

Selección de marcadores microsatélites (SSR's) para el análisis de variabilidad genética en siete cultivares de arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*)

Madeleyne Parra Fuentes, Paula Quintero Munévar, Javier Hernández Fernández

Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Grupo de Investigación en Genética. Biología Molecular y Bioinformática – GENBIMOL y Grupo de investigación Desarrollo en Horticultura Sostenible, Centro de Bio-Sistemas. Autor para correspondencia: javier.hernandez@utadeo.edu.co

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 4 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, yucataná y amarilla de tarro.

Palabras claves: estandarización, marcadores moleculares, cultivares, PCR.

Editora: Pataquiva-Mateus, A.Y.

Citation: 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.

Received: August 28, 2015. **Accepted:** October 25, 2015. **Published online:** December 31, 2015.

Copyright: ©2015 Parra *et al.* This is an open-access article, which permits unrestricted use, distributions and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing Interests: The authors have no conflict of interest.

Microsatellite markers selection of genetic variability in seven cultivars arracacia (*Arracacia xanthorrhiza*)

ABSTRACT

Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft) is a reservantes Apiaceae with tuberous roots rich in starch fine and nutritious. Microsatellites (SSR) are DNA simple sequence motifs of 1-6 nucleotides repeated in tandem, have useful features to study the genetic



diversity of a population. In the municipality of Boyacá, Boyacá, farmers identified by phenotypic differences arracacha seven cultivars. This research seeks to identify and reproducible polymorphic loci in seven arracacha native cultivars from a set of 14 SSR loci's designed from Ecuadorian cultivars. DNA of each cultivar was amplified and each microsatellite locus was evaluated at different $MgCl_2$ concentrations and annealing temperatures. The amplifications were confirmed by electrophoresis of 2.5% agarose with ethidium bromide dye and were separated by electrophoresis 6, 10 and 12% polyacrylamide gels stained with silver nitrate. The standardization for each locus was reduced nonspecific bands in 80% showed an optimal resolution of the bands on 12% polyacrylamide. Polymorphic fragment were observed in nine loci, four fragment were monomorphic and one polymorphic loci locus with excess nonspecific bands was detected. Paliverde, palirrusia, palinegra, egg yolk, white jar, yucatan and yellow jar: the use of nine microsatellite loci in the analysis of the genetic variability of cultivars arracacha was confirmed.

Keywords: standardization, molecular markers, cultivars, PCR.

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 (Idarra, Tocora, Camacho & 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 región 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, palirrusia o palimorada, palinegra, yema de huevo o cartagenera, blanca de tarro, amarilla de tarro y yucatan (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).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Los cultivares utilizados en este análisis fueron: paliverde (PV), palirrusia o palimorada (PR), palinegra (PN), yema de huevo o cartagenera (YH), blanca de tarro (BT), amarilla de tarro (AT) y yucatan (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.

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 µg/ml) 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.).

Amplificación por PCR de ADN - 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 μ L. La mezcla de reacción incluyó 1X Tampon de PCR, 0.2 mM de dNTP's, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.3 μ M 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 $^{\circ}C$ y se evaluó la concentración de $MgCl_2$ entre 1.4 a 2.5 mM con cada uno de los cebadores hasta determinar las condiciones óptimas para la amplificación. El programa de la PCR incluyó una denaturación inicial de 1 min a 94 $^{\circ}C$, seguida de 30 ciclos de 60 s a 94 $^{\circ}C$, 60 s a la temperatura de anillamiento de cada cebador (tabla 1) y 60 s de extensión a 72 $^{\circ}C$, finalizando con una extensión final de 72 $^{\circ}C$ por 7 min.

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

Locus (Accesión GenBank)	Secuencia oligonucleótidos (5'-3')	Motivo	T. Anillamiento ($^{\circ}C$)
AxC27 AY530811	F: AAGTTCGTATTGTGCTGCTGTAT R: ATTGTGGCGTGATGTGAAAAG	(GT) ₈	58
AxC38 AY530812	F: TAAAGCCTATAAACATCAAAA R: ACCCTCTCCCATCATAAC	(GT) ₈	48
AxC85 AY530813	F: TTGGGACTGGAACCTTTGT R: GTGTGCGTGATGTAATAAT	(GT) ₈ N ₁₂ (GT) ₁₀	58
AxD34 AY530814	F: AAGCTACGGATATTTACTACAT R: AGCGGGTCTGATTTGAG	(GA) ₁₃	50
AxD43 AY530815	F: AATGGTGGTGTAGGTTTGAAG R: AATTGTTATCTGAGTGC GTTGGTA	(CA) ₁₅	58
AxD72 AY530816	F: GATACCAATAGGCGAAAGGAG R: AGGGGTGGAGTAGCAATGTT	(TA) ₆ (GT) ₈	58
AxD82 AY530817	F: TGGAGAGGCTAATGCAAAATACT R: ATAAGCAGAACGCAAAACGACAT	(GT) ₁ 2(GA) ₁₁	58
AxD85 AY530818	F: TGCACGCATTGTAGA ACT R: CAAATGGACGTGGTATGT	(GA) ₈	48
AxD13 AY675515	F: AACTTTGAACATGGTCTATTACTT R: TGATGCCACGACAAAAGATA	(CA) ₈	48
AxD55 AY675514	F: AACCCGACTGAAATCCCAAAT R: GCAAAAAGACCGACAATCAA	(GT) ₈	54
AxC64 AY530819	F: GAAATGATCTGCAACTGGAT R: TCCCATCCTTCTTACATAT	(CT) ₂₀	48
AxC87 AY530820	F: CTCGCAGATCATCTCATAAAGT R: TTAACCTGCAAAGGAGCAC	(CT) ₁₃	58
AxC8 AY675512	F: GATCATTTGCAAGGTA ACTCTC R: AGTCACCTTATGAAATGTTCTGTA	(CT) ₁₂	58
AxC29 AY675513	F: GCCCAATAGCCACAAG R: TCCCATCCTTCTTACATAT	(CT) ₁₃ (TA) ₇	58

Los productos de la PCR se mezclaron con 5 μ l de buffer de carga (30 % glicerol y 0,05 % azul de bromofenol p/v) y luego se verificaron 10 μ l del producto en electroforesis de agarosa al 2.5% teñida con bromuro de etidio (2 μ g/ml) en TBE 0.5X.

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.).

RESULTADOS

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).

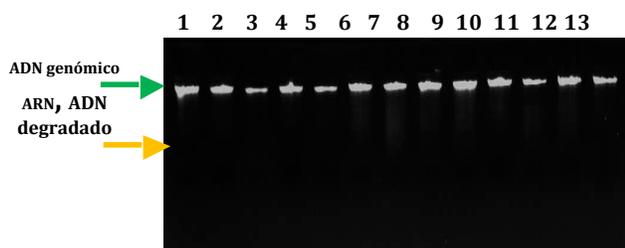


Figura 1. Electroforesis de ADN genómico de arracacha. Carriles 1 – 5: Paliverde, Carriles 6 – 7: Yema de Huevo, Carriles 8 – 9: Palinegra y Carriles 10 – 13: Individuos de Blanca de Tarro. Electroforesis en agarosa al 1%, teñida con bromuro de etidio.

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).

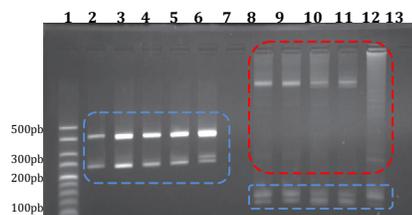


Figura 2. Amplificación de los marcadores AxD55 (Carril 2-7) y AxC87 (Carril 8-13). Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 8: PV, Carril 9: YH, Carril 10: PN, Carril 11: BT y Carril 12: PR. Carriles 13 y 7: Control negativo. Recuadro rojo: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

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).

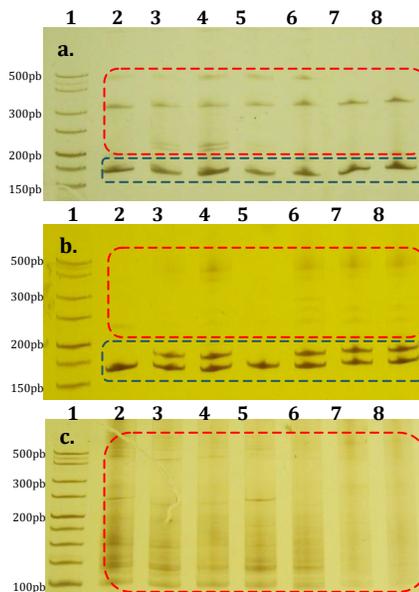


Figura 3. Loci amplificados según los parámetros reportados por Morillo *et al.* (2004) a. Loci AxD13, b. Loci AxD85 y c. Loci AxC87. Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 7: AT y Carril 8: YT. Recuadro rojo: Bandas inespecíficas y recuadro azul: Bandas específicas. Electroforesis en agarosa al 2.5%, teñida con bromuro de etidio.

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).

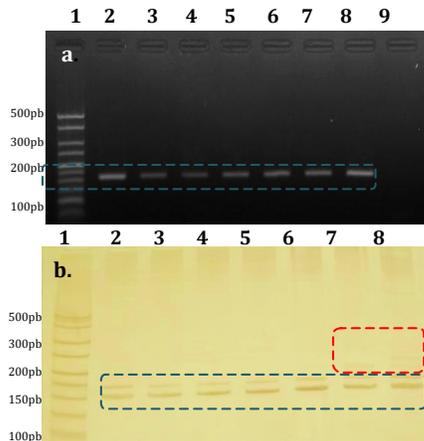


Figura 4. Observación de alelos en el Locus *AxD72*. a. En gel de agarosa 2.5%. b. En gel de poliacrilamida 12%. Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 7: AT y Carril 8: YT. Carril 9: Control negativo. Recuadro rojo: Bandas inespecíficas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

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

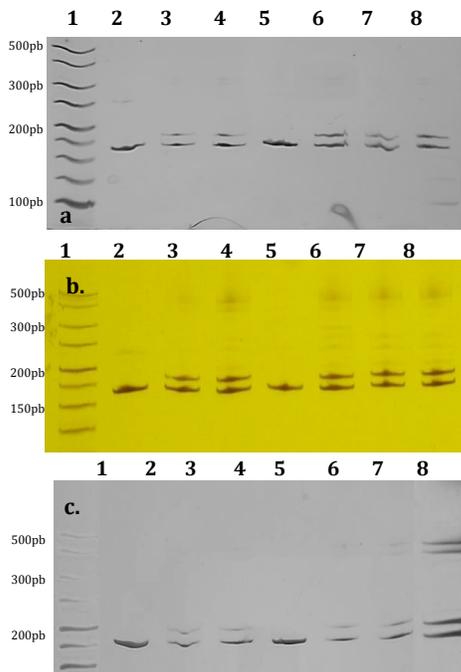


Figura 5. Revelado del locus *AxD85* en poliacrilamida. a. Gel de poliacrilamida al 8 %, b. Gel de poliacrilamida al 10 % y c. Gel de poliacrilamida al 12 %. Carril 1: Hyperladder V, Carril 2: PV, Carril 3: YH, Carril 4: PN, Carril 5: BT, Carril 6: PR, Carril 7: AT y Carril 8: YT.

Estandarización de PCR: temperatura de anillamiento y cloruro de magnesio. 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.

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

Locus	Tm (°C)	Temperatura anillamiento Morillo <i>et al.</i> (2004)	Estandarización	
			MgCl ₂ (mM)	Temperatura anillamiento (°C)
<i>AxC27</i>	54.7 56.3	58	1.5	58
<i>AxC38</i>	50.6 45.1	48	2	48
<i>AxC8</i>	51.9 49.7	58	ND	ND
<i>AxD34</i>	48.7 51.8	50	1.8	51
<i>AxD43</i>	52.9 54.6	58	1.8	58
<i>AxD85</i>	51.9 49.7	48	1.5	48
<i>AxC64</i>	50.5 46.9	48	1.5	50
<i>AxD55</i>	55.0 54.8	54	1.5	57
<i>AxC85</i>	51.2 47.7	58	1.8	58
<i>AxC87</i>	52.2 53.0	58	1.8	59
<i>AxC29</i>	53.6 51.3	58	1.8	58
<i>AxD72</i>	52.8 56.2	58	2	58
<i>AxD82</i>	54.2 55.6	58	2	57
<i>AxD13</i>	50.4 53.9	48	2	48

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.

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 10 y 20 % de las bandas específicas, 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.

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*.

CONCLUSIONES

La selección de los loci polimórficos: **AxC27**, **AxC29**, **AxC64**, **AxC85**, **AxC87**, **AxD34**, **AxD43**, **AxD55** y **AxD85** permitirán analizar la variabilidad genética en siete cultivares de arracacha provenientes del municipio de Boyacá, Boyacá.

Las condiciones de amplificación varían para cada uno de los pares de oligonucleótidos reportado 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: ahípa, 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.