

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE  
*Heliconias* spp. CON MARCADORES MOLECULARES RAMs.**

**ESTUDIANTE**

**ARIEL ENRIQUE GUATEQUE CARRILLO**

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES  
ESCUELA DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGRICOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA  
VILLAVICENCIO – META  
2020**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS DE  
*Heliconias* spp. CON MARCADORES MOLECULARES RAMs.**

**ESTUDIANTE**

**ARIEL ENRIQUE GUATEQUE CARRILLO**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PARA  
OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRONOMO**

**DIRECTOR**

***Nydia Carmen Carrillo***  
***Ingeniero agrónomo***

**CODIRECTOR**

***Christian Camilo Castañeda Cardona***  
***Ingeniero agrónomo***

**UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**  
**ESCUELA DE DE INGENIERIA EN CIENCIAS AGRICOLAS**  
**PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA**  
**VILLAVICENCIO – META**  
**2020**



**NOTA DE ACEPTACION**

---

---

---

---

---

***Diana Marcela Pirabán Villarreal***  
***Ing. Agronomo***  
***FIRMA DE JURADO***

***Zayda Julieth Polanco Falla***  
***Ing. Agronomo***  
***FIRMA DE JURADO***

**AGRADECIMIENTOS**



A la comunidad educativa y a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales (FCAYRN), por dar el mayor empeño en brindar las herramientas para un mejor desarrollo de nuestros conocimientos; A los docentes que aportaron en cada materia impartida y en cada proceso de formación académico, brindando y transfiriendo sus conocimientos de manera objetiva, a fin de formar profesionales éticos e íntegros en las ciencias agrarias.

Especial agradecimiento a la Dra. Yacenia Morillo Coronado y al Ingeniero Agrónomo Christian Camilo Castañeda Cardona por brindar sus conocimientos y su profesionalismo en pro del desarrollo de esta investigación.

## Contenido

Resumen .....	9
Abstract.....	10
Introducción .....	11
Objetivos.....	13
General .....	13
Específicos.....	13
Marco teórico .....	14
El género <i>Heliconia</i> en Colombia.....	14
Especies comerciales de Heliconias del departamento de la Meta.....	15
<i>Heliconia bihai</i> L.....	15
<i>Heliconia caribaea</i> .....	15



Heliconia latispatha.....	16
Heliconia orthotricha .....	17
Heliconia rostrata.....	18
Análisis genéticos en el género <i>Heliconia</i> .....	19
Marcadores moleculares RAMs.....	19
Análisis genéticos con marcadores RAMs en especies cultivables.....	20
Materiales y métodos.....	21
Material vegetal.....	21
Extracción de ADN.....	23
Amplificación de ADN .....	23
Preparación básica de Primers .....	24
Primers CAG y GT .....	25
Primers CT, TG y ACA.....	25
Análisis estadístico .....	26
Resultados.....	28
Discusión .....	32
Conclusiones .....	34
Referencias.....	35
Anexos.....	41
Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN mediante Kit Power Soil.....	41





## Lista de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Colecta de Material Vegetal .....	21
<b>Tabla 2.</b> Organización de las muestras.....	22
<b>Tabla 3.</b> Cebadores RAMs seleccionados. ....	23
<b>Tabla 4.</b> Coctel de preparación básico de primers. ....	24
<b>Tabla 5.</b> Variación del coctel de preparación básico para los primer CAG y GT. ....	25
<b>Tabla 6.</b> Variación del coctel de preparación básico para los primers CT, TG y ACA .....	25
<b>Tabla 7.</b> Resultados de la amplificación por PCR para la visualización de bandas con primers RAMs.....	28
<b>Tabla 8.</b> Valores de distancia genética insesgada de Nei. ....	29
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza molecular para las especies de Heliconias. ....	31



## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>Heliconia bihai</i> L.....	15
<b>Figura 2.</b> <i>Heliconia caribaea</i> .....	16
<b>Figura 3.</b> <i>Heliconia latispatha</i> .....	17
<b>Figura 4.</b> <i>Heliconia orthotricha</i> .....	18
<b>Figura 5.</b> <i>Heliconia rostrata</i> .....	18
<b>Figura 6.</b> Dendrograma de similitud genética con el método de agrupación UPGMA.....	29
<b>Figura 7.</b> Dendrograma de similitud genética a nivel de individuos, construido con el método de agrupación UPGMA a partir de la distancia de Nei y Li.....	30



## Resumen

La *Heliconia* es una planta perenne, de 70 cm a 10 m de altura, las brácteas son los órganos más llamativos de la familia de las *Heliconiaceae*. En Colombia se encuentran distribuidas en la Cordillera de los Andes, el Valle del Atrato, la Sierra de la Magdalena y los Andes Orientales. Hoy, se exportan alrededor de 24,000 a 30,000 flores cada año. Los países receptores de estas exportaciones son Estados Unidos, Canadá, Holanda y Alemania.

El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización molecular de 5 especies de Heliconias de importancia comercial (*H. bihai* L., *H. caribaea*, *H. latispatha*, *H. orthotricha* y *H. rostrata*) para futuros proyectos de mejoramiento de cultivos, a partir de marcadores RAMs (Random Amplified Microsatellites). Los marcadores RAMs fueron eficientes amplificando regiones polimórficas en las Heliconias, a partir de una matriz presencia ausencia se calculó la distancia de Nei y se generaron 5 agrupaciones en un dendrograma con el método UPGMA. Se determinó una heterocigosidad insesgada de toda la muestra con un valor de 0.39, el porcentaje de loci polimórfico fue de 97.36%, el índice de fijación fue de 0.49. El análisis de varianza molecular AMOVA permitió observar un porcentaje de variabilidad genética de 45% entre poblaciones, mientras que dentro de las poblaciones el porcentaje fue de 55%. Aunque la diversidad genética fue alta para las muestras de Heliconias tratadas, es importante generar estrategias que permitan aumentar el flujo de genes entre individuos, aumentando la variabilidad genética a nivel intraespecífico para el aprovechamiento de recursos genéticos en futuros proyectos.



## Abstract

The *Heliconia* is a perennial plant, from 70 cm to 10 m high, the bracts are the most striking organs of the *Heliconiaceae* family. In Colombia they are distributed in the Andes Mountains, the Atrato Valley, the Sierra de la Magdalena and the Eastern Andes. Today, around 24,000 to 30,000 flowers are exported each year. The recipient countries of these exports are the United States, Canada, Holland and Germany.

The objective of this work was to perform the molecular characterization of 5 commercially important species of *Heliconia* (*H. bihai* L., *H. caribaea*, *H. latispatha*, *H. orthotricha* and *H. rostrata*) for future crop improvement projects, based on RAMs (Random Amplified Microsatellites) markers. The RAMs markers were efficient in amplifying polymorphic regions in Heliconias, from a presence-absence matrix, the Nei distance was calculated and 5 clusters were generated in a dendrogram with the UPGMA method. An unbiased heterozygosity of the whole sample was determined with a value of 0.39, the percentage of polymorphic loci was 97.36%, and the fixation index was 0.49. The AMOVA molecular variance analysis allowed observing a percentage of genetic variability of 45% between populations, while within populations the percentage was 55%. Although genetic diversity was high for the treated Heliconias samples, it is important to generate strategies to increase gene flow between individuals, increasing genetic variability at the intraspecific level to take advantage of genetic resources in future projects.



## Introducción

Colombia es el segundo exportador de flores a nivel mundial con una participación de aproximadamente el 16% en el mercado global de flores de exportación (Morán Poveda, 2021), en este contexto y teniendo en cuenta la gran biodiversidad presente en el país, uno de los grupos de plantas con un alto potencial de exportación son las pertenecientes al género *Heliconia* (Orozco & Chavarro, 2005) debido a la forma de sus floraciones y sus colores es considerada una planta exótica tropical atractiva tanto en el mercado interno como en el internacional (Jácome-Chacón et al., 2018), por lo que su cultivo se ha convertido en un importante factor económico a tener en cuenta dentro de la actividad agrícola.

Sin embargo, la falta de estudios, conocimientos técnicos y científicos sobre el cultivo de las Heliconias y las poblaciones silvestres, dificultan la productividad a gran escala y ponen en riesgo poblaciones e individuos silvestres que son extraídos de forma indebida. Frente a esto, surge la necesidad de adelantar estudios de conservación, exploración y análisis de poblaciones mediante herramientas biotecnológicas de especies cultivadas y silvestres de *Heliconia* y especies relacionadas en la región de los Llanos Orientales, en la cual no se han reportado datos de áreas plantadas y aún los mismos datos de especies, no existen de forma consolidada.

Se han registrado pocos estudios especialmente a nivel nacional que incluyan técnicas biotecnológicas y moleculares para caracterizar, seleccionar, y analizar el material generado por métodos convencionales y/o cultivo in vitro, lo que incide de una u otra forma en una certificación parcial de la calidad de las flores requeridas por los mercados internacionales.

Los marcadores moleculares han demostrado ser una herramienta robusta a la hora de estudiar la genética poblacional de animales plantas y demás organismos (Scherf & Pilling, 2015). Entre los diferentes tipos de marcadores moleculares, los marcadores RAMs (Random Amplified Microsatellites) disponen de ciertas propiedades que son ideales para el estudio de plantas de interés comercial, tales como mostrar la variabilidad de los individuos dentro de una población, establecer agrupaciones de estos individuos en relación a la población, la especie, el



espacio geográfico, las relaciones filogenéticas entre otras y además, facilitar los costos y metodologías de laboratorio (Flores et al., 2008).

El objetivo de este trabajo de investigación es caracterizar mediante marcadores moleculares RAMs, genotipos cultivados y silvestres de 5 especies de Heliconias, (*H. orthotricha*, *H. caribaea*, *H. bihai*, *H. rostrata* y *H. latspatha*) con alto potencial comercial, colectadas en el departamento del Meta. La caracterización de los genotipos permite evaluar la diversidad genética de los grupos e individuos, información que a futuro puede ser el punto de partida dentro de programas de búsqueda, incorporación y mejoramiento genético de la especie y producción de individuos elite para las actividades agrícolas.



## Objetivos

### General

Caracterizar especies cultivadas y silvestres del género *Heliconia* con marcadores RAMs.

### Específicos

- Evaluar la diversidad genética con marcadores moleculares de especies del género *Heliconiaceae* para su futura conservación y utilización.
- Establecer diferencias genéticas entre especies cultivadas y silvestres del género *Heliconia* la región de la Orinoquía.



## Marco teórico

### El género *Heliconia* en Colombia

Las plantas del género *Heliconia* pertenecen al orden botánico de los Zingiberales y son el único género en la familia *Heliconiaceae*. Se caracterizan por su hábito de crecimiento herbáceo, tienen un pseudotallo constituido por la yuxtaposición de los pecíolos o de las láminas de las hojas, además, sus inflorescencias son resguardadas por brácteas grandes y coloridas (Kress et al., 1999). Colombia es considerado el país con mayor diversidad de plantas del género *Heliconia*, registrando un aproximado de 97 especies, de las cuales 52 son consideradas endémicas (Sosa Rodríguez, 2013). La mayor parte de las especies está en la región Andina (75%), regiones pacífica y amazónica (31% y 23% del total de las especies), región Caribe y Orinoquia (14% y 11% del total de las especies) (Betancur & Kress, 2007).

Los mercados internacionales tienen una gran demanda de plantas ornamentales tropicales, entre las que se incluyen las Heliconias, consideradas como plantas exóticas (Berry & Kress, 1991; Kress et al., 1999). La demanda de este tipo de plantas ornamentales se ha incrementado notablemente a nivel local e internacional, siendo un cultivo que se ha convertido en un factor de importancia en la economía agrícola de muchos países. Las características estéticas y morfológicas de las Heliconias las hacen propicias para el ornato de parques y jardines, como flores de corte, así como cultivos con miras a la producción de semillas certificadas con fines de exportación (Clay & Hubbard, 1987).

Colombia ocupa el segundo lugar como exportador mundial por la calidad de estas, sus exportaciones son del 16% después de Holanda, país que exporta el 50% (Morán Poveda, 2021). Dentro de estas, las flores tropicales presentan algunas ventajas como su aspecto exótico, belleza, mayor durabilidad postcosecha y buena aceptación en el mercado.

Muchas variedades de Heliconias han sido comercializadas como flor de corte durante los últimos 20 años. Entre ellas se encuentran *H. wagneriana*, *H. bihai*, *H. stricta*, *H. orthotricha*, *H. caribaea*, *H. psittacorum*, *H. rostrata*; *H. chartacea*, *H. platystachys* (Díaz et al., 2002). El país con mayor demanda de plantas exóticas tropicales es Estados Unidos con una marcada compra proveniente de los sectores hoteleros, quienes compran semanalmente arreglos de



flores tropicales que oscilan entre los US \$150 y los US \$ 1000. Sin embargo, más del 80% de floristerías estadounidenses no compran flores tropicales colombianas principalmente por sus altos costos en fletes, comprando productos costarricenses (Sosa Rodríguez, 2013).

### **Especies comerciales de Heliconias del departamento de la Meta**

Para este estudio se seleccionaron 5 especies de Heliconias presentes en el departamento del Meta y de importancia comercial, a continuación, una breve descripción de cada una de ellas.

#### **Heliconia bihai L.**

Planta rizomatosa de 1 a 6 metros de altura, inflorescencias en espiga con brácteas de color naranja a amarillo y rojo, 7 a 11 inflorescencias, hojas grandes en forma de óvalo y obtusas en su base, principalmente de uso ornamental, originaria de Suramérica (Kress et al., 1999).

**Figura 1.** *Heliconia bihai L*



*Nota.* Foto de Rolf Engstrand.

#### **Heliconia caribaea**

Planta herbácea perenne con hojas alternas, simples ovaladas y coriáceas que nacen de largos



pecíolos que surgen directamente del suelo, alcanza de 3 a 4 metros de altura, inflorescencias en racimos con brácteas de color escarlata o amarillo de 15 a 20 cm de largo (Gilman & Meerow, 2015).

**Figura 2.** *Heliconia caribaea*.



*Nota.* Foto por timurka.

### **Heliconia latispatha**

Planta de 1 a 2.5 metros de altura, pseudotallo formado por las vainas imbricadas de las hojas y con rizomas subterráneos, hojas simples, envainadoras, inflorescencia es compuesta, terminal, racemosa, erecta, brácteas de las inflorescencias en espiral, de colores rojos, amarillos o anaranjados, miden entre 15 y 18 cm de largo, flor es tubular, con el cáliz y corola no diferenciados, especie ornamental que se puede encontrar desde México hasta Ecuador (Betancur, 2007).



**Figura 3.** *Heliconia latispatha*



*Nota.* Foto de Liu Idárraga Orozco.

### **Heliconia orthotricha**

Planta herbácea de una altura de 2.5 a 3.5 metros de altura, hojas con peciolo largo, raquis recto a débilmente flexuoso, amarillo a rojo, inflorescencias erectas largas, espatas dísticas, 5-10 por inflorescencia, sobrelapadas, rojas a rosadas, algunas veces amarillas, flores blancas a crema hacia la base y verdes hacia el ápice, glabras a densamente pubescentes a lo largo de las márgenes de los sépalos, y parabólicas a sigmoides, presentes en Ecuador, Colombia y Perú (Kress et al., 1999).



**Figura 4.** *Heliconia orthotricha*.



*Nota. Foto de José León.*

### **Heliconia rostrata**

Planta herbácea de raíz rizomatosa, caracterizada por sus flores que crecen hacia abajo a diferencia de muchas especies de su género, hojas con pecíolo largo e inflorescencia pendular, hasta de 70 cm de largo. Raquis flexuoso, rojo, inflorescencias rojas con márgenes y ápices amarillo-verdosos, flores blancas hacia la base y amarillo-verdosas hacia el ápice, glabras, y rectas, se encuentra en Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Kress et al., 1999).

**Figura 5.** *Heliconia rostrata*.





Nota. Foto de Rubén, Tomado de Flor de Planta.

### **Análisis genéticos en el género *Heliconia***

Se han realizado diversos estudios en diversidad, filogenética y caracterización de Heliconias, los cuales involucran marcadores moleculares, entre estos se destacan los estudios de Kumar et al., (1998) quienes desarrollaron un método específico de extracción de ADN para Heliconias y realizaron un análisis de diversidad y similitud entre especies cultivables con marcadores moleculares RAPD. Côrtes et al., (2009) evaluaron 10 microsatélites para la especie *H. acuminata* para 61 individuos, concluyendo que los altos niveles de polimorfismos de los individuos permiten dar un mayor entendimiento respecto a la estructura genética espacial y al parentesco de la especie teniendo en cuenta problemáticas como la fragmentación de hábitat.

En cuanto a los estudios realizados en Colombia a nivel local, podemos mencionar a Marulanda et al., (2008) quienes realizaron estudios de diversidad genética a especies cultivables de Heliconias del centro occidente de Colombia, con marcadores moleculares microsatélites (SSRs) demostrando la utilidad de 16 loci para la diferenciación de cultivares de diferentes especies. Ramos Guimaraes et al., (2012) ejecutaron un estudio de diversidad genética en cultivares e híbridos interespecíficos de *H. psittacorum* utilizando regiones de ADN nuclear (ITS1-ITS4; 38 ITS5-ITS4; ITS1-ITS2; ITS5-ITS2; ITS3-ITS4, EF11-EF22) y de cloroplasto: (rps3'-rps5', trnL-trnF; trnS-trnF y trnS-trnL). Además, otro estudio de diversidad genética en Heliconias realizado en el país fue el de Isaza et al., (2012) quienes determinaron a partir de marcadores moleculares AFLPs una aproximación filogenética de siete especies de Heliconias, igualmente de encontrar 67 genotipos diferentes. En documentos más recientes, Marulanda et al., (2018) Confirma la transferibilidad de los microsatélites como una herramienta útil en la caracterización varietal de diferentes especies del género *Heliconia*.

### **Marcadores moleculares RAMs**

Los marcadores moleculares RAMs (Random Amplified Microsatellites por sus siglas en inglés) son diseñados específicamente para medir la diversidad genética en plantas y animales, propuestos por Hantula et al., (1996) consisten en marcadores moleculares con primers de



secuencias arbitrarias con un tamaño de 18 bases que incluyen un extremo 5' de tres nucleótidos, el cual asegura la unión del primer al inicio del microsatélite (Flores et al., 2008). Se ha demostrado la utilidad de los RAMs para medir la diversidad genética en plantas, diferenciar entre familias, entre especies he incluso a nivel intraespecífico (Muñoz et al., 2008).

### **Análisis genéticos con marcadores RAMs en especies cultivables**

Por sus beneficios los marcadores moleculares RAMs, han sido aprovechados especialmente para el estudio de diversidad genética y filogenética de especies de plantas cultivables o de importancia comercial. Hernández & Contreras et al., (2021) realizaron la caracterización genética con marcadores RAMs de 5 poblaciones de *Calycolpus moritzianus* (especie maderable y de importancia en la producción de cosméticos) en el departamento de Norte de Santander en Colombia, como resultado se encontró que de las poblaciones evaluadas se generaron dos agrupaciones, demostrando una mayor distancia genética en los individuos de una de las 5 localidades. Coronado et al., (2018) usaron marcadores RAMs con el fin de identificar poblaciones de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en 6 localidades de Boyacá (Colombia) y seleccionar genotipos con variabilidad a nivel intraespecífico para su conservación, aprovechamiento y mejoramiento para cultivos de alta calidad.

Flores et al., (2008) realizaron una revisión de sobre estudios de diversidad genética en plantas de importancia económica con marcadores moleculares RAMs, en la cual se destaca la importancia de estos estudios para el mejoramiento genético de especies cultivables como lo son la uchuva (*Physalis peruviana*), mora (*Rubus spp*), guayaba (*Psidium guajava*) y Heliconias (*Heliconia spp*). En esta revisión se mencionó el trabajo realizado por Cobo (2004) quien realizó una corroboración de la clasificación de género y subgénero en *Heliconia* a partir de caracteres morfológicos y la utilización de marcadores RAMs, ratificando la propuesta de clasificación de Kress (1999), identificar subespecies de *H. latispatha* y calcular la variación intraespecífica de diferentes especies.



## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se realizó la colecta de la parte foliar de la planta, tomando la segunda o tercera hoja, teniendo en cuenta que el tejido se encontrara en el mejor estado fitosanitario. En total se colectaron 80 muestras de Heliconias entre materiales cultivados y silvestres pertenecientes a *H. rostrata*, *H. latispatha*, *H. orthotricha cv. Tricolor*, *Heliconia bihai (L.) cv. Lobster* y *H. caribaea cv. Purpurea*. La colecta se realizó en los municipios de Granada y en las veredas El Cairo y Santa Rosa perteneciente al municipio de Villavicencio del Departamento del Meta, El número de muestras colectadas en cada finca dependió de la disponibilidad de material vegetal, en total se colectaron 16 muestras por especie (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Colecta de Material Vegetal.

<b>Especie</b>	<b>Lugar de la colecta</b>	<b>Número de muestras</b>	<b>Número total de muestras</b>
<i>H. rostrata</i>	Granada	16	16
<i>H. latispatha</i>	Granada	16	16
<i>H. orthotricha cv. Tricolor</i>	Santa Rosa	8	16
	Cairo finca La Esperanza	3	
	Vereda El Cairo	5	
<i>Heliconia bihai cv. Lobster</i>	Santa Rosa	16	16
<i>H. caribaea cv. Purpurea</i>	Santa Rosa	16	16

Nota. Guateque, A; 2021.



Se maceraron las 80 muestras del material vegetal colectado con el uso de nitrógeno líquido, se siguieron los siguientes pasos para evitar contaminación cruzada de las muestras.

1. Se desinfectan los materiales del laboratorio que se van a utilizar con alcohol al 70% (mortero, pistilo y espátula).
2. Se desinfecta el tejido a macerar con alcohol 70% y limpiando con toallas absorbentes.
3. Se corta el tejido en trozos pequeños para obtener un resultado más rápido
4. Se aplica nitrógeno líquido y se procede a macerar la muestra
5. Una vez la muestra quede como “polvillo” se guarda en tubos Eppendorf, uno completo que será el backup y otro tubo a la mitad que será usado para realizar la extracción.

Este proceso se repite para cada muestra, una vez terminado se almacenan las muestras en refrigeración a una temperatura de 4°C, para luego llevar a cabo la extracción de ADN. Es importante mencionar la organización de las muestras para tener claridad de los resultados obtenidos. Como se mencionó anteriormente se colectaron 16 muestras de cada especie, las cuales se enumeraron de la siguiente manera para obtener un total de 80 muestras (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Organización de las muestras.

<b>Especie</b>	<b>Numeración de las muestras</b>
<i>H. bihai</i> cv. <i>Lobster</i>	1 a 16
<i>H. caribaea</i> cv. <i>Purpurea</i>	17 a 32
<i>H. orthotricha</i> cv. <i>Tricolor</i> (El Cairo finca La Esperanza)	33 a 35
<i>H. orthotricha</i> cv. <i>Tricolor</i> (Santa Rosa)	36 a 43
<i>H. orthotricha</i> cv. <i>Tricolor</i> (El Cairo)	44 a 48
<i>H. rostrata</i>	49 a 64
<i>H. latispatha</i>	65 a 80

Nota. Guateque, A; 2021.



## Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó para cada una de las muestras, para ello fue necesario utilizar el kit de extracción Power Soil, cuyo protocolo se puede apreciar en el **Anexo 1**.

El ADN extraído se refrigeró a una temperatura de -20°C para su conservación.

## Amplificación de ADN

Para determinar la diversidad genética de las Heliconias muestreadas se eligieron los cebadores sintetizados por Technologies Inc. reportados como polimórficos en evaluaciones de diversidad genética (Morillo *et al.*, 2005; Mahuku *et al.*, 2002) (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Cebadores RAMs seleccionados.

Cebador	Secuencia (5' a 3')
CCA	DDB(CCA) <sub>5</sub>
CGA	DHB(CGA) <sub>5</sub>
AG	HBH(AG) <sub>7</sub> A
CT	DD(CT) <sub>7</sub> C
TG	HVH(TG) <sub>7</sub> T
CA	DBDA(CA) <sub>7</sub>
GT	VHV(GT) <sub>5</sub> G
ACA	BDB(ACA) <sub>5</sub>

*Nota.* Las designaciones usadas para los sitios degenerados son H (A o T o C); B (G o T o C); V (G o A o C) y D (G o A o T). Adaptado de "Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal" (Muñoz, Morillo y Morillo; 2008). Por Guateque, A; 2021.



Se consultaron las condiciones de amplificación por PCR descritas por Muñoz et al., (2008). La preparación del coctel fue diferente para cada primer por lo que se describirán brevemente a continuación.

### Preparación básica de Primers

Se preparó un coctel según las cantidades mostradas en la **Tabla 4**. Al cual se agregaron 2  $\mu$ l de ADN extraído de cada muestra a los tubos PCR rotulados con anterioridad para ser llevados al termociclador, para el primer CCA la temperatura de anillamiento establecida es de 55°C; en el caso de los primer AG y CA, la temperatura es de 50 °C.

REACTIVO	$\mu$ l	x 80 ( $\mu$ l)
Buffer	2.5	200
DNTPs	4.0	320
Primer	2.5	200
BSA	1.0	80
MgCl <sub>2</sub>	2.0	160
ADN	2.0	160
Taq polimerasa	0.2	16
H <sub>2</sub> O	10.8	864
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>	<b>2000</b>

**Tabla 4.** Coctel de preparación básico de primers.

*Nota.* Adaptado de "Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal" (Muñoz, Morillo y Morillo; 2008). Por Guateque, A; 2021.



## Primers CAG y GT

Las cantidades de reactivos para la preparación del coctel con los primer CAG y GT son citadas en la **Tabla 4**, con las variaciones presentadas en la **Tabla 5**. La temperatura de anillamiento para estos primers fue de 58°C.

**Tabla 5.** Variación del coctel de preparación básico para los primer CAG y GT.

REACTIVO	GT		CGA	
	µl	x 80 (µl)	µl	x 80 (µl)
MgCl <sub>2</sub>	1.0	80	1.0	80
Taq polimerasa	0.15	12	0.15	12
H <sub>2</sub> O	11.85	948	11.85	948

*Nota.* Adaptado de “Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal” (Muñoz, Morillo y Morillo; 2008). Por Guateque, A; 2021.

## Primers CT, TG y ACA

Para la preparación del coctel con los primers CT y TG se usaron las cantidades de reactivos mencionadas en la **Tabla 4** con las variaciones presentadas a continuación. La temperatura de anillamiento utilizada para estos primers fue de 55°C. Para el primer ACA es de 50°C.

**Tabla 6.** Variación del coctel de preparación básico para los primers CT, TG y ACA

REACTIVO	CT		TG		ACA	
	µl	x 80 (µl)	µl	x 80 (µl)	µl	x 80 (µl)
Taq polimerasa	0.15	12	0.15	12	0.15	12
H <sub>2</sub> O	10.85	868	10.85	868	10.85	868



*Nota. Adaptado de "Microsatélites amplificadas al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal" (Muñoz, Morillo y Morillo; 2008). Por Guateque, A; 2021.*

Para la electroforesis en geles de agarosa se tomaron 80ml de TBE 0.5x y 0.64 gr de agarosa, ambos elementos se mezclaron en un Erlenmeyer para ser calentados en horno microondas durante un minuto y medio. Paralelamente se prepararon moldes para el vertido del contenido que a temperatura ambiente se solidificó, se introdujo dentro de la cámara de electroforesis con una solución tampón de Tris Borato EDTA (TBE) y las muestras de ADN amplificado mezcladas con azul de carga y GelRed ®. Se tomaron los 3 µl de por muestra. Sembrándolas en los pozos del gel de agarosa, se tapó la cámara de electroforesis y se ubicaron los electrodos en su respectiva terminal. Se conectó la fuente de poder con una corriente de 100 voltios durante 1 hora. Finalmente se visualizaron las bandas en el transiluminador. Con base a las imágenes tomadas se construyó una matriz binaria, donde cero es ausencia y 1 es presencia de las bandas observadas en los geles teniendo de referencia al marcador de peso molecular de 100 pb.

### **Análisis estadístico**

Se generó una matriz de presencia ausencia y para la selección de bandas polimórficas se consideró como locus polimórfico aquel en el cual la frecuencia del alelo más común fue menor que el 95%. Se generó un dendrograma de similaridad genética con el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Mean Arithmetic Average*), a partir de la matriz de similitud entre individuos de acuerdo con la definición de Nei y Li (1979), así:  $S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$ . Donde  $S_{ij}$  es la similitud entre los individuos  $i$  y  $j$ ;  $a$  es el número de bandas presentes en ambos  $i$  y  $j$ ;  $b$  es el número de bandas presentes en  $i$  y ausentes en  $j$ ; y  $c$  es el número de bandas presentes en  $j$  y ausentes en  $i$ . Para tal fin se utilizó el programa estadístico NTSYS pc 2.11L (Rohlf, 2000).

El dendrograma se generó con el programa TREE de NTSYS-pc 2.11L. Para evaluar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad insesgada y el porcentaje de loci polimórficos utilizando el paquete estadístico TFPGA (Tools For Population Genetic Analices, versión 1.3, 1997). Se utilizó el paquete estadístico AMOVA®, por medio del programa AMOVA PREP para llevar a cabo el análisis de varianza molecular (AMOVA) y así poder determinar las diferencias



entre y dentro de los grupos formados. Se determinó el  $f$  estadístico insesgado con un intervalo de confianza del 95 %.



## Resultados

Los 8 primers RAMs generaron 114 patrones de bandas, el primer CT fue el que mayor número de patrones de bandas género con 19, mientras que el primer TG obtuvo el menor número de patrones de bandas con 11, teniendo en cuenta el número de muestras por especies (16) el número de bandas posibles para cada primer vario según los patrones de bandas, el número de bandas amplificadas y visualizadas en los geles de agarosa fue consignada en la matriz de ausencia presencia, dicha información se puede visualizar de forma resumida en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Resultados de la amplificación por PCR para la visualización de bandas con primers RAMs.

Primer	Número de patrones de bandas	Número de bandas posibles	Presencia / Ausencia de bandas en <i>H. bihai</i>		Presencia / Ausencia de bandas en <i>H. Caribaea</i>		Presencia / Ausencia de banda <i>H. orthotricha</i>		Presencia / Ausencia de banda <i>H. rostrata</i>		Presencia / Ausencia de bandas en <i>H. latispatha</i>	
<b>ACA</b>	15	240	0	240	74	166	104	136	138	102	115	125
<b>GT</b>	17	272	102	170	52	220	118	154	113	159	105	167
<b>CGA</b>	12	192	75	117	77	115	62	130	61	131	66	126
<b>CCA</b>	15	240	0	240	103	137	156	84	159	81	134	106
<b>CT</b>	19	304	110	194	90	214	122	182	124	180	74	230
<b>AG</b>	13	208	70	138	18	190	33	175	53	155	125	83
<b>TG</b>	11	176	41	135	52	124	71	105	96	80	89	87
<b>CA</b>	12	192	101	91	108	84	56	136	30	162	36	156
<b>TOTAL</b>	114											



Nota. Guateque, A; 2021.

La distancia genética de Nei (**Tabla 8**) permitió construir un dendrograma de similitud UPGMA que logro diferenciar cinco grupos en total (**Figura 6**). Las 5 agrupaciones corresponden a las cinco especies trabajadas, sin embargo, con el dendrograma de similitud a nivel de individuos (**Figura 7**), se observó como en algunos individuos se agruparon en nodos de especies

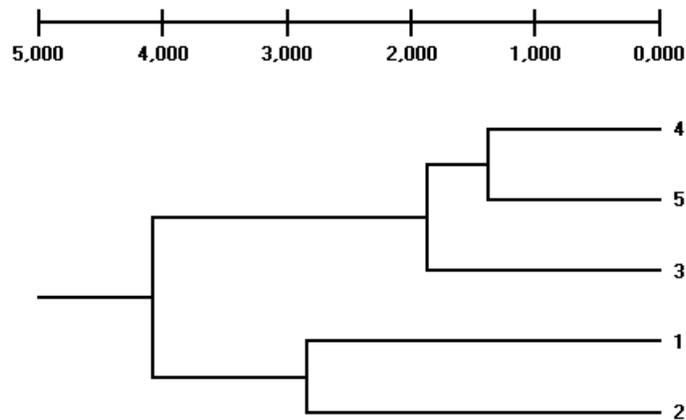
Población	1	2	3	4	5
1					
2	0.2768				
3	0.3602	0.2469			
4	0.5372	0.4418	0.154		
5	0.4402	0.3691	0.1981	0.1302	

diferentes a la correspondiente (es el caso de *H. bihai*, *H. caribaea* y *H. orthotricha*).

**Tabla 8.** Valores de distancia genética insesgada de Nei.

Nota. Guateque, A; 2021.

**Figura 6.** Dendrograma de similitud genética con el método de agrupación UPGMA.

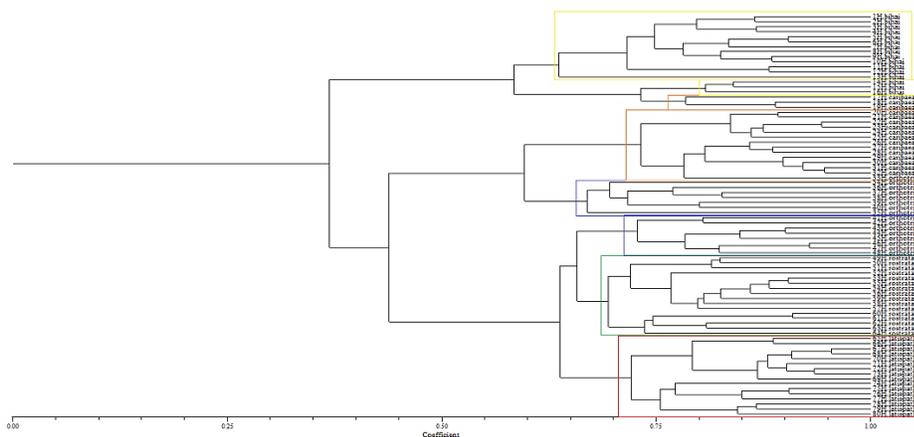


Nota. Guateque, A; 2021.

La heterocigosidad insesgada total de todas las muestras fue de 0.39, mientras que el porcentaje de loci polimórfico fue de 97.36% (con un criterio de 95%), el índice de fijación  $F_{st}$

**Figura 7.** Dendrograma de similitud genética a nivel de individuos, construido con el método de agrupación UPGMA a partir de la distancia de Nei y Li.

fue de 0.49 con una desviación estándar de 0.0230.



Nota. Guateque, A; 2021.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) para las especies de Heliconias mostro una varianza entre los cinco grupos formados de acuerdo a la especie del 45% mientras que la varianza fue de 55% entre individuos.



**Tabla 9.** Análisis de varianza molecular para las especies de Heliconias.

	<b>df</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>Est. Var.</b>	<b>%molecular</b>
Entre poblaciones	4	681.10	170.27	9.87	45%
Dentro de las poblaciones	75	920.31	12.27	12.27	55%
Total	79	1601.41		22.14	100%

*Nota.* Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las especies de Heliconias. En el cual se evalúa la variabilidad genética entre y dentro de las poblaciones estudiadas, donde **df** son los grados de libertad, **SS** es la suma de los cuadrados, **MS** es la media cuadrada, **Est. Var.** Es la estimación de varianza y **%molecular** hace referencia al porcentaje de varianza a nivel molecular. Guateque, A; 2021.



## Discusión

Los valores de distancia insesgada de Nei mostraron una mayor distancia entre las agrupaciones 1 y 4 las cuales correspondieron a individuos de las especies *H. bihai* y *H. rostrata*, Mientras que las agrupaciones 4 y 5 correspondientes a las especies *H. bihai* y *H. caribaea* mostraron la menor distancia (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Un análisis filogenético con marcadores moleculares nucleares y de cloroplastos determinó que *H. bihai* y *H. caribaea* filogenéticamente pertenecen al subgénero *Heliconia*, mientras que *H. rostrata* pertenece al subgénero *H. Griggsiana*, siendo este último subgénero más basal, mientras que el subgénero *Heliconia* es descrito como relativamente reciente y con orígenes monofiléticos (Marouelli, 2009). Cabe destacar que es frecuente encontrar híbridos interespecíficos en Heliconias (Marulanda et al., 2018) por lo que se evidencia en los resultados obtenidos en el AMOVA.

La heterocigosidad (0.39) y el porcentaje de loci polimórficos (97.36%) nos indican una alta diversidad genética en la población total analizada, trabajos anteriores como el de Marulanda et al., (2018) con marcadores microsatélites SSRs reportaron una alta heterocigosidad en *H. bihai* (0.67) y *H. stricta* (0.67) para cultivos del noroccidente de Colombia. La diversidad genética puede estar relacionada con los tipos de polinizadores que visitan las plantas, en el caso de las Heliconias, los colibríes son los principales polinizadores y se ha evidenciado su importancia en la estructura genética de diferentes especies de Heliconias (Gowda V, 2009), e incluso se ha reportado que en algunas especies de Heliconias, los colibríes como polinizadores han evitado la pérdida de diversidad genética por la fragmentación de hábitad (Stein et al., 2014).

El  $F_{st}$  o índice de diferenciación genética para el total de la población fue de 0.49, según Wright (1984) un  $F_{st}$  mayor a 0.25 indica una diversidad genética alta para la el total de la población. En diferentes estudios de caracterización genética se han reportado altos niveles de diversidad genética junto a porcentajes altos de loci polimórficos y alta heterocigosidad, como es el caso de Dotor et al., (2016) que reportaron un  $F_{st}$  de 0.29 y un porcentaje de loci polimórfico de 88% para cultivos de mora en el departamento de Boyacá o el caso de Meléndez et al., (2005) que con marcadores AFLP caracterizaron cultivos de *H. bihai* en Brasil, reportando  $F_{st}$  altos y altos



niveles de polimorfismos, a pesar de que tradicionalmente los cultivos de esta especie se producen a partir de propagación clonal.

El índice de diferenciación  $F_{st}$  nos da una idea de la variación genética por la estructura de la población, en una escala de 0 a 1, donde 0 implica que las poblaciones se cruzan libremente, mientras que 1 implica que no se comparte diversidad genética entre las poblaciones (Holsinger & Weir, 2009). Un  $F_{st}$  de 0.49 en nuestro estudio nos muestra que, aunque los individuos si están diferenciados a nivel específico, comparten cierta diversidad genética entre ellos, especialmente con las especies *H. bihai*, *H. orthotricha* y *H. caribaea*.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) evidencia una modesta variabilidad entre los grupos formados con un 45%, mientras que al interior de los grupos la variabilidad fue de un 55%. A pesar de que el efecto de la variabilidad genética en individuos es mayor que entre las especies para esta prueba estadística, es poco el porcentaje, comparando con otros estudios que calcularon la varianza molecular de especies de Heliconias, como Suarez et al., (2011) quienes con marcadores ISSR encontraron un 22.2% de variación entre poblaciones, mientras que el porcentaje al interior de los grupos fue de 77.8% y concluyendo que se debe mantener el flujo de genes entre los individuos para mantener la diversidad genética de la especie. Dotor et al., (2016) en su caracterización de *Rubus spp* reportaron un porcentaje de varianza del 77% al interior de los grupos analizados en la AMOVA, indicando que dicha varianza entre los grupos de *Rubus spp* deben ser aprovechada para el mejoramiento de cultivos. A pesar de que en nuestro estudio los valores para determinar la diversidad genética de la población fueron altos, es necesario generar estrategias para aumentar el porcentaje de varianza molecular entre los individuos de *Heliconia*.



## Conclusiones

Los marcadores RAMs utilizados fueron eficientes en el estudio de la diversidad genética de las Heliconias, permitiendo determinar una diversidad genética alta en términos de heterocigocidad y polimorfismos para las especies de Heliconias de interés comercial. La distancia genética entre las especies trabajadas permitió corroborar la proximidad de algunas especies a nivel de subgénero, por lo que debe explorar la posibilidad de aplicar estrategias que permitan aumentar la diversidad genética de estos cultivos, como el desarrollo de híbridos interespecíficos, polinizaciones cruzadas entre especies silvestres y de uso comercial que aumente el flujo de genes y la disponibilidad de nuevos alelos entre las cruzas controladas para su aprovechamiento en programas de mejoramiento genético, así como el uso de herramientas biotecnológicas que promuevan la identificación de genes de interés.



## Referencias

- Arcos, A. L., Mondragón, A. J., Muñoz, J. E., & Botero, S. (2004). Colecta y caracterización molecular con marcadores tipo RAM (Microsatélites aleatorios) de heliconias y especies relacionadas. En Congreso Colombiano de Botánica: Botánica, Diversidad y Cultura. 2 (pág. 346-347.) (Vol. 2).
- Berry, F. y Kress, W. (1991). *Heliconia* (4ª ed., pág. 334). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Betancur, J and Kress, W. (2007). *La familia Heliconiaceae en Colombia*. (2ª ed.). Actual. Biol. (Suppl 1): 77.
- Betancur, J. (2007). *Santa María, pintada de flores* (1ª ed.). Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia.
- Betancur, J., Echeverry, B., & Kress, J. (1999). Heliconias: llamaradas de la selva colombiana: guía de campo (3ra ed.). Colombia: Cristina Uribe, Editores.
- Clay, H., Hubbard, J. y Golt, R. (1987). The Hawai'i Garden: Tropical Exotics (2ª ed., pág. 143-173). Honolulu: University of Hawaii Press.
- Cobo, G. M. (2004). Caracterización morfológica y molecular de materiales comerciales de *Heliconia* spp. Trabajo de Especialista (Biotecnología), Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Côrtes MC, Gowda V, Kress WJ, Bruna EM, Uriarte M. (2009). Characterization of 10 microsatellite markers for the understory Amazonian herb *Heliconia acuminata*. *Mol Ecol Resour*. 2009 Jul; 9(4), 1261-4. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02627.x. . Epub 2009 Mar 5. PMID: 21564896.
- Díaz-Merchán, J., Ávila, L., & Oyola, J. (2002). Sondeo del mercado internacional de heliconias y follajes tropicales. De <http://hdl.handle.net/20.500.11761/31483>.



- Dotor-Robayo, Mónica Yadira, González-Mendoza, Leonardo Ariel, Castro, Mayerly Alejandra, Morillo-Coronado, Ana Cruz & Morillo-Coronado, Yacenia. (2016). Análisis de la diversidad genética de la mora (*Rubus* spp.) en el departamento de Boyacá. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.*, 14 (2), 10-17. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)10-17](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)10-17)
- FAO. 2015. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by B.D. Scherf & D. Pilling. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments. Rome. <https://doi.org/10.4060/14787E>
- Gilman, E., & Meerow, A. (2015, 10 Agosto). *FPS-247/FP247: Heliconia caribaea Caribbean Heliconia, Wild Plantain. Heliconia Caribaea Caribbean Heliconia, Wild Plantain.* <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/FP247>
- Gowda, V. (2009). Pollination biology and inter-island geographical variation in the mutualistic *Heliconia* (*Heliconiaceae*) - hummingbird (*Trochilidae*) interaction of the eastern Caribbean Islands (Doctoral dissertation, The George Washington University).
- Guimarães, W. N. R., de Moraes Guerra Ferraz, G., Martins, L. S. S., Resende, L. V., Burity, H. A., & Loges, V. (2012). Genetic Diversity Analysis of *Heliconia psittacorum* Cultivars and Interspecific Hybrids Using Nuclear and Chloroplast DNA Regions. In (Ed.), *Agricultural Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/48815>
- Hantula, J., Dusabenyagasani, M. and Hamelin, R.C. (1996), Random amplified microsatellites (RAMS) — a novel method for characterizing genetic variation within fungi. *European Journal of Forest Pathology.* , 26, 159-166. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.1996.tb00720.x>
- Hernández-Contreras, D. A., Torres-Torres, F. D. J., Figueroa-Lozano, M., Sánchez-Montaño, L. R., Posso-Terranova, A. M., & Muñoz-Flórez, J. E. (2021). Genetic structure and diversity of *Calycolpus moritzianus* (Myrtaceae) in the north-eastern Andes of Colombia. *Revista mexicana de biodiversidad.* 92. Doi: <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2021.92.3635>



- Holsinger, K., Weir, B. (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{ST}$ . *Nature Reviews Genetics*. 10., 639–650 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrg2611>
- Isaza, Liliana & Marulanda, Marta & López, Ana. (2012). Genetic diversity and molecular characterization of several *Heliconia* species in Colombia. *Genetics and molecular research: GMR*. 11. 1. 10.4238/2012.November.12.9.
- Isaza-Valencia L. (2008). Estudio de la diversidad genética y caracterización molecular de algunas especies comerciales del género *Heliconia*. Trabajo de investigación presentado para optar al título de Magíster en Biología Vegetal. Universidad Tecnológica De Pereira, Universidad De Caldas, Universidad Del Quindío. Pereira.
- Jácome-Chacón, M. A., Trejo-Téllez, L. I., Pérez-Sato, J. A., & García-Alvarado, J. C. (2018). Consideraciones sobre manejo fitosanitario, nutrimental y postcosecha de heliconias para su comercialización. *AGRO Productividad*, 11(8), 41-49.
- Kumar, P. P., Yau, J. C., & Goh, C. J. (1998). Genetic Analyses of *Heliconia* Species and Cultivars with Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science jashs*. 123(1), 91-97. <https://journals.ashs.org/jashs/view/journals/jashs/123/1/article-p91.xml>.
- Loges, Vivian & Teixeira, Maria & Castro, Ana & Costa, Andreza. (2005). Colheita, pós-colheita e embalagem de flores tropicais em Pernambuco. *Horticultura Brasileira - HORTIC BRAS*. 23(3), [online]. 2005, v. 23, n. 3, pp. 699-702. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-05362005000300001>>. Epub 24 Out 2005. ISSN 1806-9991. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362005000300001>.
- Mahuku GS, Henríquez MA, Munõz J, Buruchara RA. (2002). Molecular Markers Dispute the Existence of the Afro-Andean Group of the Bean Angular Leaf Spot Pathogen, *Phaeoisariopsis griseola*. *Phytopathology*. 2002 Jun; 92(6), 580-9. Doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.6.580. PMID: 18944253.



- Mahuku, G.S.; Henríquez, M.A.; Buruchara, R., (2002). Molecular characterization of *Phaeoisariopsis griseola* isolates from Africa. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Bean Program. En Annual Report. Cali, Colombia. pp. 70-71.
- Malakar M., Biswas S. (2021) Heliconias: Dramatic Flowers of the Tropics and Subtropics. In: Datta S.K., Gupta Y.C. (Eds) Floriculture and Ornamental Plants. Handbooks of Crop Diversity: Conservation and Use of Plant Genetic Resources. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-1554-5\\_26-1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-1554-5_26-1)
- Marouelli, L. (2009). Análisis filogenético de accesos do gênero *Heliconia* L. (*Heliconiaceae*) utilizando marcadores moleculares. De <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/711863>.
- Marulanda, Marta Leonor, Isaza, Liliana, & López, Paola Andrea. (2018). Caracterización de la diversidad genética de cultivares comerciales de heliconias en el centro occidente de Colombia. *Agronomía Costarricense.*, 42(1), 7-20. <https://dx.doi.org/10.15517/rac.v42i1.32195>
- Mazza, G. (2018, 31 enero). *Heliconia orthotricha*. Monaco Nature Encyclopedia. De <https://www.monaconatureencyclopedia.com/Heliconia-orthotricha/?lang=es><https://www.monaconatureencyclopedia.com/Heliconia-orthotricha/?lang=es>.
- Meléndez-Ackerman, E. J., Speranza, P., Kress, W. J., Rohena, L., Toledo, E., Cortés, C., Treece, D., Gitzendanner, M., Soltis, P., & Soltis, D. (2005). Microevolutionary Processes Inferred from AFLP and Morphological Variation in *Heliconia bihai* (Heliconiaceae). *International Journal of Plant Sciences.* 166(5), 781–794. <https://doi.org/10.1086/431231><https://doi.org/10.1086/431231>
- Morán-Poveda, L. (2021). Sector florícola ecuatoriano y afectación en mercado internacional a causa del covid19. *South Florida Journal of Development*, 4613. doi:10.46932/sfjdv2n3-061
- Morillo-Coronado, Ana Cruz, González-Castillo, José Alejandro & Morillo-Coronado, Yacenia. (2018). Caracterización de la diversidad genética de uchuva (*Physalis peruviana* L.) en



Boyacá. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16 (1), 26-33.  
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v16n1.631>

Muñoz- Flórez, J. E Jaime Eduardo, Morillo- Coronado, Ana Cruz A. C., & Morillo- Coronado, Yacenia. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica.*, 57 (4), 219-226. De [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012028122008000400001&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012028122008000400001&lng=en&tlng=es).

Muñoz- Flórez, Jaime Eduardo, Morillo- Coronado, Ana Cruz, & Morillo- Coronado, Yacenia. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4), 219-226. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012028122008000400001&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012028122008000400001&lng=en&tlng=es).

Murillo, A. C., Morillo C., Y., Muñoz F., J. E., Vásquez A., H. D., & Zamorano, A. (2005). Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, *Rubus* spp, de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. *Acta Agronómica.*, 54(2), 15–24. De [https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta\\_agronomica/article/view/108](https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/108)

Nei, M., & Li, W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(10), 5269–5273. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5269>.

Olvera, S., Cortés-Cruz, M., Contreras-Toledo, A., Ortiz, S., Avendaño-Arrazate, C., Olivera, A., Canul, J., & Grajales, M. (2018). Comparison of four DNA extraction methods in Heliconia (Heliconia L.). *African Journal of Biotechnology*, 17(45), 1331-1338.

Orozco- Castro, Luis Antonio, & Chavarro- Bohórquez, Diego Andrés. (2005). De la investigación al mercado: Un acercamiento a la medición del impacto de las heliconias colombianas. *Estudios Gerenciales.*, 21(96), 107-126. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S012359232005000300004&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S012359232005000300004&lng=en&tlng=es).

Quirós, M. L. (2012). La Floricultura en Colombia en el marco de la globalización: Aproximaciones hacia un análisis micro y macroeconómico. *Revista Universidad EAFIT.*,



37(122), 59–68. De <https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/992>

Rohlf, F.J. (2000) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Publishing Setauket, New York. Programa informático.

Sosa Rodríguez, Flora Margarita. (2013). Cultivo del género *Heliconia*. *Cultivos Tropicales.*, 34(1), 24-32. De [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S025859362013000100004&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025859362013000100004&lng=es&tlng=es).

Stein, K., Rosche, C., Hirsch, H., Kindermann, A., Köhler, J., & Hensen, I. (2014). The influence of forest fragmentation on clonal diversity and genetic structure in *Heliconia angusta*, an endemic understory herb of the Brazilian Atlantic rain forest. *Journal of Tropical Ecology*, 30(3), 199-208. Doi: 10.1017/S0266467414000030

Suárez-Montes, P., Fornoni, J., & Núñez-Farfán, J. (2011). Conservation genetics of the endemic Mexican *Heliconia uxpanapensis* in the Los Tuxtlas tropical rain forest. *Biotropica*, 43(1), 114- 121. Doi: 10.1111/j.1744-7429.2010.00657.x

Torres-Vanegas, F., Hadley, A. S., Kormann, U. G., Jones, F. A., Betts, M. G., & Wagner, H. H. (2019). The Landscape Genetic Signature of Pollination by Trap liners: Evidence from the Tropical Herb, *Heliconia tortuosa*. *Frontiers in Genetics*. doi:10.3389/fgene.2019.01206

Wright, S. (1984). Evolution and the genetics of populations, volume 4: variability within and among natural populations (Vol. 4). University of Chicago press.

Wright, S. (1984). *Variability within and among natural populations Evolution and the genetics of populations: A Treatise in Four Volumes* (No. 575.1 W9301e Ej. 1 025184). The University of Chicago Press.



## Anexos

### Anexo 1. Protocolo para la extracción de ADN mediante Kit Power Soil.

1. A los tubos PowerBead suministrar o agregar 0.25 gr de la muestra vegetal.
2. Usar vortex para mezclar (suavemente)
3. Revisar la solución C1. Si la solución C1 está precipitada, calentar la solución a 60°C hasta que este disuelta antes de usarla.
4. Agregar 60 µl de solución C1 e invertir varias veces o utilizar vortex brevemente
5. Asegurar los tubos PowerBead horizontalmente sobre el MO BIO vortex o asegure los tubos horizontalmente en un Flat-Bed Vortex con cinta. Use el vortex a máxima velocidad por 10 minutos.  
Nota: Si está usando el vortex de 24 puestos para más de 12 preparaciones, aumente el tiempo del vortex de 5-10 minutos
6. Asegúrese de que los tubos PowerBead giren libremente en la centrifuga sin frotar. Centrifugar a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.  
Nota: asegurarse de no exceder 10,000 x g o los tubos pueden romperse.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml (suministrado)  
Nota: esperar entre 400 µl a 500 µl de sobrenadante. El sobrenadante puede contener todavía algunas partículas de la muestra
8. Agregar 250 µl de solución C2 y usar vortex por 5 minutos. Incubar a 4°C por 5 minutos.
9. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 x g
10. Evitando el pellet, transferir no más de 600 µl de sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml
11. Agregar 200 µl de la solución C3 y usar vortex brevemente. Incubar a 4°C por 5 minutos
12. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 x g.
13. Evitando el pellet, transferir hasta no más de 750 µl de sobrenadante a un tubo limpio de 2 ml
14. Agitar la solución C4 antes de usar, agregar 12,000 µl de solución C4 al sobrenadante y usar vortex por 5 segundos
15. Cargar aproximadamente 675 µl en un Spin filter y centrifugar a 10,000 x g por un minuto a temperatura ambiente, desechar el flujo y agregar 675 ml adicionales de sobrenadante al Spin filter y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura



ambiente. Cargar el sobrenadante restante en el filtro del centrifugado y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.

Nota: se requiere un total de tres cargas por cada muestra procesada

16. Agregar 500  $\mu$ l de la solución C5 y centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos a 10,000 x g
17. Descartar el flujo completamente
18. Centrifugar de nuevo a temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 x g
19. Coloque cuidadosamente el Spin filter en un tubo de recogida limpio de 2 ml. Evite salpicar la solución C5 en el Spin filter
20. Añadir 100  $\mu$ l de solución C6 al centro de la membrana filtrante blanca. Alternativamente, se puede usar agua esterilizada de grado por PCR sin ADN para la elución de la membrana del filtro de giro de sílice en este paso
21. Centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos a 10,000 x g
22. Descartar el filtro de giro. El ADN en el tubo está ahora listo para cualquier futura aplicación. No se requieren más pasos.