2014] on-line database DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>

Picó Sirvent, M. B., & Esteras Gómez, C. 2012. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple Sequence Repeats o Short Tandem Repeats). Microsatélites.

Piperno, D. R. 2011. The origins of plant cultivation and domestication in the New World tropics: patterns, process, and new developments. *Current anthropology*, 52(S4), S453-S470.

Plunkett, G. M., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. 1996. Evolutionary patterns in Apiaceae: inferences based on matK sequence data. *Systematic Botany*, 477-495

Ponce A., R. 2013. Caracterización molecular de las variedades de papas cultivadas (*Solanum* spp.) más importantes del Perú mediante el uso de microsatélites. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas Tesis para optar Título profesional de Biólogo genetista biotecnólogo.

Popa, D. M., Pardo, E. A., & López-Parra, A. M. 2017. Revisión sobre los marcadores del origen biogeográfico y su aplicación en la investigación forense. *Colombia Forense*, 4(1).

Provan, J., Powell, W., & Waugh, R. 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 92(8): 1078-1084.

Ramey II, R. R., Wehausen, J. D., Liu, H. P., Epps, C. W., & Carpenter, L. M. 2007. How King *et al.* (2006) define an 'evolutionary distinction' of a mouse subspecies: a response. *Molecular Ecology*, 16(17), 3518-3521.

Reynoso, W., Fernández, A., & Solís, V. 2005. Análisis preliminar del grado de diploidización de *Turnera krapovickasii* Arbo autotetraploide (Turneraceae). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005.

Rivera Varón, Juan José; Garnica Montaña, Johanna Paola; Rubio Bonilla, Sandra Contenido Liliana; Lozano Tovar, María Denis; Rosero Erazo, Jhon Alexander; Trujillo Callejas, Lady Yaneth y Herrera Sánchez, Yurani Angélica. 2015. Recomendaciones tecnológicas para la producción de semilla de calidad de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft): manejo fitosanitario de la semilla vegetativa de arracacha. Bogotá: Corpoica. 72 p.

Rodríguez Borray, G. A., García Bernal, H. R., Camacho Tamayo, J. H., Arias Guerrero, F. L., Rivera Varón, J. J., & De la Torre Duque, F. 2000. La harina de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Manual técnico para su elaboración.

Rodríguez, G., Pereira da Costa, J. H., Pratta, G. R., Zorzoli, R., & Picardi, L. A. 2013. Recursos Genéticos y Genómicos para Mejorar la Calidad del Fruto en Tomate. *Agromensajes*, 35, 30-36.

Rohlf, F. J. 1988. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Publishing.

Rojas Cruz, D. L., & Barreto Bernal, P. C. 2016. Diagnostic of competitiveness of the producer sector of *Arracacia xanthorrhiza* Bancroft. Case municipality of Boyacá (Colombia) 2014. *Apuntes del CENES*, 35(62), 245-278.

Salazar C. 1997. Evaluación y caracterización citogenética de veinte entradas ecuatorianas de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Banc.). Tesis Ing. Agr. Universidad Central, Quito, Ecuador. p. 56.

Sánchez, I. 2004. Parientes silvestres de *Arracacia xanthorrhiza*, Bancroft: Apiaceae, Apioideae. En: Seminario, J. (ed.). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. p. 215-221.

Santayana Rivera, M. L. 2012. Caracterización citogenética y molecular de las especies cultivadas del género *Pachyrhizus* Richard ex DC.

Seminario, J. 2004. Origen de las Raíces Andinas. En: Seminario, J. (ed.). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003) No. 6. Universidad Nacional de Cajamarca, Centro Internacional de la Papa, Agencia Suiza para el Desarrollo y la Cooperación. Lima, Perú. p. 1-38.

Seminario, J. 2006. Descriptores para la caracterización de germoplasma de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft). En: Manual para caracterización In situ de cultivos nativos: Conceptos y Procedimientos. Ministerio de Agricultura, INIA, Fondo Mundial del Medio Ambiente-FMAM, Cooperación Italiana y PNUD. Lima, Perú, 61-68.

Smeets, H. J., Brunner, H. G., Ropers, H. H., & Wieringa, B. 1989. Use of variable simple sequence motifs as genetic markers: application to study of myotonic dystrophy. *Human genetics*, 83(3): 245-251.

Soto, K. 2004. *Características del almidón de las variedades amarilla, blanca y morada de arracacha (Arracacia xanthorrhiza)* (Doctoral dissertation, Tesis de Ingeniero en Industrias Alimentarias, Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo-Perú).

Tate, J., Soltis, D., Soltis, P. 2005. Polyploidy in plants. In: The Evolution of the Genome (ed. Gregory RT). Elsevier, San Diego, California.

Tautz, D., & Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12(10), 4127–4138.

Tauz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res.*, 17: 6463–6471.

Tian, J., Zhiying, D. E. N. G., Zhang, K., Yu, H., Jiang, X., & Li, C. 2015. Genetic Analyses of Wheat and Molecular Marker-Assisted Breeding, Volume 1: Genetics Map and QTL Mapping. Springer.

Valderrama, M., & Seminario, J. 2004. Conservación ex situ de germoplasma de cuatro raíces andinas: Chago, yacón, achira y arracacha. Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003), (4): 65-176.

Van Puyvelde, K., Van Geert, A., & Triest, L. 2010. ATETRA, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT. *Molecular Ecology Resources*, 10(2), 331-334.

Vargas. J., Iris, M., Bagshaw, A., Buschiazzo, E., Merkel, A., Gemmell, NJ. 2008. Evolution of Microsatellite DNA. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020847

Vashakidze, R. P., & Prangishvili, D. A. 1987. Simple repetitive sequences in the genomes of archaebacteria. *FEBS letters*, 216(2), 217-220.

Vásquez, N., Medina, C., & Lobo, M. 2004. Caracterización morfológica de la colección colombiana (Tolima, Huila, Boyacá, Cauca) de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento ya la capacitación. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003), (6): 165-178.

Vélez Tébar, M. D. 2007. Estudio de un sistema de marcadores microsatélites para la protección y defensa legal de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.).

Verity, R., & Nichols, R. A. 2014. What is genetic differentiation, and how should we measure it GST, D, neither or both? *Molecular ecology*, 23(17), 4216-4225.
Whitlock, M. C. 2011. and D do not replace FST. *Molecular ecology*, 20(6), 1083-1091.

Viera, W., Ponce Morales, L. A., Morillo, E., & Vásquez, C. 2016. Genetic variability of avocado germplasm for plant breeding. *Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 3(3):1-9.

Wood TE, Takebayashi N, Barker MS, Mayrose I, Greenspoon PB, Rieseberg LH. 2009. The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *P Natl Acad Sci USA*. 106(33), 13875–13879. doi: 10.1073/pnas.0811575106.

Xin-Sheng, W., Tian-Wen, W., Hui –ling, Z., long, C.G., Qi, X., Jin- Hua, C., Xiu-Bai, Z. and Guo-Hong, C. 2008. Correlation analysis of wool yield in Wan line Angora rabbits using microsatellite DNA markers. *Journal of Biological Sciences*. 8(3): 679-682.

Zárate, N. A. H., Vieira, M. D. C., Rech, J., Quast, A., Pontim, B. C. Á., & Gassi, R. P. 2008. Yield and gross income of arracacha in monocrop and intercropping with the Japanese bunching onion and parsley. *Horticultura Brasileira*, 26(2): 287-291.

Zeven, A. C. 1998. Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104(2), 127-139.

ANEXOS

Anexo A. Distribución alélica presente en 7 cultivares de arracacha analizados con 9 marcadores microsatélites.

Cultivar	1 alelo	2 alelos	3 alelos	4 alelos	Ploidía observada
Paliverde	25.00%	47.22%	12.50%	15.28%	4x
Yema de Huevo	16.67%	43.06%	22.22%	18.06%	4x
Palinegra	27.78%	38.89%	11.11%	22.22%	4x
Blanca de Tarro	54.17%	22.22%	22.22%	1.39%	4x
Palirusia	20.83%	50.00%	20.83%	8.33%	4x
Amarilla de Tarro	5.56%	54.17%	27.78%	12.50%	4x
Yucatana	13.89%	40.28%	18.06%	27.78%	4x
Promedio	23%	42%	19%	15%	4x

Anexo B. Modificaciones realizadas a los parámetros de amplificación por PCR para cada uno de los 14 microsatélites evaluados.

Oligonucleótidos	Tm (°C)	T. Anillamiento Morillo et al. (2004)	Condiciones evaluadas		Condiciones estandarizadas	
			MgCl ₂ (mM)	Temperatura anillamiento (°C)	MgCl ₂ (mM)	Temperatura anillamiento (°C)
AxC27	54.7	58	1.8	58	1.5	58
	56.3		1.6	58		
			1.5	58		
AxC38	50.6 45.1	48	20	48	2.0	48
AxC8	51.9	58	2.0	58	2.0	60
			1.8	59		
			1.8	58		
			1.8	60		
			1.6	58		
	49.7		1.7	59		
			1.7	60		
			2.0	60		
			2.0	61		
			1.8	60		
AxD34	48.7	50	2.0	50	1.8	51
	51.8		1.8	51		
			1.7	51		
			1.6	51		
AxD43	52.9 54.6	58	2.0	58	1.8	58
AxD85	51.9	48	2.0	48	1.5	48
	49.7		1.8	48		
			1.5	48		
			1.5	50		
AxC64	50.5	48	2.0	48	1.5	50
			1.5	48		
			1.7	49		
			1.8	49		
			1.5	49		
	46.9		1.6	49		
			1.5	50		
			1.8	51		
			2.0	54		
AxD55	55.0	54	1.8	55	1.5	57
	54.8		1.8	56		
			1.7	57		
			1.5	55		
			1.8	58		
			1.5	57		
			1.5	57		
AxC85	51.2 47.7	58	2.0	58	1.8	58
AxC87	52.2	58	1.8	58	1.8	59
			1.5	58		
			1.5	59		
			1.6	59		
	53.0		1.8	59		
			1.7	60		
			1.7	61		
			1.6	60		
AxC29	53.6	58	2.0	58	1.8	58
			1.8	58		
			1.7	59		
			1.7	58		
			1.5	59		
	51.3		1.6	60		
			1.6	59		
			1.5	60		
			1.4	60		
			1.45	60.5		
AxD72	52.8 56.2	58	2.0	58	2.0	58
AxD82	54.2 55.6	58	2.0	57	2.0	57
AxD13	50.4	48	2	48	2.0	48
	53.9		1.8	48		

Anexo C. Identificación de las muestras de plantas de arracacha caracterizadas en el presente estudio.

Nº	Código	Cultivar	Lote	Nº	Código	Cultivar	Lote
1	PV1	Paliverde	Teguaneque	29	BT5	Blanca de Tarro	Riqué
2	PV2	Paliverde	Teguaneque	30	BT6	Blanca de Tarro	Riqué
3	PV3	Paliverde	Teguaneque	31	BT7	Blanca de Tarro	Riqué
4	PV4	Paliverde	Teguaneque	32	BT8	Blanca de Tarro	Riqué
5	PV5	Paliverde	Teguaneque	33	PR1	Palirusia	Teguaneque
6	PV6	Paliverde	Riqué	34	PR2	Palirusia	Teguaneque
7	PV7	Paliverde	Riqué	35	PR3	Palirusia	Teguaneque
8	PV8	Paliverde	Riqué	36	PR4	Palirusia	Huerta Chica
9	YH1	Yema de Huevo	Teguaneque	37	PR5	Palirusia	Huerta Chica
10	YH2	Yema de Huevo	Teguaneque	38	PR6	Palirusia	Huerta Chica
11	YH3	Yema de Huevo	Teguaneque	39	PR7	Palirusia	Riqué
12	YH4	Yema de Huevo	Teguaneque	40	PR8	Palirusia	Riqué
13	YH5	Yema de Huevo	Teguaneque	41	AT1	Amarilla de Tarro	Riqué
14	YH6	Yema de Huevo	Teguaneque	42	AT2	Amarilla de Tarro	Huerta Chica
15	YH7	Yema de Huevo	Teguaneque	43	AT3	Amarilla de Tarro	Huerta Chica
16	YH8	Yema de Huevo	Riqué	44	AT4	Amarilla de Tarro	Riqué
17	PN1	Palinegra	Teguaneque	45	AT5	Amarilla de Tarro	Riqué
18	PN2	Palinegra	Teguaneque	46	AT6	Amarilla de Tarro	Riqué
19	PN3	Palinegra	Riqué	47	AT7	Amarilla de Tarro	Riqué
20	PN4	Palinegra	Riqué	48	AT8	Amarilla de Tarro	Riqué
21	PN5	Palinegra	Riqué	49	YT1	Yucataná	Huerta Chica
22	PN6	Palinegra	Riqué	50	YT2	Yucataná	Huerta Chica
23	PN7	Palinegra	Riqué	51	YT3	Yucataná	Huerta Chica
24	PN8	Palinegra	Riqué	52	YT4	Yucataná	Pachaquirá
25	BT1	Blanca de Tarro	Teguaneque	53	YT5	Yucataná	Pachaquirá
26	BT2	Blanca de Tarro	Teguaneque	54	YT6	Yucataná	Pachaquirá
27	BT3	Blanca de Tarro	Teguaneque	55	YT7	Yucataná	Pachaquirá
28	BT4	Blanca de Tarro	Teguaneque	56	YT8	Yucataná	Pachaquirá

Anexo D. Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

1. Terminada la amplificación de las muestras, retire los vidrios de la cámara. Los vidrios se colocan en el área a trabajar teniendo en cuenta su identificación, a fin de evitar la confusión de los materiales.
2. Separe con la ayuda de una cuchilla uno de los dos vidrios del gel.
3. Realice una marca que permita identificar cada gel.
4. Introduzca el vidrio con el gel adherido en el recipiente con solución fijadora de etanol al 10% por un período de 10 minutos con el fin de detener la reacción. El gel en esta solución se desprende del vidrio.
5. Introduzca el gel en solución de ácido nítrico al 1% durante 5 minutos.
6. Realice un lavado del gel con agua destilada desionizada por 3 a 5 minutos para eliminar el exceso de ácido nítrico y evitar que el gel se quemé.
7. Introduzca el gel por un tiempo mínimo de 30 minutos en solución de tinción a base de nitrato de plata.
8. Realice un lavado del gel con agua destilada desionizada por 3 a 5 minutos para eliminar el exceso de ácido nítrico y evitar que el gel se quemé.
9. Sumerja el gel en solución reveladora a base de carbonato de calcio hasta que aparezcan las bandas.
10. Detenga la reacción transfiriendo el gel a solución fijadora de ácido acético al 10%, para evitar que el gel se quemé u oscurezca.
11. Registre los geles fotográficamente colocándolos en cámara de luz blanca.

Anexo F. Frecuencia genética de los alelos amplificados con 9 locus microsatélite en *A. xanthorrhiza*

Locus Ax27	Cultivar/Alelos	118	122	125	131	136	142	193	197	200	205	209					
	PaliVerde	0.000	0.500	0.281	0.031	0.000	0.000	0.094	0.000	0.094	0.000	0.000					
	YemaDeHuevo	0.000	0.031	0.281	0.375	0.000	0.000	0.000	0.156	0.000	0.156	0.000					
	PaliNegra	0.000	0.063	0.250	0.188	0.000	0.000	0.063	0.250	0.000	0.188	0.000					
	BlancaDeTarro	0.000	0.000	0.813	0.000	0.125	0.063	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
	PaliRusia	0.000	0.208	0.333	0.313	0.000	0.000	0.000	0.042	0.104	0.000	0.000					
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.000 0.188	0.188 0.250	0.375 0.313	0.063 0.250	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.156 0.000	0.188 0.000	0.000 0.000	0.031 0.000					
Locus Ax29	Cultivar/Alelos	172	177	181	190	200	210	219	225								
	PaliVerde	0.313	0.188	0.250	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000								
	YemaDeHuevo	0.313	0.333	0.229	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000								
	PaliNegra	0.000	0.188	0.438	0.063	0.125	0.063	0.063	0.063								
	BlancaDeTarro	0.333	0.333	0.000	0.000	0.000	0.333	0.000	0.000								
	PaliRusia	0.000	0.000	0.000	0.198	0.323	0.125	0.198	0.156								
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.281 0.000	0.125 0.000	0.281 0.125	0.125 0.375	0.094 0.250	0.094 0.000	0.000 0.063	0.000 0.188								
Locus Ax64	Cultivar/Alelos	139	145	148	151	155	161	165	170	175	179						
	PaliVerde	0.000	0.156	0.250	0.094	0.156	0.094	0.000	0.156	0.094	0.000						
	YemaDeHuevo	0.031	0.094	0.125	0.250	0.219	0.063	0.000	0.000	0.188	0.031						
	PaliNegra	0.000	0.250	0.000	0.000	0.250	0.250	0.000	0.000	0.094	0.156						
	BlancaDeTarro	0.063	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.313	0.250	0.313						
	PaliRusia	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000						
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.250 0.000	0.333 0.250	0.000 0.000	0.083 0.250	0.000 0.250	0.000 0.000	0.250 0.250	0.083 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000						
Locus Ax85	Cultivar/Alelos	200	230	235	239	243	247	250	262	268	277	280	290	303	310	327	335
	PaliVerde	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.229	0.063	0.188	0.000	0.000	0.104	0.000	0.000	0.417	0.000	0.000
	YemaDeHuevo	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.083	0.000	0.396	0.396	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	PaliNegra	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.625	0.375	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	BlancaDeTarro	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.688	0.000	0.000	0.000	0.313
	PaliRusia	0.000	0.125	0.375	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.000 0.063	0.500 0.000	0.000 0.156	0.000 0.000	0.000 0.219	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.188	0.125 0.031	0.000 0.000	0.063 0.188	0.000 0.000	0.250 0.000	0.000 0.156	0.063 0.000	0.000 0.000
Locus Ax87	Cultivar/Alelos	85	88	92	96	98	100	105	112	116	120	125	131				
	PaliVerde	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.438	0.063	0.375	0.125	0.000	0.000	0.000				
	YemaDeHuevo	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.313	0.188	0.000	0.313	0.188	0.000	0.000				
	PaliNegra	0.000	0.000	0.167	0.083	0.042	0.250	0.083	0.125	0.125	0.083	0.042	0.000				
	BlancaDeTarro	0.000	0.083	0.208	0.042	0.000	0.333	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000	0.000				
	PaliRusia	0.063	0.188	0.375	0.125	0.000	0.063	0.188	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.042 0.000	0.229 0.000	0.000 0.000	0.417 0.188	0.188 0.000	0.083 0.000	0.042 0.000	0.000 0.125	0.000 0.000				
Locus Ax84	Cultivar/Alelos	172	180	186	189	194	197	202	207								
	PaliVerde	0.125	0.000	0.500	0.125	0.250	0.000	0.000	0.000								
	YemaDeHuevo	0.000	0.000	0.000	0.000	0.563	0.000	0.438	0.000								
	PaliNegra	0.000	0.188	0.313	0.188	0.313	0.000	0.000	0.000								
	BlancaDeTarro	0.000	0.000	0.250	0.250	0.250	0.125	0.000	0.125								
	PaliRusia	0.000	0.000	0.125	0.188	0.313	0.063	0.313	0.000								
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.000 0.000	0.000 0.063	0.188 0.000	0.063 0.438	0.375 0.313	0.375 0.125	0.000 0.063	0.000 0.000								
Locus Ax83	Cultivar/Alelos	170	176	180	186	192	256	264	276	284	289						
	PaliVerde	0.167	0.333	0.167	0.000	0.000	0.000	0.167	0.167	0.000	0.000						
	YemaDeHuevo	0.167	0.333	0.000	0.167	0.000	0.000	0.000	0.292	0.042	0.000						
	PaliNegra	0.000	0.625	0.250	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
	BlancaDeTarro	0.094	0.844	0.000	0.000	0.000	0.031	0.031	0.000	0.000	0.000						
	PaliRusia	0.198	0.385	0.000	0.063	0.000	0.156	0.198	0.000	0.000	0.000						
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.250 0.000	0.083 0.198	0.292 0.000	0.000 0.271	0.042 0.031	0.042 0.000	0.250 0.135	0.000 0.240	0.042 0.094	0.000 0.031						
Locus Ax85	Cultivar/Alelos	215	225	230	239	243	250	255	266	277	281	294	298	305	314		
	PaliVerde	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.313	0.000	0.063	0.000	0.000	0.063	0.375	0.000	0.063		
	YemaDeHuevo	0.000	0.000	0.063	0.063	0.250	0.063	0.125	0.125	0.000	0.125	0.063	0.063	0.063	0.000		
	PaliNegra	0.125	0.250	0.000	0.000	0.000	0.250	0.375	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
	BlancaDeTarro	0.000	0.000	0.000	0.188	0.063	0.313	0.000	0.000	0.250	0.000	0.188	0.000	0.000	0.000		
	PaliRusia	0.000	0.333	0.083	0.000	0.188	0.000	0.396	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.188 0.000	0.250 0.000	0.000 0.000	0.063 0.125	0.000 0.083	0.125 0.271	0.188 0.000	0.125 0.000	0.000 0.229	0.063 0.292	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000	0.000 0.000		
Locus Ax85	Cultivar/Alelos	155	160	165	170	175	180	190	198								
	PaliVerde	0.500	0.375	0.000	0.125	0.000	0.000	0.000	0.000								
	YemaDeHuevo	0.375	0.375	0.063	0.125	0.000	0.063	0.000	0.000								
	PaliNegra	0.500	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000								
	BlancaDeTarro	0.375	0.625	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
	PaliRusia	0.000	0.063	0.000	0.500	0.000	0.438	0.000	0.000								
	AmarillaDeTarro Yucataná	0.000 0.000	0.000 0.313	0.000 0.188	0.438 0.000	0.063 0.313	0.000 0.188	0.375 0.000	0.125 0.000								

Anexo G. F_{ST} de 7 cultivares de arracacha analizados con 9 marcadores microsatélites.

Cultivares	PaliVerde	Yema De Huevo	PaliNegra	Blanca De Tarro	PaliRusia	Amarilla De Tarro	Yucataná
PaliVerde	0.000						
YemaDeHuevo	0.082	0.000					
PaliNegra	0.094	0.069	0.000				
BlancaDeTarro	0.110	0.126	0.140	0.000			
PaliRusia	0.130	0.109	0.106	0.165	0.000		
AmarillaDeTarro	0.100	0.102	0.095	0.155	0.096	0.000	
Yucataná	0.085	0.084	0.111	0.137	0.100	0.091	0.000

Anexo H. G_{ST} , D_M , R_{ST} y de *Jost's D* 7 cultivares de arracacha analizados con 9 marcadores microsatélites.

	<i>Cultivar</i>	Paliverde	Yema de Huevo	Palinegra	Blanca de Tarro	Palirusia	Amarilla de Tarro	Yucataná
G_{ST}	PaliVerde	0.000						
	YemaDeHuevo	0.085	0.000					
	PaliNegra	0.097	0.073	0.000				
	BlancaDeTarro	0.113	0.130	0.145	0.000			
	PaliRusia	0.134	0.112	0.112	0.171	0.000		
	AmarillaDeTarro	0.103	0.106	0.101	0.160	0.102	0.000	
	Yucataná	0.089	0.087	0.114	0.142	0.102	0.094	0.000
D_M	PaliVerde	0.000						
	YemaDeHuevo	0.133	0.000					
	PaliNegra	0.148	0.108	0.000				
	BlancaDeTarro	0.163	0.191	0.207	0.000			
	PaliRusia	0.213	0.178	0.167	0.255	0.000		
	AmarillaDeTarro	0.166	0.171	0.154	0.245	0.157	0.00000	
	Yucataná	0.141	0.140	0.185	0.216	0.164	0.15548	0.000
R_{ST}	PaliVerde	0.000						
	YemaDeHuevo	0.198	0.000					
	PaliNegra	0.228	0.162	0.000				
	BlancaDeTarro	0.278	0.320	0.385	0.000			
	PaliRusia	0.322	0.265	0.276	0.444	0.000		
	AmarillaDeTarro	0.242	0.247	0.238	0.413	0.235	0.000	
	Yucataná	0.199	0.198	0.272	0.3421	0.238	0.212	0.000
<i>Jost's D</i>	PaliVerde	-0.096						
	YemaDeHuevo	0.369	-0.113					
	PaliNegra	0.411	0.297	-0.100				
	BlancaDeTarro	0.402	0.509	0.495	-0.066			
	PaliRusia	0.628	0.529	0.425	0.635	-0.084		
	AmarillaDeTarro	0.508	0.555	0.423	0.649	0.456	-0.108	
	Yucataná	0.447	0.456	0.574	0.611	0.510	0.545	-0.119