

Revista peruana de biología 26(4): 491 - 498 (2019)
doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i4.15829>
ISSN-L 1561-0837; eISSN: 1727-9933
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Evaluación de dos secuencias de código de barras de ADN en germoplasmas de *Arracacia xanthorrhiza* (Apiaceae) de Ecuador

TRABAJOS ORIGINALES

Presentado: 01/02/2019
Aceptado: 26/04/2019
Publicado online: 16/12/2019

Correspondencia:

*Autor de correspondencia

Marta Dávila: mb.davila@uta.edu.ec

Hernan Laurentín: hlaurentin@ucla.edu.ve

Carlos Vásquez: ca.vasquez@uta.edu.ec

Sara Paredes-Carreño: nathy_paredes@yahoo.com

Vanessa Frutos: vanefrp91@gmail.com

Olguer León: oa.leon@uta.edu.ec

Otros datos de los autores / biografía:

MD: <http://orcid.org/0000-0003-1031-4284>

CV: <http://orcid.org/0000-0002-8214-3632>

SP-C: <https://orcid.org/0000-0003-1453-4209>

VF: <https://orcid.org/0000-0002-2569-9431>

OL: <https://orcid.org/0000-0003-2521-8842>

Citación:

Dávila M., H. Laurentín, C. Vásquez, S. Paredes-Carreño, V. Frutos & O. León. 2019. Evaluación de dos secuencias de código de barras de ADN en germoplasmas de *Arracacia xanthorrhiza* (Apiaceae) de Ecuador. *Revista peruana de biología* 26(4): 491 - 498 (Diciembre 2019). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i4.15829>

Palabras clave: Zanahoria blanca; *rbcl*; *psbA-trnH*; filogenia.

Keywords: White carrot; *rbcl*; *psbA-trnH*; phylogeny.

Evaluation of two sequences of DNA barcodes in germplasm of *Arracacia xanthorrhiza* (Apiaceae) from Ecuador

Marta Dávila¹, Hernán Laurentín², Carlos Vásquez*¹, Sara Paredes-Carreño¹, Vanessa Frutos¹ y Olguer León¹

¹ Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carretera Cevallos-Quero, 180350 Cevallos, Provincia de Tungurahua, Ecuador.

² Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Agronomía. Departamento de Ciencias Biológicas. Venezuela.

Resumen

El presente estudio evalúa el gen de cloroplasto *rbcl* y la región espaciadora no codificante *psbA-trnH* de *Arracacia xanthorrhiza* como posible secuencia de código de barra. Se colectó material vegetal de *A. xanthorrhiza* en huertos de las provincias de Pichincha, Tungurahua y Cotopaxi, las cuales fueron sembradas en condiciones homogéneas en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica. El análisis del locus *rbcl* identificó los cinco materiales de *A. xanthorrhiza* con entre 97 y 99% de homología. La alineación de secuencias del locus *rbcl* y de *psbA-trnH* permitió diferenciar dos grupos, el primer grupo con SJ, QU, PP y B, observándose poca diversidad entre ellos, mientras que el segundo grupo está conformado por el material CH cultivado a 3260 m de altitud. En el segundo árbol, se demostró la divergencia entre los materiales colectados en diferentes provincias de la Sierra ecuatoriana, separándolos de acuerdo a su localidad, así como al color de la pulpa de la raíz. La región intergénica no codificadora (*psbA-trnH*) permitió identificar y obtener la diversidad genética de materiales cultivados de *A. xanthorrhiza*, provenientes de diversas zonas geográficas de la sierra ecuatoriana, con características morfológicas distintivas. Adicionalmente, esta secuencia pudo diferenciar a *A. xanthorrhiza* de otras especies de la familia Apiaceae, con lo cual se recomienda como código de barra.

Abstract

The present study aimed to evaluate the *Arracacia xanthorrhiza* *rbcl* chloroplast gene and the non-coding spacer region *psbA-trnH* as a possible barcode sequence. Plant material of *A. xanthorrhiza* was collected in orchards of Pichincha, Tungurahua and Cotopaxi provinces. This material were cultivated in standard conditions in the Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica. The *rbcl* locus analysis identified the five materials of *A. xanthorrhiza* with between 97 and 99% homology. The sequence alignment of *rbcl* locus and *psbA-trnH* allowed to differentiate two groups, the first group with SJ, QU, PP and B, showing low diversity among them, while the second group consisted of the CH material grown in 3260 m of altitude. In the second tree, the divergence between the materials collected in different provinces of the Ecuadorian Sierra was demonstrated, separating them according to their locality, as well as the color of the root pulp. The non-coding intergenic region (*psbA-trnH*) allowed identify and obtain the genetic diversity of cultivated materials of *A. xanthorrhiza*, from various geographical areas of the Ecuadorian Sierra, with distinctive morphological characteristics. Additionally, this sequence was able to differentiate *A. xanthorrhiza* from other species of the Apiaceae family, which is recommended as a bar code.

Journal home page: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con revistaperuana.biologia@unmsm.edu.pe.

Introducción

Arracacia (Apiaceae) es un género de origen andino, del cual se han reportado entre 24 hasta 75 especies. *Arracacia xanthorrhiza* Bancr. es la única especie cultivada por pequeños productores en áreas de economía campesina y con poco desarrollo tecnológico (Blas et al. 2008). Por su importancia en la zona andina, *A. xanthorrhiza* material cultivado y endémico de Colombia y Perú ha sido estudiado morfológicamente, caracterizado agrónomicamente y genéticamente (Rosso et al. 2014; Blas et al. 2008; Valderrama & Seminario 2002). Así mismo, Valderrama y Seminario (2002) describieron la variabilidad morfológica y distribución geográfica de una colección de arracacha de Perú y establecieron las zonas de mayor variabilidad basados en 17 descriptores cualitativos. Quilapanta et al. (2018) establecieron diferentes poblaciones de arracacha cultivadas en los Andes ecuatorianos, las cuales se corresponden con morfotipos bien distinguibles. También, han sido reportados caracterizaciones moleculares en bancos de germoplasmas de Ecuador y Perú (Morillo et al. 2004; Morillo & Sécond 2017). Morillo y Sécond (2017) utilizaron análisis de polimorfismos en AFLPs y de regiones no codificadoras de cloroplastos y determinaron que se podría establecer la hipótesis de que la domesticación de la arracacha pudo derivarse de la forma silvestre y que actualmente existen dos grupos de cultivares bien distinguibles a nivel molecular.

La tecnología de códigos de barra de ADN ha surgido como una herramienta importante en estudios de conservación (Vivas et al. 2014), así como para la trazabilidad de alimentos (Galimberti et al. 2013), puesto que provee una forma rápida y confiable la identidad taxonómica de una especie mediante la comparación de secuencias cortas del genoma con secuencias existentes en bases de datos. Basado en la facilidad de su amplificación, secuenciación, alineación múltiple y la variabilidad se han seleccionado tres loci de plastidio como "marcadores codificadores de barra" para plantas; porciones de las regiones codificantes de *rbcL* (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylasa/oxygenasa), *matK* (Maturasa K) y *trnH-psbA* (intergenic spacer). Estas secuencias son segmentos pequeños de ADN universales de alta variabilidad, los cuales usando la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), proporcionan a los investigadores un protocolo estandarizado que permite establecer las diferencias entre organismos estrechamente relacionados (Liu et al. 2012; Kane et al. 2012); inventarios de

ecosistemas complejos (Burgess et al. 2011; Costion et al. 2011), detectar contaminantes en productos terminados (Guo et al. 2011; Newmaster et al. 2013), entre otras aplicaciones.

En virtud de esto y dada la importancia de la identificación correcta de *A. xanthorrhiza* por su utilidad y vulnerabilidad, siguiendo la recomendación de varios autores de trabajar con este tipo de marcadores para la separación inequívoca entre especies muy relacionadas (Chase et al. 2007), el objetivo de este trabajo es reportar un código de barras de ADN de *A. xanthorrhiza*, con la finalidad de obtener su correcta identificación así como la de sus productos derivados.

Materiales y métodos

Material vegetal. Se colectó material vegetal de *A. xanthorrhiza* en huertos de las provincias de Pichincha, Tungurahua y Cotopaxi (Fig. 1, Tabla 1). Todas las muestras fueron herborizadas y depositadas en el Herbario

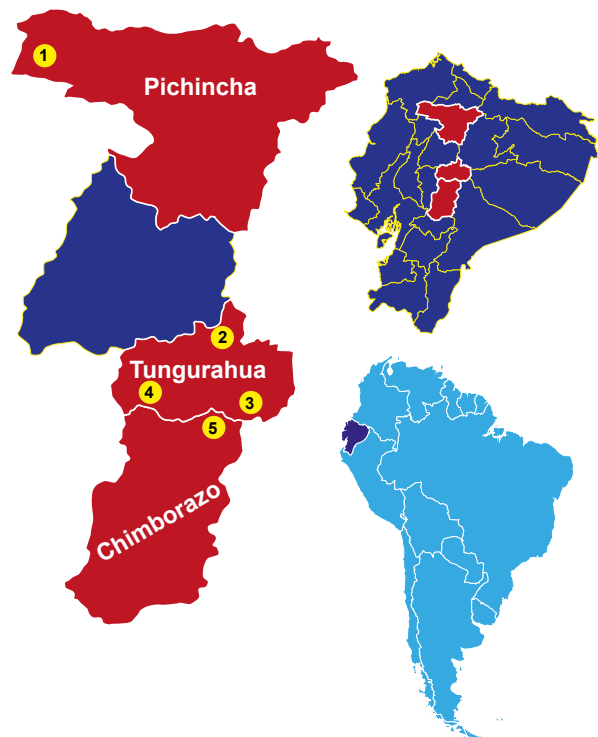


Figura 1. Localidades de muestreo de *Arracacia xanthorrhiza* en las provincias de Pichincha (SJ), Tungurahua (QU, B, CH) y Chimborazo (PP) Ecuador.

Tabla 1. Ubicación de las plantaciones de *Arracacia xanthorrhiza*

Localidad	Coordenadas	Altitud (m)	Color de la pulpa de la raíz
(1) San José de las Minas (SJ), cantón Quito	0°10'19"N – 78°24'59"W	1865	Blanca
(2) Quillán (QU), cantón Píllaro	1°20'59"N – 78°39'59"W	2276	Blanca
(3) El Triunfo (B), cantón Baños	1°10'18"S – 78°32'33"W	1683	Blanca
(4) Quinchicoto (CH), cantón Tisaleo	0°23'54" – 78°24'41"W	3260	Blanca
(5) Penipe (PP), cantón Penipe	1°32'01" – 78°25'31"W	2416	Amarilla

AMAS de la Universidad Técnica de Ambato. Para la obtención de estas plantas, se contó con el convenio entre el Ministerio del Ambiente de Ecuador y la Universidad Técnica de Ambato No. MAE-DNB-CM-2017-0070.

Todas las plantas se sembraron en condiciones homogéneas en la Granja Experimental Docente Querochaca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, de la Universidad Técnica de Ambato (UTA) ubicada en el cantón Cevallos, provincia de Tungurahua, Ecuador (01°24'02"S; 78°35'20"W, altitud 2850 m de altitud) Las condiciones climáticas de la granja experimental fueron: temperatura media diaria 13.5 °C, humedad relativa media 75.8%, precipitación anual 494,0 mm, evapotranspiración anual 2.6 mm. Las plantas provenientes de San José de las Minas (SJ) [Quito, Prov. de Pichincha], Quillán (QU) [Píllaro, Prov. de Tungurahua] y El Triunfo (B) [Baños, Prov. de Tungurahua], tienen la raíz de pulpa blanca. El material de Quinchicoto (CH) [Tisaleo, Prov. Tungurahua], tiene la raíz de pulpa blanca y las hojas y peciolos de color púrpura y las raíces del material procedente de Penipe (PP) [Penipe, Prov. Chimborazo] tiene la pulpa amarilla (Fig. 2).

Extracción de ADN.- Para la extracción del ADN de las hojas, se usó el método de Doyle y Doyle (1987), con pequeñas modificaciones. Cien miligramos (100 mg) de tejido de hojas jóvenes se trituraron con 1mL de buffer de extracción (2% CTAB, 1.5 M NaCl, 20mM EDTA pH 8.0, Tris 100 mM pH 8.0 y 2-mercaptoetanol 2%) recién preparado. Esta mezcla se incubó en baño de María a 65 °C durante 55 min con agitación cada 15 min para luego centrifugar a máxima velocidad por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se agregó igual volumen de una mezcla de cloroformo-isoamil alcohol mezclando por inversión varias veces. Se sometió a cen-

trifugación a 10.000 rpm durante 10 min para transferir la fase acuosa a otro tubo donde se añadió RNasa (10mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 30 min. Seguidamente, se agregó un volumen igual de isopropanol a -20 °C y se congeló para precipitar el ADN. A continuación se centrifugó nuevamente a 10.000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado con el ADN se lavó dos veces con 200 µL de etanol 70%. Se dejó secar completamente y se resuspendió en buffer TBE 1X (Tris/Borato/EDTA a pH 8,3).

Alícuotas de 5 µL se corrieron en geles de agarosa de 2% con SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen™, USA) en buffer TBE1X a 100V y 200 mA por 35 min y fotodocumentados con un Enduro™ GDS Touch (Labnet, USA).

Amplificación de ADN.- Para la amplificación se utilizaron las regiones codificantes de cloroplasto *rbcLa*-F (ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC) (Levin et al. 2003) y *rbcLa*-R (GTAAAATCAAGTCCACCRGC) (Kress & Erickson 2007) y regiones espaciadoras intergénicas *psbA3_f* (GTTATGCATGAACGTAATGCTC) (Sang et al. 1997) y *trnHf-05* (CGCGCATGGTGGATTACAAAATC) (Tate & Simpson 2003) sintetizados por Invitrogen™, siguiendo las recomendaciones del consorcio para código de barras de plantas (CBOL 2009). Se amplificó cada par de iniciadores por separado (*rbcLa* F-R y *psbA-trnH*). Las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 25 µL, usando 25 ng de ADN de cada muestra, 0.2 nM de cada primer, 0.1 nM de cada dNTP, 2.5 nM de MgCl₂ y 0.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen™) bajo las siguientes condiciones: un primer paso de desnaturalización a 94 °C por 4 min, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 50 s a tres diferentes Ta (48, 55 y 60 °C) y 1 min a 72 °C con una extensión final de 10 min a 72 °C. La amplificación del ADN, se llevó



Figura 2.- Plantas de *A. xanthorrhiza*. (A) plantas provenientes de Penipe (PP) (raíz amarilla) (B) plantas provenientes de Baños (B) (raíz blanca), respectivamente.

a cabo en un termociclador SimpliAmp (Applied Biosystems, CA, USA). Los productos de PCR para todos los iniciadores fueron resueltos en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1,0X, visualizados con SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen™) y registrados en un fotodocumentador Enduro GDS Touch (Labnet). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank (Tabla 3).

Secuenciación de ADN y análisis de datos.- Las reacciones de PCR fueron secuenciadas por la compañía MacroGen (USA) utilizando los primers *rbclA*-F y *psbA*-3. Las similitudes en las secuencias fueron comparadas usando BLASTn (Zhang et al. 2000) en el banco de genes disponible en el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Relaciones filogenéticas.- Las relaciones filogenéticas entre los materiales vegetales se analizaron por la alineación de secuencias en el programa ClustalW 2.0 (Larkin et al. 2007) para la construcción de árboles filogenéticos usando el programa MEGA 5.02 (Tamura et al. 2007) y los métodos de UPGMA (Sneath & Sokal 1973).

Resultados

Los amplicones obtenidos en las reacciones de amplificación con los dos pares de primers usados fueron de entre 576 a 1399 pb para el locus *rbcl* y entre 475 y 529 pb para el locus *psbA* (Tabla 2).

Taxonomía de germoplasmas de *A. xanthorrhiza*.- El análisis del locus *rbcl* identificó los cinco materiales de *A. xanthorrhiza* con entre 97 y 99% de homología, sin embargo, no hubo posibilidad de diferenciar a otras especies como *Donnellsmithia cordata* (97–99%), *Angelica acutiloba* (98%), *Zizia aurea* (98–99%) en los casos de QU, B, SJ y PP; mientras que el material de CH no mostró diferencia con las especies *Spermolepis echinata*; *Musineon divaricatum* y *Pteryxia terebinthina* (97%). La

secuencia de nucleótidos del espacio intergénico *psbA-trnH* identificó los cinco materiales de *A. xanthorrhiza* con entre 93 y 95% de homología, en este caso la diferenciación con las especies más cercanas se logró con identidades por debajo de hasta un 7% (Tabla 3).

Tabla 3. Similitud de materiales de *Arracacia xanthorrhiza* de diferentes localidades de Ecuador comparando los amplicones del locus *rbclA* y de la región intergénica *psbA-trnH* de otras especies de Apiaceae

Nombre de la muestra de <i>A. xanthorrhiza</i> (1)	Códigos de acceso en GeneBank (NCBI)	Nombre de la especie identificada	Porcentaje de similitud	Porcentaje de brecha genética (GAP)
<i>rbclA</i>				
QU	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	99	0
	U50225.1	<i>Donnellsmithia cordata</i>	99	0
	KX352468.1	<i>Angelica acutiloba</i>	98	0
	KT178117.1	<i>Zizia aurea</i>	99	0
B	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	99	0
	U50225.1	<i>Donnellsmithia cordata</i>	99	0
	KX352468.1	<i>Angelica acutiloba</i>	98	0
	KT178117.1	<i>Zizia aurea</i>	99	0
SJ	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	99	0
	U50225.1	<i>Donnellsmithia cordata</i>	99	0
	KX352468.1	<i>Angelica acutiloba</i>	98	0
	KT178117.1	<i>Zizia aurea</i>	99	0
PP	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	99	1
	U50225.1	<i>Donnellsmithia cordata</i>	97	0
	KX352468.1	<i>Angelica acutiloba</i>	98	1
	KT178117.1	<i>Zizia aurea</i>	98	1
CH	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	99	2
	KY627168.1	<i>Spermolepis echinata</i>	97	2
	MG223530.1	<i>Musineon divaricatum</i>	97	2
	MG222157.1	<i>Pteryxia terebinthina</i>	97	2
<i>psbA-trnH</i>				
QU	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	94	1
	KU530096.1	<i>Tauschia parishii</i>	89	5
	KX352468.1	<i>Angelica gigas</i>	89	6
	KT178117.1	<i>Peucedanum officinale</i>	89	5
B	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	95	0
	U50225.1	<i>Tauschia parishii</i>	88	5
	KX352468.1	<i>Angelica gigas</i>	88	6
	KT178117.1	<i>Peucedanum officinale</i>	88	5
SJ	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	94	1
	U50225.1	<i>Tauschia parishii</i>	88	5
	KX352468.1	<i>Angelica gigas</i>	87	6
	KT178117.1	<i>Peucedanum officinale</i>	88	5
PP	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	93	1
	U50225.1	<i>Angelica anomala</i>	87	7
	KX352468.1	<i>Glehnia littoralis</i>	88	7
	KT178117.1	<i>Tauschia parishii</i>	87	5
CH	KY117235.1	<i>Arracacia xanthorrhiza</i>	95	1
	KY627168.1	<i>Tauschia aparishii</i>	88	6
	MG223530.1	<i>Angelica gigas</i>	88	7
	MG222157.1	<i>Peucedanum officinale</i>	88	5

Tabla 2. Amplificaciones resultantes de los productos de PCR del ADN de los diferentes materiales vegetales estudiados

ADN y Primer amplificados	Longitud del segmento amplificado (pb)
SJ- <i>rbclA</i>	578
QU- <i>rbclA</i>	576
PP- <i>rbclA</i>	577
CH- <i>rbclA</i>	1399
B- <i>rbclA</i>	576
Promedio	741.2
SJ- <i>psbA-trnH</i>	529
Q- <i>psbA-trnH</i>	511
PP- <i>psbA-trnH</i>	477
CH- <i>psbA-trnH</i>	475
B- <i>psbA-trnH</i>	513
Promedio	501

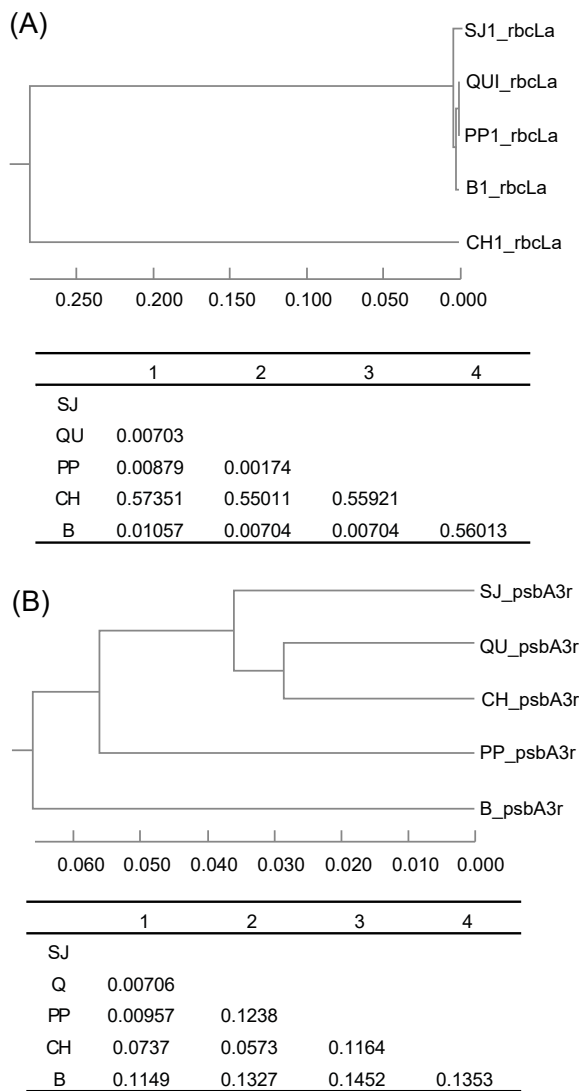


Figura 3. Árboles filogenéticos generados por el alineamiento de las secuencias del locus *rbcLa* (A) y de la región intergénica *psbA-trnH* (B) en *Arracacia xanthorrhiza*, usando los métodos MEGA X y UPGMA. Los árboles están dibujados a escala, se muestran igualmente las máximas distancias entre pares en la tabla inferior. Los materiales genéticos provienen de las provincias de San José de las Minas (SJ) (Prov. de Pichincha), Quillán (QU) y El Triunfo (B), Quinchicoto (CH) (Prov. de Tungurahua) y Penipe (PP) (Prov. de Chimborazo) de los Andes ecuatorianos.

Filogenia de germoplasmas de *Arracacia xanthorrhiza*. La alineación de secuencias del locus *rbcL* y de *psbA-trnH* (Figs. 3A-B) muestra la diversidad de los germoplasmas estudiados. En el primer caso se obtuvieron dos grupos, el primer grupo con SJ, QU, PP y B, observándose poca diversidad entre ellos, mientras que el segundo grupo está conformado por el material CH cultivado a 3260 m de altitud. En el segundo árbol, se demostró la divergencia entre los materiales colectados en diferentes provincias de la Sierra ecuatoriana, separándolos de acuerdo a su localidad, así como al color de la pulpa de la raíz.

Discusión

La secuencia nucleotídica de cloroplasto (*rbcL*) y la región intergénica (*psbA-trnH*) permitieron la identificación de materiales de zanahoria blanca colectadas en diferentes provincias de los Andes ecuatorianos identificándolas como *A. xanthorrhiza*, observándose un gap de 1% con el material de raíz amarilla (PP) y de 2% con uno de los materiales de raíz blanca, proveniente de una zona de sub-páramo (CH) y el cual mantiene consistentemente en las elevaciones más bajas, sus hojas de color verde oscuro y nervaduras y peciolo color púrpura (Quilapanta et al. 2018) Sin embargo, las secuencias *rbcL* no lograron discriminar estos materiales de otras especies de Apiaceae como *Donnellsmithia cordata* (U50225.1), *Angelica acutiloba* (KX352468.1), *Zizia aurea* (KT178117.1), *Spermolepis echinata* (KY627168.1), *Musineon divaricatum* (MG223530.1) y *Pteryxia terebinthina* (MG222157.1). Contrariamente, con el uso de *psbA-trnH*, se obtuvo un porcentaje de identidad entre nuestros materiales y la secuencia de *A. xanthorrhiza* (KY117235.1) depositada en el banco de genes más alto que aquel encontrado con otras especies de la misma familia: *Angelica gigas* (KX352468.1), *Angelica anomala* (U50225.1), *Glehnia littoralis* (KX352468.1), *Tauschia parishii* (KY627168.1) y *Peucedanum officinale* (MG222157.1). Concomitantemente, los valores del gap (conocido como una clara separación entre las distancias intraespecíficas promedio en relación a las distancias interespecíficas) entre las secuencias alcanzó hasta un 7%. La importancia del uso de marcadores moleculares en un grupo con divergencias recientes como es la familia Apiaceae ha sido señalada (Downie et al. 1998, 2015). Downie et al. (1998) pudieron separar tres tribus de Apioideae usando secuencias de regiones ITS y del intrón del gen de cloroplasto *rpoC1*. Los autores agruparon a los géneros de Mesoamérica, incluyendo *Arracacia* y *Donnellsmithia*, un grupo de géneros norteamericanos (p.e. *Zizia* y *Musineon*) y un tercer grupo de origen asiático (p.e. *Angelica*, *Peucedanum*) recalando que la diferenciación de especies de estos dos últimos géneros es extremadamente difícil debido a que ambos son grupos grandes y morfológicamente muy heterogéneos.

Downie y Jansen (2015) indicaron que la región *psbA-trnH* no arrojó diferencias notables en el análisis de genomas de plastidios completos de Apiales para identificar regiones no codificadoras altamente divergentes. Estos autores recalcaron que una región de plastidio que haya sido identificada como altamente variable para el análisis filogenético de un grupo, puede no serlo en otro. Liu et al. (2014) reportaron una eficiencia de 56% de identificación en especies de la familia Apiaceae con *psbA-trnH*, indicando que es mucho más alta que la obtenida con *rbcL* o *matK*, una de las regiones codificadoras del genoma de plastidio de más rápida evolución (Hollingsworth et al. 2011). Con relación a los datos obtenidos en la presente investigación, la secuencia de la región inter espaciadora *psbA-trnH* permitió analizar las relaciones entre los materiales de zanahoria blanca de la región central de Ecuador (475-529pb). Esta región no codificadora es altamente variable en las an-

giospermas, por lo que se ha propuesto como código de barra (Kress et al. 2005).

El análisis de la secuencia *psbA-trnH* de los cinco materiales de *A. xanthorrhiza* estudiados mostraron que existe variabilidad genética entre ellos, estos materiales se agruparon de manera correcta, por su distribución geográfica, así como por el color de la pulpa de su raíz.

En contraste con los resultados de la secuencia *psbA-trnH*, el gen *rbcl*, que codifica para la sub-unidad más grande de la enzima ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxadasa en los cloroplastos (Cuénoud et al. 2002) esta constatado que evoluciona lentamente, por lo cual se usa en estudios filogenéticos (Braukmann et al. 2017). El uso del gen *rbcl* en este estudio, no reportó divergencia entre los materiales de las diferentes localidades, agrupando a cuatro de los mismos y discriminando solo al material proveniente de Quinchicoto (CH), el cual crece a 3260 m, la zona más alta que se consiguió producción de este cultivo.

Las divergencias entre los materiales estudiados no está clara, el hecho que los cultivos de raíces y tubérculos andinos son propagados vegetativamente, incluyendo la zanahoria blanca, una característica única dentro de las Apiaceae (Knudsen et al. 2006), es posible que se haya adquirido alguna mutación que haga distinguibles a los materiales vegetales de este tipo. McKey et al. (2010) indicaron que un gran número de cultivos que son propagados clonalmente (vegetativamente) son mucho más diversos en términos ecológicos, morfológicos y filogenéticos que aquellos propagados por semillas, aunque esta variabilidad eventualmente pueda resultar erosiva. Morillo et al. (2004) reportaron 14 secuencias microsátelite polimórficas en accesiones de *A. xanthorrhiza*, de estas solo dos loci (AxD82 y AxD85) se desviaron significativamente mostrando un exceso en heterocigosis. Igualmente, estos autores atribuyeron el alto polimorfismo al hecho de que este cultivo se propaga asexualmente. Morillo y Sécond (2017) trabajaron con 27 materiales cultivados de zanahoria blanca que eran mantenidos en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Ecuador, usando AFLPs, con el objetivo de establecer la domesticación de este cultivo y uno de los resultados que obtuvieron indica que 42% de las bandas eran polimórficas entre los cultivares. El análisis de los polimorfismos, contribuyó a establecer dos grupos de *A. xanthorrhiza* cultivados, uno de los grupos se relacionó con una especie silvestre perenne (*A.x. var. andina*) mientras que el otro grupo estuvo más cerca de la especie silvestre monocárpica (*A.x.var. monocarpa*). Estos resultados confirman la alta diversidad que se obtuvo en nuestro estudio, cuando se usó el espaciador intergénico no codificante (*psbA-trnH*).

El uso de *psbA-trnH* como código de barra tiene sus detractores, las inversiones intraespecífica pueden conducir a una sobreestimación de la variabilidad intraespecífica y las inversiones interespecíficas pueden confundir las relaciones genéticas entre especies estrechamente relacionadas (Whitlock et al., 2010). Sin embargo, otros autores han hecho análisis filogenéticos

usando uno o más loci o combinándolo con espaciadores intergénicos (p.e. *rbcl+ matK+ psbA-trnH*) y no obtuvieron una diferencia significativa en el poder de identificación (Yang et al. 2012).

Hasta el presente, existen pocos estudios que permitan establecer correlaciones entre los diferentes análisis genéticos en *A. xanthorrhiza*, además que no existe un banco de germoplasmas donde estén identificados los materiales cultivados en Ecuador. Por lo que se requieren más investigaciones en este cultivo para su mejor aprovechamiento en programas de mejoramiento.

En conclusión, usando la región intergénica no codificadora (*psbA-trnH*), se logró identificar y obtener la diversidad genética de materiales cultivados de *A. xanthorrhiza*, provenientes de diversas zonas geográficas de la Sierra ecuatoriana, con características morfológicas distintas. Adicionalmente, esta secuencia pudo diferenciar a *A. xanthorrhiza* de otras especies de la familia Apiaceae, con lo cual se recomienda como código de barra.

Literatura citada

- Blas R., M. Ghislain, M. Herrera & J.P. Baudoin. 2008. Genetic diversity analysis of wild Arracacia species according to morphological and molecular markers. Genetic Resources and Crop Evolution 55:625-642. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-007-9269-7>
- Braukmann T.W.A., M.L. Kuzmina, J. Sills, E.V. Zakharov & P.D.N. Hebert. 2017. Testing the Efficacy of DNA Barcodes for Identifying the Vascular Plants of Canada. PLoS ONE. 12(1): e0169515. doi:10.1371/journal.pone.0169515
- Burgess K., A. Fazekas, P. Kesanakurti, S. Graham y col. 2011. Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcl+matK* DNA barcode. Methods in Ecology and Evolution 2:33-340. <http://dx.doi.org/doi:10.1111/j-2041-210X.2011.00092.x>.
- Camacho-Villa T.C., N. Maxted, M. Scholten & B. Ford-Lloyd. 2006. Defining and identifying crop landraces. Plant Genetic Resources 3(3): 373-384. <http://dx.doi.org/10.1079/PGR200591>
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS USA) 106(31): 12794-12797. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Chase M.W., Cowan R.S., Hollingsworth P.M., van den Berg C., Madriñán S., Petersen G., Seberg O., Jørgensen T., Cameron K.M., Carine M., Pedersen N., Hedderson T.A.J., Conrad F., Salazar G.A., Richardson J.E., Hollingsworth M.L., Barraclough T.G., Kelly L., Wilkinson M. 2007. A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. Taxon, 56 (2): 295-299. <https://doi.org/10.1002/tax.562004>
- Costion, C., A. Ford, H. Cross, H. Cryan, M. Harrington & A. Lowe y col. 2011. Plant DNA barcoding can accurately estimate species richness in poorly known floras. PLoS One. 6(11): e 26841. ; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026841>
- Cuénoud P., V. Savolainen, L.W. Chatrou, M. Powell, R.J. Grayer & M.W. Chase. 2002. Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcl*, *atpB*, and *matK* sequences. American Journal of Botany 89: 132-144. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.89.1.132>

- Downie S.R. & R.K. Jansen. 2015. A comparative analysis of whole plastid genomes from the Apiales: expansion and contraction of the inverted repeat, mitochondrial to plastid transfer of DNA, and identification of highly divergent noncoding regions. *Systematic Botany* 40(1): 336-351. <https://doi.org/10.1600/036364415X686620>
- Downie S.R., S. Ramanath, D.S. Katz-Downie & E. Llanas. 1998. Molecular systematics of Apiaceae Subfamily Apioideae: Phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer and Plastid RpoC1 Intron Sequences. *American Journal of Botany* 85(4): 563-591. <http://dx.doi.org/10.2307/2446441>
- Doyle J.J. & J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Galimberti A., F. De Mattia, A. Losa, I. Bruni, S. Federici, M. Casiraghi, S. Martellos & M. Labra. 2013. DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International* 50: 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.036>
- Guo X., X. Wang, W. Su, G. Zhang & R. Zhou. 2011. DNA barcodes for discriminating the medicinal plants *Scutellaria baicalensis* (Lamiaceae) and its adulterants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34(8):1198-1203. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.1198>
- Hollingsworth P.M., S.W. Graham & D.P. Little. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e19254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>
- Kane N., S. Sveinsson, H. Dempewolf, Y. Yang, D. Zhang, J.M. Engels & Q. Cronky col. 2012. Ultra-barcoding in cacao (*Theobroma* spp.) Malvaceae using whole chloroplast genomes and nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany* 99 (2): 320-329. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.1100570>
- Knudsen S.R., B. Orting & M. Sorensen. 2006. Multiplicación y conservación de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) y ajipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi), in: Moraes M., R.B. Øllgaard, L.P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev (Eds.), *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, pp. 483-508.
- Kress W.J. & D.L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding rbcL gene complements the noncoding trnH-psbA spacer region. *PLoS ONE*. 6: 508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- Kress W.J., K.J. Wurdack, E.A. Zimmer, L.A. Weigt & D.H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS USA)* 102: 8369-8374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>
- Larkin M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson & D.G. Higgins. 2007. Clustal W & Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23:2947-2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- León B., & C. Monsalve. 2006. Apiaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de Biología (Número especial)*. 13(2): 42-45. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v13i2.1799>
- Levin R.A., W.L. Wagner, P.C. Hoch, M. Nepokroeff, J.C. Pires, E.A. Zimmerly & K.J. Sytsma. 2003. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast rbcL and ndhF. *American Journal of Botany* 90: 107-115. <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.90.1.107>
- Liu J., J. Provan, L.M. Gao & D. Zhu Li. 2012. Sampling strategy and potential utility of indels for DNA barcoding of closely related plant species: A case study in *Taxus*. *The International Journal of Molecular Sciences (IJMS)* 13: 8740-8751. <http://dx.doi.org/doi:10.3390/ijms13078740>
- Liu J., L. Shi, J. Han, G. Li, H. Lu, J. Hou, X. Zhou, F. Meng & S.R. Downie. 2014. Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources* 14: 1231-1238. <http://dx.doi.org/10.1111/1755-0998.12262>
- McKey D., M. Elias, B. Pujol, A. Duputie. 2010. The evolutionary ecology of clonally propagated domesticated plants. *New Phytologist* 186: 318-332. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03210.x>
- Morillo E., G. Sécond, J.L. Pham & A.M. Risterucci. 2004. Development of DNA microsatellite markers in the Andean root crop arracacha: *Arracacia xanthorrhiza* Banc. (Apiaceae). *Molecular Ecology Notes* 4: 680-682. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00783.x>
- Morillo E. & G. Sècond. 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. <http://dx.doi.org/10.1017/S1479262116000046>
- National Center for Biotechnology Information (En línea). Basic Local Alignment Search Tool. Disponible en: (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Acceso: 14/06/2015.
- Newmaster S., M.Grguric, D. Shanmughanandhan, S. Ramalingam & S. Ragupathy. 2013. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Medicine*. 11:1-13. <http://dx.doi.org/doi:10.1186/1741-7015-11-222>
- Quilapanta R., M. Dávila, C. Vásquez & V. Frutos. 2018. Morfotipos de *Arracacia xanthorrhiza* Bancr. (zanahoria blanca) de Ecuador, como fuente de variabilidad del germoplasma. *Scientia Agropecuaria* 9(2): 281-286. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.02.13>
- Rosso C.A., Medina C.I. & M. Lobo. Morphologic characterization and agronomic evaluation of a Colombian collection of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) *FAO Biodiversity*. 132:22-29.
- Sang T., D.J. Crawford & T.F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136. <http://dx.doi.org/10.2307/2446155>
- Sneath P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tate J.A. & B.B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723-737. <http://dx.doi.org/10.1043/02-64.1>
- Valderrama M. & J. Seminario. 2002. Los parientes silvestres de la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) y su uso en medicina tradicional, en el norte peruano. *Arnaldoa*. 9: 67-91.

-
- Vivas C.V., R.C.S. Moraes, A. Alves-Araujo, M. Alves, E. Mariano-Neto, C. van Den Berg & F.A. Gaiotto. 2014. DNA barcoding in Atlantic Forest plants: What is the best marker for Sapotaceae species identification? *Genetics and Molecular Biology* 37(4): 662-670. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572014005000019>
- Whitlock B.A., A.M. Hale & P.A. Groff. 2010. Intraspecific inversions pose a challenge for the trnH-psbA plant DNA barcode. *PLoS ONE*. 5(7): e11533. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011533>
- Yang H.Q., Y.R. Dong, Z.J. Gu, N. Liang & J.B. Yang. 2012. A preliminary assessment of matK, rbcL and trnH-psbA as DNA barcodes for Calamus (Arecaceae) species in China with a note on ITS. *Annales Botanici Fennici* 49(5):319-330. <http://dx.doi.org/10.5735/085.049.0603>
- Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner & W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203-214. <http://dx.doi.org/10.1089/10665270050081478>

Agradecimientos:

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato, Dirección de Investigación y Desarrollo, por el apoyo financiero a través del proyecto 2443-CU-P-2015. A los Srs. Olga Ortiz de la Granja Agroecológica San Martín, Elvira Moposita, Ana Bonilla y José Aguirre por los materiales de zanahoria blanca suministrados.

Conflicto de intereses:

Los autores no incurrir en conflictos de intereses.

Rol de los autores:

MD, CV: Diseño del proyecto, análisis de datos y redacción del manuscrito, NP, VF: participaron en el trabajo de laboratorio y en el muestreo en campo, HL: Análisis de datos, OL: Participó en el muestreo en campo.

Fuentes de financiamiento:

Universidad Técnica de Ambato, Dirección de Investigación y Desarrollo, proyecto 2443-CU-P-2015

Aspectos éticos / legales:

Los autores declaran que en el presente trabajo no se trasgredió ninguna norma ética ni legal.