UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación morfológica y molecular de accesiones de anonáceas (anón, chirimoya y atemoya) en condiciones *in situ*, de las regiones Andina y Caribe Colombiano

Sandra Liliana Castañeda Garzón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Morphological and molecular evaluation of Annonaceae´s accessions (custard apple, cherimoya and atemoya) *in situ* conditions of the Colombian Caribbean and Andean regions

Sandra Liliana Castañeda Garzón

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2014

Evaluación morfológica y molecular de accesiones de anonáceas (anón, chirimoya y atemoya) en condiciones *in situ*, de las regiones Andina y Caribe Colombiano

Sandra Liliana Castañeda Garzón

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias, área de Genética y Fitomejoramiento

Director:
Ph.D. Gustavo Ligarreto M.
Codirectora:
Ph.D. María Isabel Chacón

Línea de Investigación:
Genética y Fitomejoramiento
Grupo de Investigación:
Horticultura

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
Bogotá, Colombia
2014

Dedicatoria

A mis padres Jorge Castañeda y Mary Garzón,
y a mi hermano Camilo Andrés, por su incondicional
e invaluable apoyo.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia, especialmente a la Escuela de Posgrados de la facultad de Ciencias Agrarias, por su apoyo a través de la financiación parcial de la tesis de maestría.

Al profesor Diego Miranda (PhD), por la confianza depositada en mí, por brindarme un espacio en su grupo de trabajo y destinar los recursos económicos para el desarrollo de la investigación. Igualmente por el apoyo, la dirección y el acompañamiento en las actividades desarrolladas para el cumplimiento de los objetivos de la tesis.

Al Director, Gustavo Ligarreto (PhD), por la dirección, asesoría y acompañamiento en el desarrollo de las actividades del área de investigación, en el análisis de la información y presentación de resultados obtenidos.

A la Codirectora, María Isabel Chacón (PhD), por la asesoría y la colaboración para desarrollar el trabajo molecular en el laboratorio de Agrobiotecnología.

Al equipo del proyecto de Anonáceas, especialmente a Fabio Martínez (MSc), Jennifer Blanco (MSc) y Adriana Robles, quienes fueron un gran apoyo en el desarrollo de las actividades de colecta y registro del material vegetal.

A Jennifer Blanco (MSc) y Sonia Tinjacá (MSc), por su invaluable colaboración, acompañamiento y asesoría en el desarrollo de las actividades de laboratorio durante el análisis molecular.

A los productores de las especies e investigadores del área, quienes han sido la fuente de información secundaria y del material vegetal que actualmente consolida las colecciones de trabajo de germoplasma de Anonáceas.

A mis padres Mary y Jorge, y a mi hermano Camilo Andrés, por su inmenso apoyo y colaboración, porque han depositado en mí su confianza y han sido quienes me han brindado la fortaleza para llevar a cabo las metas propuestas durante mi vida personal y profesional.

A todos los me acompañaron de una u otra manera en el proceso. A familiares y amigos cercanos, muchas gracias.

Resumen

A través de la prospección de los recursos fitogenéticos de especies de la familia Annonaceae en Colombia (2009 y 2011), se conformó una población *in situ* compuesta por 167 accesiones, de cinco especies y un híbrido interespecífico (*Annona cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa, Rollinia sp. y A. squamosa x A. cherimola*), distribuidas en 13 departamentos y 48 municipios de las regiones Andina y Caribe. Estableciendo y enriqueciendo tres colecciones de trabajo, conformadas por 164 accesiones (un banco de semillas) y 198 accesiones (dos bancos de campo). La evaluación morfológica de la población *in situ* por medio de 25 descriptores (cuantitativos y cualitativos), denota que los rasgos fenotípicos que se relacionan con la calidad del fruto (tamaño, peso, simetría, grados brix, pH, acidez, peso y número de semillas) son los que diferencian los conglomerados de las especies más representativas (seis grupos para *A. squamosa* y cuatro para *A. reticulata*). Mientras que la evaluación molecular de la población *in situ* por medio de la amplificación cruzada de 20 marcadores tipo SSR, revela a nivel intrapoblacional, déficit de heterocigotos en *A. squamosa y A. reticulata*, mayor riqueza alélica y mayor diversidad en *A. squamosa*. A nivel interpoblacional, las especies más representativas revelan una mayor variación genética dentro de las poblaciones *a priori* (regiones geográficas), detectando un bajo grado de diferenciación genética en *A. squamosa* y una ausencia de estructura poblacional en *A. reticulata*. El contraste de las evaluaciones para un conjunto de accesiones de estas especies, refleja diferencias en su agrupamiento.

Palabras clave: recursos genéticos, marcadores microsatélite, diversidad genética, Colombia.

Abstract

Surveying of plant genetic resources of species of Annonaceae family in Colombia (2010 and 2011), an *in situ* population was established, composed by 167 accessions of five species and one interspecific hybrid (*Annona cherimola*, *A. glabra, A. reticulata, A. squamosa, Rollinia sp* and *A. squamosa x A. cherimola*) of 13 departments and 48 municipalities in the Andean an Caribbean regions. Were also established and enriched three work collections, composed by 164 accessions (a seed bank) and 198 accessions (two field banks, in Corpoica-Nataima and Córdoba University). The morphological evaluation of *in situ* population by 39 descriptors (quantitative and qualitative), denotes that the phenotypic traits that are related to fruit quality (size, weight, symmetry, degrees brix, pH, acidity, weight and number of seeds) are the clusters that differentiate the most representative species (six groups for *A. squamosa* and four for *A. reticulata*). While, the molecular evaluation of *in situ* population through cross amplification of 20 SSR markers, reveals at intrapopulation level, deficit of heterozygotes in *A. squamosa* and *A. reticulata*, higher allelic richness and diversity in *A. squamosa*. At interpopulation level, the most representative species (*A. squamosa* and *A. reticulata*) show greater genetic variation within populations *a priori* (geographic regions), detecting a low degree of genetic differentiation in *A. squamosa* and a lack of structure population *A. reticulata*.

Keywords: genetic resources, microsatellite markers, genetic diversity, Colombia.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **XI**

Lista de figuras ..... **XV**

Lista de fotografías ..... **XVII**

Lista de tablas ..... **XVIII**

Introducción **1**

Objetivos **3**

1. Prospección, colecta y establecimiento de una colección de trabajo de especies de la familia Annonaceae en Colombia **5**
1.1 Resumen 5
1.2 Introducción 5
1.3 Metodología 8
1.4 Resultados 11
1.4.1 Banco de semillas 11
1.4.2 Banco de campo 16
1.5 Discusión 18
1.6 Conclusiones 21
1.7 Recomendaciones 22

2. Evaluación morfológica de una población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia **25**
2.1 Resumen 25
2.2 Introducción 25
2.3 Metodología 29
2.4 Resultados 31
2.4.1 Distribución geográfica, hábitat y clima 31
2.4.2 Variabilidad morfológica interespecífica 33
2.4.3 Variabilidad morfológica intraespecífica 41
2.5 Discusión 46
2.6 Conclusiones 47
2.7 Recomendaciones 49

3. Evaluación molecular de accesiones de anonáceas de una población *in situ* en Colombia **51**
3.1 Resumen 51
3.2 Introducción 51

3.3 Metodología 56
3.4 Resultados 59
3.4.1 Extracción de ADN 59
3.4.2 Amplificación en PCR y PAGE.....63
3.4.3 Transferibilidad de marcadores SSR 65
3.4.4 Diversidad genética en especies de la familia Annonaceae.....66
3.4.5 Contraste entre la evaluación morfológica y molecular de un conjunto de accesiones de las especies representativas de la población *in situ*.....78
3.5 Discusión.....83
3.6 Conclusiones.....90
3.7 Recomendaciones.....92

A. Anexo A: Descriptores empleados en la documentación de los recursos fitogenéticos de Anonáceas.....95

B. Anexo B: Accesiones que conforman la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia 97

C. Anexo C: Mapa de distribución geográfica de las accesiones que conforman la población *in situ* de especies de Annonaceae en Colombia 101

D. Anexo D: Distribución geográfica de la población *in situ* y comparación con indicadores climatológicos 102

E. Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos 105

F. Anexo F: Mapas de distribución geográfica de los conglomerados identificados de las especies representativas.....115

G. Anexo G: Protocolos de extracción de ADN e imágenes de geles.....117

H. Anexo H: SSR seleccionados para el estudio de la colección Colombiana de Anonáceas.....121

I. Anexo I: Accesiones empleadas en el análisis molecular 122

J. Anexo J: Resultados del análisis estadístico a nivel molecular.....124

K. Anexo K: Resultados del contraste entre la evaluación morfológica y molecular130

Bibliografía 137

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1: Número de accesiones por departamento con material disponible en el banco de semillas.....12
Figura 1-2: Especies con semilla disponible en el banco de semillas de Anonáceas....13
Figura 1-3: Ejemplo de la ficha técnica elaborada por cada accesión que conforma la población *in situ*.....15
Figura 1-4: Representación de especies de anonáceas en los bancos de campo.....17
Figura 2-1: Categoría de frutos de especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*. 38
Figura 2-2: Imágenes de frutos de categoría superior y común según la especie de la familia Annonaceae.....39
Figura 2-3: Dendrograma correspondiente a las variables morfológicas evaluadas en especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*. 41
Figura 2-4: Diagrama bidimensional de las variables morfológicas evaluadas en *A. squamosa*. 42
Figura 2-5: Dendrograma correspondiente a las variables morfológicas evaluadas en *A. squamosa*. 43
Figura 2-6: Diagrama bidimensional de las variables morfológicas evaluadas en *A. reticulata*. 44
Figura 2-7: Dendrograma correspondiente a las variables morfológicas evaluadas en *A. reticulata*. 45
Figura 3-1: Diagrama de coordenadas principales para *A. squamosa*.....71
Figura 3-2: Topología Neighbor-Joining (NJ) con base en índice de similitud y agrupamiento UPGMA para SSRs en un grupo de accesiones de la especie *A. squamosa*. 72
Figura 3-3: Análisis de la estructura poblacional con k=2 a k=7 en 26 genotipos de *A. squamosa*. 73
Figura 3-4: Diagrama de coordenadas principales para *A. reticulata*.....75
Figura 3-5: Topología Neighbor-Joining (NJ) con base en índice de similitud y agrupamiento UPGMA para SSRs en un grupo de accesiones de la especie *A. reticulata*. 76
Figura 3-6: Análisis de la estructura poblacional con k=2 a k=6 en 16 genotipos de *A. reticulata*. 77
Figura 3-7: Diagrama de conglomerados producto de la evaluación morfológica (izquierda) y molecular (derecha) en accesiones de *A. squamosa*. 79

Figura 3-8: Diagrama de conglomerados producto de la evaluación morfológica (izquierda) y molecular (derecha) en accesiones de *A. reticulata*. 80
Figura 3-9: Diagrama de conglomerados producto del análisis combinado de rasgos morfológicos y marcadores moleculares en accesiones de *A. squamosa*. 81
Figura 3-10: Diagrama de conglomerados producto del análisis combinado de rasgos morfológicos y marcadores moleculares en accesiones de *A. reticulata*. 82

Lista de fotografías

Pág.

Fotografía 1-1. Banco de semillas de especies de la familia Annonaceae (Universidad Nacional de Colombia). 11
Fotografía 1-2. Semillas de las especies de la familia Annonaceae que conforman la colección de trabajo.....13
Fotografía 1-3. Comparación visual de las semillas de especies de la familia Annonaceae que conforman la colección de trabajo. 14
Fotografía 1-4. Bancos de campo de especies de la familia Annonaceae. 16

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Número de accesiones de Annonaceae evaluadas en campo por periodo de tiempo de colecta. 12
Tabla 1-2: Número de accesiones de Annonaceae con semilla disponible en el banco. 12
Tabla 1-3: Relación de la cantidad de semilla por especie, almacenada en la colección de trabajo. 14
Tabla 1-4: Principales características de las semillas almacenadas en la colección de trabajo. 14
Tabla 1-5: Especies que conforman la colección de material vegetal de Anonáceas (población *in situ*) para análisis molecular. 17
Tabla 2-1: Información general de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia. 31
Tabla 2-2: Rango altitudinal en el que se encuentran las especies especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*. 32
Tabla 2-3: Porte y tipo de ramificación de individuos de especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*. 34
Tabla 2-4: Forma predominante y tamaño promedio de las hojas de las especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*. 34
Tabla 2-5: Principales características de los frutos de las especies de Annonaceae de la población *in situ*. 36
Tabla 2-6: Forma predominante de los frutos de las especies de Annonaceae de la población *in situ*. 36
Tabla 2-7: Principales aspectos del agrupamiento de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia. 40
Tabla 2-8: Características generales de los grupos de accesiones de *A. squamosa* (población *in situ*). 43
Tabla 2-9: Características generales de los grupos de accesiones de *A. reticulata* (población *in situ*). 45
Tabla 3-1: Principales resultados obtenidos en el proceso de estandarización de extracción de ADN. 59
Tabla 3-2: Accesiones morfológicamente contrastantes (población *in situ* de anonáceas). 64
Tabla 3-3: Transferibilidad de 20 loci microsatélite, en especies de la población *in situ* de Anonáceas de Colombia. 65

Tabla 3-4: Número de accesiones obtenidas tras la primera depuración de la matriz base. 66
Tabla 3-5: Parámetros de diversidad genética por locus, en *A. squamosa* de la población *in situ*.....67
Tabla 3-6: Parámetros de diversidad genética por locus, en *A. reticulata* de la población *in situ*.....67
Tabla 3-7: Parámetros de diversidad genética por locus, en *A. cherimola* de la población *in situ*.....68
Tabla 3-8: Parámetros de variabilidad genética (intrapoblacional) de los loci microsatélite en las especies más representativas de la población *in situ*. 68
Tabla 3-9: Parámetros de diversidad genética interpoblacional en *A. squamosa* de la población *in situ*.....70
Tabla 3-10: Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA) para *A. squamosa*. 70
Tabla 3-11: Parámetros de diversidad genética interpoblacional en *A. reticulata* de la población *in situ*.....74
Tabla 3-12: Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA) para *A. reticulata*. 74
Tabla 3-13: Relación de número de accesiones de las especies más representativas, evaluadas morfológica y molecularmente.....78
Tabla 3-14: Accesiones de *A. squamosa* evaluadas por medio de 25 descriptores morfológicos y 6 marcadores moleculares SSR. 78
Tabla 3-15: Accesiones de *A. reticulata* evaluadas por medio de 25 descriptores morfológicos y 7 marcadores moleculares SSR. 79

Introducción

El presente estudio se enmarca dentro del programa de investigación "Material de siembra y mejoramiento genético de anón (*Annona squamosa* L.)", aprobado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, en la Convocatoria Nacional de Investigación y Desarrollo Agropecuario 2007, y cuyo objetivo es el "desarrollo del cultivo de anón en Colombia, a través del suministro de materiales de mayor calidad y productividad a nivel nacional e internacional, mejor adaptación agronómica y mejor producción por medio de técnicas de propagación más efectivas".

La familia Annonaceae, pertenece al orden Magnolial (Chatrou, 1999a), de árboles de zonas bajas que crecen principalmente en el sotobosque, aunque algunas especies de los géneros *Duguetia, Guatteria* y *Xylopia* son componentes del dosel y otras como *Annona hypoglauca* y *A. scandens* son bejucos (Murillo y Restrepo, 2000). Según Gentry (1993), el número de géneros reportados a nivel mundial para la familia es de 130, en el Neotrópico es de 40 y para los países de Colombia, Perú y Ecuador es de 27 en total; no obstante, en el país se reportan 17 géneros para esta familia.

A nivel mundial, las especies *A. cherimola* (chirimoya), *A. muricata* (guanábana) y *A. squamosa* (anón) son las de mayor demanda y por lo tanto las de mayor producción. Sus frutos son principalmente comercializados en mercados locales, regionales y nacionales, y son de interés alimenticio (consumo de frutos frescos y de pulpa) y medicinal (Andreade-Ceto y Heinrich, 2005). Los principales factores limitantes de su desarrollo son las condiciones climáticas y de crecimiento, las técnicas agronómicas pobres o poco efectivas, el limitado conocimiento en poscosecha, manejo y transporte, la falta de iniciativas comerciales que incentiven la producción, mercadeo e investigación, y la falta de conocimiento acerca del valor nutricional y de las técnicas de elaboración de productos procesados (Pinto *et al.*, 2005). A esto se suma el desconocimiento del grado de domesticación, así como de la variabilidad genotípica y fenotípica de algunas especies.

En torno a las especies de la familia Annonaceae, surgen nuevas inquietudes, la amplia variedad de flores, frutos y de morfología del polen, el hábitat, la preferencia de hábitat y los síndromes de polinización (Scheldeman, 2002), condicionan la colecta del material y su posterior manejo y almacenamiento. De igual manera, la presencia de problemas fitosanitarios, condicionan la disponibilidad y calidad de los frutos y por ende, limitan su mercado.

En Colombia, el anón (*Annona squamosa*) y la chirimoya (*Annona cherimola*), son especies vegetales promisoras que hacen parte del sector de frutas frescas del país (MADR, 2005) y son cultivadas con fines alimenticios y económicos. Según Guerrero y Fischer (2007), "estas frutas han ganado una gran aceptación entre los consumidores y podrían constituirse en un grupo de frutas con características muy apetecibles y con grandes oportunidades en el sector agroindustrial". En el país, "existen varias zonas

productoras de anón que cuentan con las condiciones agroclimáticas óptimas para el desarrollo de este frutal; pero debido al deficiente manejo del cultivo, es muy baja la producción y la rentabilidad del mismo" Guerrero y Fischer (2007).

La alta variabilidad morfológica y genética reportada para *Annona cherimola* (Andrés-Agustín, 2004; Sheldeman, 2002), es aspecto de interés no solo a nivel mundial, sino también local, puesto que en el país, el conocimiento que se tiene de las especies de la familia Annonaceae es escaso. Las implicaciones de cultivar especies de gran variabilidad genética, incide directamente en su productividad y rentabilidad. Por lo tanto, es necesario conocer ampliamente las características de los materiales colectados y así proveer material vegetal de mayor productividad, que beneficie directamente a los productores, a través del establecimiento de cultivos más rentables y homogéneos.

En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la variabilidad morfológica y molecular de una población *in situ* de anonáceas (anón, chirimoya y atemoya), provenientes de las regiones Andina y Caribe colombianas. Los resultados se presentan en tres capítulos, en los cuales se hace referencia a las etapas de prospección y colecta de de recursos fitogenéticos, la evaluación morfológica y la evaluación molecular de la población *in situ*. En Colombia, hasta el momento, no se habían desarrollado estudios similares en especies de la familia Annonaceae (excepto para *A. muricata*, por Mejía *et al*., 2002), por lo tanto, esta investigación contribuye al conocimiento de las especies, específicamente en lo relacionado con el área de genética y fitomejoramiento de cultivos de frutales.

Objetivos

General

Evaluar la variabilidad morfológica y molecular de una población *in situ* de anonáceas (anón, chirimoya y atemoya), provenientes de las regiones Andina y Caribe Colombiano.

Específicos

- Realizar la prospección, colecta y establecimiento de una colección de trabajo de especies de la familia Annonaceae.
- Determinar el nivel de diversidad morfológica de al menos 30 accesiones que conforman el Banco Colombiano de Germoplasma de especies de la familia Annonaceae.
- Determinar la diversidad genética de al menos 30 accesiones de anonáceas que conforman el Banco Colombiano de Germoplasma, mediante marcadores moleculares.

1. Prospección, colecta y establecimiento de una colección de trabajo de especies de la familia Annonaceae en Colombia

1.1 Resumen

La prospección de los recursos fitogenéticos de especies de la familia Annonaceae en Colombia se fundamentó en el desarrollo de nueve jornadas de colecta realizadas durante los años 2010 y 2011 en la zona Andina y Caribe colombianas (poblaciones *in situ* de 13 departamentos y 48 municipios), permitiendo la obtención de material vegetal (semillas, estacas y hojas) de cinco especies y un híbrido interespecífico (*Annona cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa, Rollinia sp. y A. squamosa x A. cherimola*), a partir del cual, se establecieron y enriquecieron tres colecciones de trabajo compuestas por un banco de semillas (Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá) y dos bancos de campo (Corpoica-Nataima y Universidad de Córdoba), así como se obtuvo la información y el material vegetal para la evaluación morfológica y molecular de la población *in situ*. El banco de semillas cuenta con material vegetal de 164 accesiones (aproximadamente 13000 semillas), provenientes de 16 departamentos y 72 municipios de Colombia visitados entre los años 2009 y 2011; siendo la especie *A. squamosa* la más representativa de la colección (48,57%). Por su parte, los bancos de campo cuentan con material vegetal de 198 accesiones (100 en el banco de Corpoica – Nataima y 98 en el banco de la Universidad de Córdoba), que fueron propagados por vía sexual y asexual, y en los cuales la especie *A. squamosa* es la más representativa de la colección (51% y 70%, respectivamente).

1.2 Introducción

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO (2013) “los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (RFAA) se colectan e intercambian en forma sistemática desde hace unos 500 años. La conservación (*in situ* y *ex situ*) se concentra explícitamente en el mantenimiento de la diversidad de toda la variación genética de una especie o taxón en particular”. Según la FAO (2013), las principales razones para conservar los RFAA son: “asegurar la posibilidad futura de adaptación de los cultivares y de las poblaciones silvestres; conservar los datos y los caracteres que aseguran la sostenibilidad agrícola; promover el uso de los recursos genéticos en el comercio y la biotecnología; y conservar la diversidad genética por motivos culturales”.

La importancia de especies de la familia Annonaceae en el mercado local del país (*Annona squamosa* y *A. cherimola*, principalmente) y su inclusión en la cadena de

frutales de exportación en Colombia prevista para crearse (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia - MADR, 2005), ponen en evidencia la necesidad del desarrollo de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*, que permitan la posterior implementación de programas de mejoramiento del cultivo y de conservación de los recursos genéticos de las especies de esta familia botánica. A través de la prospección, colecta y la conformación de la colección de trabajo, se conserva parte del patrimonio agrícola nacional de estas especies, sentando así las bases para la implementación de un programa de mejoramiento genético en especies de la familia Annonaceae en Colombia.

Según el IPGRI (2000), "los Recursos Fitogenéticos (RFG) del Caribe han evolucionado en un ambiente de islas volcánicas y coralinas, unas grandes y otras muy pequeñas, que están relativamente aisladas, no sólo una de otra, sino también de América Central y de América del Sur. Este aislamiento, ha dado lugar a un nivel alto de endemismo vegetal y al desarrollo divergente de razas nativas de muchos cultivos". Entre los RFG importantes para la región hay especies maderables y ornamentales y acervos genéticos entre los cuales se encuentra *Annona* spp (IPGRI, 2000).

La conservación *ex situ* se refiere a la conservación de la diversidad biológica fuera de su hábitat natural, que en el caso de los recursos fitogenéticos, puede ser en bancos de semillas, en bancos de germoplasma *in vitro* o como colecciones vivas en bancos de germoplasma en el campo (Rao *et al*., 2007). Según Engels y Visser (2007), dentro de las estrategias de conservación *ex situ* se encuentran: el almacenamiento de semillas, el almacenamiento de polen, los bancos de germoplasma en campo, la conservación *in vitro*, los jardines botánicos y arboretos, el almacenamiento de ADN y como método complementario, la agricultura, el método original de conservación, que está ligada directamente a la utilización.

Las técnicas de propagación *in vitro* pueden emplearse para intercambiar y conservar en condiciones *ex situ*, especies que producen pocas semillas por fruto o plantas que han sido propagadas vegetativamente, incluyendo las *Annona* (Pinto *et al*., 2005). En especies como la chirimoya (*A. cherimola*), varios investigadores han desarrollado estudios relacionados con ésta técnica de propagación, obteniendo resultados favorables a través de micropropagación (Tazzari *et al*., 1990; Padilla y Encina, 2004) y organogénesis (Jordán, 1988; Jordán *et al*., 1991; Encina *et al.*, 1994 y George, 1993).

A pesar de la disponibilidad de semilla y de las técnicas *in vitro*, en la práctica, la mayoría de los recursos genéticos de especies de *Annona* son almacenados en bancos de germoplasma, también llamados repositorios clonales o colecciones de plantas vivas, que son más susceptibles a enfermedades, errores humanos y peligros ambientales, que otras técnicas de conservación (Ferreira, 2001). En algunos casos, estas colecciones son de mejoradores y son raramente representativas del rango de variabilidad del género *Annona* que debe conservarse (Pinto *et al*., 2005). Según los autores, en el año 2005, se disponía de 1741 accesiones de 11 especies identificadas de *Annona*, un híbrido específico y varias *Annona* spp. documentadas (IPGRI, 2000), con un bajo porcentaje de duplicación en 67 colecciones institucionales de 34 países. Debido a su importancia comercial, las tres especies con gran número de accesiones son *A. cherimola, A. muricata* y *A. squamosa* (Pinto *et al.*, 2005). Según estos autores, algunos investigadores sugieren que las semillas de *Annona* pueden conservarse en bancos de genes bajo temperaturas inferiores a 18°C, almacenadas en recipientes herméticos a un contenido de humedad de 5 ± 1%.

En Colombia, se tiene conocimiento del registro de establecimiento de la seminoteca (1985) y de bancos de campo (viveros) de *A. muricata*, por la Corporación Araracuara (COA), hoy Instituto de Investigaciones Amazónicas –SINCHI (MADR, 1995), al igual que la conservación *ex situ* de *A. cherimola* y *A. muricata* por Smurfit Cartón de Colombia, sembradas en ensayos forestales, como estrategia de conservación de especies arbóreas forestales autóctonas (Wright, 1995). Lobo *et al.* (2007), propusieron un modelo de conservación dinámica de la variabilidad de *A. cherimola* (chirimoya) y *A. muricata* (guanábana), especies frutales con semilla ortodoxa, que consiste en mantenimiento en campo de un número limitado de individuos por accesión debido a los costos de mantenimiento y conservación, y a largo plazo, mantenimiento en cuartos fríos de semillas de un mayor número de árboles de cada población como banco base, aspecto que permite mejor una representación de la variabilidad intrapoblacional. Lo anterior, se complementa con la obtención periódica de semillas de polinización abierta provenientes de la colección de campo, lo que permite el enriquecimiento genético, útil para procesos de evaluación y selección de nuevos materiales por parte de los investigadores y usuarios del germoplasma.

Los RFG de la familia Annonaceae, específicamente de las especies en estudio (anón, chirimoya y atemoya), se encuentran ampliamente documentados en el Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y El Caribe (IPGRI, 2000), que maneja la FAO y Bioversity International (antes IPGRI), donde se compila la información sobre las actividades de conservación *ex situ* de los RFG de América Latina y el Caribe, y en el cual se observa que las especies anón (*A. squamosa*), chirimoya (*A. cherimola*), atemoya (*A. squamosa x A. cherimola*) y anona corazón (*A. reticulata*), cuentan con colecciones de germoplasma significativas, que aportan en gran medida en su conservación.

La familia Annonaceae es del orden Magnolial, de zonas bajas que crecen principalmente en el sotobosque, aunque algunas especies de *Duguetia, Guatteria* y *Xylopia* son componentes del dosel y otras como *A. hypoglauca* y *A. scandens* son bejucos (Murillo y Restrepo, 2000). Según Gentry (1993), el número de géneros reportados a nivel mundial para la familia es de 130, en el Neotrópico es de 40 y para los países de Colombia, Perú y Ecuador es de 27; no obstante, en Colombia se reportan 17 géneros para esta familia. Se caracteriza porque la corteza externa se desprende en tiras y la corteza interna es reticulada; las hojas son simples, alternas, dísticas, enteras y generalmente aromáticas; las flores hermafroditas, son solitarias o reunidas en cimas helicoides con todas las ramas en un mismo plano, llamadas ripidios; el perianto es trímero y generalmente con dos verticilos de pétalos. Los estambres son numerosos, los carpelos libres y los frutos generalmente apocárpicos (Murillo, 2001).

La polinización es principalmente llevada a cabo por insectos y algunas veces por el viento. El hecho que las flores sean protóginas (los pistilos maduran antes que el polen sea liberado por las anteras), sugiere que la autopolinización no es una regla entre las annonas (Pinto *et al*., 2005). El amplio número de especies y taxones de Annonaceae, ha generado algunos problemas de clasificación, debido a la amplia variedad, entre otros, de flores, frutos y morfología del polen, hábitat, preferencia de hábitat y síndromes de polinización (Chatrou, 1999a). La alta heterocigosis del género hace que las plantaciones de anón, atemoya, chirimoya y guanábana sean heterogéneas, con pronunciadas diferencias en productividad y características vegetativas. Esto ha generado alternativas de propagación y mejoramiento en frutales de *Annona* (Litz, 2005).

Según Murillo (2001), "de los géneros encontrados en Colombia, *Anaxagorea, Annona, Cananga, Duguetia* y *Xylopia* tienen distribución pantropical, en tanto que *Diclinanona, Froesiodendron, Guatteriella, Guatteriopsis, Ruizodendron* y *Trigynaea* son amazónicos y los restantes géneros son neotropicales. La familia está ampliamente distribuida en todo el país; la mayor diversidad de especies se encuentra en las regiones amazónica (54 %), pacífica (27.5%) y andina (27%). El 87 % crece en alturas menores a 500 m y solo *Raimondia quinduensis* alcanza los 2600 m".

La familia es importante desde el punto de vista alimenticio pues *A. cherimola* (chirimoya), *A. muricata* (guanábana), *Raimondia cherimolioides, Raimondia quinduensis* y *Rollinia mucosa* se cultivan por sus frutos deliciosos (Murillo, 2001). En general, las anonáceas han sido estudiadas ampliamente por los investigadores de la Universidad de Utrecht (Holanda) y la Estación Experimental "La Mayora" (España), entre otras instituciones. Sin embargo, en Colombia, "el conocimiento que se tiene de las anonáceas es escaso" (Murillo, 2001).

Con el objetivo de contribuir en el conocimiento de las especies de Anonáceas en el país, se desarrolló el presente estudio, con el cual, a través de las etapas de prospección, planificación (definición del área de estudio, tipo del material vegetal y metodología de trabajo) y de colecta de material en condiciones *in situ*, se establecieron las colecciones de trabajo (bancos de semillas y de campo) y se obtuvo el material vegetal para el análisis molecular, complementando el proceso con la evaluación morfológica y molecular de la población *in situ*. El establecimiento y la permanencia de las colecciones de trabajo, contribuye en la conservación de los RFG de especies de la familia Annonaceae en Colombia.

1.3 Metodología

A partir del "Diseño de colecta de tres especies agrícolas del género *Annona* de interés para Colombia", elaborado en el año 2009, por el equipo técnico del Proyecto "Establecimiento del Banco de Germoplasma Colombiano de Anón (*Annona squamosa* L.)", de la Universidad Nacional de Colombia (UN) - Sede Bogotá, se identificaron las zonas de colecta de material vegetal para Colombia de *A. squamosa, A. cherimola* y *A. reticulata* que serían incluidas en el estudio para la conformación de la población *in situ*. A través del uso de modelos predictivos de distribución de especies y la integración de información de mapas de presencia, de ecosistemas terrestres (continentales) y de información antropogénica empleando el software DIVA-GIS, se construyó la cartografía temática que definió 6 zonas de colecta (Antioquia, Caribe, Centro Norte, Centro Sur, Occidente y Zona Cafetera) que fueron calificadas según su prioridad.

Partiendo de esa información, se definió que para el desarrollo del presente estudio, la zona Andina y Caribe, serían muestreadas al azar, bajo los criterios de selección independiente (selección paralela para las características deseadas) de presencia, distribución, estado fitosanitario y estado fenológico, donde se seleccionaron individuos representativos en la zona de estudio, sin mayor afectación fitosanitaria en troncos, ramas, hojas, flores y frutos, y en proceso de floración y/o fructificación (en lo posible). Durante la etapa de prospección se llevaron a cabo nueve recorridos en 13 departamentos y 48 municipios, en la zona Andina y Caribe colombianas, en los cuales se evaluaron los individuos en campo y se colectó el material vegetal destinado a las

colecciones de trabajo. Se visitaron principalmente huertos caseros, solares y cultivos, colectando algunos materiales en zonas de distribución natural de las especies *A. squamosa, A. glabra, A. reticulata y A. squamosa* x *A. cherimola*, e incluyendo en la colección algunas accesiones de *A. cherimola y A. purpurea*.

La colecta de material vegetal se realizó luego de la identificación de los individuos en campo y del registro de los descriptores de pasaporte y ambiente del sitio, árbol, hojas, flores y frutos (características externas), empleando 67 de los descriptores definidos para la chirimoya (*A. cherimola*) por Bioversity International y CHERLA (2008) (Anexo A: Descriptores empleados en la documentación de los recursos fitogenéticos de Anonáceas), conformando así, la base de datos de la población *in situ* y de las colecciones de trabajo. El material vegetal de tipo asexual fue tomado de ramas basales, dimensionado las estacas (con 3 yemas en promedio) y cortando parte de la lámina foliar. Este material se guardó en papel absorbente humedecido, cubriéndolo con papel aluminio y etiquetándolo con el código definido para cada accesión, hasta su acondicionamiento y siembra en la Universidad de Córdoba y Corpoica – Nataima.

El material de tipo sexual fue tomado de los árboles, se colectaron frutos en buen estado fitosanitario, que fueron sometidos a revisión, registro de descriptores de los frutos (forma y tamaño) y registro fotográfico. El almacenamiento se hizo en bolsas de papel debidamente codificadas y guardadas en neveras de icopor, que fueron llevados al Laboratorio de Recursos Fitogenéticos (UN, Sede Bogotá), para su posterior beneficio. Este material constituye el banco de semillas (UN) y los bancos de campo (Universidad de Córdoba y Corpoica – Nataima).

En el proceso, el beneficio de frutos y extracción de semillas, se hizo manualmente, teniendo en cuenta el procedimiento base para la extracción de semillas en frutos carnosos (Rao *et al*., 2007) y para el procesamiento de semillas (CONIF, 1996), a partir del cual se procedió a revisar y seleccionar los frutos, extraer la pulpa y las semillas. La etapa de registro contempló la codificación de las accesiones por medio del uso de algunos de los descriptores de pasaporte (accesión y recolección) definidos en el presente estudio.

El proceso de limpieza y secado de las semillas se hizo de manera manual, por medio de la revisión de semillas y el secado (al aire libre y bajo sombra). La etapa de empaque y almacenamiento se llevó a cabo en bolsas de papel, mientras se depositaban en los envases de almacenamiento final (envases transparentes de vidrio, provistos de tapa), dentro de un refrigerador a una temperatura promedio de 7°C con su respectiva etiqueta. Este material se encuentra en el Laboratorio de Recursos Fitogenéticos de UN (Sede Bogotá, Facultad de Ciencias Agrarias). Las labores de mantenimiento que se han llevado a cabo se relacionan con la inspección visual del estado fitosanitario de las semillas y la eliminación del material vegetal en mal estado.

El material destinado al análisis molecular, se seleccionó de los individuos evaluados, tomando de tres a seis hojas en un estado de madurez intermedia y en buen estado fitosanitario. Posteriormente se depositaron en servilletas (a manera de sobre) dentro de bolsas ziploc con gel de sílice en su interior, para favorecer el proceso de secado y evitar su deterioro. Cada bolsa (debidamente codificada) se almacenó en una nevera de icopor con hielo seco en su interior, para favorecer el proceso de conservación del material mientras se llevaba al laboratorio. Una vez en las instalaciones de la UN, este material se

almacenó en refrigeradores a -20°C y a -80°C en el Laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, para su posterior análisis.

Para la evaluación y conservación *ex situ* del germoplasma, se estableció el banco de germoplasma (BGP) de orden institucional (banco de semillas y bancos de campo), cuyas colecciones son consideradas de "trabajo" principalmente (Rao *et al.*, 2007), ya que aunque fueron establecidas con objetivo de conservación, no son objeto de procesos de regeneración, multiplicación ni distribución, pero sí de caracterización y evaluación. En este proceso se tuvieron en cuenta los lineamientos contenidos en el Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma (Rao *et al*., 2007), la Guía para la documentación de recursos genéticos (Painting *et al*., 1993), las Normas para los bancos de genes (FAO e IPGRI, 1994) y la Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma (Engels y Visser, 2007). La codificación de las accesiones se definió por la ubicación geográfica (departamento, municipio), el nombre de la especie y el número consecutivo de colecta.

Es preciso aclarar que en el presente estudio, el término de "población", no se refiere a un grupo de organismos de la misma especie que ocupan un lugar particular en un tiempo particular (Krebs, 1994; Roughgarden *et al*., 1989), sino que se refiere al conjunto total de accesiones de todas las especies incluidas; ésta se podría concebir entonces, como una población construída.

1.4 Resultados

1.4.1 Banco de semillas

Este banco es denominado como de mediano plazo, ya que el material ha sido almacenado a una temperatura promedio de 7°C, desconociendo a la fecha su viabilidad, puesto que el trabajo en esta fase finalizó con el establecimiento del banco, para proseguir con el proceso de evaluación morfológica y molecular. Las labores que se han realizado posteriormente, se relacionan específicamente con la inspección del estado fitosanitario.

El método de almacenamiento se definió con base en la información suministrada por investigadores que afirman que las especies *A. cherimola* (chirimoya) y *A. muricata* (guanábana), son “especies frutales con semilla ortodoxa” (Lobo *et al.*, 2007) y que “las semillas de *Annona* pueden conservarse en bancos de genes a temperaturas inferiores a 18°C, almacenadas en recipientes herméticos a un contenido de humedad de 5 ± 1%” (Pinto *et al*., 2005).

El banco de semillas cuenta actualmente con material de 164 accesiones provenientes de 16 departamentos y 72 municipios de Colombia de cinco especies y un híbrido interespecífico, e integra tanto las semillas que fueron colectadas por el equipo técnico del proyecto marco (año 2009), como aquellas obtenidas en la prospección realizada en los años 2010 y 2011 (Fotografía 1-1).

Fotografía 1-1. Banco de semillas de especies de la familia Annonaceae (Universidad Nacional de Colombia).

Refrigerador de almacenamiento de semillas

Organización por grupos de accesiones en estantes

Semillas almacenadas en frascos de vidrio debidamente codificados

De un total de 247 accesiones evaluadas en campo (Tabla 1-1), el 33,60% (provenientes de siete departamentos y ocho municipios), no cuenta con semilla disponible en la colección de trabajo, ya que no fue posible colectar frutos en el momento de la evaluación, no se logró obtener semilla de calidad (semillas no desarrolladas) o porque el individuo se encontraba muerto (o había sido eliminado) en el momento de la evaluación. Lo anterior sucedió con las accesiones presentes en los sitios que fueron visitados en más de una ocasión. La relación del número de accesiones con material vegetal disponible en el BGP y su procedencia se observa en la Tabla 1-2 y en la Figura 1-1.

Tabla 1-1: Número de accesiones de Annonaceae evaluadas en campo por periodo de tiempo de colecta.

ESPECIE	N° DE ACCESIONES EVALUADAS POR AÑO			N° TOTAL DE ACCESIONES EVALUADAS
	2009	2010	2011	
Annona cherimola	8		12	20
Annona glabra	6	1	3	10
Annona purpurea	1			1
Annona reticulata	4	4	29	37
Annona squamosa	47	46	80	173
Annona squamosa x A. cherimola	3		1	4
Rollinia sp			2	2
TOTAL GENERAL	**69**	**51**	**127**	**247**

Tabla 1-2: Número de accesiones de Annonaceae con semilla disponible en el banco.

ESPECIE	SEMILLA DISPONIBLE EN BGP	SEMILLA NO DISPONIBLE EN BGP	TOTAL	% SEMILLA DISPONIBLE
Annona cherimola	12	8	20	4,86%
Annona glabra	9	1	10	3,64%
Annona purpurea	1		1	0,40%
Annona reticulata	20	17	37	8,10%
Annona squamosa	119	54	173	48,18%
Annona squamosa x A. cherimola	3	1	4	1,21%
Rollinia sp		2	2	0,00%
TOTAL GENERAL	**164**	**83**	**247**	**66,40%**

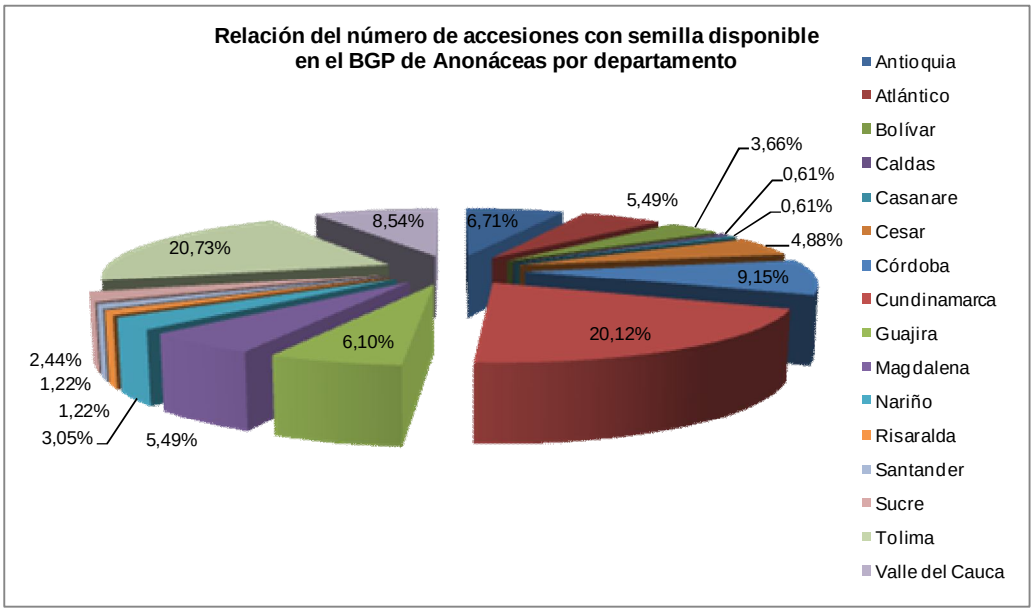


Figura 1-1: Número de accesiones por departamento con material disponible en el banco de semillas.

Actualmente, el banco cuenta con la colección de semilla de cinco especies y un híbrido interespecífico (Fotografía 1-2), colección en la cual las especies más representativas son *A. squamosa* (48,18%) y *A. reticulata* (8,10%) (Figura 1-2). De igual manera, cuenta

con semilla de algunas otras especies del género *Annona* de interés para iniciar un programa de fitomejoramiento de especies de la familia Annonaceae en el país.

Fotografía 1-2. Semillas de las especies de la familia Annonaceae que conforman la colección de trabajo.

Annona cherimola *Annona glabra* *Annona reticulata*

Annona squamosa *Annona squamosa x A. cherimola* *Annona purpurea*

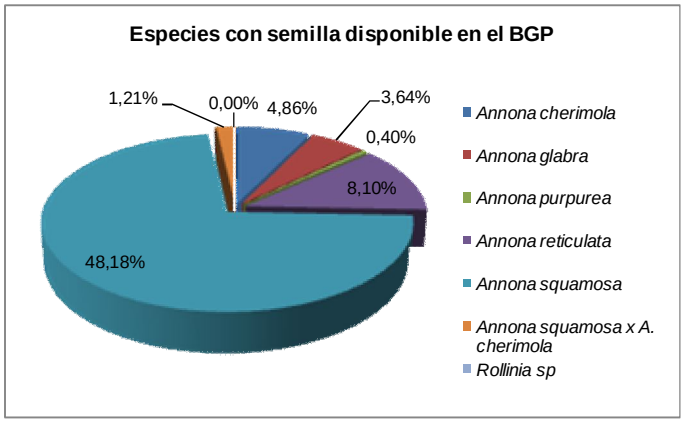


Figura 1-2: Especies con semilla disponible en el banco de semillas de Anonáceas.

Un diagnóstico de la colección permite identificar que la mayoría de los materiales provienen de individuos presentes en ciudades y/o centros poblados (41,70%) y en fincas (campo; 16,19%), su condición biológica es “cultivar / raza local / variedad tradicional” (61,13%) y no provienen generalmente de un sistema de cultivo (63,16%). De igual manera es posible identificar que solamente cinco accesiones (2,02%) se encuentran en predios de grupos étnicos (Chenche – Angostura, presente en el municipio de Coyaima-Tolima)[1] y su historia se remite al uso ancestral o indígena. En contraste, la mayoría de individuos de los cuales fue colectado el material vegetal que conforma la colección, fueron introducidos en los sitios donde se encontraban, desconociendo generalmente, el momento en el que fueron sembradas las plantas.

La relación de cantidad de material almacenado en la colección de trabajo, denota que la mayor cantidad de semilla disponible corresponde a las especies de mayor

[1] A través del contacto con líderes de la zona (establecidos en previas colectas por el equipo del proyecto), se hizo la colecta de material vegetal en las fincas de algunas familias.

representatividad en la colección (*A. squamosa* y *A. reticulata*), alcanzando una cantidad aproximada de 13.977 semillas (Tabla 1-3).

Tabla 1-3: Relación de la cantidad de semilla por especie, almacenada en la colección de trabajo.

ESPECIE	NÚMERO TOTAL DE SEMILLAS
Annona squamosa	10.367
Annona reticulata	1.767
Annona glabra	1.190
Annona cherimola	589
Annona squamosa x A. cherimola	39
Annona purpurea	25
TOTAL GENERAL	**13.977**

Al comparar las características de tamaño, forma, color y peso promedio de las semillas de las especies que conforman la colección de trabajo con una muestra de semilla de *A. muricata*, se observa la variedad morfológica. En general, las semillas son de forma elipsoidal, de contorno redondeado, lisas y brillantes (excepto *A. purpurea*), presentan varias tonalidades de color marrón (excepto *A. purpurea* y *A. glabra*), son livianas y de tamaño medio (entre 1 y 2 cm, excepto *A. reticulata* y *A. squamosa* que son más pequeñas) (Tabla 1-4 y Fotografía 1-3).

Tabla 1-4: Principales características de las semillas almacenadas en la colección de trabajo.

ESPECIE	DIÁMETRO POLAR (mm)	DIÁMETRO ECUATORIAL (mm)	PESO DE 10 SEMILLAS (g)	COLOR DE LA SEMILLA FRESCA
Annona cherimola	17,09	9,65	5,50	Chocolate
Annona glabra	17,1	10,41	2,60	Oro oscuro
Annona purpurea	30,32	14,09	13,00	Púrpura oscuro
Annona reticulata	13,28	6,48	1,30	Marrón oscuro
Annona squamosa	11,62	8,58	2,30	Marrón oscuro
Annona squamosa x A. cherimola	16,11	9,76	4,30	Marrón oscuro
Annona muricata	18,05	11,46	5,80	Marrón claro

Fotografía 1-3. Comparación visual de las semillas de especies de la familia Annonaceae que conforman la colección de trabajo.

De izq a der: *A. purpurea, A. squamosa*cherimola, A. muricata, A. cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa*
La única especie que no hace parte del banco es *A. muricata* (guanábana), que fue incluida aquí como parámetro de comparación. El banco de semillas no cuenta con semilla de *Rollinia sp.*, debido a que no fue posible obtenerla durante la colecta.

Dentro del proceso de documentación de la etapa de prospección, colecta y establecimiento de la colección de trabajo de especies de la familia Annonaceae, se elaboraron las fichas técnicas de todas las accesiones de la población *in situ*, en las cuales se registró la información básica de identificación, ubicación geográfica y registro fotográfico. Esta información complementa la obtenida en el proyecto “Establecimiento

del Banco de Germoplasma Colombiano de Anón (*Annona squamosa* L.)", bajo el cual se desarrolló la presente investigación. Un ejemplo de la ficha técnica se presenta en la Figura 1-3.

Ficha técnica (información básica)	
Accesión No.	**T4AS151**
Nombre científico	*Annona squamosa*
Nombre común	Anón
Ubicación geográfica	
Departamento	Tolima
Municipio	Carmen de Apicalá
Vereda, inspección o corregimiento	Casco urbano
Latitud	N 4 08 47.7
Longitud	W 74 43 17.4
Altura (msnm)	331

Registro fotográfico	
Árbol	Hojas
Flores	Frutos
Semillas	Estacas

Figura 1-3: Ejemplo de la ficha técnica elaborada por cada accesión que conforma la población *in situ*.

1.4.2 Banco de campo

El banco de campo tiene por objetivo principal la conservación a largo plazo de RFG a nivel nacional, pero de igual manera busca sentar las bases para el desarrollo de un programa de mejoramiento genético (PMG) de las especies de la familia Annonaceae, junto con el desarrollo de trabajos de caracterización y evaluación.

Estos bancos se encuentran en las instalaciones de la Universidad de Córdoba (Montería, Córdoba) y Corpoica – Nataima (Espinal, Tolima), bajo la supervisión de la Universidad Nacional de Colombia (Fotografía 1-4); se establecieron durante el desarrollo del proyecto de investigación marco y fueron complementados y documentados a partir del desarrollo de la presente investigación.

Están compuestos por 198 accesiones (100 en el banco de Corpoica – Nataima y 98 en el banco de la U. de Córdoba), que fueron colectadas entre los años 2009 y 2011, fueron propagadas y actualmente son objeto de monitoreo por los profesionales de las dos entidades. El tipo de propagación empleada para la conformación de las colecciones fue sexual y/o asexual, y existe una cantidad considerable de accesiones que se encuentran igualmente en el banco de semillas.

Fotografía 1-4. Bancos de campo de especies de la familia Annonaceae.

Universidad de Córdoba
(Montería, Córdoba)

CORPOICA – Nataima
(Espinal, Tolima)

Con respecto al número especies que conforman los bancos de campo y a su procedencia, el banco de Corpoica – Nataima, está compuesto por accesiones de cinco especies (*A. cherimola, A. glabra, A. purpurea, A. reticulata, A. squamosa*), provenientes de 13 departamentos y 35 municipios, mientras que el banco de la U. de Córdoba lo conforman accesiones de cuatro especies (*A. cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa*), provenientes de 14 departamentos y 38 municipios. Según los investigadores de los bancos de campo, el número de plantas que conformaban las colecciones era de 321 (año 2012) y de 211 (año 2011), información que deberá actualizarse progresivamente.

De aquellas accesiones que solo se encuentran en campo (provenientes de colectas del año 2009), no se dispone de información de pasaporte, por lo que no se tiene certeza de su procedencia y por ende, de su duplicidad tras nuevas colectas. Un análisis molecular detallado permitiría establecer relaciones de parentesco o duplicidad del material vegetal. Es igualmente necesaria, la evaluación morfológica de estas colecciones.

La presencia de accesiones por especie en los bancos de campo, deja ver que la mayor cantidad de accesiones corresponden a la especie *A. squamosa* (Figura 1-4) y que infortunadamente no se cuenta con la información completa de la especie y de los datos de pasaporte de 44 accesiones (22,22% de las colectadas en el año de 2009). No obstante, a futuro, podría hacerse una identificación botánica, para complementar el registro.

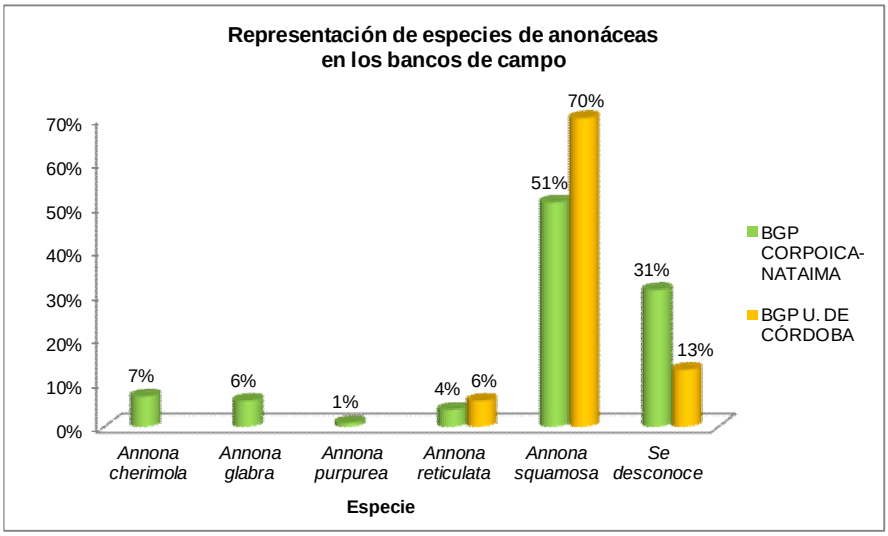


Figura 1-4: Representación de especies de anonáceas en los bancos de campo.

Por otra parte, durante la etapa de prospección y colecta que se llevó a cabo entre diciembre de 2010 y junio de 2011, se recolectó material vegetal para el análisis molecular (hojas) de 155 accesiones, correspondiente a cuatro especies y un híbrido interespecífico (*A. squamosa x A. cherimola*) de la población *in situ* de Anonáceas del país (Tabla 1-5); material proveniente de 13 departamentos y 48 municipios.

Tabla 1-5: Especies que conforman la colección de material vegetal de Anonáceas (población *in situ*) para análisis molecular.

ESPECIE	N° DE IND	%
Annona squamosa	111	71,61%
Annona reticulata	28	18,06%
Annona cherimola	12	7,74%
Annona glabra	3	1,94%
Annona squamosa x A. cherimola	1	0,65%
TOTAL	**155**	**100%**

Posteriormente (junio de 2012), se colectó material vegetal de 115 accesiones presentes en los bancos de campo, así: 33 accesiones del Banco de la U. de Córdoba (39,76%) y 82 del Banco de Corpoica – Nataima (98,80%), correspondiente a las especies *A. cherimola, A. glabra, A. purpurea, A. reticulata* y *A. squamosa*. No obstante, el material empleado para el análisis molecular fue el propagado por vía asexual y corresponde a las especies *A.squamosa y A. reticulata*.

1.5 Discusión

Según el Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y El Caribe, que maneja la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación – FAO y Bioversity International (antes IPGRI) – IPGRI, 2000, las especies anón, chirimoya, atemoya y anona corazón, cuentan con colecciones de germoplasma de importancia en la conservación *ex situ* de sus RFG.

Según los registros, la especie *A. squamosa* está presente en 13 colecciones de germoplasma de centros de investigación y estaciones experimentales en los países de Brasil, Costa Rica, Cuba, Ecuador, Francia, Granada (América del Norte), Jamaica y México (IPGRI, 2000 y Araújo *et al.*, 2002), siendo el número de accesiones inferior a 12, excepto por la Empresa Brasilera de Investigación Agrícola de Pernambuco (IPA), que reporta 85 accesiones silvestres brasileras (IPGRI, 2000). En tanto que la especie *A. cherimola* está presente en 15 colecciones de germoplasma de centros de investigación, estaciones y granjas experimentales, universidades y bancos de germoplasma en los países de Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, España, Francia, México y Perú (IPGRI, 2000; Araújo *et al.*, 2002 y Escribano *et al.*, 2008a y 2008b), los cuales tienen en sus colecciones un pequeño número de accesiones, excepto por el Centro Andino de Tecnología Rural (CATER) de la Universidad Nacional de Loja, que reporta 150 accesiones silvestres de Ecuador y la Granja Experimental de Tumbaco -INIAP (Ecuador), que reporta 66 variedades tradicionales (IPGRI, 2000).

Según el directorio, la especie *A. reticulata* cuenta con el reporte de variedades en 10 colecciones de Brasil, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Francia, Guatemala y República Dominicana (IPGRI, 2000) y un número no superior a seis accesiones. Mientras que el híbrido *Annona cherimola x A. squamosa* se encuentra presente en dos colecciones de germoplasma en Costa Rica y Francia, que no superan las dos accesiones (IPGRI, 2000). Como se observa en el anterior reporte, la representatividad de algunas especies de la familia Annonaceae en colecciones de germoplasma a nivel mundial es alta con respecto a los países que salvaguardan sus recursos, pero no lo es con relación al número de accesiones y variedades allí presentes, excepto para *A. cherimola*, una especie comercial de interés a nivel mundial.

En Colombia, se tiene conocimiento del establecimiento de bancos de semillas y de campo de *A. muricata* por el Instituto de Investigaciones Amazónicas -SINCHI (MADR, 1995) y de bancos de campo de *A. cherimola* y *A. muricata* por Smurfit Cartón de Colombia (Wright, 1995) y de *A. cherimola* por Corpoica La Selva (IPGRI, 2000); pese a esto, se desconoce la actual existencia de algunos bancos. Por lo tanto, la conformación de la colección de trabajo de semillas y las colecciones de campo relacionadas en el presente estudio, constituyen un aporte considerable en la conservación *ex situ* de sus recursos fitogenéticos, ya que agrupan accesiones provenientes de 16 departamentos y 72 municipios de la región Andina y Caribe Colombiana, y están representadas por seis especies (*A. cherimola, A. glabra, A. purpurea, A. reticulata, A. squamosa y Rollinia sp.*) y un híbrido interespecífico (*A: squamosa x A. cherimola*). Este aspecto es de igual manera relevante en comparación con la representatividad en el número de accesiones presentes en colecciones de germoplasma reportadas por Bioversity International en el Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y El Caribe -IPGRI (2000).

A través de la prospección de los recursos fitogenéticos de especies de la familia Annonaceae desarrollada en el presente estudio, fue posible ampliar las zonas de colecta de material vegetal para las especies *A. squamosa y A. reticulata*, con respecto a las reportadas por el equipo técnico del Proyecto "Establecimiento del Banco de Germoplasma Colombiano de Anón (*Annona squamosa* L.)", teniendo en cuenta que en el diseño de colecta se identificaron para *A. squamosa y A. reticulata* un total de 11 y siete departamentos como de distribución potencial, y en el estudio se colectó material en 12 y ocho departamentos respectivamente.

En cambio, para la especie *A. cherimola* la zona de colecta se redujo de siete a dos departamentos, debido a que durante esta etapa, las labores se enfocaron en la colecta de material vegetal para la especie de estudio del programa de investigación (*A. squamosa*). Sin embargo, la colección *ex situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia se enriqueció a través de la colecta de material vegetal de *A. glabra, A. purpurea, A. squamosa x A. cherimola y Rollinia sp.,* en dos departamentos como máximo por especie. Los resultados obtenidos de la etapa de prospección y colecta del presente estudio, representan un aporte significativo en la documentación y conformación de la colección de trabajo de especies de la familia Annonaceae en Colombia.

Dentro de los principios fundamentales para el establecimiento y manejo de los BGP definidos por la FAO (2012) se encuentra: a) La correcta identificación de las accesiones, b) El mantenimiento de la viabilidad, la integridad genética y la calidad de las muestras de semillas en los BGP, c) El mantenimiento de la integridad genética, d) El mantenimiento de la sanidad del BGP, e) La seguridad física de las colecciones, f) La disponibilidad y uso del germoplasma, g) La disponibilidad de la información, y h) La gestión proactiva de los BGP. De los anteriores principios, durante el periodo comprendido entre el 2009 y el 2011 se cumplieron los relacionados con la correcta identificación de los materiales, a través del registro de los descriptores de pasaporte (accesión y recolección), junto con la codificación completa de las accesiones y la georeferenciación de los individuos de la población *in situ*. Se ha procurado igualmente la integridad genética y la calidad de las muestras de semillas, a través de la implementación de procesos adecuados de recolección y procesamiento, quedando pendiente la determinación periódica de la viabilidad de las semillas y la regeneración de las accesiones propagadas sexualmente. En el proceso, se procuró obtener muestras representativas de la población y colectar semillas de buena calidad y en cantidad suficiente.

El mantenimiento de la sanidad ha sido otro principio relevante en el monitoreo de los BGP de Anonáceas, al realizar la revisión periódica y la eliminación los materiales con problemas fitosanitarios. También lo ha sido la seguridad física de las colecciones, sobretodo en el banco de semillas, al contar con un sistema adecuado de seguridad que garantiza que los equipos de refrigeración se encuentren en buenas condiciones de funcionamiento y los eventos externos no sean causales del deterioro de los mismos. En el caso de los bancos de campo, los factores ambientales están por fuera de control, ya que estos bancos se encuentran en sitios descubiertos, pero en el interior de predios privados, lo que evitaría en parte, daños ocasionados por el hombre.

El banco de semilla resulta ser una excelente fuente de RFG de las especies de la familia Annonaceae, pero en el momento de su establecimiento, se desconocían algunas características fisiológicas, que podrían estar condicionando el periodo de

almacenamiento y longevidad del material vegetal, aunque se consideró como base de trabajo para el almacenamiento de las semillas, los aportes hechos por Lobo *et al.* (2007) y Pinto *et al*. (2005), quienes afirmaron que las especies *A. cherimola* y *A. muricata*, son "especies frutales con semilla ortodoxa" (Lobo *et al.*, 2007) y que "las semillas de *Annona* pueden conservarse en bancos de genes bajo temperaturas inferiores a 18°C, almacenadas en recipientes herméticos a un contenido de humedad de 5 ± 1%" (Pinto *et al.,* 2005). Por lo tanto, los materiales almacenados en este banco podrían no presentar una alta viabilidad y podría correrse el riesgo de perder parte de los recursos allí almacenados, ya que no se han hecho evaluaciones de la efectividad del uso de tapas con respecto al intercambio de humedad de la semilla con el medio externo. Este tipo de análisis deberá considerarse en futuras investigaciones.

Sin embargo, paralelo al desarrollo del presente estudio, se llevó a cabo la investigación titulada "Caracterización morfoanatómica de semillas de anón (*A. squamosa* L.) y evaluación de algunos parámetros fisiológicos del proceso de germinación y latencia" (Martínez, 2012), que brinda aportes en el conocimiento de la germinación y la latencia de las semillas de anón bajo el uso de tratamientos pregerminativos. Martínez (2012) concluyó que las semillas de *A. squamosa* L. presentan latencia de tipo endógena (fisiológica y morfológica) y exógena (mecánica), son dependientes de la temperatura para su germinación (se recomienda una temperatura de 35°C) y su testa no presenta un impedimento para la absorción de agua. A partir de esa investigación el autor determinó que la temperatura ambiente durante 60 y 120 días es las más adecuada para el almacenamiento, ya que se observan altos valores de porcentaje de germinación (>80%), velocidad media de germinación (>0,15 semillas germinadas/día), valores menores de tiempo medio de germinación (< 7 días) y altos niveles de sacarosa (incremento del 72,3%), lo cual es debido a una posible superación de la latencia presente de forma natural, lo que garantiza la germinabilidad durante el periodo de almacenamiento.

Con respecto a los bancos de campo, es conveniente mencionar que en el momento de su establecimiento no se tenía suficiente conocimiento sobre algunos parámetros biológicos de relevancia en el proceso de conservación del material vegetal, como lo es el método de propagación y las características fisiológicas de las semillas de las especies, motivo por el cual, el número de plantas presentes por accesión en los bancos de campo es variable (1 a 4), al igual que lo es por especie. Rao *et al.* (2007), afirman que para reducir al mínimo la deriva genética en los BGP, se debe sembrar un número adecuado de plantas y muestrearlas. Según IPGRI y Cornell University (2004), la deriva genética se refiere a las fluctuaciones en las frecuencias alélicas que ocurren por casualidad (en particular en las poblaciones pequeñas) como resultado del muestreo al azar entre los gametos. La deriva disminuye la diversidad dentro de una población, porque tiende a causar la pérdida de alelos poco usuales, reduciendo el número total de alelos.

Aunque la cantidad de material vegetal disponible en el momento de colecta estaba sujeta a la etapa fenológica de la planta y a su estado fitosanitario, en un principio, el BGP de anonáceas se trato como una estrategia de "rescate" de RFG, pero no como una "colección viva" que debía estar bien documentada. Las fallas que se presentaron en el procedimiento de registro de información de las primeras colectas (año 2009), pueden ser un factor que incide en la cantidad de material disponible en campo y en el desconocimiento de la procedencia de algunas de las accesiones colectadas en periodos anteriores al año 2010. Aun así, las colecciones de trabajo cuentan con la presencia de varias especies y con un número considerable de accesiones (de las especies más

representativas) que provienen de varios sitios de colecta, lo que permitiría a futuro, el enriquecimiento de los bancos de campo por medio de la reproducción del banco de semillas, así como la evaluación morfológica y molecular de las colecciones vivas (bancos de campo) y el fortalecimiento del programa de mejoramiento a implementar.

1.6 Conclusiones

La prospección de recursos fitogenéticos de especies de la familia Annonaceae en Colombia, desarrollada durante los años 2009 y 2011 en 16 departamentos y 72 municipios de la zona Andina y Caribe colombianas, permitió la evaluación en campo de 247 accesiones de seis especies y un híbrido interespecífico (*Annona squamosa, A. reticulata, A. cherimola, A. glabra, A. purpurea, Rollinia sp.* y *Annona squamosa x A. cherimola*) a partir de la cual se enriqueció el banco de semillas y se establecieron dos colecciones de trabajo como bancos de campo.

Con respecto a su conformación, el mayor número de especies y de accesiones se encuentra en el banco de semillas, compuesto por 164 accesiones de cinco especies y un híbrido interespecífico (*Annona squamosa, A. reticulata, A. cherimola, A. glabra, A. purpurea* y *Annona squamosa x A. cherimola*), contrario a los bancos de campo que están compuestos por 198 accesiones de cinco especies (*A. cherimola*, *A. glabra*, *A. purpurea*, *A. reticulata* y *A. squamosa*). Actualmente, se cuenta con 62 accesiones de las especies *A. cherimola, A. glabra, A, reticulata y A. squamosa*, presentes en las dos colecciones (semillas y campo). Una mirada previa al desarrollo de esta investigación, denota la relevancia del estudio a nivel nacional, fundamentada en la conformación de colecciones de trabajo que sientan las bases para el desarrollo de un programa de fitomejoramiento en especies de la familia Annonaceae en Colombia.

La representatividad de las especies en las colecciones de trabajo se atribuye principalmente al objetivo del proyecto marco, a través del cual se establecería el Banco Colombiano de Germoplasma de anón (*A. squamosa*), no obstante, incidieron también la amplia distribución geográfica y la abundancia de la especie en las zonas de colecta. Cabe resaltar que la colección de trabajo está conformada por accesiones de especies relacionadas (*A. reticulata, A. glabra, A. purpurea, A. cherimola, A. cherimola x A. squamosa y Rollinia sp*) que se encontraban presentes en las zonas de estudio y que no fueron contempladas al iniciar la investigación, constituyéndose en una colección base para el desarrollo de nuevos estudios en el área. Aunque no se colectó material vegetal en todas las zonas identificadas como de distribución potencial de las especies, a través del estudio se logró muestrear un mayor número de departamentos y municipios en las zonas Caribe y Andina colombianas, reduciendo así, la brecha en la representación geográfica a nivel nacional.

Las colecciones de trabajo establecidas a través del desarrollo de la presente investigación superan notablemente a las reportadas en el Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y El Caribe (IPGRI, 2012), con respecto al número de accesiones que las conforman. En los bancos de germoplasma incluidos en este directorio se reporta a las especies *A. squamosa, A. cherimola, A. reticulata y A. cherimola x A. squamosa*; en contraste, el banco de semillas y los bancos de campo de especies de la familia Annonaceae en Colombia, cuentan con la representación de *A.*

glabra, A. purpurea y *A. squamosa x A. cherimola*, lo que contribuye en el enriquecimiento de las colecciones a nivel nacional y posiblemente a nivel internacional.

Estas colecciones (banco de semilla y bancos de campo) se caracterizan por contener accesiones colectadas en ciudades y/o centros poblados y fincas, y su condición biológica es "cultivar / raza local / variedad tradicional". Esto denota la necesidad de incluir en próximas colectas, materiales silvestres y otros provenientes de cultivos, que enriquezcan la colección y fortalezcan la evaluación a nivel morfológico y molecular, con miras al establecimiento de un programa de mejoramiento genético. No obstante, su conformación inicial se convierte en una estrategia de conservación *ex situ* de sus recursos fitogenéticos.

El presente estudio se constituye en el primer trabajo de colecta estructurada para especies de la familia Annonaceae en el país y sienta las bases para el desarrollo de nuevas investigaciones en el área de genética y fitomejoramiento.

1.7 Recomendaciones

Teniendo en cuenta las características de las actuales colecciones de trabajo de anonáceas en Colombia y las recomendaciones para el manejo de bancos de germoplasma hechas por Rao *et al.* (2007) y Engels y Visser (2007), se recomienda que las entidades que manejan las actuales colecciones las enriquezcan y regeneren por medio de la colecta en las poblaciones *in situ* de un número mayor de individuos por especie (según la disponibilidad en campo) a los colectados en el presente estudio, se mantengan las mismas especies contempladas en el presente estudio (seis especies y un híbrido interespecífico), se amplien las zonas de colecta en municipios y departamentos de las regiones naturales del país y se incluyan en el futuro, individuos silvestres, cultivos comerciales y colecciones *ex situ*.

Podría considerarse entonces, trabajar en la actualización del diseño de colecta, bajo los objetivos de rescate de recursos fitogenéticos de las especies en mención y de uso inmediato para el enriquecimiento de las colecciones de trabajo, teniendo como estrategia una colecta centralizada, a través del desarrollo de visitas de exploración en las regiones Amazonía, Andina, Caribe, Orinoquía y Pacífico. Como estrategia de muestreo podría definirse el número de poblaciones conforme el número de departamentos visitados, colectando material vegetal de las poblaciones *in situ* bajo un muestreo al azar, de selección independiente (de características de productividad) partiendo de criterios de presencia, distribución geográfica, estado fitosanitario y estado fenológico.

Será preciso considerar a futuro el aporte hecho por Engels y Visser (2007) quienes afirman que manejar con efectividad el germoplasma en un banco requiere contar con cierta información básica sobre la biología de la floración y de la producción de semillas, sobre los sistemas de polinización, las características fisiológicas de la semilla (latencia y germinación) y su capacidad de almacenamiento, los modelos de diversidad genética y los métodos para mantener la integridad de una población aplicando prácticas de cultivo apropiadas; tratándose de materiales vegetativos, hay que conocer el tipo de propagación y de crecimiento del cultivo de tejidos en condiciones *in vitro*. Lo anterior, podría considerarse para desarrollar nuevas investigaciones en las especies de estudio o en especies perennes como los frutales, ya que las labores de establecimiento y

mantenimiento de los BGP suelen ser amplias y en algunos casos la viabilidad de la semilla y la sobrevivencia de las plantas en campo no garantizan la permanencia de los recursos genéticos en el tiempo.

Según Adams (1997), un método de almacenamiento a largo plazo es la recolección de material rico en ADN, como las hojas y los nódulos de la raíz, trabajo que puede hacerse con poco esfuerzo adicional cuando los especímenes se recolectan para herbarios o para BGP. Al respecto, Engels y Visser (2007) afirman que el almacenamiento del ADN nunca puede sustituir el almacenamiento de materiales vivos, ya sea en semilla, en tejidos *in vitro* o en materiales crioconservados. Esta estrategia de conservación podrá considerarse a futuro para la colección de trabajo de especies de la familia Annonaceae, una vez se hayan estandarizado por especie los procesos de extracción y amplificación de ADN.

Se recomienda contemplar a futuro, el modelo de conservación dinámica de la variabilidad de *A. cherimola* (chirimoya) y *A. muricata* (guanábana) propuesto por Lobo *et al.* (2007) para especies frutales con semilla ortodoxa, que consiste en mantenimiento en colecciones de campo de un número limitado de individuos por accesión, y a largo plazo, el mantenimiento de colecciones de semillas de un mayor número de árboles de cada población como banco base, aspecto que permite mejor una representación de la variabilidad intrapoblacional. Lo anterior, se complementa con la obtención periódica de semillas de polinización abierta provenientes de la colección de campo, lo que permite el enriquecimiento genético, útil para procesos de evaluación y selección de nuevos materiales por parte de los investigadores y usuarios del germoplasma.

De igual manera, contemplar para las especies de la familia Annonaceae que conforman las colecciones de trabajo, las labores de premejoramiento, por medio de la ampliación de la base genética del cultivo, la documentación del germoplasma y la transferencia de atributos de importancia a partir de taxa relacionados y materiales “primitivos” (Lobo, 2006).

2. Evaluación morfológica de una población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia

2.1 Resumen

A partir de la prospección de recursos fitogenéticos de la familia Annonaceae en Colombia, se conformó una población *in situ* compuesta por 167 accesiones, de cinco especies y un híbrido interespecífico (*Annona cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa, Rollinia sp. y A. squamosa x A. cherimola*), distribuidas en 13 departamentos y 48 municipios. Se caracteriza por estar mejor representada por las especies *A. squamosa* y *A. reticulata* (117 y 32 accesiones), contar con materiales de cultivares tradicionales que provienen de ciudades o centros poblados, que no hacen parte de sistemas de cultivos y se encuentran en un rango altitudinal amplio. En esta población, predominan los individuos de porte arbolito, hojas elípticas, frutos cordiformes y redondos, que en su mayoría, se pueden catalogar como frutos comunes. La evaluación morfoagronómica a través del uso de 39 descriptores cuantitativos y cualitativos definidos para *A. cherimola*, permitió identificar en *A. squamosa* y *A. reticulata*, que los rasgos fenotípicos que se relacionan con la calidad del fruto (tamaño, peso, simetría, grados brix, pH, acidez, peso y número de semillas) son los que diferencian los conglomerados conformados. En el estudio, se obtuvieron seis grupos de accesiones para la especie *A. squamosa* y cuatro grupos para *A. reticulata*, notando que en *A. squamosa* la mayor cantidad de accesiones morfológicamente similares, provienen de los departamentos de Atlántico, Casanare, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Sucre, Tolima y Valle del Cauca, mientras que en *A. reticulata* provienen de los departamentos de Tolima, Valle del Cauca, Santander y Córdoba.

2.2 Introducción

La importancia alimenticia e industrial que tienen algunas especies de la familia Annonaceae, ha dado origen al desarrollo de variedades comerciales reconocidas a nivel mundial, como en el caso de la chirimoya (*A. cherimola*) – CERESPAIN (2011) y la atemoya (*A. squamosa x A. cherimola*) - Queesland Horticulture Institute (1999), producto de un largo proceso de mejoramiento genético, que ha permitido la identificación de plantas con características agronómicas deseables a nivel comercial, que hoy día, demarcan el mercado de frutales de esta familia.

Es así, como centros de investigación y universidades, han desarrollado estudios para evaluar la variabilidad genética existente por medio de la caracterización morfológica de poblaciones, colecciones *in situ*, bancos de germoplasma (BGP) y cultivares de chirimoya

y guanábana en países como Bolivia (Martínez, 2007), Colombia (Márquez, 2009), Costa Rica (Tacán, 2007), México (Alavéz-López, 2000; Lozano *et al*., 2003; Andrés-Agustín *et al*., 2004; Andrés-Agustín *et al.*, 2006) y Nicaragua (Benavides, 2004). En algunos casos, estas evaluaciones han sido complementadas posteriormente con la caracterización molecular en especies de interés como la chirimoya (Andrade, 2009) y el anón (Salazar *et al*., 2010).

Dentro de la caracterización del germoplasma se contempla el estudio de la variabilidad genética de colecciones, en las cuales la evaluación de los caracteres cualitativos y cuantitativos, que se transmiten a la descendencia del germoplasma en cualquier ambiente, se conoce como caracterización y permite determinar el grado de similitud entre las accesiones por medio de su apariencia morfológica o fenotipo y de variabilidad en la colección (Ligarreto, 2003). Por esta razón, desde hace años, se han venido desarrollado estudios a nivel morfológico en especies de importancia agroalimentaria, como en el caso del aguacate (Rodríguez-Medina *et al*., 2003), el cacao (Martínez, 2007) y la uchuva (Trillos *et al*., 2008), entre otras especies. En Colombia, los estudios en especies de la familia Annonaceae son pocos y los existentes se han centrado en especies comerciales, dejando de lado especies promisorias como el anón. Para el establecimiento de un programa de mejoramiento de especies de la familia Annonaceae en el país y la conformación de un banco de germoplasma de anón, es preciso desarrollar la evaluación morfológica de las colecciones de trabajo establecidas a partir del presente estudio.

En especies de la familia Annonaceae, los estudios a nivel morfológico han permitido la identificación de rasgos fenotípicos que caracterizan los materiales empleados en programas de mejoramiento genético (PMG) y que han sido seleccionados bajo criterios de productividad y calidad de fruto. Una revisión de los antecedentes en la evaluación morfológica de estas especies, denota el desarrollo de investigaciones que aportan información valiosa en el proceso de caracterización, como lo es el estudio de Alavéz-López *et al*. (2000), quienes identificaron que entre los caracteres morfológicos que aportan mayor variabilidad fenotípica en una colección *in situ* de un grupo de árboles de *A. cherimola* en la Estación Experimental “La Cruz” (municipalidad de Coatepec, Harinas, México), se encuentran en primera instancia, los relacionados con el vigor del árbol (altura, longitud de ramas, peso de una semilla y peso de todas las semillas por fruto), seguidos por las características del fruto (principalmente el pH y el contenido de sólidos solubles) y las hojas (área y forma de la hoja). El estudio les permitió igualmente corroborar que los árboles presentes en esa colección, fueron previamente seleccionados por el tamaño del fruto (coincidiendo con el estudio de Rubi-Arriaga *et al*., 1992), al evaluar 12 genotipos de chirimoya a través de 22 características morfológicas (árbol, hojas, flores y frutos).

Dentro de los registros se encuentran también los aportes hechos por Lozano *et al.* (2003), en la evaluación de la producción y la calidad frutícola de una huerta de árboles de *A. muricata* en Juitepec (Morelos, México), con el objetivo de iniciar allí trabajos de selección y mejoramiento genético. A través de la evaluación de ocho variables vegetativas y frutícolas de árbol (diámetro del tronco, producción), hojas (área) y frutos (peso, sólidos solubles totales, acidez, color de la cáscara) en 65 árboles de 18 años de edad, logró identificar dos grupos de individuos, uno caracterizado por árboles de mayor producción y frutos con cáscara de color más brillante; y otro caracterizado por árboles de mayor diámetro de tronco y frutos con jugo de mayor acidez. Lo anterior, demarcaría entonces los objetivos de su PMG. En contraste, Benavides (2004) evaluó el

germoplasma de *A. muricata* muestreado en el Pacífico y el Norte de Nicaragua, a través de 20 características cuantitativas y cualitativas en 69 accesiones, identificando que un porcentaje significativo de la variación total (50,6%) es aportada principalmente por los caracteres de fruto (peso de fruto, diámetro de fruto, aroma, jugosidad, peso de cáscara) y semilla (peso). Dicha investigación le permitió igualmente identificar diferencias en grupos de cultivares provenientes del occidente, sur del Pacífico y norte del país, notando que éstos grupos están asociados a las áreas de adaptación, ecología y grado de selección por parte de los productores.

Dentro de la evaluación morfológica de especies de esta familia, también se han incluído características de las hojas, estudio desarrollado por Andrés-Agustín *et al.* (2004) en accesiones de *A. cherimola* presentes en el BGP de la Fundación Salvador Sánchez Colín- CICTAMEX (Estado de México), que permitió la identificación de seis grupos de individuos en el BGP, a través de la evaluación de nueve selecciones y ocho cultivares del chirimoyo, por medio de 10 caracteres morfométricos de la hoja. Los resultados obtenidos les permitieron identificar que los caracteres que más aportaron en la evaluación fueron: área del limbo, índice de redondez, longitud del pecíolo, ángulo de la quinta vena, relación eje longitudinal/eje radial y número de venas secundarias (lado derecho o izquierdo del envés). De igual manera, el estudio les permitió concluir que existe variabilidad morfométrica en la hoja de la especie y que esta puede ser útil para diferenciar germoplasma y en consecuencia, para elaborar descriptores morfológicos. Los autores aseveran que los resultados obtenidos en la morfometría coinciden con los obtenidos por Alavez-López *et al.* (1997), que al caracterizar genotipos provenientes de semilla, validaron el uso del área foliar y longitud de la hoja, entre otros caracteres hortícolas del chirimoyo, en la diferenciación de genotipos derivados de semilla, razón por la cual en el presente estudio, los descriptores empleados para la caracterización (Bioversity International y CHERLA, 2008), cuentan con características como las mencionadas con anterioridad.

El mismo año, Morales *et al.* (2004), publicaron los resultados obtenidos tras el análisis de la variabilidad fenotípica en frutos de *A. cherimola*, a través de la evaluación de 2.690 frutos provenientes de 538 plantas silvestres y cultivadas en huertos de agricultores de la provincia de Loja (Amaluza, Jimbura, La Papaya, Lauro Guerrero, Loja, Masanamaca, Nambacola, Santa Cecilia, Tabloncillo, Tacoranga y Trigopamba). Dicha evaluación se enfocó en los caracteres relación pulpa-semilla, consistencia de la corteza de la fruta y en las características químicas y organolépticas del fruto (sólidos solubles, acidez y análisis sensorial).

Los resultados obtenidos permitieron identificar que existe una gran variabilidad genética para la especie en la provincia de Loja, afirmando que esta provincia se encuentra en un centro importante de biodiversidad. Así mismo, identificaron que para las variables peso del fruto, sólidos solubles y análisis sensorial, existe una diferencia significativa dentro de un mismo árbol; mientras que en las variables: índice de semillas, forma del fruto, consistencia de la corteza y acidez, no se encontraron diferencias marcadas dentro de los frutos de un mismo árbol. Según Morales *et al*. (2004), a partir del análisis realizado, se pudo establecer que para la variable peso del fruto, la mayor parte de los frutos colectados estuvieron clasificados entre las categorías mejor remuneradas en el mercado de exportación, como son de primera, extras y súper-extras según las normas de calibrado internacional. En tanto que para la variable índice de semillas, se notó que solo

un 8% de los frutos presentaron un índice óptimo igual o menor a 7, es decir, que esta variable no sería la más adecuada para escoger los progenitores.

Dos años después, los mismos investigadores (Andrés-Agustín *et al*., 2006) publicaron los resultados de un estudio en el cual se analizó la morfometría de órganos de *A. cherimola* y parámetros del fruto para la caracterización de cultivares (Campas, Burtons y White) y selecciones de germoplasma mexicano (siete selecciones), incluyendo en el análisis un nuevo cultivar obtenido en México (Cortés-II-31). En el estudio se evaluaron 21 características morfométricas (siete de hojas, nueve de flores, dos de frutos y tres de semillas) y cinco características del fruto de importancia agronómica y tres parámetros químicos. Por medio de la evaluación de esas características y del uso de análisis multivariado (análisis de componentes principales y análisis de conglomerados) de cultivares comerciales y locales, se identificó que los rasgos que produjeron la máxima separación entre las accesiones fueron: forma de la hoja, ángulo de inserción de la 5° vena en las hojas, ángulo superior de las hojas, área de la sección transversal de los pétalos, superficie máxima proyectada del pétalo, peso de los frutos, sólidos solubles totales, resistencia del exocarpo al penetrómetro y la longitud y anchura del área proyectada de las semillas.

Consecuentemente, se identificaron cuatro grupos de accesiones con niveles de similar cercanos, de los cuales, dos de esos grupos estaban conformados por accesiones con un origen bien definido, el primero, de accesiones de Coatepec Harinas (S-196, S-256, S-260 and S-266) y el segundo, de accesiones de la comunidad indígenas de Pure´pecha, del Estado de Michoacán (S-Selene and S-Carapan). En tanto que los otros dos grupos de accesiones lo conformaban las accesiones de las cuales no se tenía mucho conocimiento. Sin embargo, los autores afirman que una clasificación de cultivares basada en estudios de ADN, podría llevarse a cabo a futuro con el fin de determinar las razones de esta agrupación (Andrés-Agustín *et al.*, 2006).

La evaluación morfoagronómica de ecotipos de *A. muricata* y *A. cherimola* en fincas de agricultores y en la colección del CATIE, desarrollada por Tacán (2007), sentó las bases para la identificación de características morfológicas que determinan la agrupación de individuos según su similaridad fenotípica, al evaluar 76 árboles de guanábana y 64 de chirimoya en condiciones *in situ* y 11 accesiones de guanábana en condiciones *ex situ* (colección CATIE). Dicha investigación contempló la valoración de descriptores cuantitativos y cualitativos para las 2 especies, evaluando un número diferente de accesiones según su distribución geográfica. Para la caracterización de guanábana en fincas de agricultores (*in situ*) se utilizaron 32 descriptores (22 cuantitativos y 10 cualitativos) y para la fase *ex situ* (colección CATIE) se utilizaron 29 descriptores (21 cuantitativos y ocho cualitativos). En tanto que en chirimoya, en las fincas de agricultores, se emplearon 36 descriptores: 23 cuantitativos y 13 cualitativos.

Los resultados obtenidos, permitieron identificar tres grupos fenotípicos para la especie *A. muricata*, notando que en condiciones *in situ*, la ubicación geográfica incide en el agrupamiento (diferenciación de cantones) y que las características que más aportan a la separación de los grupos son: altura de árbol, peso del pericarpio, diámetro de la semilla y número de semillas/fruto. En tanto que en condiciones *ex situ*, se identificaron dos grupos, donde 10 de los 21 caracteres evaluados contribuyen a identificar la variabilidad (largo de fruto, diámetro de fruto, peso de fruto, peso del pericarpio, peso del receptáculo de la pulpa, peso de pulpa, pH, número de semillas/fruto, peso de semillas/fruto y longitud de la semilla) y tres tienen el mayor peso para separar los grupos en el análisis

discriminante (peso de pulpa, altura del árbol y número de ramas terciarias). Contrario a lo obtenido para la especie *A. cherimola*, para la cual, en condiciones *in situ* se identificaron tres grupos fenotípicos que se relacionan en parte con la distribución geográfica, pero en este caso, de las 23 características cuantitativas evaluadas en la especie, 20 contribuyeron en la diferenciación de grupos y tres descriptores no aportan en la separación de los grupos (número de ramas terciarias, grados brix y pH). Sin embargo, para la chirimoya, las características que más aportan en la separación de los grupos son: largo de fruto, peso de pulpa y peso de semillas por fruto.

Como se observa, los mayores avances en la evaluación morfológica en especies de la familia Annonaceae, se han llevado a cabo en colecciones *in situ* y *ex situ* de *A. cherimola*, notando que las características del fruto y las hojas son rasgos de relevancia en la diferenciación de genotipos presentes en colecciones y bancos de germoplasma.

Con el objetivo de caracterizar y evaluar morfológicamente la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia y contribuir en su conocimiento, se emplearon los descriptores desarrollados para chirimoya por Bioversity International y CHERLA (2008). El análisis estadístico descriptivo y multivariado de las accesiones de las especies más representativas (*A. squamosa* y *A. reticulata*), permitió la identificación de rasgos morfológicos que determinarán a futuro, el posterior uso de genotipos de anón en un programa de mejoramiento genético en el país, bajo criterios de producción y calidad de fruto.

2.3 Metodología

A partir de la información obtenida en la etapa de prospección de recursos fitogenéticos de especies de la familia Annonaceae, se conformó la población *in situ* (conformada por el conjunto de accesiones de todas las especies involucradas) que fue objeto de caracterización y evaluación morfológica, en la cual, se colectó el material vegetal para el establecimiento de las colecciones de trabajo (colecciones *ex situ*). En el proceso se incluyeron tanto las accesiones seleccionadas en colectas previas a la investigación (trabajo realizado por el equipo técnico del proyecto en el año 2009) como las seleccionadas en las colectas recientes (presente investigación, años 2010 y 2011) que contaban con información de los rasgos morfológicos de la planta (árbol, hoja, flor, fruto y semilla).

A partir de los descriptores morfológicos definidos para la chirimoya (*A. cherimola*) por Bioversity International y CHERLA (2008), se seleccionaron y definieron para la caracterización y evaluación morfológica, los descriptores de **hoja** (forma, base, ápice, longitud y anchura), **flor** (longitud y anchura), **fruto** (hábito fructificación, forma del fruto, n° de frutos, peso de fruto, simetría, diámetro polar y ecuatorial; tipo, color, peso y grosor de exocarpo, peso del raquis, peso de la pulpa, grados brix, acidez y ph) y **semillas** (peso y n° de semillas).

Esta información se complementó con los descriptores de **pasaporte** (accesión, recolección y etnobotánica) y **sitio y medio ambiente** (topografía, forma del terreno, elementos de suelo y posición, pendiente, tipo de agricultura, vegetación general en los alrededores y el sitio, y drenaje del suelo) que fue tomada durante la etapa de prospección y colecta, y con los datos obtenidos en en el laboratorio, tras el beneficio de

los frutos y la obtención de las semillas. La cantidad de flores y frutos colectados dependió del estado fenológico y fitosanitario de los individuos. Toda la información obtenida se compiló en la base de datos y en el álbum fotográfico de la población *in situ* y las colecciones de trabajo.

Con el objetivo de contar con suficiente información para realizar la documentación de las colecciones, así como la caracterización y evaluación morfológica de la especies, se precisó emplear 67 de los descriptores definidos para la chirimoya (*A. cherimola*) por Bioversity International y CHERLA (2008) (Anexo A: Descriptores empleados en la documentación de los recursos fitogenéticos de Anonáceas), conformando así la base de datos de la población *in situ* de especies Annonaceae, que es objeto de análisis en el presente estudio. De los 67 descriptores registrados, 29 corresponden a información de pasaporte, 6 a sitio y medio ambiente, 7 a características del árbol (descriptores de planta) y 25 a rasgos de la planta relacionados con formas y tamaños de hojas, frutos y semillas.[2] Éstos últimos (25 en total) fueron los empleados en la evaluación morfológica.

Para la identificación y definición de las accesiones en campo (un árbol representa una accesión), éstas se georreferenciaron con gps (sistema de geoposicionamiento global, por su sigla en inglés) y se codificaron con caracteres específicos y un número consecutivo, que deberá conservarse para el manejo y posterior identificación del material que se obtenga de ésta colección. El procedimiento de codificación sigue los lineamientos empleados para el establecimiento de la colección de trabajo.

La depuración de la información se realizó por medio del registro en la base de datos, la revisión de información disponible y la eliminación (solo para el análisis estadístico) de individuos que no cuentan con toda la información de los descriptores en el estudio (se dejaron aquellas accesiones que tenían más del 80% de la información en frutos y semillas, que es un componente importante de evaluación). Así, se organizaron los datos y se prepararon los archivos necesarios para el análisis estadístico a través de los programas estadísticos SAS 9.1 y PAST 2.17 (Hammer y Harper, 2006).

Se procedió a realizar un análisis exploratorio de la información de los descriptores de pasaporte, ambiente del sitio y de las principales características de la planta, las hojas y los frutos de las accesiones de la población *in situ*. Esto permitió identificar las características de los sitios de colecta con respecto a la fuente de recolección, los aspectos etnobotánicos y de ambiente del sitio, así como con respecto a los rasgos morfológicos generales de las accesiones que conforman la población *in situ*. Consecutivamente y de acuerdo con los parámetros que se han definido para la producción y mercadeo de los frutos de la chirimoya en países como España y Perú, se procedió a analizar las características morfológicas y organolépticas del fruto de las especies que conforman la población *in situ* de Annonaceae. Para esto se tuvieron en cuenta los criterios definidos en la Orden APA/3120/2002, por la que se ratifica el Reglamento de la denominación de origen protegida «Chirimoya de la Costa Tropical de Granada-Málaga» (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España). Con el objetivo de identificar aquellos individuos cuyos frutos presentan las características deseables en el mercado, se procedió a definir dos categorías (superior y común), a partir de las características de peso de fruto (g), forma, simetría y grados brix (°brix).

[2] Aunque el tamaño de la flor (longitud y anchura) fue registrado, los datos no se incluyeron en el análisis debido a que pocas accesiones contaban con esta información. En contraste, se incluyó información de porcentaje de exocarpo y de pulpa.

Posteriormente, se realizó el análisis estadístico de la información (a nivel inter e intraespecífico), considerando el procedimiento de análisis desarrollado en investigaciones similares para especies de Annonaceae (Alavéz-López *et al*., 2000; Andrés-Agustín *et al*., 2004; Benavides, 2004; Lozano *et al*., 2003; Andrés-Agustín *et al*., 2006 y Tacán, 2007) y otros frutales (Trillos *et al*., 2008; Tapia y Legaria, 2007), complementándolo por medio de la consulta a expertos en el área de fitomejoramiento y fisiología de cultivos, así como de la consulta de algunos documentos soporte (Asensio, 1988; Franco e Hidalgo, 2003). Esto permitió en consenso, definir el procedimiento de análisis teniendo en cuenta las características de las especies y la cantidad y calidad de información obtenida, lo que finalmente permitió evaluar simultáneamente las variables morfológicas (cualitativas y cuantitativas) en las especies de estudio.

El proceso desarrollado contempló el análisis general de la información disponible por accesión para cada uno de los descriptores morfológicos, seguido del análisis estadístico univariado a nivel inter e intraespecífico (medidas de tendencia central y dispersión) y el análisis estadístico multivariado intraespecífico de las especies más representativas de la colección (componente principales, análisis de conglomerados por el método de agrupamiento de UPGMA y la distancia de Gower), a través de los programas estadísticos SAS 9.1 y PAST 2.17 (Hammer y Harper, 2006), que permitió la identificación de grupos de accesiones según su similaridad morfológica.

Es preciso aclarar que en el presente estudio, el término de “población”, no se refiere a un grupo de organismos de la misma especie que ocupan un lugar particular en un tiempo particular (Krebs, 1994; Roughgarden *et al*., 1989), sino que se refiere al conjunto total de accesiones de todas las especies incluidas; ésta se podría concebir entonces, como una población construída.

2.4 Resultados

2.4.1 Distribución geográfica, hábitat y clima

A partir de la etapa de prospección y colecta se conformó una población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia, compuesta por 167 accesiones correspondientes a cinco especies y un híbrido interespecífico, distribuidas en 13 departamentos y 48 municipios (Tabla 2-1). La información de las accesiones y su distribución geográfica se presentan en el Anexo B: Accesiones que conforman la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia y en el Anexo C: Mapa de distribución geográfica de las accesiones que conforman la población *in situ* de especies de Annonaceae en Colombia.

Tabla 2-1: Información general de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia.

DEPARTAMENTO	N° DE ACCESIONES	ESPECIE (S)	MUNICIPIO (S)
Tolima	33 (19,76%)	*Annona reticulata, A. squamosa*	Alvarado, Ambalema, Armero, Carmen de Apicalá, Coyaima, Espinal, Flandes, Guamo, Melgar, Piedras, Saldaña
Valle del Cauca	28 (16,77%)	*Annona cherimola, Annona squamosa x A. cherimola, A.*	Guacarí, La Unión, La Victoria, Obando, Roldanillo, Sonso, Toro, Zaragoza,

DEPARTAMENTO	N° DE ACCESIONES	ESPECIE (S)	MUNICIPIO (S)
		reticulata, A. squamosa, , Rollinia sp.	Zarzal
Cundinamarca	26 (15,57%)	*Annona reticulata, A. squamosa*	Apulo, Cambao, Girardot, Guataquí, Jerusalén, Nariño
Santander	20 (11,98%)	*Annona reticulata, A. squamosa*	Cepitá, Piedecuesta
Guajira	13 (7,78%)	*Annona reticulata, A. squamosa*	Dibulla, La Jagua del Pilar, San Juan del Cesar, Urumita, Villanueva
Nariño	11 (6,59%)	*Annona cherimola*	Funes, Yacuanquer
Magdalena	11 (6,59%)	*Annona glabra, A. reticulata, A. squamosa*	El Retén, Fundación
Córdoba	8 (4,79%)	*Annona glabra, A. reticulata, A. squamosa*	Lorica, San Antero, Tuchín
Atlántico	7 (4,19%)	*Annona squamosa*	Ponedera, Sabanagrande, Sabanalarga
Casanare	4 (2,40%)	*Annona reticulata, A. squamosa*	Trinidad, Yopal
Sucre	3 (1,80%)	*Annona squamosa*	Sampués
Cesar	2 (1,20%)	*Annona squamosa*	Valledupar
Bolívar	1 (0,60%)	*Annona squamosa*	Santa Catalina

El análisis exploratorio de los datos permitió identificar algunos aspectos importantes de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae, con respecto a los descriptores de recolección y ambiente del sitio, así como de los principales rasgos morfológicos de las especies incluidas en el estudio.

En cuanto a la fuente de recolección, la condición biológica y el sistema de cultivo, se tiene que la principal fuente de recolección de material vegetal es la ciudad o centro poblado (52,69%), los materiales son en su mayoría cultivares tradicionales (82,04%) y no hacen parte de sistemas de cultivos (94,61%), puesto que los individuos generalmente se encuentran solitarios en solares o fincas. Durante las colectas realizadas, solo se identificaron cultivos de anón (*A. squamosa*) en el municipio de Apulo (Cundinamarca). Con respecto a los descriptores de ambiente del sitio evaluados en la población *in situ*, se tiene que el tipo de agricultura que predomina en la colecta es de árbol y arbusto natural (51,50%) y la vegetación general en los alrededores y el sitio de colecta es el entorno urbano (49,70%).

En la población *in situ*, se registró que el rango altitudinal del anón entre otras especies de anonáceas (*A. glabra, A. reticulata, A. cherimola, A. squamosa, A. cherimola* y *A. squamosa, Rollinia sp*) oscila entre el nivel del mar y los 1032 msnm, contrario a la especie *A. cherimola* cuyo rango altitudinal oscila entre 968 y 2014 msnm (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Rango altitudinal en el que se encuentran las especies especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*.

Especie	Cota máxima (msnm)	Lugar	Cota mínima (msnm)	Lugar
Annona cherimola	2.104	Yacuanquer (Nariño)	968	Toro (Valle del Cauca)
Annona squamosa x A. cherimola	1.032	Guacarí (Valle del Cauca)	1.032	Guacarí (Valle del Cauca)
Annona glabra	66	Fundación (Magdalena)	59	San Antero (Córdoba)
Annona reticulata	1.021	Guacarí (Valle del Cauca)	64	Fundación (Magdalena)
Annona squamosa	1.019	Guacarí (Valle del Cauca)	3	Sabanagrande (Atlántico)
Rollinia sp.	962	Obando (Valle del Cauca)	935	Zarzal (Valle del Cauca)

Al comparar la información de los indicadores climatológicos del IDEAM (2001) con la obtenida en la etapa de prospección, se observa que las especies de *Annona* (*A. squamosa, A. reticulata, A. glabra, A. squamosa x A. cherimola*) de la población *in situ*, se encuentran en sitios que presentan una temperatura mínima media (promedio multianual) que oscila entre 20°C y 24°C y una temperatura máxima media (promedio multianual) entre 24°C y 32°C, mientras que *A. cherimola* se ubica en sitios que presentan una temperatura mínima y máxima media de 4 y 12°C (Anexo D: Distribución geográfica de la población *in situ* y comparación con indicadores climatológicos).

Con respecto a la humedad relativa se observa que para las especies del género *Annona*, en los lugares donde se encuentran los individuos evaluados, ésta oscila entre 70 – 75% en algunos sitios de los departamentos de Cesar, Cundinamarca, Guajira, Tolima y Valle del Cauca, y entre 70 – 85% en departamentos como Atlántico, Casanare, Córdoba, Magdalena, Nariño, Tolima y Valle del Cauca. Según la clasificación climática de Holdridge y la información suministrada por el IDEAM (2011), las especies *A. squamosa* y *A. reticulata* se encuentran en zonas de clima cálido húmedo (Casanare), cálido seco (Zona Caribe, Cundinamarca y Tolima) y templado seco (Santander), aunque en el Valle del Cauca, el clima en el que se encuentran algunos individuos de *A. reticulata* y de *A. squamosa x A. cherimola* es templado seco. Por el contrario, las accesiones de *A. cherimola* se encuentran en una zona de clima frío seco (Nariño).

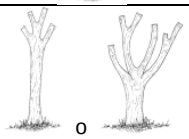
2.4.2 Variabilidad morfológica interespecífica

Un análisis exploratorio de la información de los descriptores morfológicos de las especies de la población *in situ*, permitió la identificación de claras diferencias a nivel interespecífico en algunos de los descriptores de la planta. Sin embargo, es preciso recordar que el número de accesiones por especie es variable (p.e. entre una y 117 accesiones, para *A. squamosa x A. cherimola y A. squamosa*) y por lo tanto, las variaciones observadas no podrán ser empleadas como medida de comparación general entre especies de la población *in situ*, pero sí brindan información de utilidad en posteriores estudios.

Referente a los descriptores del árbol, se observa que aunque las especies presentan generalmente porte de arbolito, la ramificación del tronco varía (considerando que esto podría atribuirse al efecto de la edad de la planta o al manejo silvícola), así como su altura total y el volumen de la copa[3] (Tabla 2-3). A nivel intraespecífico, se observan algunas diferencias en los rasgos cuantitativos y cualitativos que podrían antribuirse a los factores antes mencionados; esta información se ampliará en el análisis de variabilidad morfológica intraespecífica. No obstante, es recomendable ampliar el tamaño de muestra por especie en nuevos estudios.

[3] Estimado a partir de la fórmula de Turrel (V=0,5236 HD2) – Turrel (1946).

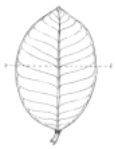
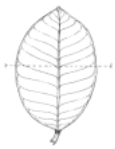
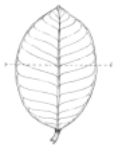
Tabla 2-3: Porte y tipo de ramificación de individuos de especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*.

Especie	Altura total (cm) "promedio"	Porte	Volumen de la copa (m^3)	Tipo de ramificación predominante	
Annona cherimola	796	Arbolito	20,30	Dos ramas	
Annona squamosa x A. cherimola	700	Arbolito	23,56	Tres o más ramas	
Annona glabra	617	Arbolito	9,25	Una sola rama	
Annona reticulata	656	Arbolito	15,62	Una sola rama o tres ramas	 o
Annona squamosa	475	Arbolito	8,45	Tres o más ramas	
Rollinia sp.	450	Arbolito	6,39	Una sola rama	

Con relación a las características cuantitativas y cualitativas de las hojas, se observa una variación interespecífica en los rasgos de forma y tamaño, predominando en las especies de la población *in situ*, las hojas de forma elíptica (Tabla 2-4). En contraste, a nivel intraespecífico se detectan variaciones en las especies *A. squamosa y A. reticulata*. La evaluación morfológica de la población *in situ* que se presenta posteriormente, permitirá concluir sobre dicha variación.

Tabla 2-4: Forma predominante y tamaño promedio de las hojas de las especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*.

Especie	Forma predominante de las hojas	
	Bioversity y CHERLA (2008)	Colección en Colombia
Annona cherimola	Elíptica Longitud (129,56) y anchura (69,21) promedio	

Especie	Forma predominante de las hojas	
	Bioversity y CHERLA (2008)	**Colección en Colombia**
Annona squamosa x A. cherimola	 Elíptica Longitud (168,55) y anchura (75,49) promedio	
Annona glabra	 Elíptica Longitud (78,54) y anchura (53,01) promedio	
Annona reticulata	 Lanceolada Longitud (172,04) y anchura (52,50) promedio	
Annona squamosa	 Ovada Longitud (106,65) y anchura (41,86) promedio	
Rollinia sp.	 Elíptica Longitud (241,25) y anchura (81,33) promedio	

En cuanto a los rasgos morfológicos de los frutos, se observa que la forma predominante y los valores promedio del peso total del fruto, el porcentaje de pulpa y el número de semillas por fruto, es variable entre las especies de la población *in situ* (Tabla 2-5 y Tabla 2-6). Al respecto, se observa que los frutos de anón del pacífico (*Rollinia sp.*), atemoya (*A. squamosa x A. cherimola*) y anón liso (*A. reticulata*), son los que presentan mayor peso total, aunque los valores de porcentaje de pulpa son variables a nivel interespecífico. La evaluación morfológica permitirá identificar con mayor precisión la variación a nivel intraespecífico.

En este punto, es preciso aclarar que en la evaluación de la población *in situ*, no se tuvo en cuenta el efecto genotipo x ambiente, ya que las accesiones provienen de diferentes procedencias. Como primera medida, se ha realizado un análisis exploratorio de la

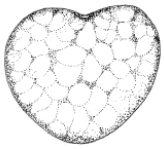
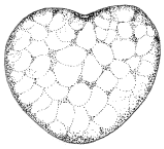
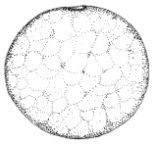
información general, que permitirá identificar las características generales de la población *in situ* y algunos rasgos morfológicos de interés para la selección de genotipos a futuro.

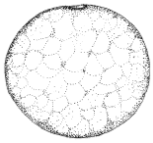
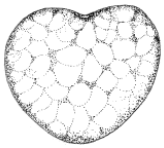
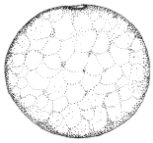
Con relación al número de semillas, a nivel intraespecífico se observa que aunque el valor es variable debido a las características morfológicas del fruto, en general, las especies tienen un número considerable de semillas en su interior. Los valores de grados brix (°brix) indican que en general, las especies de la colección presentan un contenido bajo de azúcares en la pulpa de los frutos, excepto por anona blanca (*A. glabra*), que presenta un valor muy bajo. Los soportes del análisis estadístico se presentan en el Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos.

Tabla 2-5: Principales características de los frutos de las especies de Annonaceae de la población *in situ*.

Especie	Valores promedio			
	Peso total del fruto (g)	% de pulpa	N° de semillas /fruto	° brix
Annona cherimola	131,74	0,56	14,83	16,47
Annona glabra	152,63	0,40	95,11	8,92
Annona reticulata	267,33	0,43	45,56	20,03
Annona squamosa	129,72	0,31	37,64	18,78
Annona squamosa x A. cherimola	285,18	0,35	28,75	18,60
Rollinia sp.	680,10	0,35	12,00	21,87

Tabla 2-6: Forma predominante de los frutos de las especies de Annonaceae de la población *in situ*.

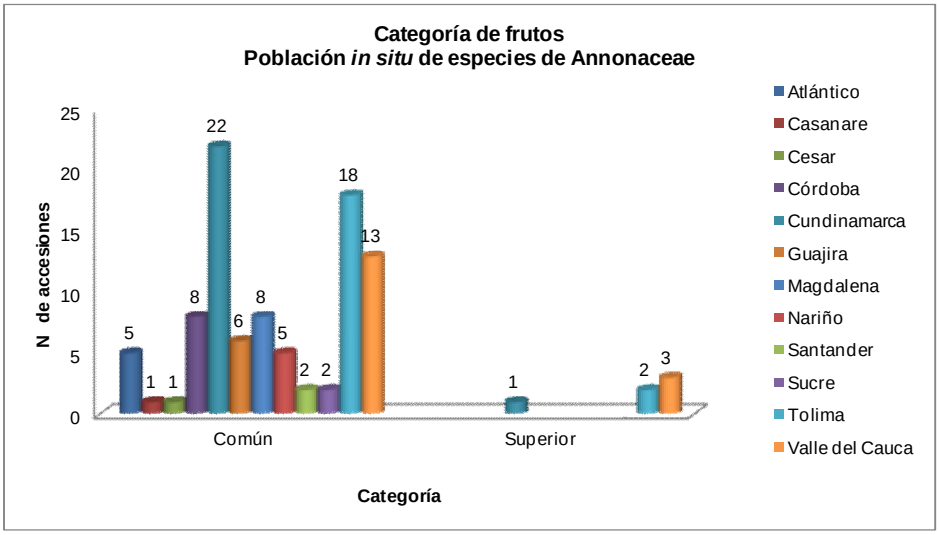
Especie	Forma predominante del fruto	
	Bioversity y CHERLA (2008)	Colección en Colombia
Annona cherimola	 Cordiforme	
Annona squamosa x A. cherimola	 Cordiforme	
Annona glabra	 Redonda	

Especie	Forma predominante del fruto	
	Bioversity y CHERLA (2008)	Colección en Colombia
Annona reticulata	 Redonda	
Annona squamosa	 Cordiforme	
Rollinia sp.	 Redonda	

Según los valores obtenidos de la evaluación en campo de la población *in situ* y teniendo en cuenta los criterios definidos en la Orden APA/3120/2002, por la que se ratifica el reglamento de la denominación de origen protegida «Chirimoya de la Costa Tropical de Granada-Málaga» (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España) para las características morfológicas y organolépticas del fruto, se optó por agrupar el conjunto de datos según su morfología en dos clases: frutos superiores y frutos inferiores.

Los **frutos superiores**, corresponden a aquellos frutos que presentan una forma cordiforme o redonda, con una tendencia simétrica respecto al eje peduncular, cuyo peso unitario es superior al promedio para los frutos de la especie y presentan un contenido de grados brix superior a 15°. Y los **frutos comunes**, corresponden a aquellos de forma diferente a cordiforme o redonda, con una tendencia asimétrica respecto al eje peduncular, cuyo peso unitario es inferior al promedio para los frutos de la especie y presentan un contenido de grados brix inferior a 15°. El proceso de clasificación de las accesiones, obedeció a la calificación por clases según los rasgos y a la agrupación según la clase de tipo de fruto. La información respectiva, se presenta en el Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos.

De esta manera, se observó que en su mayoría (93,81%), los frutos obtenidos de los individuos de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae se pueden catalogar como frutos comunes (Figura 2-1).



Para la clasificación de grupos según su categoría, se trabajó con un total de 97 accesiones, correspondientes a aquellas que cuentan con todos los registros de los descriptores contemplados (FF, PF, SIM y BRIX).

Figura 2-1: Categoría de frutos de especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*.

Al analizar la información de categorías de frutos por especie (Figura 2-2), se observa que los principales departamentos en los que se producen frutos de categoría superior son Cundinamarca y Tolima (*A. reticulata y A. squamosa*) y Valle del Cauca (*Rollinia sp. y A. reticulata*). En tanto que los frutos comunes de las especies *A. cherimola, A. glabra* y *A. squamosa x A. cherimola*, se producen en los departamentos de Córdoba, Magdalena, Nariño y Valle del Cauca (Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos).

Frutos de Annona cherimola - Categoría común
Accesión N1AC262

Frutos de Annona glabra - Categoría común
Accesión CO4AG148

Frutos de Annona reticulata - Categoría superior
Accesión T9AR173

Frutos de Annona squamosa - Categoría superior
Accesión C2AS227

Frutos de Annona squamosa x A. cherimola - Categoría común
Accesión V1ASC216

Frutos de Rollinia sp. - Categoría superior
Accesión V4R192

Figura 2-2: Imágenes de frutos de categoría superior y común según la especie de la familia Annonaceae.

Al desarrollar el análisis exploratorio de los datos, se detectó que no se disponía de la información completa para todos los descriptores de las accesiones que conformaban de las poblaciones *in situ* y por lo tanto, se procedió a considerar (para el análisis estadístico) aquellas accesiones que contaban con más del 80% de la información de los 39 descriptores analizados (ambiente de sitio y de caracterización de la planta). Con base en esto, en el estudio de caracterización se tuvieron en cuenta 98 accesiones de las especies (*A. cherimola, A. squamosa x A. cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa* y *Rollinia sp.*).

A través del análisis univariado interespecífico realizado a la base de datos final (98 accesiones), se puede observar en cuanto a las medidas de tendencia central y dispersión, que los valores por descriptor son variables y no existen descriptores que se convierten en constantes, así mismo, no existe simetría en los datos y su dispersión es notoria, ya que algunos descriptores (longitud y anchura de hoja, forma del fruto, diámetro polar y ecuatorial del fruto, tipo y grosor de exocarpo, grados brix, acidéz, pH, porcentaje de exocarpo y de pulpa) presentan varianzas considerables (Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos). Sin embargo, esto es de esperarse, ya que las especies son morfológicamente diferentes en algunos de los descriptores. El análisis a nivel intraespecífico, se presentará en el siguiente ítem.

Seguidamente, se realizó el análisis multivariado interespecífico, cuyos resultados dejan ver que los 16 primeros componentes son los que aportan mayor variabilidad (equivalente al 86,87% de la variabilidad total)[4], notando que todas las variables (descriptores) analizadas son informativas; no obstante, aquellas relacionadas con las características morfológicas de hojas y frutos son las de mayor aporte en el análisis (correspondientes a 20 de los 25 descriptores de forma y tamaño de hojas y frutos). En este caso, se observa que los tres primeros componentes explican el 40,61% de la variación y que las características peso del fruto, diámetro polar y ecuatorial del fruto, peso del exocarpo, del ráquis y de la pulpa, grados brix, acidez y peso de la semilla, son las que hacen un mayor aporte en dicha variación.

Aquí es preciso aclarar que en el análisis multivariado desarrollado en el presente estudio, por sugerencia de expertos, se tuvieron en cuenta aquellos componentes que aportan más del 85% de la variación morfológica, teniendo en cuenta que según Judéz (1989) en la práctica, para la presentación completa de las observaciones mediante las

[4] Eigenvalue de 0,62.

variables incluidas en el análisis de componentes principales, se suele considerar solamente un número que explique el 70% u 80% de la inercia total o podría emplearse otro criterio empírico, al considerar solamente aquellos ejes asociados a los componentes principales cuya varianza sea superior a 1 (que es la varianza de una sola variable).

Al revisar detenidamente los valores de los vectores propios y la matriz de correlación, se identificó que para la colección de accesiones de Annonaceae, todas las variables son informativas en los 16 componentes; por lo que el análisis de agrupamiento permitió identificar seis grupos de accesiones a una distancia Gower de 0,26[5]. De esta manera, el análisis de conglomerados corrobora el agrupamiento de accesiones por especie debido a sus características morfológicas. El anterior análisis se realiza por sugerencia de expertos.

A partir de los resultados obtenidos, se puede observar que los grupos de accesiones se caracterizan por aglomerar individuos de la misma especie (salvo algunos pocos casos) según las características morfológicas cualitativas de hojas y frutos. En este caso, las características cuantitativas son variables entre grupos, excepto por el grupo H que contiene la única accesión de *Rollinia sp.*, cuyos valores en la mayoría de los descriptores son mayores (Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos).

Lo anterior, es notorio para la especie *A. reticulata*, procedente de Santander, Cundinamarca y Tolima, Córdoba y Valle del Cauca, claramente diferenciada en los grupos A, B, E y F. En tanto que la especie *A. squamosa* tiene la mayor representación en el grupo D y proviene de diferentes partes del país. Por el contrario, las especies *Rollinia sp.* y *A. cherimola*, se ubican en grupos disímiles (G y H, respectivamente) y en otros casos, algunos grupos (E y F) aglomeran accesiones de más de una especie, pero su distribución geográfica es específica de un departamento (Tabla 2-7 y Figura 2-3). Esto podría atribuirse a la estrategia de muestreo empleada y a la inclusión progresiva de individuos de algunas otras especies durante la colecta.

Tabla 2-7: Principales aspectos del agrupamiento de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia.

ESPECIE(S)	CONGLOMERADO	N° DE ACCESIONES Y REPRESENTATIVIDAD EN LA COLECCIÓN	OBSERVACIONES
Annona reticulata	A	2 (2,04%)	Proveniente de Santander
Annona reticulata	B	3 (3,06%)	Proveniente de Cundinamarca y Tolima
Annona squamosa	C	20 (20,41%)	Proveniente de Cundinamarca y Tolima
Annona squamosa	D	47 (47,96%)	Proveniente de la mayor parte del país (9 departamentos)
A. glabra y A. reticulata	E	4 (16,33%)	Provenientes principalmente de Córdoba (*A. reticulata*) y Magdalena (*A. glabra*)
Annona reticulata, Annona squamosa y A. squamosa x cherimola	F	16 (16,33%)	Provenientes principalmente del Valle del Cauca (excepto 1 accesión del Tolima)
Annona cherimola	G	5 (5,10%)	Proveniente de Yacuanquer (Nariño)
Rollinia sp.	H	1 (1,02%)	Proveniente de Obando (Valle del Cauca)

[5] Se observa la conformación de grupos evidentes.

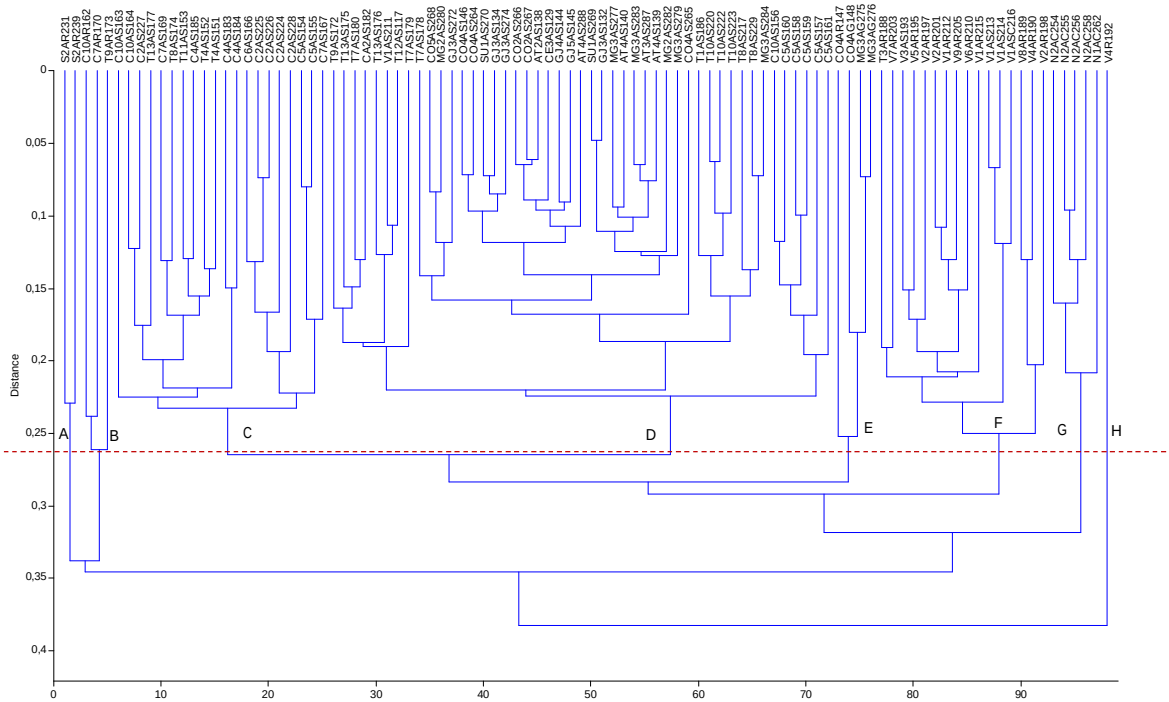


Figura 2-3: Dendrograma correspondiente a las variables morfológicas evaluadas en especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*.

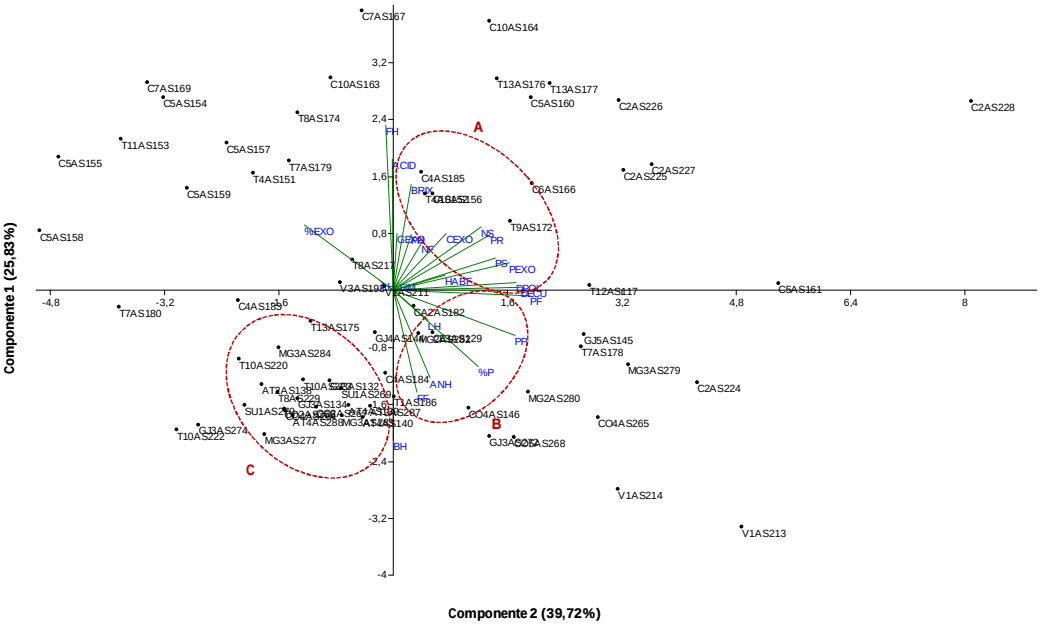
2.4.3 Variabilidad morfológica intraespecífica

El análisis multivariado a nivel intraespecífico de las especies más representativas de la colección (*A. squamosa* y *A. reticulata*), se realizó por medio del análisis de componentes principales (método estadístico de interdependencia) a partir de 25 variables morfológicas de hojas y frutos, hallando los valores propios (eigenvalue) y la proporción de la varianza para el grupo de variables definidas. Debido a que los descriptores empleados para la evaluación morfológica contemplan variables mixtas (cuantitativas y cualitativas), se optó por realizar un análisis de conglomerados, partiendo de la definición de la Unidad Básica de Caracterización, que en el presente estudio es “una planta”, se calculó la matriz de distancia entre individuos a partir del coeficiente de similaridad de Gower (1971) y con esta información se generó el dendrograma mediante el método de agrupamiento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

Para la especie ***A. squamosa***, inicialmente, se realizó el análisis univariado con los 39 descriptores[6] (en un total de 70 accesiones) y se encontró que la variable tipo de exocarpo (TEXO) es una constante, por lo que debió ser eliminada para poder efectuar el análisis multivariado por componentes principales (PCA en inglés). Debido a que la evaluación es del orden morfológico, el análisis de componentes principales contempló 24 descriptores (sin incluir la variable TEXO por las razones ya mencionadas) que se relacionan con los parámetros de calidad definidos a nivel comercial.

[6] 14 descriptores generales (ambiente de sitio y de árbol) y 25 descriptores morfológicos (hoja, frutos y semillas).

Los resultados del PCA denotan que los 10 primeros componentes aportan el 85% de la variabilidad total, siendo las variables más informativas el peso del fruto, el diámetro polar y ecuatorial, el peso del exocarpo, el peso del ráquis y de la pulpa, el porcentaje de exocarpo y de pulpa, el peso de la semilla y el número de semillas (Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos). En el diagrama bidimensional se observan inicialmente tres grupos de accesiones; que se aglomeran por las características del fruto (grupo A), algunas características del fruto y las características de las hojas (grupo B y C) (Figura 2-4).

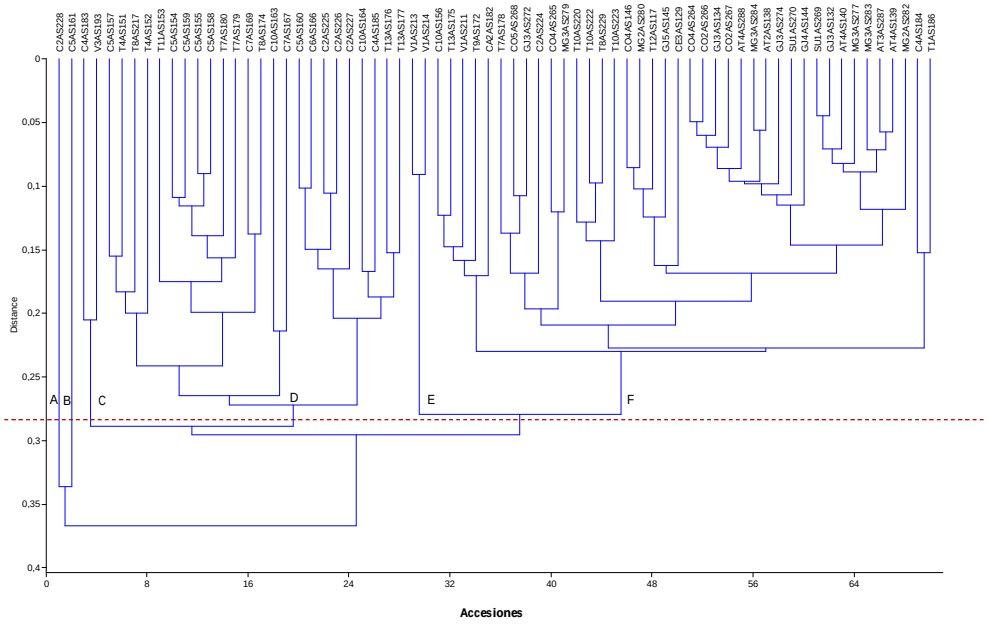


Software PAST 2.17.

Figura 2-4: Diagrama bidimensional de las variables morfológicas evaluadas en *A. squamosa*.

En el análisis de conglomerados, se identifican seis grupos de accesiones (a una distancia Gower de 0,28)[7], que se aglomeran indistintamente según la procedencia, notando que en el grupo F se ubican la mayor cantidad de accesiones, provenientes de los departamentos del Caribe Colombiano y la Zona Andina (Figura 2-5), seguido del grupo D, que reúne accesiones provenientes de Cundinamarca y Tolima.

[7] Se observa la conformación de grupos evidentes.



Software PAST 2.17.

Figura 2-5: Dendrograma correspondiente a las variables morfológicas evaluadas en *A. squamosa*.

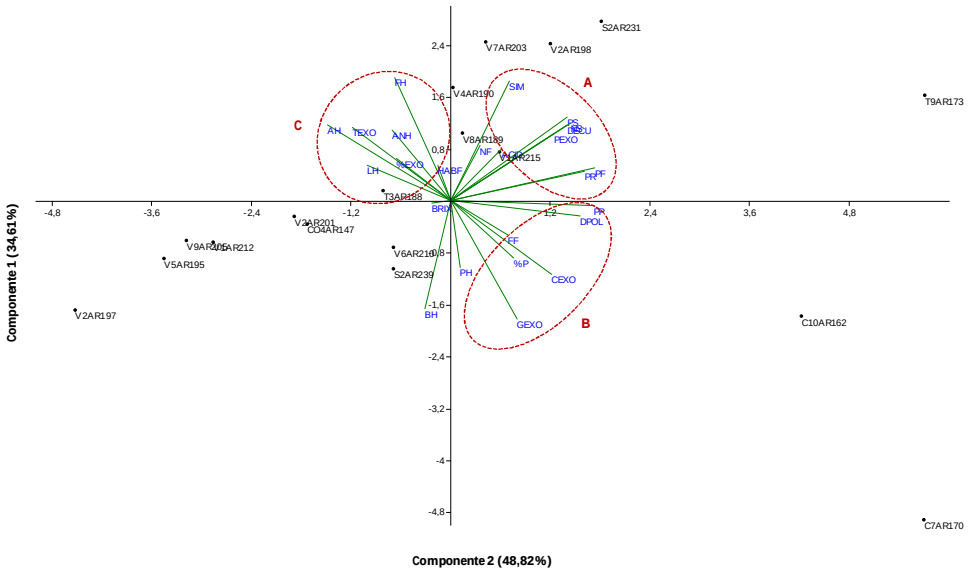
Al analizar con mayor detenimiento los seis grupos de accesiones de *A. squamosa*, se identificó los rasgos fenotípicos son los principales aspectos que los diferencian; lo que permite definir las principales homologías y diferencias entre los grupos, que para anón rugoso se deben básicamente a la calidad del fruto (tamaño, peso, simetría, grados brix, pH, acidez, peso y número de semillas); sin embargo, la procedencia es un aspecto de importancia en el agrupamiento (Tabla 2-8 y Anexo F: Mapas de distribución geográfica de los conglomerados identificados de las especies representativas).

Tabla 2-8: Características generales de los grupos de accesiones de *A. squamosa* (población *in situ*).

GRUPO	CARACTERÍSTICAS (Accesiones de *A. squamosa*)
A	Procedente de Cundinamarca (1 accesión, equivalente al 1,43%). Hojas lanceoladas, de base y ápice agudo, y de tamaño promedio. Hábito de fructificación superior y menor número de frutos. Frutos de peso y tamaño superior, cordiformes, simétricos y de color verde. Contenido de azúcares y ácido cítrico promedio, ligeramente ácidos, con menor porcentaje de pulpa, pero superior en peso y número de semillas.
B	Procedente de Cundinamarca (1 accesión, equivalente al 1,43%). Hojas ovadas, de base obtusa y ápice agudo, y de tamaño inferior. Hábito de fructificación superior, frutos de peso y tamaño promedio, cordiformes, asimétricos y de color verde amarillento. El peso de la pulpa es inferior. Contenido de azúcares inferior, mayor contenido de ácido cítrico, ligeramente ácidos, con un número de semillas promedio.
C	Procedentes de Cundinamarca y Valle del Cauca (2 accesiones, equivalentes al 2,86%). Hojas obovadas, de base agua y ápice acuminado, y de tamaño promedio. Hábito de fructificación inferior, frutos de peso y tamaño inferior, cordiformes, asimétricos y de color verde. Contenido de azúcares y ácido cítrico promedio, ligeramente ácidos, con número de semillas promedio.
D	Procedentes de Cundinamarca y Tolima (24 accesiones, equivalentes al 34,29%). Hojas ovadas, de base y ápice agudo, y de tamaño inferior al promedio. Hábito de fructificación medio, frutos de peso y tamaño promedio, cordiformes, asimétricos y de color verde claro. El porcentaje de exocarpo es superior. Contenido de azúcares y acidez superior, con porcentaje de pulpa y número de semillas inferior al promedio.
E	Procedentes de Valle del Cauca (2 accesiones, equivalentes al 2,86%). Hojas elípticas, de base acuminada y ápice agudo, y de tamaño superior. Hábito de fructificación bajo y mayor número de frutos. Frutos de peso y tamaño promedio, cordiformes, asimétricos y de color verde. El grosor y el porcentaje de su exocarpo es inferior. Contenido de azúcares y ácido cítrico promedio, ligeramente ácidos, con

GRUPO	CARACTERÍSTICAS (Accesiones de *A. squamosa*)
	porcentaje de pulpa promedio y menor número de semillas.
F	Procedentes del Atlántico, Casanare, Cesar, Córdoba, Cundinamarca, Guajira, Magdalena, Sucre, Tolima y Valle del Cauca (40 accesiones, equivalentes al 57,14%). Hojas ovadas, de base obtusa y ápice agudo, y de tamaño promedio. Hábito de fructificación medio y número de frutos promedio. Frutos de peso y tamaño promedio, cordiformes, asimétricos y de color verde claro. Contenido de azúcares promedio, menor contenido de ácido cítrico, ligeramente ácidos, con número de semillas promedio.

Para la especie ***A. reticulata***, inicialmente, se realizó el análisis univariado con los 39 descriptores[8] (en un total de 18 accesiones), pero el análisis de componentes principales contempló 25 descriptores que se relacionan con los parámetros de calidad definidos a nivel comercial. Los resultados del PCA denotan que los siete primeros componentes aportan el 86% de la variabilidad total (eigenvalue superiores a 1), siendo las variables más informativas la longitud y ápice de la hoja, el peso del fruto, el diámetro polar y ecuatorial del fruto, el tipo, color y peso del exocarpo, el peso del ráquis, la pulpa y la semilla, y el número de semillas (Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos). En el diagrama bidimensional se observan inicialmente tres grupos de accesiones; que se aglomeran por las características del fruto (grupo A y B) y las características de las hojas y algunas de los frutos (grupo C) (Figura 2-6).

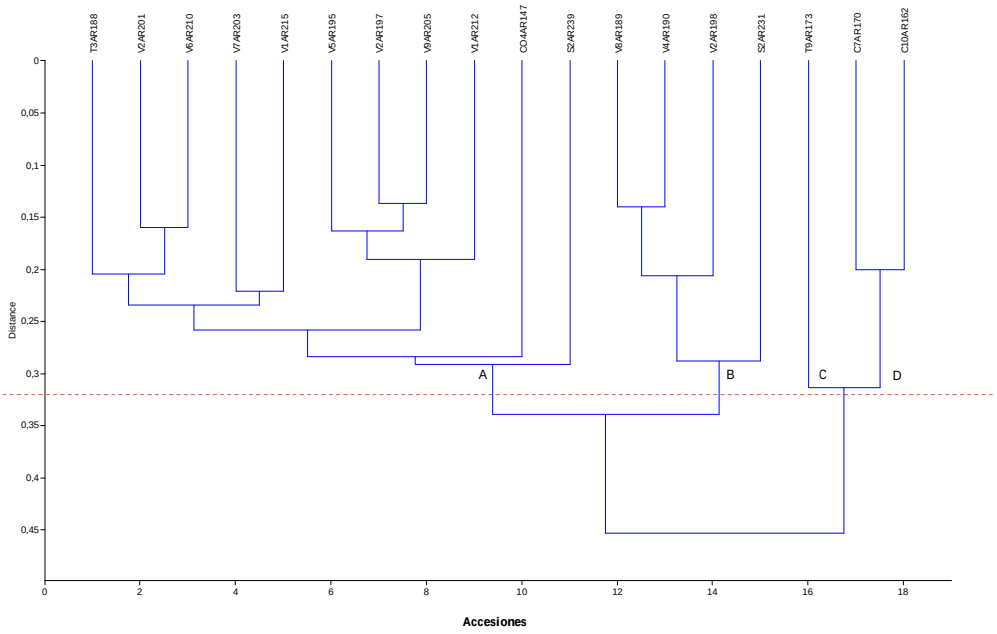


Software PAST 2.17.

Figura 2-6: Diagrama bidimensional de las variables morfológicas evaluadas en *A. reticulata*.

En el análisis de conglomerados, se identifican cuatro grupos de accesiones (a una distancia Gower de 0,32)[9], que tienden a aglomerarse según la procedencia, notando que en el grupo A se ubican la mayor cantidad de accesiones, provenientes de los departamentos de Tolima, Valle del Cauca, Santander y Córdoba (Figura 2-7). En los demás grupos se integran unas pocas accesiones.

[8] 14 descriptores generales (ambiente de sitio y de árbol) y 25 descriptores morfológicos (hoja, frutos y semillas).
[9] Se observa la conformación de grupos evidentes.



Software PAST 2.17.

Figura 2-7: Dendrograma correspondiente a las variables morfológicas evaluadas en *A. reticulata*.

Al analizar con mayor detenimiento los cuatro grupos de accesiones de *A. reticulata*, se identificó que los rasgos fenotípicos son los principales aspectos que los diferencian; lo que permite definir las principales homologías y diferencias entre los grupos, que para anón liso se deben básicamente a la calidad del fruto (tamaño, peso, simetría, grados brix, pH, acidez, peso y número de semillas); sin embargo, la procedencia es un aspecto de importancia en el agrupamiento (Tabla 2-9 y Anexo F: Mapas de distribución geográfica de los conglomerados identificados de las especies representativas).

Tabla 2-9: Características generales de los grupos de accesiones de *A. reticulata* (población *in situ*).

GRUPO	CARACTERÍSTICAS (Accesiones de *A. reticulata*)
A	Procedentes de Córdoba, Santander, Tolima y Valle del Cauca (11 accesiones, equivalentes al 61,11%). Hojas lanceoladas, de base obtusa, ápice acuminado y tamaño superior. Hábito de fructificación superior y menor número de frutos. Frutos de peso y tamaño inferior, redondos, asimétricos, de exocarpo con depresiones suaves y color verde amarronado. Contenido de azúcares y ácido cítrico inferior, baja acidez. El porcentaje de exocarpo es superior, mientras que el porcentaje de pulpa es inferior y contiene el menor número y peso de semillas.
B	Procedentes del Valle del Cauca y Santander (4 accesiones, equivalentes al 22,22%). Hojas lanceoladas, de base obtusa, ápice agudo y longitud inferior. Hábito de fructificación bajo y número de frutos promedio. Frutos de peso y tamaño promedio, cordiformes, simétricos, de exocarpo con depresiones suaves y color verde amarillento. Superior en contenido de azúcares y pH. El grosor de su exocarpo es superior, con porcentaje de pulpa y número de semillas promedio.
C	Procedentes del Tolima (1 accesión, equivalente al 5,56%). Hojas lanceoladas, de base redonda, ápice agudo y anchura inferior. Hábito de fructificación medio y mayor número de frutos. Frutos de peso y tamaño superior, redondos, simétricos, de exocarpo liso y color verde rojizo. Contenido de azúcares promedio, contenido de ácido cítrico superior y menor acidez. El grosor de su exocarpo es inferior, mientras que su porcentaje es inferior. Porcentaje de pulpa, peso de pulpa y número de semillas superior.
D	Procedentes de Cundinamarca (2 accesiones, equivalentes al 11,11%). Hojas ovadas, de base obtusa, ápice agudo y tamaño promedio. Hábito de fructificación bajo y número de frutos promedio. Frutos de peso y tamaño promedio, cordiformes, asimétricos, de exocarpo liso y color amarillo rojizo. Contenido de azúcares y ácido cítrico promedio, ligeramente ácidos, con porcentaje de pulpa, peso de pulpa y número de semillas promedio.

2.5 Discusión

Al analizar las características de distribución geográfica y clima de las zonas en la que se hallan las especies que conforman la población *in situ*, se observa que *A. squamosa, A. reticulata, A. glabra, A. squamosa x A. cherimola y Rollinia sp.,* se encuentran en un amplio rango altitudinal y geográfico del país, en zonas de clima predominantemente cálido y temperaturas altas, humedad relativa intermedia y precipitación moderadamente baja; contrario a lo observado en *A. cherimola*, que se encuentra en zonas con características de distribución geográfica y clima diferentes. Esta información concuerda con los reportes hechos por Hoyos (1989), George y Nissen (1987) y Guerrero & Fischer (2007), sobre los rangos altitudinales de las especies y de temperatura, humedad relativa y precipitación más apropiados para su desarrollo. Sin embargo, la información de pasaporte, sitio y medio ambiente podrá emplearse a futuro, en el desarrollo de estudios edafoclimáticos y de interacción genotipo x ambiente, complementando el proceso de documentación de los recursos fitogenéticos de estas especies en Colombia.

El análisis morfoagronómico de las especies que conforman la población *in situ* de anonáceas (*A. cherimola, A. squamosa x A. cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa* y *Rollinia sp.*), denota que las características cuantitativas del fruto (peso del fruto, diámetro polar y ecuatorial, peso del exocarpo, del ráquis y de la pulpa, grados brix, acidez y peso de la semilla), son las que hacen un mayor aporte en dicha variación. El análisis de conglomerados a nivel interespecífico, deja ver la conformación de seis grupos, en los cuales predomina la diferencia entre las especies según los rasgos morfológicos de las hojas y los frutos.

Con respecto a los descriptores identificados como los que aportan mayor variabilidad fenotípica en especies de la familia Annonaceae en colecciones *ex situ* e *in situ*, y que coinciden con los empleados en el presente estudio, se observa que para la especie *A. cherimola* son: peso de todas las semillas (Alavéz-López *et al*., 2000), pH (Alavez-López *et al.,* 1997; Andrés-Agustín *et al.*, 2006 y Tacán, 2007), grados brix (Tacán, 2007), peso del fruto (Morales *et al*., 2004 y Andrés-Agustín *et al.*, 2006), peso de la pulpa y peso de las semillas por fruto (Tacán, 2007), forma de la hoja (Alavez-López *et al.,* 1997) y tamaño de la hoja (Andrés-Agustín *et al*., 2004 y Alavez-López *et al*., 1997). Esta información es de utilidad en el posterior proceso caracterización y evaluación morfológica de las colecciones de trabajo establecidas por medio de la presente investigación.

En la población *in situ* se observa que las accesiones de *A. squamosa* y *A. reticulata* que conforman la colección, presentan similaridad morfológica según la procedencia, ya que aquellas accesiones provenientes de la Zona Caribe y algunas pocas provenientes de la Zona Andina se ubican en un gran grupo. En contraste, se observa que para las dos especies de mayor representatividad en la colección, algunas accesiones provenientes de los departamentos de Cundinamarca, Tolima y Valle del Cauca, se agrupan en conglomerados diferentes y sus características morfológicas son relevantes para el mercado y el consumo. La información aquí obtenida, se complementa con el análisis molecular, sin embargo, para concluir la incidencia de la procedencia en los rasgos fenotípicos es necesario en desarrollo de un estudio edafoclimático.

Al comparar algunas de las características físicas de los genotipos de la población *in situ* de anón (*A. squamosa*) en Colombia, con genotipos de *A. squamosa* en Brasil, se

observa que el número de semillas promedio por fruto en los grupos obtenidos tras el análisis multivariado (análisis de conglomerados) oscila entre 13 y 84, y es igualmente variable a los valores obtenidos por Cavalcante *et al*. (2011), quienes encontraron en los genotipos evaluados dentro de un banco activo de germoplasma, una variación entre 11 y 47 semillas por fruto. Aunque la población base de comparación en el presente análisis es mucho más amplia (70 accesiones procedentes de 10 departamentos) que la empleada por los investigadores Brasileros (12 genotipos identificados en 1 municipio), los valores de referencia hallados por los investigadores Brasileros, es de utilidad como medida de productividad en *A. squamosa* para el caso de estudio.

Al contrastar los resultados de la forma del fruto en las accesiones de *A. squamosa* de la población *in situ*, con respecto a la relación entre el diámetro longitudinal y transversal del fruto (relacion DL/DT), se observa que los valores oscilan entre 0.76 y 1.03, lo que permite categorizarlos como frutos redondos aptos para el mercado. Según Araújo Filho *et al*. (1998), esta característica es relevante para la comercialización de frutas de mesa, puesto que cuando el valor se acerca a 1.0 los frutos son de forma redondeada y clasifican como frutos de cualidad para mesa, característica de especial relevancia para el anón de consumo fresco. Cavalcante *et al*. (2011), hicieron la misma comparación en genotipos *A. squamosa* L., y encontraron igualmente, que son frutos que cumplen con las características de forma exigidas por el mercado Brasilero. Esta relación, podrá tenerse presente en futuras investigaciones.

Aunque en el presente estudio no fue contemplada la evaluación de la interacción genotipo por ambiente, las variaciones morfológicas a nivel intraespecífico pueden atribuirse en parte, a la amplia distribución geográfica de la población *in situ*, a las diferentes características de ambiente de sitio y a las condiciones climáticas de las regiones contempladas. Al respecto, podría pensarse que exista una relación entre la distribución geográfica y los genotipos evaluados, si se tiene en cuenta que la colecta se hizo en ciudades y centros poblados, y las especies vegetales alimenticias han sido objeto de un proceso de domesticación; según la FAO (1992), “probablemente el mayor número de domesticaciones se hizo con los frutales”. No obstante, hay rasgos morfológicos relacionados con la calidad del fruto (p.e. tamaño, peso, simetría, grados brix, pH, acidez, peso y número de semillas en *A. squamosa y A. reticulata*), que condicionan el agrupamiento de las accesiones según su similaridad.

2.6 Conclusiones

La etapa de prospección y colecta de recursos fitogenéticos de especies de la familia Annonaceae en Colombia, contribuyó en la conformación de una población *in situ* compuesta por 167 accesiones distribuidas en 13 departamentos y 48 municipios de las regiones Andina y Caribe, pertenecientes a cinco especies y un híbrido interespecífico (*Annona squamosa, A. reticulata, A. cherimola, A. glabra, Rollinia sp.* y *Annona squamosa x A. cherimola*). La caracterización y evaluación morfológica de la población *in situ*, permitió la identificación de la variabilidad morfológica a nivel inter e intraespecífico, así como de los genotipos con características físicas deseables para el mercado y consumo de frutas de anonáceas y de los rasgos físicos de mayor capacidad discriminante en lo relacionado con la calidad del fruto.

La evaluación morfoagronómica de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia, contempló la valoración de descriptores cuantitativos y cualitativos de la hoja, el fruto y la semilla (25 en total) para las especies *A. cherimola, A. squamosa x A. cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa* y *Rollinia sp.*, evaluando un número diferente de accesiones según su distribución geográfica. A través del análisis exploratorio de los datos, se identificaron diferencias interespecíficas en los descriptores de hojas y frutos, específicamente en los rasgos de longitud y anchura de hoja, forma del fruto, diámetro polar y ecuatorial del fruto, tipo y grosor de exocarpo, grados brix, acidéz, pH, porcentaje de exocarpo y de pulpa.

Una aproximación en la clasificación de los frutos de especies de la familia Annonaceae, con base en el análisis exploratorio de las características morfológicas y el reglamento de la Orden APA/3120/2002 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España), para la denominación de origen de frutos de chirimoya, permite identificar de manera preliminar, que para las especies *A. reticulata y A. squamosa* evaluadas en la población *in situ*, los departamentos en los que se encuentran frutos de categoría superior son Cundinamarca y Tolima, mientras que para *Rollinia sp. y A. squamosa x A. cherimola* es en el Valle del Cauca. En la población *in situ*, la mayoría de los frutos de las especies evaluadas son clasificados como comunes ya que sus características difieren en gran medida de las exigidas por el mercado de frutales a nivel internacional, aspecto que resalta la importancia de la implementación de un PMG en el país, enfocado en la calidad de los frutos y la obtención de variedades a partir de características morfoagronómicas como peso, forma, color, contenido de pulpa y sabor.

A nivel intraespecífico, el agrupamiento de accesiones de anón rugoso (*A. squamosa*) deja ver que la mayoría de los frutos (grupo C), presentan características de forma y tamaño del fruto aceptables en el mercado nacional, caracterizándose por ser de peso y tamaño inferior (71g y de diámetro polar y ecuatorial de 46,51 y 62,45 cm respectivamente), cordiformes, asimétricos, de porcentaje de pulpa y exocarpo intermedio (45% y 50% respectivamente) y con un número de semillas promedio para la especie (15 semillas por fruto). No obstante, el grupo A, reúne una accesión que cumple con la mayoría de características deseables en el mercado (forma del fruto, peso del fruto y simetría); aunque el contenido de grados brix (°brix) y el porcentaje de pulpa son inferiores y presentan la mayor cantidad de semillas, con respecto a los demás grupos. Aún así, entre los grupos identificados se observa variabilidad en las características morfológicas, que pueden ser ampliamente aprovechadas a través de un PMG, con el objetivo de favorecer la calidad del fruto.

Por otra parte, el agrupamiento de accesiones de anón liso (*A. reticulata*) deja ver que la mayoría de los frutos (grupo A), presentan características de forma y tamaño del fruto aceptables en el mercado nacional, caracterizándose por ser de peso y tamaño inferior (207g, de diámetro polar y ecuatorial de 76,27 y 77,53 cm respectivamente), redondos, asimétricos, de porcentaje de pulpa inferior (40%) y exocarpo superior (49%), con un bajo contenido de azúcares en la pulpa (19,30 °brix), ligeramente ácidos (5,01) y con un bajo número de semillas (31 semillas por fruto en promedio). En el anón liso, los frutos de peso superior (1 individuo en el grupo C), son simétricos, son redondos, tienen un contenido de azúcares en la pulpa intermedio (20,20 °brix), son ácidos y presentan un alto número de semillas en su interior (95 semillas); aspectos que son poco deseables en el mercado.

Tanto para las especies más representativas como para las presentes en la población *in situ*, es necesario implementar un PMG enfocado en la productividad y en la calidad de los frutos, partiendo de la información obtenida a través de la investigación, así como es preciso el desarrollo de investigaciones a nivel molecular que permitan genotipificar las accesiones que conformen las colecciones de trabajo y el banco de germoplasma que será empleado como un banco de genes que codifiquen para características de interés agrícola y constituyan los insumos para el PMG en el país.

La evaluación morfológica de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia, es una herramienta clave en el conocimiento de sus RFG y se constituye en el insumo fundamental de conservación de germoplasma con fines de producción alimenticia e industrial y de estudios a nivel molecular, permitiendo la identificación de relaciones genéticas de parentesco entre individuos presentes en diferentes departamentos del país. Lo anterior, se convierte en un invaluable recurso para el desarrollo de diferentes PMG y de conservación del recurso genético de especies de frutales ampliamente distribuidas y demandas por la población local. A esto debe sumarse un programa de manejo fitosanitario que reduzca la afectación y pérdida de individuos.

2.7 Recomendaciones

Si bien, dentro de la población *in situ* se identificaron algunos materiales de características superiores de las especies más representativas, es conveniente antes de iniciar con el programa de fitomejoramiento, se realice una nueva etapa de prospección, con el objetivo de enriquecer las colecciones de trabajo a través del incremento del número de accesiones por especie y por sitio, la colecta de material vegetal de las accesiones que no se encontraban en etapa de fructificación y el desarrollo de visitas de exploración en las regiones Amazonía, Andina, Caribe, Orinoquía y Pacífico. Sin embargo, se recomienda llevar a cabo paralelamente, la evaluación morfológica y molecular de las colecciones de campo, así como la multiplicación, regeneración y monitoreo del banco de semillas.

Se recomienda que el enriquecimiento de las colecciones se complemente con la evaluación de los rasgos de los frutos en fase de maduréz óptima y con la colecta de al menos 10 frutos típicos y bien desarrollados (Bioversity International y CHERLA, 2008). En contraste, si el objetivo es enriquecer la variabilidad de la colección de semillas y evaluar su desarrollo, se recomienda la colecta de pocos frutos por accesión y el incremento del número de accesiones por procedencia, lo que permitiría posiblemente capturar un mayo número de alelos.

Al conocer las características de la población *in situ* a partir de la cual se conformaron las colecciones de trabajo de especies de la familia Annonaceae, es posible definir un método de selección apropiado, que favorezca la expresión de genes que codifiquen para características cuantitativas como peso del fruto, contenido de grados brix y número de semillas, que bajo un manejo agronómico adecuado, permitirán incrementar la calidad de los frutos que se obtengan en nuevas generaciones. Así mismo, teniendo en cuenta las características morfológicas de las accesiones según su procedencia, la implementación de un PMG, no solo con fin de producción, sino también de conservación, permitirá contar con material vegetal de amplia variabilidad, que supla las

diferentes necesidades del mercado nacional e internacional, y favorezca el desarrollo de cadenas productivas de especies promisorias, como los frutales de la familia Annonaceae.

Aunque se emplearon descriptores morfológicos desarrollados para *A. cherimola* por Bioversity International y CHERLA (2008), se recomienda una evaluación más profunda de los descriptores útiles por especie, puesto que podrían estarse empleando marcadores morfológicos que no aporten mayor información con respecto a los rasgos de especies relacionadas. Una revisión taxonómica detallada, junto con el desarrollo de un análisis discriminante que complemente el análisis multivariado desarrollado, permitiría la identificación de rasgos que mejor discriminan los conglomerados obtenidos.

Si bien, la comparación de los patrones de distribución con los indicadores climatológicos del IDEAM (2011), fue de gran utilidad en la identificación de características generales de la población *in situ;* la información obtenida en el proceso de documentación de recursos fitogenéticos de especies de anonáceas en el país, podrá emplearse a futuro en el desarrollo de estudios edafoclimáticos o en la evaluación del efecto de la interacción genotipo x ambiente. El análisis de las posibles correlaciones que existan entre la geografía y la morfología, así como la identificación del grado de plasticidad fenotípica, serán de gran utlidad en el el programa de mejoramiento genético que se implemente en el país para estas especies.

3. Evaluación molecular de accesiones de anonáceas de una población *in situ* en Colombia

3.1 Resumen

Veinte marcadores moleculares tipo microsatélite desarrollados para *Annona cherimola,* fueron empleados para evaluar por medio de amplificación cruzada, una población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia. Los resultados obtenidos permitieron el desarrollo preliminar de protocolos de extracción de ADN, de PCR y PAGE para las especies *A. squamosa* y *A. reticulata, A. cherimola*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A. squamosa x A. cherimola* y *Rollinia sp*. Seis SSR fueron transferibles en seis especies y un híbrido interespecífico, y las especies *A. squamosa*, *A. reticulata* y *A. cherimola* fueron evaluadas por medio de seis, siete y siete SSR, respectivamente. El análisis intrapoblacional revela valores promedio de heterocigosidad observada y esperada entre 0,36-0,63 (*A. squamosa*), 0,50-0,63 (*A. reticulata*) y de 0,64-0,62 (*A. cherimola*). En la población, *A. squamosa* y *A. reticulata* presentan déficit de heterocigotos y se halló un mayor número variable de alelos por locus, así como mayor riqueza alélica y mayor diversidad en *A. squamosa*. A nivel interpoblacional, las especies más representativas (*A. squamosa* y *A. reticulata*), revelan una mayor variación genética dentro de las poblaciones *a priori* (regiones geográficas), detectando un bajo grado de diferenciación genética en *A. squamosa* y una ausencia de estructura poblacional en *A. reticulata*. En *A. squamosa* existe un mayor número de alelos compartidos entre las accesiones de Cundinamarca y las demás accesiones evaluadas, mientras que en *A. reticulata* esto se presenta entre las accesiones provenientes de Santander y las de Cundinamarca y Casanare.

3.2 Introducción

Según el IPGRI y Cornell University (2004), “la diversidad genética se refiere a la variación de los genes de las especies, o sea, a la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos”. No obstante, es preciso considerar que podría presentarse alta variación, pero baja diversidad genética[10]; aspecto que deberá analizarse detenidamente en la evaluación molecular. Según los autores, la variación se presenta en a) La secuencia de ADN, b) La cantidad de ADN por célula, o c) El número y la estructura de los cromosomas.

[10] Chacón. M.I. Comunicación por vía electrónica el 6 de enero de 2014.

La diversidad genética es el resultado de la selección, la mutación, la migración, la deriva genética y la recombinación (solas o en conjunto). Estos fenómenos ocasionan cambios en las frecuencias génicas y genotípicas, lo que conduce a la evolución de las poblaciones. La generación de nueva variación genética se produce continuamente en los individuos a causa de las mutaciones cromosómicas y génicas, las cuales se propagan en los organismos de reproducción sexual, mediante la recombinación. La variación genética recibe también el influjo de la selección. Las consecuencias de estos fenómenos son los cambios en las frecuencias genotípicas y alélicas, que son los responsables de la evolución de las poblaciones (IPGRI y Cornell University, 2004).

Según los autores, para poder conservar y usar la variación genética, primero hay que evaluarla, es decir, es preciso determinar su extensión y distribución. La variación puede evaluarse a nivel tanto fenotípico como genotípico. La evaluación de la **variación fenotípica** contempla principalmente los rasgos morfológicos, es decir, en aquellas características que definen la forma y la apariencia de un conjunto de individuos. Algunos de estos caracteres pueden considerarse "genéticos" si su presencia en individuos emparentados es hereditaria y no depende del ambiente; esto quiere decir que esos caracteres están asociados con una secuencia específica de ADN. Sin embargo también incluye el producto de la expresión de los genes (ARN y proteínas) y la variación epigenética que podría ser igualmente heredada.[11] La evaluación de la **variación genotípica** se hace al nivel de la molécula de ADN, que es la responsable de la transmisión de la información genética. La molécula de ADN está compuesta por nucleótidos organizados en una configuración de doble hélice, cuyo nivel de complejidad aumenta hasta constituir los cromosomas.

Un marcador genético es un carácter cuantificable que puede detectar variación ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN. Una diferencia, bien sea fenotípica o genotípica, puede actuar como marcador genético si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo, o de ambos y si, además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones (IPGRI y Cornell University, 2004). Un marcador genético podría igualmente incluir rasgos morfológicos que no tengan influencia ambiental.[12]

Según los autores, los marcadores genéticos pueden ser de 3 tipos: a) morfológicos, b) protéicos o bioquímicos, y c) de ADN o moleculares. Los **marcadores moleculares** (empleados en el presente estudio) afectan a la molécula de ADN como tal y se consideran, por ello, medidas objetivas de la variación. No están sujetos a las influencias ambientales, las pruebas con ellos pueden realizarse en cualquier momento del desarrollo de las plantas, y tienen el potencial de hallarse en número ilimitado porque abarcan todo el genoma, lo que representa su mejor atributo. Los polimorfismos del ADN pueden detectarse en el ADN nuclear y en el ADN de los organelos; este último se encuentra en las mitocondrias y en los cloroplastos en las plantas (IPGRI y Cornell University, 2004).

Los marcadores moleculares han sido empleados en recientes años para realizar ensayos que permitan la detección de secuencias específicas entre dos o más individuos. La variabilidad o polimorfismo de estos marcadores puede ser usado en los

[11] Chacón. M.I. Comunicación por vía electrónica el 6 de enero de 2014.
[12] Ibid.

diferentes estudios sobre la diversidad genética de las especies vegetales y su herencia puede ser monitoreada (Chávez, 2003). Según IPGRI y Cornell University (2004), las siguientes son las propiedades deseables de un marcador genético: altamente polimórficos, reproducibles, codominantes, se encuentran distribuidos en todo el genoma, son discriminantes, no están sujetos a influencias ambientales, son neutrales, de bajo costo y fácil medición.

Los **microsatélites o secuencias simples repetidas** (SSRs) son secuencias de ADN de 1 a 4 pares de bases que se repiten *en tandem* a lo largo de un cromosoma, por ejemplo mononucleótidos (T)n, dinucleótidos (AT)n, trinucleótidos (ATC)n o tetranucleótidos (AAGG)n. Estos loci son de copia única, se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan alto polimorfismo (Armour *et al*., 1994; Coltman *et al*., 1996 y Gupta *et al*., 1994). De igual manera, los SSRs se forman posiblemente por errores de la ADN polimerasa al momento de la replicación del ADN, ya que al tratarse de secuencias repetidas, esta enzima puede experimentar lo que se conoce como “deslizamiento”, copiando una o más unidades repetidas adicionales en comparación con el ADN molde. Como resultado de los procesos que reparan estos errores de la polimerasa, se pueden obtener nuevos alelos con un número diferente de repeticiones con relación a la molécula molde original.[13] Los microsatélites de ADN nuclear han sido detectados en múltiples grupos de plantas y animales, y han sido utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos (Nagata *et al*., 2004).

Los microsatélites han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs, debido a que: i) Tienen el más alto grado de polimorfismo; ii) Segregan de manera mendeliana y son codominantes; iii) La presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar y iv) Son selectivamente neutros (Golstein y Pollock, 1994 y Vendramin *et al*., 1996). Además, para trabajar con SRR es necesario conocer la secuencia de la región a analizar para contar con primers específicos que amplifiquen la región repetitiva (el microsatélite) responsable de la variación observada, que además es homóloga para diferentes especies o incluso géneros (Golstein *et al*., 1996). Esto es, los microsatélites son específicos para ciertos grupos de especies y homólogos entre sí (Vendramin *et al*., 1996), lo que permite hacer estudios comparativos entre especies o géneros de un mismo grupo (Eguiarte *et al*., 2007). Otra ventaja que presenta el uso de microsatélites con relación al uso de secuencias, es que la mutación es homogénea: en la mayoría de los SSR las mutaciones son de un paso (una unidad repetitiva) siguiendo el modelo mutacional SMM (stepwise mutation model) de Ohta y Kimura (1973). Los fragmentos son separados por medio de electroforesis en geles de acrilamida (Eguiarte *et al*., 2007), electroforesis capilar o por medio de genotipeo directo de loci SSR con NGS (Tecnologías de Secuenciación de Siguiente Generación, por su sigla en inglés)[14] y son visualizados con nitrato de plata o radioactividad.

Tras el desarrollo de técnicas de biología molecular y a partir del interés de identificar cultivares, caracterizar colecciones *in situ* y *ex situ*, y documentar bancos de germoplasma en especies de la familia Annonaceae, desde hace décadas se han venido desarrollando investigaciones en el área, que han permitido evaluar la diversidad

[13] Chacón. M.I. Comunicación por vía electrónica el 6 de enero de 2014.
[14] Ibid.

genética existente (principalmente en *A. cherimola*, una especie de interés agroalimentario a nivel mundial), empleando diferentes métodos de análisis entre los que se encuentran estudios isoezimáticos (Perfectii y Pascual, 2005; Zavala *et al*., 2009 y Salazar *et al*., 2010) y los de marcadores moleculares tipo SRR (Escribano *et al*., 2004; Hormanza *et al*., 2007; Kwapata *et al*., 2007; Escribano *et al*., 2008a y 2008b; Chatrou *et al*., 2009), ISSR (Rascoe *et al*., 2004), AFLP (Rahman *et al*., 1998 y Narváez-Trujillo *et al*., 2007), RAPD (Owens, 2003; Brown *et al*., 2003; Ballesteros *et al*., 2006 y Souza *et al.*, 2010) y RFLP (Rahman *et al*., 1997), entre algunas otras investigaciones.

La historia investigativa en especies de la familia Annonaceae se fundamenta en los resultados obtenidos tras un largo proceso de mejoramiento genético que se ha llevado a cabo en la chirimoya (George *et al.*, 1999 y Chatrou, 1999b) y la atemoya (George *et al.*, 1999). Las especies de esta familia botánica tienen una interesante historia biogeográfica (Richardson *et al.*, 2004) que ha permitido identificar mediante el uso de la biotecnología y el desarrollo de continuas investigaciones, las relaciones filogenéticas existentes (Doyle y Le Thomas, 1997).

Uno de los mejores aportes en el área molecular para las especies de estudio, han sido los hechos por Escribano *et al*., en el año 2004, quienes publicaron 15 marcadores moleculares tipo microsatélite (SSR) identificados para *A. cherimola* Mill., usando dos librerías genómicas del cultivar Fino de Jete, digeridas con HaeIII y RsaI y enriquecidas con repeticiones CT/GA. El polimorfismo de dichos marcadores se estudió en 23 accesiones de chirimoya provenientes de diferentes áreas geográficas (Bolivia, Colombia, Ecuador, México, Perú, Portugal y España), evaluando igualmente su transferibilidad en otras especies de la familia, al incluir en el análisis dos cultivares de atemoya (*A. cherimola x A. squamosa*), y en un genotipo de *A. squamosa*.

Retomando este trabajo, Hormanza *et al*. (2007), emplearon 16 SSR para evaluar polimorfismos moleculares en 279 genotipos de *A. cherimola* Mill., pertenecientes a una colección *ex situ* de germoplasma proveniente de diferentes países del mundo (Australia, Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, España, Estados Unidos, Italia, México y Perú). En la investigación, los SSR estudiados dieron origen a 267 diferentes perfiles genéticos (*fingerprinting profiles*), de los cuales 258 fueron genotipos únicos, mientras que el resto correspondieron a duplicados o errores de etiquetado en el BGP.

Los resultados obtenidos por Escribano *et al.* (2004), le permitirían años después (Escribano *et al.*, 2008a), evaluar un mayor número de SSR (52 SRR en 23 cultivares de chirimoya). Estudio en el cual se detectaron 222 alelos (media de 4,3 alelos por locus) y se halló una Ho y He que osciló entre 0,08 y 0,73 (media de 0,40) y de 0,20 y 0,84 (media de 0,57) respectivamente. Estos valores fueron similares a los obtenidos en chirimoya con 155 SRR (Escribano *et al.*, 2004) y permitió identificar un set de 20 SSR (LMCH36, LMCH39, LMCH40, LMCH48, LMCH63, LMCH69, LMCH83, LMCH87, LMCH91, LMCH102, LMCH106, LMCH122, LMCH131, LMCH137, LMCH139 y LMCH144 de Escribano *et al*. (2008a) y LMCH1, LMCH14, LMCH6 y LMCH16 de Escribano *et al*., 2004), seleccionados con base en su polimorfismo y el rango de tamaño de los fragmentos, que permitirán comparar la diversidad genética en diferentes países donde hay recursos fitogenéticos de chirimoya.

A nivel poblacional, también se ha estudiado la diversidad genética presente en *A. senegalensis* Pers. (Kwapata *et al*., 2007), empleando en la evaluación nueve poblaciones (total de 135 muestras) y cuatro SSR desarrollados en *A. cherimola* por

Escribano *et al*. (2004), de los cuales tres resultaron útiles en el estudio (M04, M06 y M11). En la investigación, se detectó un total de 23 alelos en las poblaciones estudiadas y los parámetros de diversidad genética revelaron altos niveles de heterocigosidad (entre 4 y 14 alelos por locus). En el estudio, se encontraron 34 genotipos y se observó asociación entre la distancia genética y geográfica en los individuos, indicando que existe una diferenciación ecotípica y una distancia geográfica a gran escala, que se refleja en los marcadores SSR. En este caso, la alta diversidad genética es atribuida a las características biológicas de la especie y a la heterogeneidad del hábitat. Finalmente, el estudio revela la utilidad del uso de marcadores SSR de chirimoya en la evaluación de la especie *A. senegalensis* Pers.

La utilidad de los marcadores moleculares en el análisis de diversidad de especies de la familia Annonaceae, ha sido igualmente corroborada por investigadores como Chatrou *et al*. (2009), al desarrollar un análisis filogenético por medio del uso del gen *rcbL* y los espaciadores intergénicos *trn*L-*trn*F y *psb*A-*trn*H (Pirie *et al*., 2006 y 2007) y dos loci microsatélite desarrollados en chirimoya (locus LMCH9 y el LMCH10; Escribano *et al*., 2004), en una colección de 24 especies (22 del género *Annona* y dos del género *Asimina*) que representan una amplia y completa muestra de la distribución geográfica del género, con una considerable variación morfológica.

Los resultados obtenidos les permitieron demostrar la utilidad de estos marcadores en el análisis, ya que al obtener los filogramas por medio del análisis de máxima parsimonia, fue posible observar el agrupamiento de especies según el género (*Annona* y *Rollinia*) y la agrupación similar por clados para algunas especies de la familia, como sucede en el caso de *A. deminuta, A. montana y A. muricata, y de A. glabra y A. senegalensis*. En contraste, identificaron un patrón de agrupación variable en otras especies del género *Annona* y *Rollinia*. Lo anterior, les permitió corroborar la utilidad de los marcadores moleculares en el análisis filogenético en angiospermas, ya que resultaron útiles en la identificación de relaciones a nivel de especie y son congruentes con la evolución molecular de esas mismas regiones, convirtiéndose en una herramienta clave en la clasificación taxonómica.

En Colombia, el conocimiento que se tiene de la diversidad genética de especies de la familia Annonaceae es escaso, por lo tanto, para la implementación de un PMG en frutales como el anón (*A. squamosa, A. reticulata*), la chirimoya (*A. cherimola*) y la atemoya (*A. squamosa x A. cherimola*), es preciso conocer la variabilidad genética de la población *in situ* a partir de la cual se han establecido las colecciones de trabajo empleadas como estrategia de conservación *ex situ* de sus recursos fitogenéticos. A través de la evaluación morfoagronómica y molecular de las colecciones, es posible identificar accesiones con características fenotípicas superiores que cumplan con las exigencias del mercado nacional e internacional y fortalecer el conocimiento de la riqueza genética de la colección, maximizando así la función productiva de los cultivos cuyos componentes son el genotipo, el fenotipo y la interacción genotipo x ambiente.

En ese sentido, a continuación se presentan los resultados obtenidos en la evaluación molecular de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia, a través de la cual se estimaron los parámetros de diversidad genética siguiendo los lineamientos descritos por Escribano *et al.* (2004 y 2008a). En general, el proceso de evaluación se fundamentó en cinco fases: colecta de material vegetal, extracción de ADN, amplificación cruzada por medio de PCR, visualización de patrones electroforéticos

por medio de la PAGE y análisis estadístico de la información. Y de manera complementaria, se presenta un análisis integrado de la evaluación morfológica y molecular.

3.3 Metodología

En la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae (167 accesiones en total), conformada a partir de la prospección de los RFG, se colectó material vegetal (hojas) de 155 accesiones, pertenecientes a cuatro especies y un híbrido interespecífico (*A. cherimola, A. glabra, A. reticulata, A. squamosa y A. squamosa x A. cherimola*), distribuidas en 13 departamentos y 48 municipios de Colombia. Es preciso aclarar que en el presente estudio, el término de "población", no se refiere a un grupo de organismos de la misma especie que ocupan un lugar particular en un tiempo particular (Krebs, 1994; Roughgarden *et al*., 1989), sino que se refiere al conjunto total de accesiones de todas las especies incluidas; ésta se podría concebir entonces, como una población construída.

De cada accesión (representada por un individuo), se tomaron muestras de hojas vigorosas y en buen estado fitosanitario (por los menos cuatro hojas), que se depositaron en papel absorbente dentro de bolsas herméticas con gel de sílice (debidamente identificadas) y se transportaron en neveras de icopor con hielo seco, hasta su almacenamiento en el Laboratorio de Agrobiotecnología (UN, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias Agrarias). Para el acondicionamiento del material vegetal y su posterior almacenamiento en el laboratorio, los foliolos colectados fueron sometidos a un proceso de limpieza con etanol al 70%, seguido de maceración manual (año 2011) y con nitrógeno líquido (año 2012), almacenándolo en tubos eppendorf (debidamente identificados) de 1,5 ml a una temperatura de -20° y -80°C, disponiendo así, de las cantidades necesarias para el trabajo de laboratorio.

Posteriormente, en el año 2012 (junio), se colectó material vegetal (hojas) de los bancos de campo de Corpoica – Nataima (Espinal, Tolima) y la Universidad de Córdoba (Montería, Córdoba), contando con material vegetal macerado de 115 accesiones (33 del BGP de la U. de Córdoba y 82 del BGP de Corpoica – Nataima, equivalentes al 39,76% y al 98,80% respectivamente). Para el análisis molecular, fue empleado el material de las accesiones propagadas por vía asexual, contando con 21 individuos pertenecientes a las especies *A. squamosa* (19 individuos) y *A. reticulata* (2 individuos). Adicionalmente, en este banco de campo se colectó material de *A. muricata* (2 individuos), que se empleó como testigo.

El **proceso de extracción de ADN**, inició en febrero de 2011 y finalizó en diciembre de 2013 y se realizó con el uso del kit de extracción de Qiagen (Kit DNeasy Plant Mini - Qiagen, 2006) y de los protocolos reportados por Doyle y Doyle (1987), Doyle y Doyle (1990), Jobes *et al.* (1995), Conejo (sin publicar),[15] Dellaporta (1983), Doyle y Doyle (1987) modificado por Siqueira M,[16] Godoy y Jordano (2001), Saldaña y Salazar (2007), Escribano *et al*. (2004), Hilje (2008), Díaz *et al.* (2008), Sharma *et al*. (2008), Sambrook y Russell (2001) y Fang *et al.* (1992). En general, los protocolos fueron modificados con

[15] MSc Ana Conejo y PhD Federico Albertazzi (Costa Rica). Comunicación por vía electrónica el 23 de marzo de 2012. Único recurso en internet: http://www.rlb-botanica.org/SimposioCostaRica/Posters/43.Ana%20Maria%20Conejo_Resumen.pdf Consultado el 15/05/12.

[16] Siqueira Marcos. PhD, integrante del Grupo de Genética y Genómica de la Conservación de la Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Piracicaba, SP. Brasil. Comunicación por vía electrónica el 9 de mayo de 2012.

respecto a los reactivos y los volúmenes empleados en pasos de lisis celular, purificación y almacenamiento del ADN. En este proceso, se evaluó principalmente el tiempo de almacenamiento (0 a 24 meses) y la especie, debido a que se observó degradación progresiva del ADN obtenido de las accesiones colectadas en la etapa de prospección en la población *in situ*. De igual manera, fue necesaria la inclusión (como medida de comparación), de materiales de *A. cherimola*, *A. glabra* y *Rollinia sp.,* pertenecientes a la población *in situ* de anonáceas, así como de dos materiales de *A. muricata* (banco de campo de Corpoica – Nataima) como testigo.

La cantidad y calidad del ADN obtenido en las muestras (tejido fresco) se realizó por medio de visualización en gel de agarosa (1%) y cuantificación por medio de espectrofotometría en un Nanodrop (Thermo Scientific). Este procedimiento se llevó a cabo en el año 2011 (febrero a julio), en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias (UN, Sede Bogotá). Los geles se prepararon con agarosa (Amresco) al 1% y buffer TAE (Tris-Acetate) en una solución 0,5X. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio al 0,001%, adicionando a las muestras de ADN blue juice (relación 5:1) y sirviéndolas en cada uno de los pozos. Los geles se corrieron en la cámara de electroforesis, a 100V, durante 25 minutos, visualizándolos en un documentador fotográfico.

A partir del mes de octubre del año 2011, el procedimiento se realizó en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UN. Allí, la integridad del ADN se determinó por medio de geles de agarosa de alta resolución (1%), tomando 3,2 µl de agua HPLC, 0,8 µl de EZvision (6x) y 1 µl de ADN. Las muestras se sometieron a electroforesis en TBE 0,5X, durante 40 minutos a 90V. La visualización se realizó en un transiluminador UV de BIO-RAD®, a través del software Quantity One. Para determinar la concentración de ADN extraído se empleó como control el fago lambda (fago λ), al comparar con 3 concentraciones diferentes (50 ng, 100 ng y 200 ng/µl).

Para determinar cuáles marcadores SSR se emplearían en el estudio, se revisó la información publicada de los análisis de diversidad genética para especies de la familia Annonaceae, encontrando un reporte de 66 SSR desarrollados para *A. cherimola* Mill (52 SSR por Escribano *et al.*, 2008a y 14 SSR por Escribano *et al.*, 2004). La definición de los marcadores a emplear en la colección Colombiana de Anonáceas, se basó en la selección de los SSR polimórficos reportados por Escribano *et al.* (2008a) para *A. cherimola, A. squamosa, A. glabra, Rollinia emarginata, Rollinia salicifolia* y atemoya (cv Gefner y cv. Pink´s mammoth) y su transferibilidad en otras especies (*A. squamosa, A. glabra, A. montana, A. senegalensis, Rollinia emarginata, Rollinia salicifolia*, atemoya cv Gefner y atemoya cv. Pink´s mammoth). La revisión de la información permitió definir un total de 20 SSR (LMCH1, LMCH3, LMCH4, LMCH5, LMCH6, LMCH8, LMCH9, LMCH11, LMCH14, LMCH16, LMCH29, LMCH43, LMCH53, LMCH69, LMCH71, LMCH78, LMCH79, LMCH119, LMCH122 y LMCH144).

El **proceso de amplificación en PCR**, contempló, como primera medida, la inclusión del factor de expresión del gen INO[17] "Inner no outer" conservado entre *A. squamosa* y *Arabidopsis taliana* (Lora *et al.*, 2011), para verificar la utilidad del ADN obtenido tras el proceso de extracción. Para tal fin, se diseñaron los primers por medio del software Primer 3. La PCR de este factor, para un volumen total de 20 µl, se realizó con el kit de

[17] El gen INO es un miembro de la familia de genes Yabby, que codifica los factores de transcripción asociados con la determinación de la polaridad de órganos laterales (Villanueva *et al.*, 1999 y Siegfried *et al.*, 1999)

PCR de Bioline (BIOLASETM PCR Kit), bajo el programa compuesto por 1 ciclo de denaturación inicial a 95ºC durante 3 minutos, 35 ciclos que comprendieron las etapas de denaturación a 95ºC durante 30 segundos, anillamiento con un gradiente de temperatura durante 30 segundos y extensión a 72ºC durante 45 segundos, finalizando el proceso con 1 ciclo de extensión final a 72ºC durante 5 minutos. Para determinar la temperatura de anillamiento de los primers, se incluyó un gradiente térmico que incluyó 5 temperaturas: 58,9°C, 59,6°C, 60,0°C, 61,2°C y 62,3°C.

Seguidamente, se llevó a cabo la amplificación cruzada de los SSR seleccionados, empleando el kit de PCR (BIOLASETM PCR Kit) y ajustando las condiciones de amplificación y el programa reportado por Escribano *et al.* (2008a), para un volumen total de 15 µl. Este procedimiento se realizó en un termociclador MyCicler de Biorad ®, constando de 1 ciclo de denaturación inicial a 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos que comprendieron las etapas de denaturación a 94°C durante 30 segundos, anillamiento con una temperatura entre 43° y 56° (según el SSR) durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, finalizando el proceso con 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos. La visualización de los productos de PCR se realizó a través de electroforesis en gel de agarosa de alta resolución (2%), tomando 1,2 µl de agua HPLC, 0,8 µl de EZvision (6x) y 3 µl de producto de PCR. Las muestras se sometieron a electroforesis en TBE 0,5X, durante 120 minutos a 90V. La visualización se realizó en un transiluminador UV de BIO-RAD®, a través del software Quantity One.

Para **visualización de los patrones electroforéticos** de las muestras de estudio definidas en el proceso de extracción y amplificación con SSR, se empleó el método analítico de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por su nombre en inglés). En el procedimiento, los productos de PCR fueron desnaturalizados por calentamiento a 95°C por 5 minutos, previa adición del buffer de carga (3 µl) de formamida 95% (95% formamida con EDTA 20 mM, 0.25% de xilencianol, 0.25% de azul de bromofenol y 30% de glicerol) durante 5 minutos a 95°C. Se utilizaron alícuotas de 3 µl (producto de PCR) en un gel de acrilamida al 5% (Acrilamida/Bisacrilamida 19:1), empleando un buffer de corrida TBE 1X para la electroforesis, a un pH 8.0 y 60 W, durante un tiempo de corrida de 1 hora. Como medida de comparación del peso de los fragmentos obtenidos, se emplearon tres marcadores de peso molecular: 100 pb, 10 pb y 10 – 300 pb (ultra low range).

Posteriormente, los geles fueron relevados por medio de fijación con ácido acético 3X y etanol 10%, tinción con nitrato de plata 0,2% y formaldehido (0,75 ml/l), revelado con carbonato de sodio (30 g/l), tiosulfato de sodio 2X y formaldehido (0,54 ml/l), finalizando el proceso con una solución de parada con ácido acético 0,5%. Una vez revelados los geles, éstos se dejaron secar a temperatura ambiente. Este procedimiento se llevó a cabo con los productos de PCR de 66 accesiones (PCR 2012 y 2013) y 87 accesiones (PCR 2011), correspondientes a 6 especies (*A. cherimola, A. glabra, A. muricata, A. reticulata, A. squamosa y Rollinia sp*) y un híbrido (*A. squamosa x A. cherimola*). Las pruebas de repetibilidad de los marcadores moleculares empleados, se hizo a través de 2 ensayos de evaluación independiente (en una muestra de las accesiones, debido a la degradación que se presentó en las muestras de ADN), realizados por el mismo analista, bajo las mismas condiciones de PCR, reactivos y equipos. Toda la información se almacenó en una matriz base de análisis (Excel).

El **análisis estadístico** de los resultados contempló la identificación de la reproducibilidad y la transferibilidad de los SSR en las especies evaluadas, seguido de la

determinación de los parámetros de diversidad genética intrapoblacional a través de los programas MSA 4.05 (Dieringer y Schlötterer, 2003), GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2006) y GenePop 4.2 (Rousset, 2008). Los parámetros de diversidad genética calculados fueron riqueza alélica (n° de alelos, A), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), n° de alelos efectivos (NAE), probabilidad de identidad (PI), índice de fijación (F) y valor de significancia del test de Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) a través del programa GenePop 4.2 (Rousset, 2008). El contenido de información polimórfica (PIC) se calculó a partir de la información de frecuencias obtenidas, a través de la fórmula PIC = 1 - $\sum fi^2$, donde: Σfi^2 es la suma de las frecuencias alélicas al cuadrado.

Los parámetros de diversidad genética a nivel interpoblacional fueron estimados a través de las medidas de diversidad en subpoblaciones para el grupo de accesiones de las especies representativas (empleando los programas antes mencionados), complementándolo con la determinación de estadísticos F (Wright, 1978) y el análisis de varianza molecular (AMOVA) por medio de los programas GenAlex 6.5 y GenePop 4.2. De manera complementaria, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) y el Test de Mantel (Mantel, 1967) empleando Gen Alex 6.5, el cálculo de distancias genéticas y su representación por medio de una topología Neighbor-Joining "JN" (empleando el índice de similitud de concordancia simple y método de agrupamiento UPGMA) a través del software Darwin 5 (Perrier *et al*., 2003) y de subestructura de las poblaciones a través del software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al*., 2000). Finalmente, se realizó la comparación de los resultados de la evaluación morfológica y molecular de un grupo de accesiones de las especies más representativas de la población *in situ*, siguiendo los procedimientos anteriormente mencionados

3.4 Resultados

3.4.1 Extracción de ADN

El proceso de extracción de ADN requirió la estandarización de los protocolos según la especie y el tipo de material vegetal. Los principales resultados obtenidos en el proceso fueron los siguientes (Tabla 3-1):

Tabla 3-1: Principales resultados obtenidos en el proceso de estandarización de extracción de ADN.

PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	RESULTADO DE LA EXTRACCIÓN	N° ENSAYOS
Kit DNeasy Plant Mini	Rendimiento y calidad nulo en *A. reticulata y A. squamosa*, a partir de material fresco.	1
Doyle y Doyle (1987) modificado	Rendimiento y calidad aceptable en algunos materiales frescos de *A. reticulata y A. squamosa* y algunos materiales almacenados (menos de 6 meses) de *A. cherimola*, *A. glabra y Rollinia sp.*	18
Doyle y Doyle (1990) modificado	Rendimiento y calidad aceptable en *A. glabra y A. squamosa* (material fresco y macerado con nitrógeno líquido).	1
Jobes *et al.* (1995) modificado	Rendimiento y calidad bajo. Útil con material almacenado (menos de 6 meses) de *A. glabra* y material fresco de *A. squamosa* (macerado con nitrógeno líquido y almacenado a -20°c).	5
Conejo (sin publicar) modificado	Rendimiento y calidad nulo en *A. reticulata y A. squamosa*, a partir de material almacenado (6 meses en adelante).	2
Doyle y Doyle (1987) modificado por Siqueira M	Rendimiento y calidad alto en material fresco de *A. squamosa*, macerado con nitrógeno líquido y almacenado a -20°C.	2

PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	RESULTADO DE LA EXTRACCIÓN	N° ENSAYOS
Dellaporta (1983) modificado	Rendimiento y calidad nulo para *A. reticulata y A. squamosa*, a partir de materiales almacenados (6 meses en adelante).	1
Godoy y Jordano (2001) modificado	Rendimiento y calidad nulo para *A. reticulata y A. squamosa*, a partir de materiales almacenados (6 meses en adelante). Se obtienen pellets gelatinosos y oxidados de difícil manejo.	2
Saldaña y Salazar (2007) modificado	Rendimiento y calidad nulo para *A. reticulata y A. squamosa,* a partir de materiales almacenados (6 meses en adelante). Se obtienen pellet gelatinosos y oxidados de difícil manejo.	1
Escribano *et al.* (2004) modificado	Rendimiento y calidad aceptable para algunos materiales de *A. squamosa y A. reticulata.* Los mejores resultados se obtienen en materiales de *A. cherimola, A. glabra y Rollinia sp.* Al incrementarse el periodo de almacenamiento disminuye su efectividad.	4
Hilje (2008) modificado	Rendimiento y calidad nulo. El protocolo no resulta útil en *A. cherimola, reticulata y A. squamosa x A. cherimola,* pero sí en una accesión de *A. squamosa* (almacenada por 6 meses). La concentración de ADN es baja y no es una técnica reproducible en todos los materiales de esta especie. El protocolo original es reportado para *A. purpurea*.	1
Díaz *et al.* (2008) modificado	Rendimiento y calidad nulo en materiales almacenados (6 meses en adelante) de *A. squamosa, A. reticulata, A. cherimola y A. cherimola x A. squamosa.*	1
Sharma *et al.* (2008) modificado	Rendimiento y calidad bajo. Útil con un material almacenado (menos de 6 meses) de *A. reticulata*, pero no es útil en *A. cherimola, A. reticulata, A. squamosa, A. squamosa x A. cherimola y Rollinia sp*, en las mismas condiciones de almacenamiento.	2
Escribano *et al.* (2004), Hilje (08), Sharma *et al.* (08) Modificados	Rendimiento y calidad aceptable en el protocolo de Escribano *et al.* (2004) para *A. cherimola*. Rendimiento y calidad nulo en el protocolo de Hilje (2008) para *A. squamosa.* Rendimiento y calidad bajo en el protocolo de Sharma *et al.* (2008) para *A. reticulata.*	1
Alcalina (Sambrook y Russell, 2001) modificado	Rendimiento y calidad aceptable en accesiones de *A. glabra, A. muricata y Rollinia sp,* a partir de material almacenado (18 meses) .	1
Fang *et al.* (1992) modificado	Rendimiento y calidad nulo (técnica de purificación) al emplearse con las extracciones de los protocolos (modificados) de Salazar y Saldaña (2007), Godoy y Jordano (2001), Dellaporta (1983), Escribano *et al.* (2004) y Conejo (sin publicar).	1
Doyle y Doyle (1987) y Fang *et al.* (1992) con modificaciones	Rendimiento y calidad bajo. Útil en algunos materiales frescos (macerados con nitrógeno líquido y almacenados - 80°C) de *A. squamosa* se obtiene ADN de baja concentración, no es útil en materiales de *A. muricata y A. reticulata* de las mismas características. Se obtiene un sobrenadante denso y un pellet amarillento.	4
Doyle y Doyle (1987) y Escribano *et al.* (2004) con modificaciones	Rendimiento y calidad aceptable. Los protocolos son útiles en algunos materiales de *A. cherimola, A. muricata, A. reticulata, A. squamosa, A. squamosa x A. cherimola y Rollinia sp* almacenados por más de 6 meses, pero la concentración de ADN es baja (10 ng/µl) y variable. En tanto que en algunos materiales frescos (macerados con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C) de *A. squamosa, A. glabra, A. muricata, A. reticulata* y el híbrido interespecífico, es útil pero la concentración de ADN obtenido es variable. Al incrementarse el tiempo de almacenamiento el protocolo reduce su efectividad, se obtienen pellets gelatinosos y de difícil manejo, por lo que se requiere de la purificación.	9
Escribano *et al.* (2004) y Fang *et al.* (1992) con modificaciones	Rendimiento y calidad altos en *A. cherimola, A. glabra, A. muricata, A. squamosa x A. cherimola y Rollinia sp* (material fresco, macerado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C). Rendimiento y calidad aceptable para las mismas especies en materiales almacenados (6 meses en adelante). Rendimiento y calidad baja a nula en materiales de *A. reticulata y A. squamosa*. En general, al incrementarse el tiempo de almacenamiento, se reduce la efectividad y se requiere de purificación.	3
Vega-Vela y Chacón-Sánchez (2011) modificado	Rendimiento y calidad nula en accesiones de *A. squamosa y A. reticulata.* Rendimiento y calidad alta para accesiones de *A. cherimola.* El protocolo no es de utilidad al emplear material vegetal almacenado por más de 12 meses en las especies *A. squamosa y A. reticulata.*	1

Dentro de los aspectos identificados como relevantes para la extracción de ADN en materiales de especies de la familia Annonaceae, se encuentran el proceso de ruptura de tejidos (manual o con nitrógeno líquido), la madurez del material vegetal, el tiempo de almacenamiento del material luego de la colecta y la especie, principalmente. Con respecto al método de ruptura de tejidos, los mejores resultados se obtuvieron con

material vegetal macerado con nitrógeno líquido y con el uso de perlas en el proceso de lisis celular (buffer de extracción).

El proceso se llevó a cabo inicialmente con materiales recién colectados, observando la efectividad del protocolo de Doyle y Doyle (1987) en las especies *A. squamosa* y *A. reticulata*, que posteriormente, en el proceso de verificación de calidad y amplificación en PCR dejara en evidencia la degradación del ADN en cortos periodos de tiempo. Por lo anterior, se hizo necesario, realizar nuevos ensayos con el material obtenido en la etapa de prospección y colecta del presente estudio. En ese momento, el material (hojas completas) llevaba aproximadamente seis meses de almacenamiento en laboratorio (en gel de sílice a -20°C y -80°C).

Con el objetivo de identificar los factores que en el caso de estudio, estuvieran incidiendo en la efectividad de la extracción de ADN, tras la revisión bibliográfica, se encontró que algunas plantas leñosas tienen metabolitos como compuestos polifenólicos, polisacáridos, taninos y ARN, que interfieren en el aislamiento de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) - Rout *et al*. (2002). En especies de la familia Annoaceae, varios investigadores han detectado la presencia de metabolitos secundarios como: aceites esenciales en hojas (Brophya *et al*., 2004; Pallazo *et al*., 2009 y Ramírez *et al*., 2011). Teniendo en cuenta lo reportado, se procedió a modificar progresivamente, algunos pasos del proceso de lisis celular, acondiciomiento y almacenamiento de ADN, con el objetivo de mejorar la efectividad del proceso.

Para descartar el factor “tiempo de almacenamiento” se colectó material de *A. squamosa* propagado por semilla y presente en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional (Bogotá), con el cual se realizó el proceso de aislamiento de ADN (Doyle y Doyle, 1987), comparándolo con otros protocolos (Jobes *et al*., 1995; Conejo, sin publicar; Saldaña y Salazar, 2007; Godoy y Jordano, 2001), sin obtener resultados favorables con el material previamente almacenado. De manera paralela, se realizaron ensayos en el material colectado en la primera etapa de la investigación, empleando adicionalmente los protocolos de Dellaporta (1983), Escribano *et al.* (2004), Díaz *et al*. (2008), Hilje (2008) y Sharma *et al.* (2008), pero no se logró obtener ADN para la amplificación en PCR y posterior análisis de diversidad genética. Al emplear el protocolo de extracción alcalina de Sambrook y Russell (2001), se logró obtener ADN de accesiones de *A. glabra, A. muricata* y *Rollinia sp.*, de concentración variable.

A raíz de la degradación progresiva que se observó en el ADN y a la obtención de pellets de color amarillento o café, de consistencia gelatinosa, de difícil manipulación y resuspensión, fue necesaria la inclusión en los ensayos de extracción de agentes como PVP (Polivinil pirrolidona), de adsorbentes de polifenoles como el PEG (Polietilenglicol) y de antioxidantes como DTT (Dithiothreitol); así como de proteinasa K y RNAsa en el proceso de lisis celular y resuspensión del ADN, respectivamente. Estos agentes son sugeridos por Pierpoint (2004), para la extracción de enzimas en tejidos de plantas ricos en compuestos fenólicos y por Ausubel *et al*. (2003) para reducir la contaminación por presencia de nucleasas (posible causa de degradación) y la contaminación por ARN. Los resultados obtenidos al incluir estos agentes y enzimas, permitieron incrementar la efectividad de los protocolos de extracción identificados para especies de anonáceas de la población *in situ*.

Con el objetivo de identificar si la especie era uno de los factores que incidían en el estudio, se incluyó en los ensayos, material vegetal de las especies *A. cherimola, A. glabra, Rollinia sp.*, pertenecientes a la población *in situ*. Los resultados obtenidos en esta etapa revelaron su incidencia en el proceso, así como la variabilidad en los resultados por especie. En ese punto, se concluye que los protocolos de extracción de Jobes *et al.* (1995) y Doyle y Doyle (1987), podrían ser útiles para la especie *A. glabra*, en materiales maduros y almacenados por un periodo de tiempo superior a seis meses. Mientras que el método de Escribano *et al.* (2004), podría ser efectivo en materiales de *A. cherimola* y en algunos casos, en materiales de *A. reticulata* almacenados por seis meses en laboratorio. Sin embargo, las concentraciones de ADN son bajas para *A. reticulata*.

Para descartar las dudas sobre la incidencia del tiempo de almacenamiento en la obtención de ADN de accesiones de la colección, se procedió a colectar material vegetal de los bancos de campo de Anonáceas establecidos en Corpoica – Nataima (Espinal, Tolima) y la Universidad de Córdoba (Montería, Córdoba), realizando el proceso de extracción de ADN en el menor tiempo posible (1 día tras la colecta). Los resultados del proceso denotan que la técnica de Doyle y Doyle (1987) con algunas modificaciones, no resulta ser muy efectiva en cuanto a la concentración del ADN obtenido en *A. squamosa*, sin embargo, corrobora la importancia de trabajar con material vegetal fresco.

En este proceso, se observa que el uso de fenol (1:1) y clorofomo:alcohol isoamílico (24:1) en el proceso de purificación química del protocolo de Doyle y Doyle (1987), no es favorable para *A. squamosa*, mientras que las técnicas de Escribano *et al.* (2004) y Fang *et al.* (1992), son útiles para obtener ADN de algunas accesiones de *A. glabra* y *A. cherimola*. De igual manera, se observa que al trabajar con material fresco de algunas muestras de *A. squamosa* y *A. reticulata* es posible obtener ADN en bajas concentraciones.

Posteriormente, se realizó una prueba de comparación de los protocolos de Escribano *et al.* (2004) y Fang *et al.* (1992) con el material recién colectado en los bancos de campo (propagación asexual), incluyendo algunos materiales previamente almacenados (material macerado con nitrógeno líquido y almacenado entre 12 y 18 meses), observando que estos procedimientos son útiles para obtener ADN de materiales de *A. squamosa x A. cherimola*, *A. glabra* y *A. muricata*. Los resultados obtenidos en ese momento denotan que no es posible obtener una alta concentración de ADN a partir de material vegetal almacenado de las especies *A. squamosa* y *A. reticulata*, contrario a lo sucedido con el material de *A. squamosa x A. cherimola*. De igual manera, dejan ver que el proceso de extracción de ADN es cada vez más complicado, requiriendo de una purificación por medio del protocolo de Fang *et al.* (1992). Al comparar la efectividad del procedimiento en materiales recién colectados, se observa que los resultados obtenidos son mejores porque es posible obtener ADN de algunas accesiones, pero la especie sigue siendo un factor clave en el proceso.

Las mayores modificaciones en el protocolo de extracción útil para las especies de estudio, a partir de material vegetal previamente almacenado fueron: a) Adición de PVP 2%, bisulfito de Na (1%), β-mercaptoetanol (5%) y proteinasa K (20 mg/ml) en el primer buffer de extracción, para reducir la oxidación de compuestos fenólicos y la acción de endonucleasas; b) Adición de SDS (20%) para favorecer la denaturación de proteínas y tejidos, recurriendo de doble incubación a 65°C; c) Inclusión de un primer paso de purificación química con CIA (24:1) y la adición de CTAB 10% como segundo buffer de

extracción; d) Inclusión de un segundo paso de purificación química con CIA (24:1) y la adición de acetato de Na (3M), NaCl (5M) e isopropanol en proceso de precipitación; e) Incremento en el periodo de precipitación (3 o 4 noches) al emplear material maduro previamente almacenado; f) Uso de etanol al 70% y 90% en el proceso de limpieza, resuspendiendo finalmente el pellet en solución TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) y RNasa (1 mg/ µl), y g) Inclusión del protocolo de purificación de Fang *et al.*, (1992) tras obtener pellets gelatinosos y de difícil manipulación.

Tras el desarrollo de estos ensayos se corrobora lo mencionado por algunos autores, sobre el requerimiento de diferentes protocolos de extracción de ADN en especies del mismo género y las diferencias en el tiempo requerido, la calidad del producto final y los reactivos empleados en el buffer de aislamiento (CAB International, 2001). Al finalizar esta etapa se logró obtener ADN de 66 accesiones en total (equivalente al 39,52% del material colectado en campo), incluyendo las 10 accesiones contrastantes morfológicamente de la población *in situ* y las tres empleadas como testigo. Este grupo, lo conforman 12 accesiones de *A. cherimola*, tres de *A. glabra*, dos de *A. muricata*, 16 de *A. reticulata*, 31 de *A. squamosa*, una de *A. squamosa x A. cherimola* y una de *Rollinia sp.;* y las concentraciones de ADN varían entre 10 y 300 ng/µl. Estos materiales provienen de 10 departamentos y 30 municipios, lo que indica que cuenta con una representatividad considerable con respecto a la distribución geográfica de la población *in situ* (promedio del 70%).

Finalmente, se encontró útil el protocolo de Doyle y Doyle (1987) modificado, para el material fresco de *A. squamosa* y *A. reticulata*, macerado con nitrógeno líquido. Mientras que para el material vegetal de *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A. squamosa x A. cherimola* y *Rollinia sp.*, que ha sido almacenado por un periodo de tiempo que oscila (según la accesión) entre 3 y 24 meses (excepto por el material del banco de campo, almacenamiento de 6 meses), se encontró que el protocolo de Escribano *et al.* (2004) y Fang *et al.* (1992) con algunas modificaciones, resulta ser el de mayor utilidad en la obtención de ADN (Anexo G: Protocolos de extracción de ADN e imágenes de geles).

3.4.2 Amplificación en PCR y PAGE

Una vez se visualizaron todas las muestras de ADN obtenidas (incluyendo el factor INO), se seleccionó un total de 96 accesiones para realizar la PCR con los SSR definidos para el estudio (Anexo H: SSR seleccionados para el estudio de la colección Colombiana de Anonáceas). Estas accesiones fueron seleccionadas a partir de los resultados de la extracción de ADN (ADN de buena calidad en el 1° y el 2° intento de extracción) de 153 accesiones en total. El proceso de amplificación cruzada, también requirió de su estandarización, debido a que no se obtuvo amplificación en algunas muestras de ADN de *A. squamosa* y *A. reticulata*, previamente visualizadas en agarosa.

La amplificación cruzada de las 96 accesiones seleccionadas, se llevó a cabo con 11 SSR (LMCH1, LMCH3, LMCH4, LMCH5, LMCH6, LMCH8, LMCH9, LMCH11, LMCH16 y LMCH29) durante el año 2011 (octubre a diciembre), notando que el número de accesiones que presentaron amplicones era muy variable por SSR, como lo sucedido con los SSR LMCH8, LMCH14 y LMCH16, cuyos porcentajes de amplificación fueron inferiores al 10% (menos de 10 accesiones del total de la población base de evaluación: “96 accesiones”). En el proceso se observó, que los SSR LMCH5 y LMCH6 presentaron un alto porcentaje de amplificación (superior al 60%). La revisión de estos resultados,

conllevó a repetir la visualización de las muestras de ADN empleadas en la PCR, notando degradación del ADN, por lo que fue preciso retomar el proceso de extracción de ADN y PCR nuevamente.

El protocolo de PCR reportado por Escribano *et al*. (2008a), para especies de la familia Annonaceae, resultó inicialmente útil en algunos SSR, pero se requirió del ajuste de las condiciones debido a que se observó la amplificación en fragmentos inespecíficos y bajo rendimiento para la PCR en algunos casos. Teniendo en cuenta el procedimiento estándar y los parámetros de optimización reportados por Ausubel *et al.* (2003), se disminuyó la concentración del buffer a 0,7X y del ADN a 10 ng/µl, se incrementó la concentración de dNTPs a 0,2 mM, de los primers a 0,5 µM y de la Taq a 1,0 µl, adicionando en el mix de reacción BSA (Albúmina Sérica Bovina) a una concentración de 0,3 mg/ml, para mejorar la eficiencia de la PCR. Los resultados obtenidos a partir de estos cambios, fueron favorables en el estudio.

Se observó que la concentración reportada por Escribano *et al.* (2008a) como óptima para la PCR en materiales de *A. cherimola* (25 ng/µl), no es la adecuada para las demás especies, por lo que se disminuyó a 10 ng/µl, lo que mejoró parcialmente el rendimiento del proceso. Sin embargo, se identificó que el proceso es más eficiente cuando se parte de la dilución del ADN puro, ya que al trabajar con ADN puro a una concentración inicial de 10 ng/µl, no se obtienen buenos resultados, aún si se incrementa el volumen de ADN en la reacción.

Debido a las limitaciones que se presentaron en la obtención y conservación del ADN y con el objetivo de identificar la utilidad los loci SSR definidos en el estudio, se escogieron en total 10 accesiones contrastantes morfológicamente por especie y se empleó como testigo un individuo de *Rollinia sp.* y dos individuos de *A. muricata* (que no hacen parte de la colección), para un total de 13 accesiones contrastantes (Tabla 3-2). El contraste taxonómico y morfológico de las accesiones escogidas fue empleado como base para la comparación y la identificación de los marcadores polimórficos de utilidad en el estudio. Estas accesiones fueron empleadas en los procesos de PCR y PAGE.

Tabla 3-2: Accesiones morfológicamente contrastantes (población *in situ* de anonáceas).

ID	ESPECIE	MUNICIPIO	DEPARTAMENTO
CO4AG148	*A. glabra*	San Antero	Córdoba
C5AS161	*A. squamosa*	Girardot	Cundinamarca
C7AR170	*A. reticulata*	Jerusalén	Cundinamarca
V1AS214	*A. squamosa*	Guacarí	Valle del Cauca
V1ASC216	*A. squamosa x A. cherimola*	Guacarí	Valle del Cauca
C2AS227	*A. squamosa*	Apulo	Cundinamarca
S2AR239	*A. reticulata*	Piedecuesta	Santander
N2AC254	*A. cherimola*	Yacuanquer	Nariño
N1AC260	*A. cherimola*	Funes	Nariño
MG3AG275	*A. glabra*	Fundación	Magdalena
G1	*A. muricata*	Espinal	Tolima
G2	*A. muricata*	Espinal	Tolima
Rol	*Rollinia sp*	Trinidad	Casanare

La PCR de las accesiones contrastantes y su posterior visualización[18], permitieron identificar preliminarmente variaciones genotípicas en algunos de los marcadores y su posterior utilidad en el procedimiento PAGE. No obstante, se observó en algunos casos,

[18] Visualizada en geles de agarosa (3%) de alta resolución (TBE 0,5X).

la amplificación de productos no específicos, aspecto que deberá corregirse para cada especie, en nuevas investigaciones. Una vez definidos los SSR más informativos a nivel intra e intra específico, se procedió a realizar las PCR con 53 accesiones (Anexo I: Accesiones empleadas en el análisis molecular), correspondientes a seis especies (*A. cherimola, A. glabra, A. muricata, A. reticulata, A. squamosa y Rollinia sp.*) y un híbrido (*A. squamosa x A. cherimola*).

Finalmente, la visualización de los patrones electroforéticos se llevó a cabo con los productos de PCR de 66 accesiones (PCR 2012 y 2013) y 87 accesiones (PCR 2011), correspondientes a 6 especies (*A. cherimola, A. glabra, A. muricata, A. reticulata, A. squamosa* y *Rollinia sp*) y un híbrido (*A. squamosa x A. cherimola*).

3.4.3 Transferibilidad de marcadores SSR

Como primera medida y para proceder con el análisis estadístico de los datos, se depuró (primer filtro) la matriz base, eliminando aquellas accesiones en las cuales no se observaron patrones de bandeo claros o se observaron patrones nulos, así como de aquellos marcadores en los cuales no se obtuvo amplificación en la mayoría de sus muestras. De esta manera, se procedió a revisar los resultados obtenidos en los geles de acrilamida, para dilucidar la transferibilidad de los SSR en las especies de la familia Annonaceae, siguiendo los lineamientos de análisis empleados por Escribano *et al.* (2004 y 2008a), quienes identificaron una alta transferibilidad en taxa relacionados con *A. cherimola* (especies de los géneros *Annona, Rollinia y Asimina*).

Los resultados de amplificación cruzada de los 20 loci microsatélite desarrollados por Escribano *et al.* (2004 y 2008a) y Hormanza *et al.* (2007) para *A. cherimola* (Tabla 3-3), exhiben una transferibilidad media a baja en la población *in situ* de anonáceas de Colombia, en la cual se evaluó un grupo de 136 accesiones de 13 departamentos y 44 municipios del país. No obstante, los resultados obtenidos permiten dilucidar la utilidad de algunos loci (LMCH6, LMCH29, LMCH71 y LMCH144) en especies del mismo género (*A. glabra, A. muricata y A. squamosa*), aspecto de relevancia en posteriores análisis de diversidad genética.

Tabla 3-3: Transferibilidad de 20 loci microsatélite, en especies de la población *in situ* de Anonáceas de Colombia.

SSR	*Annona cherimola*	*Annona glabra*	*Annona muricata*	*Annona reticulata*	*Annona squamosa*	*A. squamosa x A. cherimola*	*Rollinia sp.*
LMCH1	**	o	x	x	**	O	o
LMCH3	x	x	x	o	o	X	x
LMCH4	x	x	x	x	x	X	x
LMCH5	o	o	o	x	o	SD	SD
LMCH6	o	**	*	**	**	*	**
LMCH8	x	x	x	x	x	X	x
LMCH9	x	x	x	x	x	X	x
LMCH11	o	x	x	o	o	X	x
LMCH14	x	x	x	x	x	X	x
LMCH16	**	o	*	x	x	O	*
LMCH29	**	**	**	**	**	O	**
LMCH43	o	SD	x	x	o	**	**
LMCH53	x	x	x	x	x	X	x
LMCH69	**	x	x	x	**	**	x
LMCH71	**	o	**	o	**	**	*

SSR	*Annona cherimola*	*Annona glabra*	*Annona muricata*	*Annona reticulata*	*Annona squamosa*	*A. squamosa x A. cherimola*	*Rollinia sp.*
LMCH78	x	x	x	x	x	X	x
LMCH79	o	o	**	o	o	O	o
LMCH119	**	o	**	x	x	O	**
LMCH122	*	**	o	x	o	*	o
LMCH144	**	**	o	**	**	**	o

**, Fuerte amplificación con claros alelos; o, Fuerte amplificación con alelos no claros; *, Débil amplificación con claros alelos; x, No amplifica; SD, se desconoce.

En las accesiones de *A. glabra, A. muricata, A. reticulata, A. squamosa x A. cherimola* y *Rollinia sp.*, predomina la nula amplificación (en porcentajes de 42,11%, 74,36%, 53,67%, 42,11% y 45%, respectivamente), contrario a lo observado en *A. cherimola* y *A. squamosa*, especies en las cuales se presentó una fuerte amplificación, con valores del 43,93% con alelos claros en *A. cherimola* y del 45,50% con alelos no claros en *A. squamosa*.

La reproducibilidad de los 20 SSR empleados fue alta, excepto en algunas accesiones de *A. glabra* y *A. squamosa x A. cherimola*, donde se obtuvieron patrones de bandeo débiles o con alelos no claros. Se tiene conocimiento que *A. glabra* es tetraploide (Kessler, 1993) y que *A. squamosa x A. cherimola*, proviene de un cruce de especies diploides, aún así, los resultados obtenidos no permiten corroborar esto en la población *in situ*.

La revisión y depuración inicial de la información obtenida, con respecto al porcentaje de datos faltantes por SSR, dio como resultado la conformación de una matriz de 117 accesiones (seis especies y un híbrido interespecífico, Tabla 3-4) y 10 SSR a evaluar. En este proceso se eliminaron los registros de aquellas accesiones que tras la PCR y la PAGE, no presentaron patrón de bandeo en ninguno de los SSR seleccionados.

Tabla 3-4: Número de accesiones obtenidas tras la primera depuración de la matriz base.

ESPECIE	N° DE ACCESIONES
A. squamosa x A. cherimola	1
Annona cherimola	12
Annona glabra	3
Annona muricata	1
Annona reticulata	21
Annona squamosa	78
Rollinia sp	1
N° total de accesiones	**117**

3.4.4 Diversidad genética en especies de la familia Annonaceae

El **análisis intrapoblacional** de las especies representativas de la población *in situ*, inició con una segunda depuración de información (porcentaje de datos faltantes inferior al 15%), a través de la cual se obtuvo una base de datos compuesta por 26 accesiones de *A. squamosa*, 16 accesiones de *A. reticulata* y 11 de *A. cherimola*, al evaluar entre seis y siete SSR (Anexo J: Resultados del análisis estadístico a nivel molecular). Seguidamente, se procedió a determinar los parámetros de diversidad genética intrapoblacional para las especies *A. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola*. Es preciso aclarar que para el presente estudio, las poblaciones *a priori* por especie (subpoblaciones), fueron definidas por regiones geográficas de las cuales provienen las accesiones, lo que indica que no se hace referencia a poblaciones naturales.

En el grupo de accesiones de *A. squamosa* de la población *in situ*, se detectaron 32 alelos en total (promedio de 5,5 alelos por locus) y una variación amplia en los valores de heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He) por locus, al oscilar entre 0,00-0,89 y 0,44-0,85 respectivamente. La máxima PI fue detectada en el SSR LMCH79 (0,41) con dos alelos y la mínima PI se detectó en LMCH1 (0,04) con 10 alelos. Los SSR empleados resultaron ser muy informativos según los valores del PIC (Contenido de información polimórfica) - Botstein *et al.* (1980), excepto por el marcador LMCH79. Los seis loci se desviaron significativamente del Equilibrio Hardy-Weinberg (P<0,01) y se observa un exceso de heterocigotos en los loci LMCH1 y LMCH29 (Tabla 3-5).

Tabla 3-5: Parámetros de diversidad genética por locus, en *A. squamosa* de la población *in situ*.

LOCUS	SECUENCIA (5'-3')	T°a (°C)	Rep.	RT (bp)	N° ID	A	Ho	He	NAE	PI	PIC	F	HWE
LMCH 1	Fw: CTCTTCAAAGGTACGACTTC Rv: TTGAGAAAAGGATAAGGATT	47	(CT)20	291-312	18	10	0,89	0,85	6,82	0,04	0,85	-0,04	***
LMCH 16	Fw: TGAAAAATAACAAGAATGTAA Rv: GGATAAACAAAGCAGTAAATC	43	(GA)20	216-230	8	5	0,38	0,63	2,72	0,17	0,63	0,41	**
LMCH 29	F: GTACCATCTTTTAGGAAATC R: TGCAATCTATGTTAGTCAC	43	(GA)9	185-195	23	6	0,78	0,63	2,73	0,20	0,63	-0,23	***
LMCH 69	F: AGCTTTAGCCATGAATTAGA R: GAAAGGCTGACGAGATATAA	50	(GA)9 (GT)3	147-187	12	3	0,00	0,57	2,32	0,28	0,57	1,00	***
LMCH 71	F: AGATAACACCCGCCCACTAT R: ACAACTTTTCTCCCAACCTATC	54	(GA)14	272-290	22	6	0,14	0,81	5,23	0,06	0,81	0,83	***
LMCH 79	F: GAAGCAAGTAGACACGTAGTA R: AGGGTTGGTATTTCTTTATAGT	46	(CT)12	206-210	21	2	0,00	0,44	1,80	0,41	0,44	1,00	***
MEDIANA						**5,50**	**0,26**	**0,63**	**2,73**	**0,19**		**0,62**	
PROMEDIO						**5,33**	**0,36**	**0,66**	**3,61**	**0,19**		**0,49**	
ERROR ESTÁNDAR						**1,15**	**0,16**	**0,06**	**0,80**			**0,22**	

T°a, temperatura de anillamiento; Rep, repetición; RT (bp), rango de tamaño (bp); N° IND, n° de individuos; A, n° de alelos; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; NAE, n° de alelos efectivos; PI, probabilidad de identidad; PIC, Contenido de información polimórfica; F, índice de fijación; HWE, valor de significancia del test de Equilibrio Hardy-Weinberg (P<0,001). Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

En contraste, en el grupo de accesiones de *A. reticulata* de la población *in situ*, se detectaron 22 alelos en total (promedio de 3,14 alelos por locus) y una variabilidad amplia en los valores de Ho y He por locus, al oscilar entre 0,00-1,00 y 0,47-0,72 respectivamente. La máxima PI fue detectada en los SSR LMCH29 y LMCH69 (0,38) con dos alelos y la mínima PI se detectó en LMCH1 (0,13) con 4 alelos. Los SSR empleados resultaron ser muy informativos según los valores del PIC (Botstein *et al*., 1980), excepto por el marcador LMCH79. Los loci LMCH1, LMCH29, LMCH71 y LMCH7 se desviaron significativamente del Equilibrio Hardy-Weinberg (P<0,01) y se observa un exceso de heterocigotos en los loci LMCH29 y LMCH71 y en un déficit de heterocigotos en los loci LMCH69 y LMCH79 (Tabla 3-6).

Tabla 3-6: Parámetros de diversidad genética por locus, en *A. reticulata* de la población *in situ*.

LOCUS	SECUENCIA (5'-3')	T°a (°C)	Rep.	RT (bp)	N° ID	A	Ho	He	NAE	PI	PIC	F	HWE
LMCH 1	Fw: CTCTTCAAAGGTACGACTTC Rv: TTGAGAAAAGGATAAGGATT	47	(CT)20	291-312	5	4	0,00	0,72	3,57	0,13	0,72	1,00	*
LMCH 16	Fw: TGAAAAATAACAAGAATGTAA Rv: GGATAAACAAAGCAGTAAATC	43	(GA)20	216-230	2	3	0,50	0,63	2,67	0,21	0,63	0,20	ns
LMCH 29	F: GTACCATCTTTTAGGAAATC R: TGCAATCTATGTTAGTCAC	43	(GA)9	185-195	13	2	1,00	0,50	2,00	0,38	0,50	-1,00	***
LMCH 43	F: CTAGTTCCAAGACGTGAGAGAT R:	50	(GA)9	210-216	5	4	0,60	0,70	3,33	0,14	0,70	0,14	ns

LOCUS	SECUENCIA (5'-3')	T°a (°C)	Rep.	RT (bp)	N° ID	A	Ho	He	NAE	PI	PIC	F	HWE
	ATAGGAATAAGGGACTGTTGAG												
LMCH 69	F: AGCTTTAGCCATGAATTAGA R: GAAAGGCTGACGAGATATAA	50	(GA)9 (GT)3	147-187	2	2	0,00	0,50	2,00	0,38	0,50	1,00	ns
LMCH 71	F: AGATAACACCCGCCCACTAT R: ACAACTTTTCTCCCAACCTATC	54	(GA)14	272-290	12	4	0,75	0,68	3,16	0,16	0,68	-0,10	**
LMCH 79	F: GAAGCAAGTAGACACGTAGTA R: AGGGTTGGTATTTCTTTATAGT	46	(CT)12	206-210	13	3	0,00	0,47	1,90	0,32	0,47	1,00	***
MEDIANA						**3,00**	**0,50**	**0,63**	**2,67**	**0,21**		**0,20**	
PROMEDIO						**3,14**	**0,41**	**0,60**	**2,66**	**0,25**		**0,32**	
ERROR ESTÁNDAR						**0,34**	**0,16**	**0,04**	**0,27**			**0,28**	

T°a, temperatura de anillamiento; Rep, repetición; RT (bp), rango de tamaño (bp); N° IND, n° de individuos; A, n° de alelos; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; NAE, n° de alelos efectivos; PI, probabilidad de identidad; PIC, Contenido de información polimórfica; F, índice de fijación; HWE, valor de significancia del test de Equilibrio Hardy-Weinberg (P<0,001). Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

En contraste, en el grupo de accesiones de *A. cherimola* de la población *in situ*, se detectaron 23 alelos en total (promedio de 3,29 alelos por locus) y una variabilidad amplia en los valores de Ho y He por locus, al oscilar entre 0,00-1,00 y 0,00-0,74 respectivamente. La máxima PI fue detectada en el SSR LMCH71 (1,00) con un alelo y la mínima PI se detectó en LMCH69 (0,11) con cuatro alelos. Los SSR empleados resultaron ser muy informativos según los valores del PIC (Botstein *et al*., 1980), excepto por los marcadores LMCH16, LMCH71 y LMCH79. Los resultados de desviación del Equilibrio Hardy-Weinberg fueron variables en este grupo, siendo el SSR LMCH29 el que presentó la desviación más significativa (P<0,001). En general, el grupo de 12 accesiones exhibe exceso de heterocigotos, excepto por el SSR LMCH69 (Tabla 3-7).

Tabla 3-7: Parámetros de diversidad genética por locus, en *A. cherimola* de la población *in situ*.

LOCUS	SECUENCIA (5'-3')	T°a (°C)	Rep.	RT (bp)	N° ID	A	Ho	He	NAE	PI	PIC	F	HWE
LMCH 1	Fw: CTCTTCAAAGGTACGACTTC Rv: TTGAGAAAAGGATAAGGATT	47	(CT)20	291-312	10	4	1,00	0,64	2,74	0,20	0,64	-0,57	ns
LMCH 16	Fw: TGAAAAATAACAAGAATGTAA Rv: GGATAAACAAAGCAGTAAATC	43	(GA)20	216-230	11	3	0,64	0,46	1,85	0,36	0,46	-0,39	ns
LMCH 29	F: GTACCATCTTTTAGGAAATC R: TGCAATCTATGTTAGTCAC	43	(GA)9	185-195	11	5	1,00	0,71	3,41	0,13	0,71	-0,42	***
LMCH 43	F: CTAGTTCCAAGACGTGAGAGAT R: ATAGGAATAAGGGACTGTTGAG	50	(GA)9	210-216	11	4	0,73	0,62	2,60	0,22	0,62	-0,18	*
LMCH 69	F: AGCTTTAGCCATGAATTAGA R: GAAAGGCTGACGAGATATAA	50	(GA)9 (GT)3	147-187	9	4	0,22	0,74	3,86	0,11	0,74	0,70	**
LMCH 71	F: AGATAACACCCGCCCACTAT R: ACAACTTTTCTCCCAACCTATC	54	(GA)14	272-290	11	1	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00		
LMCH 79	F: GAAGCAAGTAGACACGTAGTA R: AGGGTTGGTATTTCTTTATAGT	46	(CT)12	206-210	9	2	0,22	0,20	1,25	0,66	0,20	-0,13	ns
MEDIANA						**4,00**	**0,64**	**0,62**	**2,60**	**0,22**		**-0,28**	
PROMEDIO						**3,29**	**0,54**	**0,48**	**2,39**	**0,39**		**-0,16**	
ERROR ESTANDAR						**0,52**	**0,15**	**0,11**	**0,41**			**0,17**	

T°a, temperatura de anillamiento; Rep, repetición; RT (bp), rango de tamaño (bp); N° IND, n° de individuos; A, n° de alelos; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada; NAE, n° de alelos efectivos; PI, probabilidad de identidad; PIC, Contenido de información polimórfica; F, índice de fijación; HWE, valor de significancia del test de Equilibrio

Los siguientes, son los resultados generales del análisis **intrapoblacional** de las especies más representativas de la población *in situ* (Tabla 3-8):

Tabla 3-8: Parámetros de variabilidad genética (intrapoblacional) de los loci microsatélite en las especies más representativas de la población *in situ*.

Especie	N° loci evaluados	N° de loci polimórficos	N° IND	A	A/L	P	Ho promedio	He promedio	N° deptos	N° mpios
Annona squamosa	6	6	26	32	1 a 10	100%	0,36	0,63	7	26
Annona reticulata	7	7	16	22	2 a 4	100%	0,50	0,63	5	16
Annona cherimola	7	6	11	23	1 a 5	86%	0,64	0,62	2	3

N° IND, n° de individuos; A, n° total de alelos; A/L, n° de alelos por locus; P, porcentaje de polimorfismo; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada. Dptos (departamentos del país representados), Mpios (municipios del país representados).

La población *in situ* se caracteriza por presentar una amplia representatividad a nivel nacional, siendo superior en *A. squamosa* (7 departamentos y 26 municipios de los que provienen las accesiones evaluadas) y por lo tanto, se espera que los valores a nivel genético (subpoblacional) reflejen las características propias de una población constituida por diferentes pools. En general, para las tres especies (*A. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola*), el número de alelos efectivos (NAE) promedio es inferior al número de alelos encontrados por locus (A/L), lo que denota que las especies albergan menor diversidad genética que la teórica máxima. Sin embargo entre las tres especies, *A. squamosa* tiene un mayor NAE y por ende una mayor diversidad. Esto deja en evidencia la necesidad de incrementar (en posteriores estudios) el número de individuos muestreados por población y el posible sesgo estadístico que se presenta por la baja transferibilidad de los SSR en estas especies y la intensidad del muestreo empleada.

Con respecto a los resultados, es preciso considerar el sesgo estadístico que se podría presentar en este análisis, ya que se evaluó una población que dista en número de accesiones por especie y por procedencia (departamento y municipio) y que el número de loci evaluados es pequeño en comparación con lo recomendado para una evaluación molecular, en la cual se sugiere “analizar un mínimo de 30 loci en 20 individuos por población, para reducir el riesgo de sesgo estadístico” (IPGRI y Cornell University, 2004).

El **análisis a nivel interpoblacional** de las especies más representativas, se fundamentó en el cálculo de las medidas de diversidad anteriormente mencionadas en subpoblaciones para el grupo de accesiones, complementándolo con la determinación de los estadísticos F (Wright), el AMOVA, el PCoA y el Test de Mantel (Mantel, 1967), teniendo en cuenta la distribución geográfica de las accesiones que conforman la población *in situ*. Este análisis se complementó con la identificación de la subestructura poblacional a través del programa Structure (Anexo J: Resultados del análisis estadístico a nivel molecular).

Debido a que el número de accesiones de la especie *A. cherimola* no es equitativo según la procedencia (11 accesiones provienen del departamento del Nariño y 1 accesión proviene del Valle del Cauca), no se realizó un análisis a nivel interpoblacional. Los siguientes, son los resultados del análisis en las accesiones de las especies *A. squamosa* y *A. reticulata*.

El grupo de accesiones de la especie ***A. squamosa***, está compuesto por 26 individuos provenientes de 7 departamentos y 26 municipios del país, lo que permite su agrupación (*a priori*) en subpoblaciones por regiones. No obstante, al agrupar inicialmente en cuatro regiones (Andina Centro, Andina Occidental, Caribe y Llanos), se identificó que el número de accesiones era muy variable y por lo tanto, lo resultados se verían notoriamente afectados. Para no perder la información obtenida, se procedió a conformar

grupos poblacionales con un número similar de accesiones teniendo en cuenta la distribución geográfica, así: población n° 1: Andina Centro y Oriental con siete accesiones (Casanare y Cundinamarca), población n° 2: Andina Occidental con siete accesiones (Tolima y Valle del Cauca) y población n° 3: Caribe con 12 accesiones (Atlántico, Guajira y Santander).

Los resultados de los parámetros de variabilidad genética (interpoblacional), revelan un mayor grado de diferenciación genética (F_{ST}) detectada por medio del locus LMCH16, así como inferioridad en el NAE con respecto al número de alelos encontrados (A), diferencias en los valores promedio de Ho y similaridad en los valores promedio de He por población (Tabla 3-9). En el grupo de accesiones de *A. squamosa*, se detecta un déficit de heterocigotos y un alto porcentaje de polimorfismo en las poblaciones evaluadas. De igual manera, se observa que la población n° 2 alberga una mayor diversidad genética con respecto a las otras poblaciones definidas *a priori* y su principal característica es la amplia distancia geográfica de las accesiones que la conforman. El número de alelos únicos en las tres poblaciones es de dos, siete y uno respectivamente.

Tabla 3-9: Parámetros de diversidad genética interpoblacional en *A. squamosa* de la población *in situ*.

POBLACIÓN N°	PARÁMETRO	N° ID	A	NAE	Ho	He	F	% P
1	Media	4,17	3,50	3,01	0,40	0,59	0,43	100,00%
	E. estándar	0,54	0,72	0,60	0,17	0,08	0,23	
2	Media	5,17	4,17	3,62	0,36	0,58	0,47	83,33%
	E. estándar	0,95	1,19	1,01	0,20	0,13	0,26	
3	Media	8,00	3,67	2,82	0,33	0,60	0,48	100,00%
	E. estándar	1,13	0,67	0,50	0,16	0,06	0,27	
		Media	3,78	3,15	0,36	0,59	0,46	94,44%
		E.S.	0,49	0,41	0,10	0,05	0,14	5,56%

El AMOVA entre individuos, entre poblaciones y dentro de las poblaciones, indica que para *A. squamosa* en la población *in situ*, la mayoría de la variación se presenta dentro de las poblaciones *a priori*, es decir entre individuos dentro de las poblaciones (64,29%). Así mismo, se observa que no existe variación entre poblaciones, lo que indica que las regiones muestreadas en el país para *A. squamosa* no difieren mucho entre sí. El grado de diferenciación genética entre poblaciones en términos de frecuencias alélicas (F_{ST}) fue de -0,03, lo cual según Wright (1978) indica una nula diferenciación genética (Tabla 3-10).

Tabla 3-10: Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA) para *A. squamosa*.

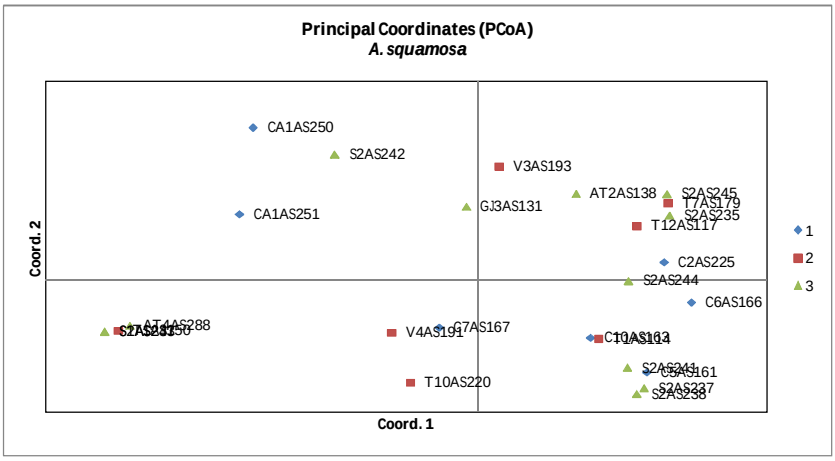
Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	2	4,68	2,34	0,00	0,00%
Among Indiv	23	81,39	3,54	1,38	64,29%
Within Indiv	26	20,00	0,77	0,77	35,71%
Total	**51**	**106,08**		**2,15**	**100,00%**

F-Statistics	Value	P(rand >= data)
F_{ST}	-0,0344	0,993
F_{IS}	0,6429	0,001
F_{IT}	0,6306	0,001

Fst max	0,2807
F'st	-0,1226

El PCoA para el grupo de accesiones de *A. squamosa*, permitió identificar que las tres coordenadas resultantes, explicaron el 52,73% de la totalidad de la diversidad genética.

El eje 1 explicó el 23,43% de la variabilidad, el eje 2 explicó el 17,23% y el eje 3 explicó el 12,07% de la variabilidad para los marcadores empleados. En el diagrama bidimensional, se observan inicialmente cuatro grupos de accesiones, conformados por individuos de diferentes procedencias, correspondientes a varias de las subpoblaciones definidas *a priori* (Figura 3-1).



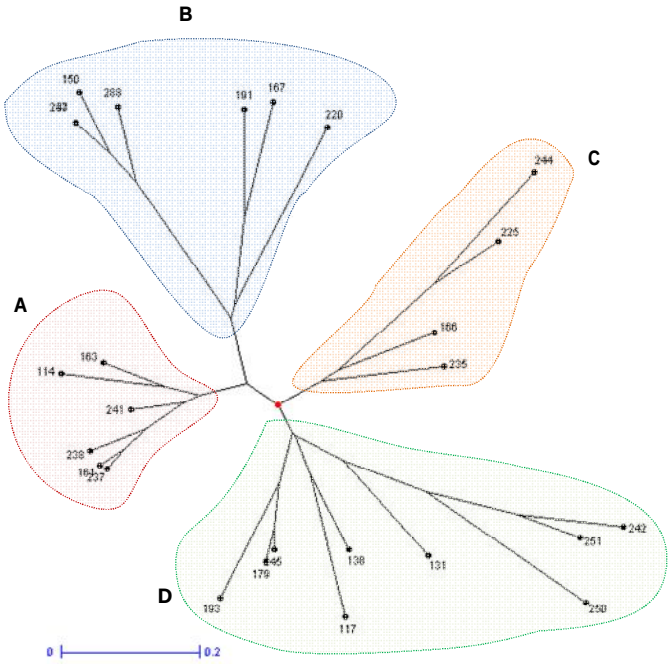
Los valores de la leyenda 1, 2 y 3, corresponden a las poblaciones definidas *a priori* para la especie (subpoblaciones), según la distribución geográfica de las accesiones.

Figura 3-1: Diagrama de coordenadas principales para *A. squamosa*.

El análisis de distancias genéticas[19] del grupo de accesiones de *A. squamosa*, desarrollado por medio del software Darwin 5 (Perrier *et al*., 2003) y representado por medio del algoritmo de Neighbor-Joining "NJ" (Saitou y Nei, 1987), permite identificar la diferenciación entre los individuos evaluados. En el grupo A, se observa una proximidad en las accesiones de Santander y Cundinamarca, en el grupo B entre Valle del Cauca y Cundinamarca, en el grupo C se observa una clara diferenciación entre Cundinamarca y Santander y en contraste, en el grupo D, la proximidad se presenta entre las accesiones de Cundinamarca y entre las accesiones de Tolima y Valle del Cauca (Figura 3-2).

En la topología se observa que los grupos D y B concentran accesiones provenientes tanto de la región Andina como de la región Caribe, siendo concordante con el AMOVA, donde se observó que no existe diferenciación entre las poblaciones definidas *a priori*. Este análisis permite identificar que existe un mayor número de alelos compartidos entre las accesiones de Cundinamarca y las demás accesiones evaluadas.

[19] Se empleó el índice de disimilitud de concordancia simple y el método de agrupamiento UPGMA, para el conjunto de datos alélicos.



CONSEC	ID	POBLACIÓN *a priori*
163	C10AS163	1
161	C5AS161	1
237	S2AS237	3
238	S2AS238	3
241	S2AS241	3
114	T1AS114	2
288	AT4AS288	3
167	C7AS167	1
247	S1AS247	3
233	S2AS233	3
220	T10AS220	2
150	T1AS150	2
191	V4AS191	2
225	C2AS225	1
166	C6AS166	1
235	S2AS235	3
244	S2AS244	3
138	AT2AS138	3
250	CA1AS250	1
251	CA1AS251	1
131	GJ3AS131	3
242	S2AS242	3
245	S2AS245	3
117	T12AS117	2
179	T7AS179	2
193	V3AS193	2

CONSEC, n° consecutivo de la accesión; ID, código de la accesión. Las letras A, B, C y D, corresponden a los grupos de accesiones obtenidos tras el análisis de distancias genéticas y la topología NJ.

Figura 3-2: Topología Neighbor-Joining (NJ) con base en índice de similitud y agrupamiento UPGMA para SSRs en un grupo de accesiones de la especie *A. squamosa*.

Como complemento al AMOVA y al PCoA, se realizó la prueba de Mantel por medio del software GenAlex 6.5 (basada en 999 permutaciones), cuyo resultado es concordante con el análisis de varianza molecular y sugiere que no existe una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas (R= -0,003, R2= 9E-06, P=0,516, α 0,05), siendo posible concluir que no existe aislamiento por distancia en los individuos muestreados de *A. squamosa*.

El análisis de estructura poblacional de la colección de *A. squamosa*, se complementó a través del software Structure 2.3.4. El número de subpoblaciones “K” fue confirmado por medio del análisis MCMC al emplear un periodo de burning de 100.000, 200.000 repeticiones y 10 iteraciones en total, bajo un modelo de ancestría mezclado y un modelo de frecuencias alélicas correlacionadas. El número máximo de subpoblaciones “K” evaluadas en el proceso, se definió de acuerdo con el número de departamentos de los cuales provienen las accesiones de las colecciones de trabajo. De esta manera, en la población *in situ* de *A. squamosa* se evaluaron de 2 a 7 K, hallando un óptimo K=6 [20] (Figura 3-3 y Anexo J: Resultados del análisis estadístico a nivel molecular).

Al evaluar la subestructura poblacional en 26 accesiones de *A. squamosa* a partir de 6 loci, se observa que en general, los individuos de las tres regiones son muy parecidos entre sí en cuanto a su ancestría a partir de cada una de las 6 poblaciones hipotéticas, excepto por algunos individuos de la región andina occidental y caribe (T1AS150, AT4AS288, S1AS247 y S2AS233) que derivan la mayor parte de su ancestría de la

[20] De acuerdo con el resultado del comportamiento del logaritmo de probabilidad (Ln PD) en función del número k de poblaciones para las accesiones evaluadas. Se seleccionó el mejor agrupamiento basándose en el estadístico *ad hoc* ΔK (Evanno *et al*., 2005).

población hipotética 1 y por lo tanto lucen genéticamente diferentes al resto de individuos de *A. squamosa* pero similares entre sí. Al revisar la ubicación de los individuos en los análisis PcoA y NJ, se observa que son muy cercanos entre sí y muy distantes del resto de los individuos evaluados. Estas accesiones provienen de los departamentos del Tolima, Atlántico y Santander respectivamente y se muestran igualmente diferentes en K=5 y K=7.

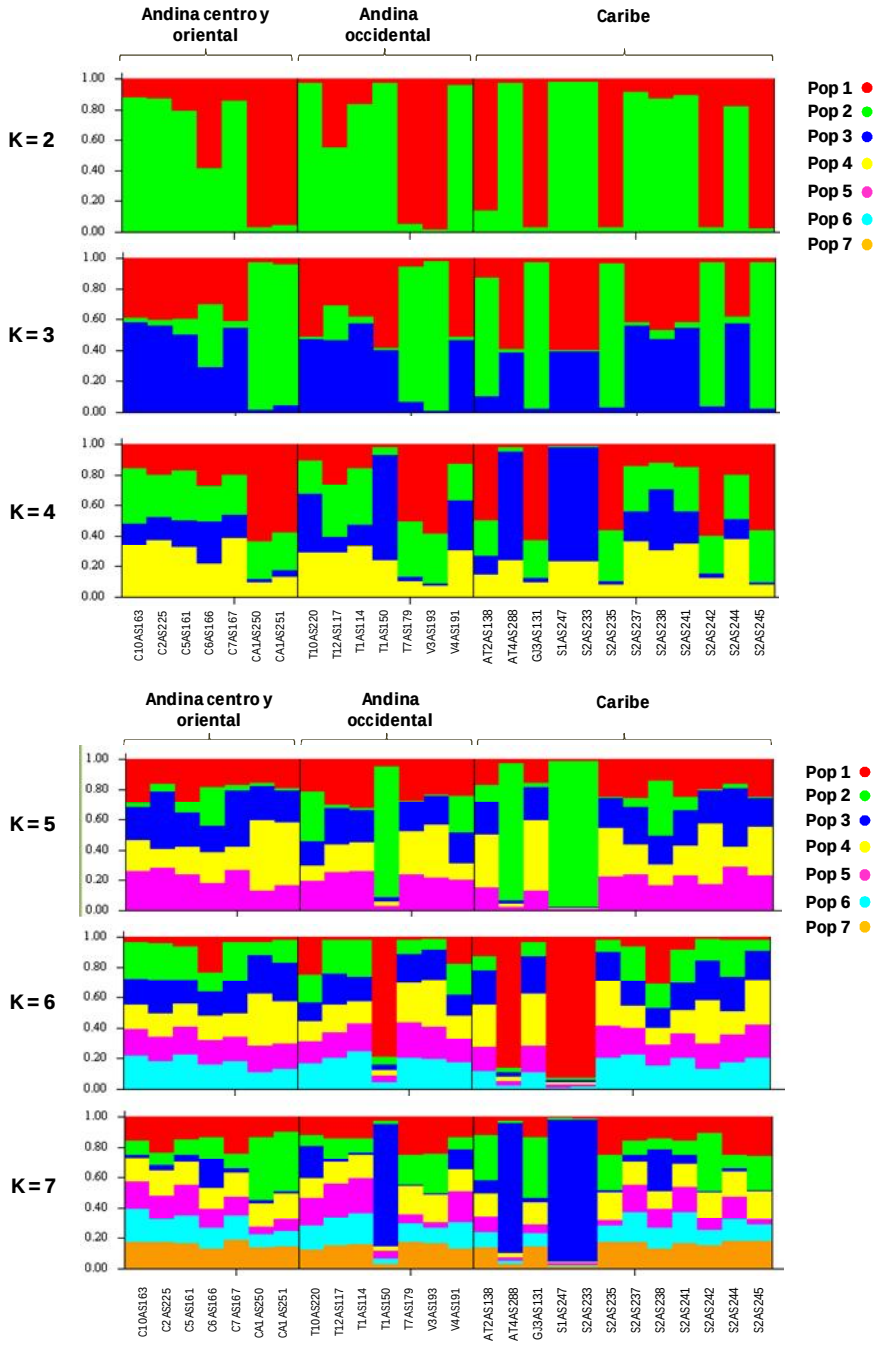


Figura 3-3: Análisis de la estructura poblacional con k=2 a k=7 en 26 genotipos de *A. squamosa*.

En ***A. reticulata*** los grupos poblacionales (*a priori*) están conformados por la población n° 1: Andina Centro y Oriental con ocho accesiones (Casanare, Cundinamarca y Santander) y población n° 2: Andina Occidental con ocho accesiones (Tolima y Valle del Cauca).

Los resultados de los parámetros de variabilidad genética (interpoblacional), revelan un mayor grado de diferenciación genética (F_{ST}) detectada por medio de los loci LMCH69 y LMCH16, así como inferioridad en el NAE con respecto al número de alelos encontrados (A) y diferencias en los valores promedio de Ho y He por población, siendo superior la He en la población n° 1 y la Ho en la población n° 2, cuyas accesiones provienen principalmente del Valle del Cauca (Tabla 3-11). En esta colección de accesiones de *A. reticulata*, se detecta un déficit de heterocigotos y un porcentaje de loci polimórficos variable en las poblaciones evaluadas. El número de alelos únicos en las dos poblaciones es de 12 y 4 respectivamente.

Tabla 3-11: Parámetros de diversidad genética interpoblacional en *A. reticulata* de la población *in situ*.

POBLACIÓN N°	PARÁMETRO	N° ID	A	NAE	Ho	He	F	% P
1	Media	4,29	2,71	2,48	0,42	0,56	0,30	100,00%
	E. estándar	0,71	0,29	0,26	0,16	0,05	0,29	
2	Media	3,14	1,43	1,27	0,26	0,24	-0,08	42,86%
	E. estándar	1,30	0,48	0,41	0,17	0,11	0,38	
		Media	2,07	1,87	0,34	0,40	0,18	71,43%
		E.S.	0,32	0,29	0,11	0,07	0,21	28,57%

En *A. reticulata*, el AMOVA indica que la mayoría de la variación se presenta dentro de las poblaciones *a priori*, es decir entre individuos dentro de las poblaciones (51,86%). Así mismo, se observa existe un poco variación entre poblaciones (4,44%), lo que indica que existe una ligera variación entre las regiones muestreadas en el país para la especie. El grado de diferenciación genética entre poblaciones en términos de frecuencias alélicas (F_{ST}) fue de 0,04, lo cual según Wright (1978) indica una poca diferenciación genética (Tabla 3-12). En la población *in situ* de *A. reticulata*, no hay evidencia de diferenciación genética al emplear estos marcadores y este tamaño de muestras (el F_{ST} no es estadísticamente significativo).

Tabla 3-12: Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA) para *A. reticulata*.

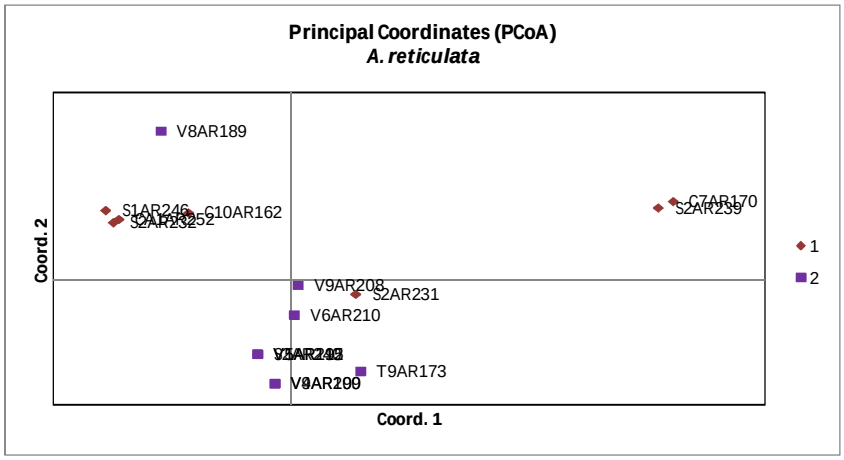
Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	1	4,06	4,06	0,08	4,44%
Among Indiv	14	38,38	2,74	0,96	51,86%
Within Indiv	16	13,00	0,81	0,81	43,70%
Total	**31**	**55,44**		**1,86**	**100,00%**

F-Statistics	Value	P(rand >= data)
Fst	0,0444	0,089
Fis	0,5427	0,001
Fit	0,5630	0,001

Fst max	0,4923
F'st	0,0902

En contraste, para el grupo de accesiones de *A. reticulata*, el PCoA, permitió identificar que las tres coordenadas resultantes, explicaron el 65,20% de la totalidad de la diversidad genética. El eje 1 explicó el 33,84% de la variabilidad, el eje 2 explicó el 18,14% y el eje 3 explicó el 13,22% de la variabilidad para los marcadores empleados. En el diagrama bidimensional, se observan inicialmente tres grupos de accesiones,

conformados por individuos de diferentes procedencias, correspondientes a varias de las subpoblaciones definidas *a priori* (Figura 3-4).

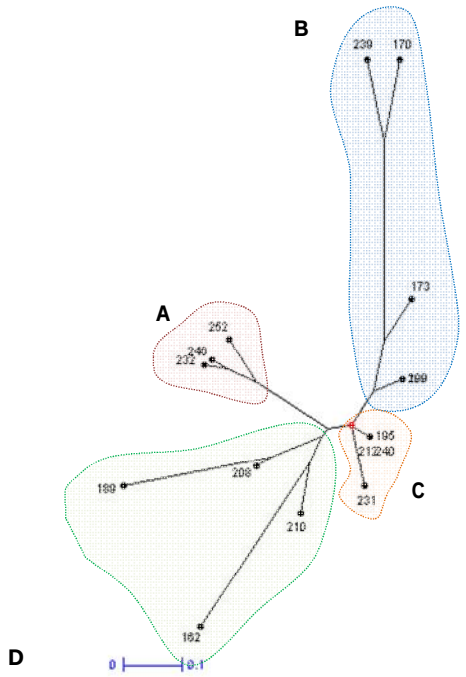


Los valores de la leyenda 1 y 2, corresponden a las poblaciones definidas *a priori* para la especie (subpoblaciones), según la distribución geográfica de las accesiones.

Figura 3-4: Diagrama de coordenadas principales para *A. reticulata*.

El análisis de distancias genéticas[21] del grupo de accesiones de *A. reticulata*, desarrollado por medio del software Darwin 5 (Perrier *et al*., 2003) y representado por medio del algoritmo de Neighbor-Joining "NJ" (Saitou y Nei, 1987), permite identificar una ligera diferenciación entre los individuos evaluados. En los grupos A y C, se observa proximidad en las accesiones de Santander y Casanare (Grupo A) y Santander y Valle del Cauca (Grupo C). En esta especie, el grupo B está representado por accesiones procedentes de varios departamentos, observando una proximidad entre las accesiones se presenta entre los individuos de Cundinamarca y Santander (2 accesiones), y los de Tolima y Valle del Cauca, estando estas 3 accesiones bastante alejadas de las 2 mencionadas con anterioridad (Figura 3-5). Por el contrario, el grupo D está compuesto principalmente por accesiones del Valle del Cauca.

[21] Se empleó el índice de disimilitud de concordancia simple y el método de agrupamiento UPGMA, para el conjunto de datos alélicos.



CONSEC	ID	POBLACIÓN *a priori*
252	CA1AR252	1
246	S1AR246	1
232	S2AR232	1
170	C7AR170	1
239	S2AR239	1
173	T9AR173	2
190	V4AR190	2
209	V9AR209	2
231	S2AR231	1
240	S2AR240	1
212	V1AR212	2
195	V5AR195	2
162	C10AR162	1
210	V6AR210	2
189	V8AR189	2
208	V9AR208	2

CONSEC, n° consecutivo de la accesión; ID, código de la accesión. Las letras A, B, C y D, corresponden a los grupos de accesiones obtenidos tras el análisis de distancias genéticas y la topología NJ.

Figura 3-5: Topología Neighbor-Joining (NJ) con base en índice de similitud y agrupamiento UPGMA para SSRs en un grupo de accesiones de la especie *A. reticulata*.

Como complemento al AMOVA y al PCoA, se realizó la prueba de Mantel por medio del software GenAlex 6.5 (basada en 999 permutaciones), cuyo resultado es concordante con el análisis de varianza molecular y sugiere que no existe una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas (R= -0,012, R2= 0,0001, P=0,494, α 0,05), siendo posible concluir que no existe aislamiento por distancia en los individuos muestreados de *A. reticulata*.

El análisis de estructura poblacional de la colección de *A. reticulata*, se complementó a través del software Structure 2.3.4. El número de subpoblaciones “K” fue confirmado por medio del análisis MCMC al emplear un periodo de burning de 100.000, 200.000 repeticiones y 10 iteraciones en total, bajo un modelo de ancestría mezclado y un modelo de frecuencias alélicas correlacionadas. El número máximo de subpoblaciones “K” evaluadas en el proceso, se definió de acuerdo con el número de departamentos de los cuales provienen las accesiones de las colecciones de trabajo. De esta manera, en la población *in situ* de *A. reticulata* se evaluaron de 2 a 5 K,[22] hallando un óptimo K=5 [23] (Figura 3-6 y Anexo J: Resultados del análisis estadístico a nivel molecular).

Al evaluar la subestructura poblacional en 16 accesiones de *A. reticulata* a partir de 7 loci, se observa que las dos regiones geográficas definidas *a priori* son muy similares entre sí para los diferentes K evaluados, corroborando de alguna manera los resultados acumulados hasta el momento de una aparente ausencia de estructura poblacional para

[22] Para *A. reticulata* se definió un número de poblaciones *a priori* de 2, por lo tanto, en el análisis de estructura poblacional el valor de k evaluado es concordante con lo recomendado por expertos (evaluación de K *a priori* +3).

[23] De acuerdo con el resultado del comportamiento del logaritmo de probabilidad (Ln PD) en función del número k de poblaciones para las accesiones evaluadas. Se seleccionó el mejor agrupamiento basándose en el estadístico *ad hoc* ΔK (Evanno *et al*., 2005).

los grupos geográficos definidos, aunque hay que tener en cuenta el número bajo de loci evaluados y el pequeño tamaño de muestra empleado en el análisis.

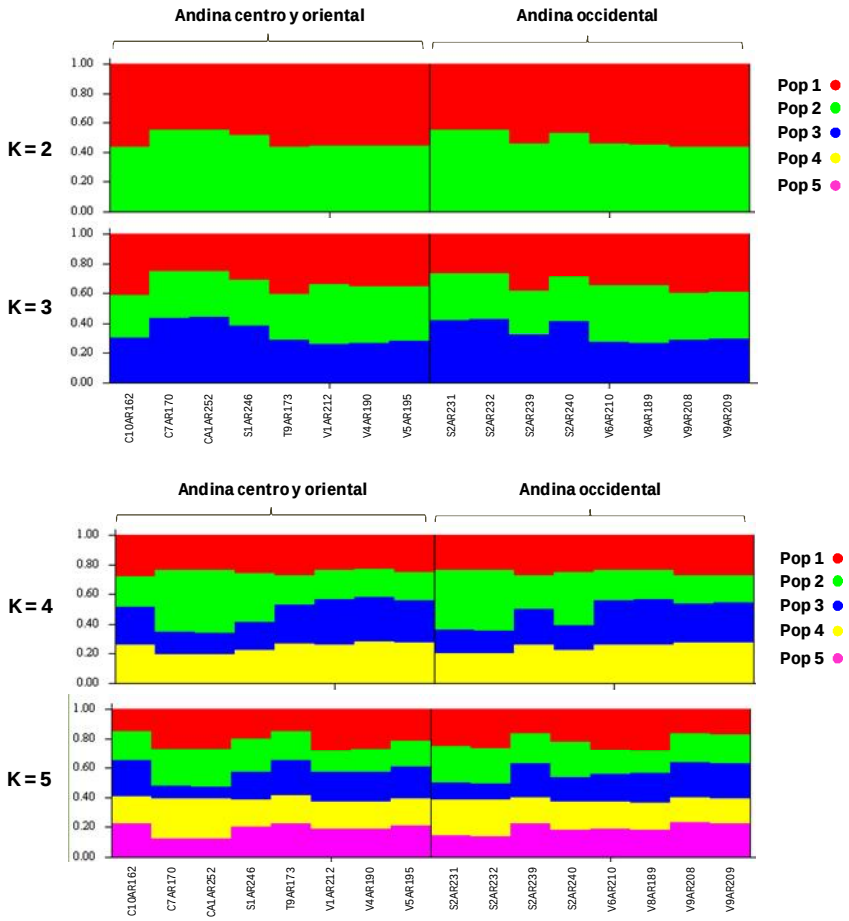


Figura 3-6: Análisis de la estructura poblacional con k=2 a k=6 en 16 genotipos de *A. reticulata*.

El análisis de estructura poblacional para las especies *A. squamosa* y *A. reticulata*, denota que en la población *in situ*, algunas accesiones presentan rasgos genéticos similares y que la procedencia es un factor relevante en la evaluación. Aunque este tipo de análisis no había sido empleado previamente en colecciones de especies de la familia Annonaceae, brinda las bases complementarias a nivel molecular, para la selección y uso de materiales en el programa de mejoramiento genético.

3.4.5 Contraste entre la evaluación morfológica y molecular de un conjunto de accesiones de las especies representativas de la población *in situ*

Partiendo de los resultados de la evaluación morfológica y molecular de las especies más representativas de la población *in situ* (*A. squamosa* y *A. reticulata*), se procedió a construir una base de datos con las accesiones que tuvieran registros de marcadores morfológicos y moleculares, notando una reducción en el número de accesiones evaluadas en conjunto (Tabla 3-13).

Tabla 3-13: Relación de número de accesiones de las especies más representativas, evaluadas morfológica y molecularmente.

ITEM	ESPECIE	
	A. squamosa	***A. reticulata***
N° de accesiones evaluadas morfológicamente	70	18
N° de marcadores morfológicos	24	24
N° de accesiones evaluadas molecularmente	26	16
N° de marcadores moleculares	6	7
N° de accesiones con evaluación morfológica y molecular	11	10

Este conjunto de accesiones se emplearon para el desarrollo de la evaluación morfológica y molecular, siguiendo la metodología de análisis estadístico presentada en cada capítulo. Esta comparación se lleva a cabo con el objetivo de identificar las principales características que en conjunto, agrupan las accesiones de las especies más representativas de la población *in situ*. Los resultados del análisis estadístico de los descriptores morfológicos para las dos especies, se presentan en el Anexo K: Resultados del contraste entre la evaluación morfológica y molecular.

En *A. squamosa,* un total de 11 accesiones procedentes de los departamentos de Atlántico, Cundinamarca, Tolima y Valle del Cauca, contienen información morfológica y molecular (Tabla 3-14).

Tabla 3-14: Accesiones de *A. squamosa* evaluadas por medio de 25 descriptores morfológicos y 6 marcadores moleculares SSR.

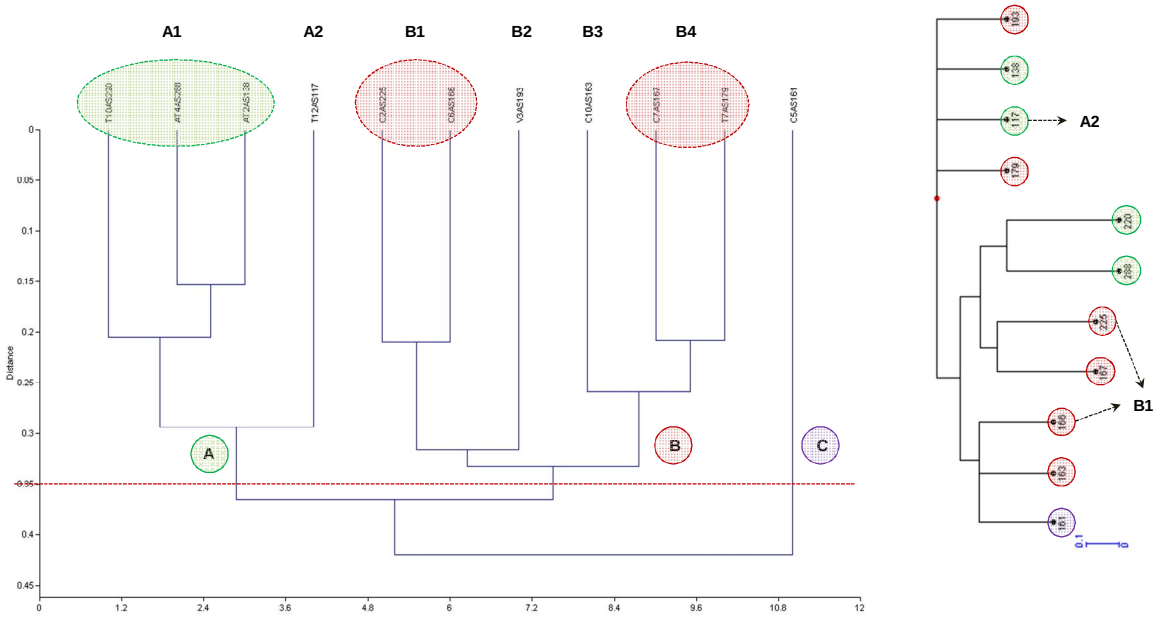
ID		
AT2AS138	C5AS161	T12AS117
AT4AS288	C6AS166	T7AS179
C10AS163	C7AS167	V3AS193
C2AS225	T10AS220	

Tras la evaluación morfológica en *A. squamosa*, bajo el procedimiento de análisis de PCA y de conglomerados, empleando el método de agrupamiento UPGMA y la distancia de Gower de 0,35[24] (Software PAST 2.17, Hammer y Harper, 2006), se identifican 3 grupos de accesiones de diferente procedencia, en los cuales las características de forma y tamaño de las hojas (junto con el peso del fruto) son las que aportan el 84,11% de la variación y condicionan su agrupamiento.

En contraste, la evaluación molecular de las accesiones bajo el procecimiento de análisis de PCoA, empleando el índice de similtud de concordancia simple y el método de agrupamiento UPGMA, bajo la topología NJ (software Darwin 5), denotan la

[24] Se observa la conformación de grupos evidentes.

conformación de dos grupos y algunas accesiones independientes. Al comparar el agrupamiento bajo los dos métodos de evaluación, se observa aunque las accesiones procedentes de Cundinamarca y Tolima, tienen características morfológicas similares a las de otros departamentos. La agrupación por rasgos morfológicos y moleculares difiere considerablemente (Figura 3-7).



Software evaluación morfológica: PAST 2.17. y evaluación molecular: Darwin 5.

Figura 3-7: Diagrama de conglomerados producto de la evaluación morfológica (izquierda) y molecular (derecha) en accesiones de *A. squamosa*.

En *A. reticulata,* un total de 10 accesiones procedentes de los departamentos de Cundinamarca, Santander, Tolima y Valle del Cauca, contienen información morfológica y molecular (Tabla 3-15).

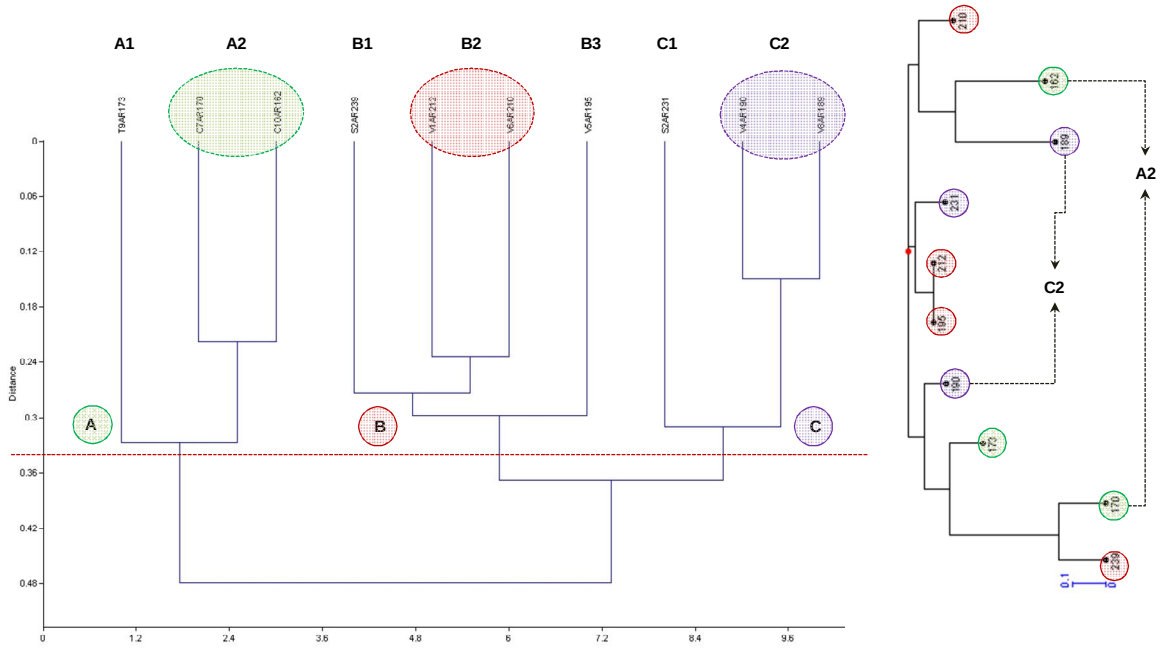
Tabla 3-15: Accesiones de *A. reticulata* evaluadas por medio de 25 descriptores morfológicos y 7 marcadores moleculares SSR.

ID	
C10AR162	V1AR212
C7AR170	V4AR190
S2AR231	V5AR195
S2AR239	V6AR210
T9AR173	V8AR189

Tras la evaluación morfológica en *A. reticulata*, bajo el procedimiento de análisis de PCA y de conglomerados, empleando el método de agrupamiento UPGMA y la distancia de Gower de 0,34[25] (Software PAST 2.17, Hammer y Harper, 2006), se identifican 3 grupos de accesiones de diferente procedencia, en los cuales las características de tamaño de la hoja, forma y tamaño del fruto son las que aportan el 85,73% de la variación y condicionan su agrupamiento.

[25] Se observa la conformación de grupos evidentes.

En contraste, la evaluación molecular de las accesiones bajo el procedimiento de análisis de PCoA, empleando el índice de similtud de concordancia simple y el método de agrupamiento UPGMA, bajo la topología NJ (software Darwin 5), denotan la conformación de tres grupos. Al comparar el agrupamiento bajo los dos métodos de evaluación, se observa que aunque las accesiones procedentes de Santander y Valle del Cauca tienen características morfológicas similares y se agrupan en 2 clados. La agrupación por rasgos morfológicos y moleculares difiere considerablemente (Figura 3-8).



Software evaluación morfológica: PAST 2.17. y evaluación molecular: Darwin 5.

Figura 3-8: Diagrama de conglomerados producto de la evaluación morfológica (izquierda) y molecular (derecha) en accesiones de *A. reticulata*.

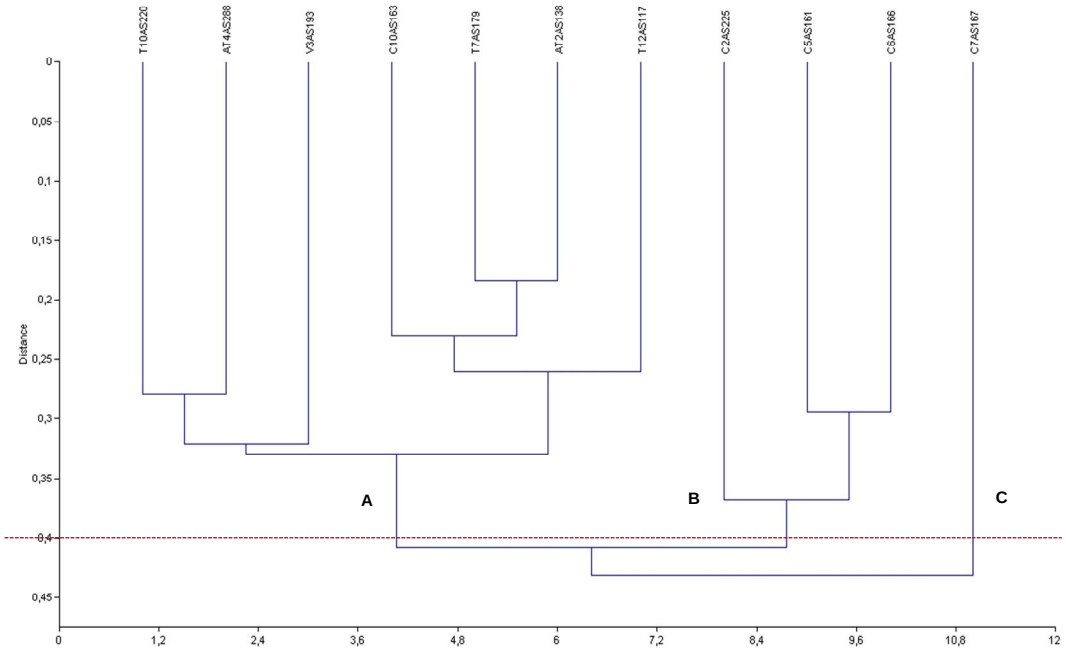
Un **análisis combinado** (multivariado) para ***A. squamosa*** empleando el método de PCA y de conglomerados por medio del método de agrupamiento UPGMA y una distancia de Gower de 0,40[26] (Software PAST 2.17, Hammer y Harper, 2006), se identifican 3 grupos de accesiones (Figura 3-9), en los cuales las características de forma las hojas y los frutos (incluyendo peso del fruto y grados brix), junto con cinco marcadores SSR (de 6 evaluados) son las que aportan el 85,57% de la variación y condicionan su agrupamiento.

Con respecto a la procedencia, se observa que en clado A (compuesto por 7 individuos) se agrupan las accesiones del Atlántico, Tolima, Valle del Cauca y una accesión de Cundinamarca; contrario a los clados B (3 individuos) y C (1 individuo), en los cuales se agrupan exclusivamente accesiones de Cundinamarca. Se observa que la accesión C7AS167, proveniente de Cundinamarca (municipio de Jerusalén) y perteneciente al grupo C, no presenta similaridad con las demás accesiones evaluadas.

Se observa que las accesiones de Cundinamarca: C2AS225, C5AS166 y C6AS166 (grupo B), provenientes de los municipios de Apulo, Girardot y Guataquí, no presentan

[26] Se observa la conformación de grupos evidentes.

similaridad con la accesión C10AS163 proveniente del municipio de Nariño (Cundinamarca).



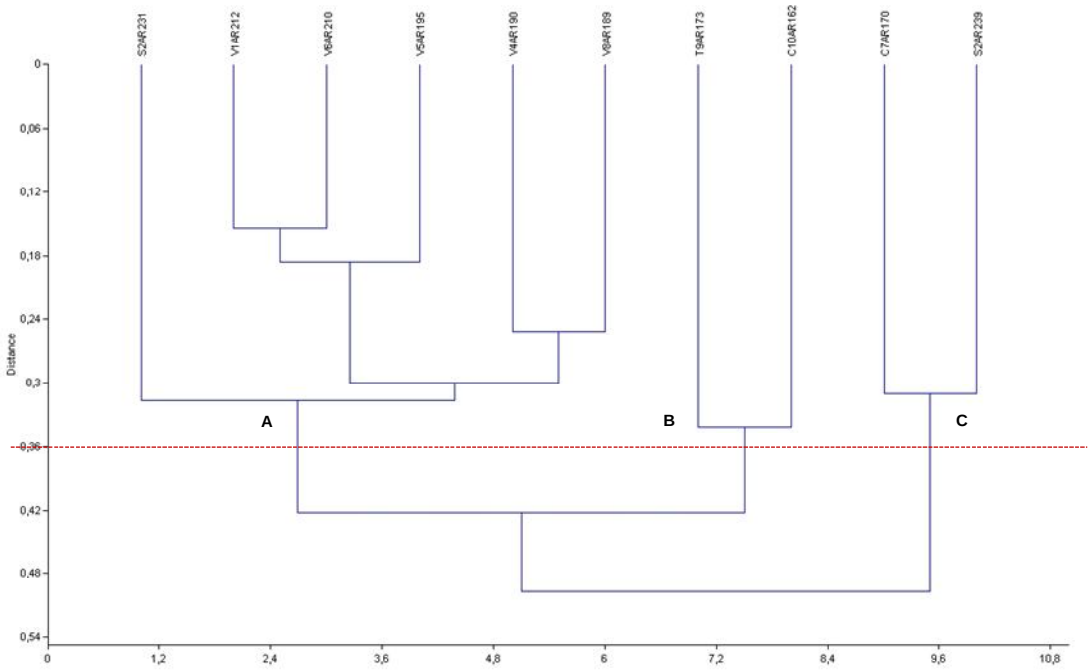
Software PAST 2.17.

Figura 3-9: Diagrama de conglomerados producto del análisis combinado de rasgos morfológicos y marcadores moleculares en accesiones de *A. squamosa*.

Un **análisis combinado** (multivariado) para ***A. reticulata*** empleando el método de PCA y de conglomerados por medio del método de agrupamiento UPGMA y la distancia de Gower de 0,36[27] (Software PAST 2.17, Hammer y Harper, 2006), se identifican 3 grupos de accesiones (Figura 3-10), en los cuales las características de peso del fruto, tipo y color de exocarpo (incluyendo forma de la hoja, pH y simetría del fruto), junto con cinco marcadores SSR (de 7 evaluados) son las que aportan el 84,62% de la variación y condicionan su agrupamiento.

Con respecto a la procedencia, se observa que en clado A (compuesto por 6 individuos) se agrupan las accesiones del Santander y Valle del Cauca; contrario al clado B en el cual se agrupan dos accesiones provenientes de Cundinamarca y Tolima, y el clado C en el que se agrupan dos accesiones de Cundinamarca y Santander. No obstante, la accesión de Santander (S2AR231, proveniente del municipio de Piedecuesta) se encuentra distante a las demás accesiones del grupo A, aunque en el grupo C, la accesión S2AR239 proveniente del mismo municipio, presente similaridad con una accesión del municipio de Jerusalén (C7AR170), departamento de Cundinamarca.

[27] Se observa la conformación de grupos evidentes.



Software PAST 2.17.

Figura 3-10: Diagrama de conglomerados producto del análisis combinado de rasgos morfológicos y marcadores moleculares en accesiones de *A. reticulata*.

El contraste de los dos métodos de comparación (análisis individual y análisis combinado), deja ver que para *A. squamosa,* las accesiones provenientes de Cundinamarca, tienden a agruparse en los mismos clados o en clados similares. En tanto que para *A. reticulata*, son las accesiones provenientes del Valle del Cauca, las se agrupan en grupos definidos. Para el conjunto de accesiones evaluadas, los mayores grados de similaridad se presentan en las accesiones que provienen de un mismo departamento.

3.5 Discusión

Extracción de ADN y transferibilidad de los marcadores moleculares tipo SSR
Los protocolos de extracción de ADN reportados como útiles en especies de la familia Annonaceae por autores como Escribano *et al.* (2004), no resultaron completamente efectivos en *A. squamosa y A. reticulata*, debido a que se observaron limitantes en el proceso de lisis celular, purificación y acondicionamiento del ADN, debido posiblemente a la presencia de aceites esenciales (Brophya *et al.*, 2004; Pallazo *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2011), polifenoles y polisacáridos en las hojas (Nagori y Dutta, 2012). Las limitantes observadas en el presente estudio, corroboran lo expuesto por Nagori y Dutta (2012), quienes afirman que "las hojas de *A. squamosa* tienen un alto contenido de polifenoles y polisacáridos que hacen la extracción de ADN difícil por medio de métodos convencionales", como lo es el método de extracción CTAB (Doyle y Doyle, 1987).

Los 20 loci microsatélite desarrollados por Escribano *et al.* (2004 y 2008a) y Hormanza *et al.* (2007) para *A. cherimola*, exhiben una transferibilidad media a baja en la población *in situ* de anonáceas de Colombia, en la cual se evaluó un grupo de 136 accesiones de 13 departamentos y 44 municipios del país. Lo anterior, es contrario a lo concluido por Escribano *et al.* (2004 y 2008a), quienes reportan una alta transferibilidad de los SSRs diseñados para *A. cherimola* en taxa relacionadas y una fuerte amplificación de productos homólogos en especies de *Annona* y *Rollinia*, 100% en atemoya, 54% - 67% en otras especies de *Annona* y 57% - 63% en especies del género *Rollinia*. Al respecto, podría pensarse que la baja calidad del ADN obtenido en el presente estudio, haya sido uno de los factores que incidieran en la baja transferibilidad de los marcadores SSR.

Teniendo en cuenta los resultados de la extracción de ADN y las limitantes mencionadas con anterioridad, esto es factible y corrobora lo expuesto por Rout *et al.* (2002), al afirmar que "algunas plantas leñosas tienen metabolitos como compuestos polifenólicos, polisacáridos, taninos y ARN, que interfieren en el aislamiento de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)".

Es conveniente considerar que los marcadores SSR diseñados para *A. cherimola* en la evaluación de especies relacionadas, pueden ser regiones del genoma que no están conservadas entre especies, lo que denota la necesidad del desarrollo de SSR especie específicos.

Diversidad genética es especies de la familia Annonaceae en Colombia
Al comparar los parámetros de **diversidad genética a nivel intrapoblacional** para las especies más representativas de la población *in situ*, se observó que los grupos de accesiones de las especies *A. squamosa*, *A. reticulata* y *A. cherimola*, exhiben una variabilidad en el número de alelos por locus (de 1 a 10, 2 a 4 y 1 a 5 respectivamente), en la probabilidad de identidad (PI) y en la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He). Se encontró igualmente un alto porcentaje de loci polimórficos y una desviación en el Equilibrio Hardy-Weinberg (P<0,001) en cinco, dos y un locus para *A. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola*, de los seis, siete y seis loci evaluados respectivamente. Estos resultados son igualmente el reflejo del número variable de accesiones por especie (26 en *A. squamosa*, 16 en *A. reticulata* y 11 en *A. cherimola*) en la colección de trabajo.

Resalta la riqueza alélica en *A. squamosa* (32 alelos en total) y la similaridad observada en este parámetro para las especies *A. reticulata y A. cherimola* (22 y 23 alelos en total),

al emplear un menor número de loci a los sugeridos por IPGRI y Cornell University (2004), para reducir el sesgo estadístico (se sugiere "analizar un mínimo de 30 loci en 20 individuos por población"). La representatividad de *A. squamosa* en la población *in situ* es alta (siete departamentos y 26 municipios de los que provienen las accesiones evaluadas) y por lo tanto, se espera que los valores a nivel genético (subpoblacional) reflejen las características propias de una población constituida por diferentes pools.

La diferencia entre la Ho y la He en las tres especies, exhibe inferioridad en la Ho y por lo tanto, deficiencia de individuos heterocigotos con los SSR empleados en el estudio, excepto en *A. cherimola*, que podría atribuirse a la presencia de alelos nulos. Sin embargo, éstos loci resultaron ser muy informativos según los valores del PIC (Botstein *et al*., 1980). En general, para las especies *A. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola*, el número de alelos efectivos (NAE) promedio es inferior al número de alelos encontrados por locus (A/L), lo que denota que las especies albergan menor diversidad genética que la teórica máxima. Sin embargo entre las tres especies, *A. squamosa* tiene un mayor NAE y por ende una mayor diversidad. Esto deja en evidencia la necesidad de incrementar (en posteriores estudios) el número de individuos muestreados por población y el posible sesgo estadístico que se presenta por la baja transferibilidad de los SSR en estas especies y la intensidad del muestreo empleada.

En especies de la familia Annonaceae, se han desarrollado variados estudios a nivel molecular, que han permitido evaluar la diversidad genética existente, empleando diferentes métodos de análisis entre los que se encuentran estudios isoezimáticos (Perfectii y Pascual, 2005; Zavala *et al*., 2009 y Salazar *et al*., 2010) y los de marcadores moleculares tipo SRR (Escribano *et al*., 2004; Hormanza *et al*., 2007; Kwapata *et al*., 2007; Escribano *et al*., 2008ª y 2008b; Chatrou *et al*., 2009), ISSR (Rascoe *et al*., 2004), AFLP (Rahman *et al*., 1998 y Narváez *et al*., 2007), RAPD (Owens, 2003; Brown *et al*., 2003; Ballesteros *et al*., 2006 y Souza *et al.*, 2010) y RFLP (Rahman *et al*., 1997), entre algunas otras investigaciones.

Una revisión de los antecedentes en el área, para las especies que conforman la población *in situ* de anonáceas en Colombia, deja en evidencia la preferencia por las especies de interés agroalimentario a nivel mundial, como lo es la chirimoya (*A. cherimola*), por lo tanto, la confrontación entre estudios se restringe en parte a la información disponible. Aún así, es posible realizar algunas comparaciones generales. Concordando con lo expuesto por Salazar *et al.* (2010), la especie *A. squamosa* es una de las especies de importancia a nivel alimenticio, pero las investigaciones a nivel molecular son escasas.

Los resultados del estudio desarrollado por Salazar *et al.* (2010) a nivel isoenzimático (12 sistemas empleados), en árboles de huertos caseros en 14 poblaciones de 5 regiones de la Península de Yucatán (México), revelan polimorfismo en todos los marcadores empleados con 3 o 4 alelos. Según los autores, el número promedio de alelos y de alelos en loci polimórficos obtenidos en su estudio fue alto respecto a otros árboles cultivados del género *Prunus* empleando este tipo de marcadores, "lo que sugiere que los efectos de la deriva génica no han sido importantes". En este caso, al evaluar por medio de seis marcadores SSR, 26 accesiones de *A. squamosa*, procedentes de siete departamentos (26 municipios) del país, se encontró polimorfismo total, obteniendo entre uno y 10 alelos.

Con respecto a los valores de heterocigosidad, los valores obtenidos por Salazar *et al.* (2010) oscilan entre 0,37 (±0,03) para Ho y 0,4 (±0,02) para He, en tanto que en la

población *in situ* oscilan entre 0,26 (±0,16) y 0,66 (±0,06), resaltando la diferencia entre los valores en el presente estudio. Aunque no son completamente comparables los 2 estudios, es posible dilucidar la utilidad del uso de marcadores moleculares para esta especie, dejando abierta la opción de desarrollar en la población *in situ* de Colombia, un estudio a nivel izoenzimático como el desarrollado por Salazar *et al.* (2010).

Según Salazar *et al.* (2010), "el sistema reproductivo puede ser el principal factor que mantiene un alto nivel de polimorfismo en plantas como *A. squamosa*, que tienen un sistema de cruza mixto que le permite apareamientos abiertos y con menor posibilidad de autopolinización". Según Gottsberger (1999), "el grupo *Annona-Rollinia*, ha sufrido una activa diferenciación y radiación hacia la polinización por varios grupos de escarabajos". Teniendo en cuenta que la "coevolución es uno de los principales procesos de organización de la biodiversidad en la tierra" (Thompson, 1999), los procesos de coevolución descritos por Gottsberger (1999) en especies de la familia Annonaceae, podrían incidir en su variabilidad genética.

El exceso o déficit de heterocigotos identificado al emplear marcadores SSR en las especies más representativas de la población *in situ* (*A. squamosa, A. reticulata y A. cherimola*), podría atribuirse al método de reproducción de las especies y su naturaleza alógama, así como al bajo poder informativo de los marcadores empleados en el proceso de amplificación cruzada. Éstos parámetros de diversidad genética aportan información más precisa al evaluar poblaciones naturales, por lo anterior, los resultados obtenidos en el conjunto de accesiones de la población *in situ*, no podrían ser concluyentes al respecto.

Estudios en *A. cherimola*, reportan un promedio de 3,5 y 4,3 alelos por locus (Escribano *et al.,* 2004 y 2008 respectivamente) al evaluar 52 y 15 SSR en 23 genotipos de chirimoya, valores similares a los obtenidos en la población *in situ* del país, al evaluar 11 accesiones por medio de siete SSR y obtener un promedio de alelos por locus de 3,29. Con respecto a la heterocigosidad observada y esperada, los estudios desarrollados por Escribano *et al.,* (2008a) reportan valores que oscilan entre 0,08 y 0,73 para la He y entre 0,20 y 0,84 para la Ho (en 23 genotipos con 15 SSR) y entre 0,17 y 0,61 para Ho y entre 0,12 y 0,76 para He (en 23 genotipos con 52 SSR, Escribano *et al*., 2004), valores similares a los obtenidos en la población *in situ*, la hallar una Ho entre 0,00 y 1,00 y una He entre 0,00 y 0,74.

Los valores promedio de estos dos parámetros revelan un déficit de heterocigotos en los 23 genotipos evaluados (Escribano *et al*., 2004 y 2008a), al hallar una Ho menor a la He (Ho: 0,40 y He: 0,57; Ho: 0,43 y He: 0,49, respectivamente), contrario a lo observado en la población *in situ*, en la cual se observa un exceso de heterocigotos, ya que la Ho es mayor que la He (0,54 y 0,48 respectivamente). En general, se observa que para la especie *A. cherimola*, los valores de número de alelos por locus, Ho y He son igualmente variables entre loci y sus valores se asemejan en parte a los obtenidos en la evaluación de 23 accesiones que provienen de diferentes áreas geográficas de Bolivia, Colombia, Ecuador, México, Perú, Portugal y España (Escribano *et al.,* 2004 y 2008a), aunque en la población *in situ* del presente estudio, se evaluaron siete SSR en 11 accesiones provenientes de dos procedencias (Nariño y Valle del Cauca). Lo anterior, denota la necesidad de incluir un mayor número de accesiones en la población *in situ* y comparar la información con materiales provenientes de otros países, ya que estos individuos se

encuentran cerca del que se ha identificado como centro de origen “Sureste de Ecuador y Norte del Perú” (Scheldeman, 2002).

En *A. cherimola* Mill, han evaluado 16 SSR en 279 accesiones de un banco de germoplasma de materiales colectados en diferentes países (Australia, Bolivia, Chile, Colombia, Costa Rica, España, Italia, Japón, México, Portugal y U.S.) y materiales colectados directamente del área de origen en Perú y Ecuador. Los resultados obtenidos por Hormanza *et al*., (2007) revelan un promedio de 4,87 alelos por locus (entre dos y 10 alelos encontrados), Ho inferior a la He (0,44 y 0,50) y consecuentemente valores de *F* positivos con un promedio de 0,19, mostrando deficiencia de heterocigotos. Estos valores distan en algunos parámetros en la población *in situ* (3,29 alelos por locus, entre uno y 10 alelos encontrados, Ho promedio de 0,54 y He promedio de 0,48, valores de F negativos en 5 SSR de los 7 empleados), resaltando nuevamente la necesidad de incrementar el tamaño de la muestra para esta especie y poder comparar con otros estudios.

Según Khanlou *et al.*, (2011) “una inapropiada estrategia de muestreo puede generar un sesgo en la estimación de la diversidad genética”, que es lo observado en el presente estudio al evaluar un pequeño número de materiales provenientes de áreas cercanas. Al respecto, Suzuki *et al*. (2004), precisan que “los resultados de estudios con marcadores moleculares para determinar los parámetros genéticos y demográficos de una población, especialmente en plantas o animales sésiles en condiciones de campo, son altamente dependientes de la estrategia de muestreo empleada”.

El **análisis de diversidad genética a nivel interpoblacional** de la población *in situ*, revela que para las especies *A. squamosa* y *A. reticulata*, el mayor porcentaje de varianza se presenta entre individuos dentro de las poblaciones definidas *a priori* según las regiones geográficas (64,29% y 51,86% respectivamente), seguido de la variación genética entre individuos (35,71% y 43,70% respectivamente). En la población *in situ*, las especies *A. squamosa y A. reticulata* no hay evidencia de una diferenciación genética entre poblaciones en términos de frecuencias alélicas (F_{ST} de -0,034 y 0,044 respectivamente) y se observa déficit de heterocigotos (Fis 0,6429 y 0,5427). Es preciso aclarar que en el estudio, la especie *A. cherimola* no fue incluida en el análisis intrapoblacional debido a que se evaluó un pequeño número de accesiones provenientes de dos departamentos y tres municipios, lo que no facilitaba la subdivisión en regiones, como se efectuó con las otras dos especies.

Para la especie *A. squamosa*, los resultados reportados por Salazar *et al.* (2010), al emplear marcadores isoenzimáticos, dejan ver que el mayor porcentaje de la varianza se encuentra entre los genotipos dentro de las poblaciones (85%), ante lo cual los autores mencionan que “en *A. squamosa* no se espera que la dispersión natural de polen sea a gran distancia ya que la estructura floral, como en otras anonas, no la favorece; las anteras no presentan filamento y se mantienen muy cubiertas aún en la máxima antesis”. Un estudio con un mayor número de accesiones por región y una mayor cobertura geográfica de la población *in situ*, podría revelar valores más precisos de la variación genética, debida a la dispersión de semillas producto del proceso de domesticación que han presentado las especies de la familia Annonaceae (Pinto *et al.*, 2005).

A nivel molecular, en *A. squamosa*, se observa que existe un mayor número de alelos compartidos entre las accesiones de Cundinamarca y las demás accesiones evaluadas, mientras que en *A. reticulata*, esto se presenta entre las accesiones de Santander y las de Cundinamarca y Casanare. Podría pensarse que en los departamentos de

Cundinamarca y Santander, haya existido un intercambio de material vegetal proveniente de otras regiones, que haya dado origen a una mayor variación de genotipos de *A. squamosa* y *A. reticulata*, respectivamente. No obstante, se desconoce la historia evolutiva de las especies en el país y los resultados obtenidos reflejan una parte de la variabilidad genética de las especies.

Con respecto al análisis interpoblacional, aplicando los conceptos de genética de poblaciones, es preciso contemplar que aún cuando se realizó un muestreo en una amplia zona geográfica del país (Andina y Caribe Colombiano), no sería conveniente asumir la premisa de contar con una "población natural de Anonáceas" adecuadamente representada, ya que el muestreo se realizó en lugares específicos, obedeciendo a los objetivos del proyecto marco del presente estudio. Sin embargo, al revisar los resultados obtenidos del análisis estadístico, específicamente los relacionados con la correlación entre las matrices de datos genéticos y geográficos, es posible identificar que en la colección de trabajo de *A. squamosa* y *A. reticulata* no se presenta aislamiento por distancia, ya que la regresión simple entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica no resultó significativa (R= -0,003, R2= 9E-06, P=0,516, α 0,05 en *A. squamosa* y R= -0,012, R2= 0,0001, P=0,494, α 0,05 en *A. reticulata*).

Al evaluar la subestructura poblacional de las especies, se observa en *A. squamosa*, los individuos de las tres regiones (*a priori*) son muy parecidos entre sí en cuanto a su ancestría a partir de cada una de las seis poblaciones hipotéticas, excepto por algunos individuos de la región Andina Occidental y Caribe (T1AS150, AT4AS288, S1AS247 y S2AS233) que derivan la mayor parte de su ancestría de la población hipotética 1 y por lo tanto lucen genéticamente diferentes al resto de individuos de *A. squamosa* pero similares entre sí. En contraste, en *A. reticulata*, se observa que las dos regiones geográficas definidas *a priori* (Andina Centro y Oriental, Andina Occidental) son muy similares entre sí para los diferentes K evaluados (K=5), corroborando de alguna manera los resultados acumulados hasta el momento de una aparente ausencia de estructura poblacional para los grupos geográficos definidos, aunque hay que tener en cuenta el número bajo de loci evaluados y el pequeño tamaño de muestra empleado en el análisis. Hasta el momento, no se cuenta con reportes de estudios similares en las especies más representativas, por lo que no es posible hacer una comparación con otros estudios.

Según IPGRI y Cornell University (2004), una población se considera estructurada si: 1) hay deriva genética en algunas de sus subpoblaciones, b) la migración no se da uniformemente en toda la población, o c) el apareamiento no ocurre al azar en toda la población. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio no es posible inferir sobre la población *in situ* evaluada, debido a que se partió de una pequeña muestra de individuos muestreados al azar y colectados bajo criterios de selección independiente (selección paralela para las características deseadas) según su presencia en las zonas de prospección. Esto denota la necesidad de realizar nuevos estudios moleculares en estas especies, con el fin de identificar el grado de similitud entre las poblaciones y poder elegir la(s) fuente(s) más apropiada(s) para la conservación y recuperación de sus recursos fitogenéticos, así como la conformación de bancos de germoplasma que contengan una muestra representativa de su variabilidad genética.

El análisis de asignación de individuos por medio del software Structure (análisis de la subestructura de la población *in situ*), permitió la organización de éstos en seis y cinco poblaciones estadísticas desde el punto de vista genético para las especies *A. squamosa*

y *A. reticulata* respectivamente. La representación gráfica de los resultados de asignación de poblaciones, permite observar la fracción genotípica que cada individuo tiene en el cluster inferido, notando que en los grupos predefinidos en cada especie (es decir las regiones geográficas), los individuos son muy similares en cuanto a su porcentaje de ancestría derivado de los diferentes K evaluados. Lo anterior, corrobora lo obtenido por medio del AMOVA, al obtener un mayor porcentaje de la variación dentro de las regiones geográficas y una baja o nula diferenciación genética entre regiones (F_{ST} no significativamente diferente a cero).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el análisis de diversidad genética a niver interpoblacional y de la subestructura poblacional en el conjunto de accesiones de *A. squamosa y A. reticulata* en la población *in situ*, podrían estar condicionados por la selección de materiales en solares y fincas (entornos urbanos y arboledas), condicionando posiblemente el agrupamiento de las accesiones.

En el presente estudio, el término de “población”, no se refiere a un grupo de organismos de la misma especie que ocupan un lugar particular en un tiempo particular (Krebs, 1994; Roughgarden *et al*., 1989), que es uno de los significados dados bajo un paradigma ecológico (Waples y Gaggiotti, 2006); sino que se refiere al conjunto total de accesiones de todas las especies de anonáceas incluidas en el estudio, ésta se podría concebir entonces, como una población construída para el establecimiento del banco de germoplasma y la evaluación de rasgos morfológicos y moleculares. Por lo tanto, la aparente ausencia de estructura poblacional en el conjunto de accesiones de *A. reticulata*, no se puede explicar a partir de los resultados obtenidos, ya que se evaluaron pocas accesiones procedentes de varios sitios de colecta y no se halló una correlación significativa entre las distancias genéticas y geográficas.

Según Porras-Hurtado *et al*. (2013), el uso del método bayesiano de análisis de Structure, ofrece algunas ventajas, especialmente en el contexto de la clasificación de individuos mezclados, ya que permite el uso de información a priori que puede ser informativa en el momento de asistir el cálculo de las proporciones de ancestría para esos individuos. En el presente estudio, el uso del programa permitió corroborar la relación genética entre las accesiones evaluadas y las subpoblaciones observadas en las especies *A. squamosa y A. reticulata*. Se reitera nuevamente, la necesidad de desarrollar nuevos estudios con una muestra poblacional mayor.

Contraste entre la evaluación morfológica y molecular de un conjunto de accesiones de las especies representativas de la población *in situ*

El contraste entre la evaluación morfológica y molecular en un grupo de accesiones de las especies *A. squamosa y A. reticulata*, denota que algunas características de forma y tamaño de hojas y fruto condicionan el agrupamiento, siendo la procedencia un aspecto de interés, que se sugiere evaluar posteriormente. El análisis combinado de rasgos cuantitativos y cualitativos evaluados a nivel morfológico y molecular, permitió la identificación de tres grupos de accesiones para las dos especies, notando que para *A. squamosa* las accesiones provenientes de Cundinamarca se agrupan en clados diferentes y para *A. reticulata* se agrupan con accesiones provenientes de otros departamentos. El flujo de materiales dentro de las regiones, producto de un proceso de selección antrópica histórica, podría ser uno de los aspectos que contribuyan a que se presente similaridad entre éstos.

La caracterización morfológica y molecular ha sido empleada para la evaluación de los recursos fitogenéticos presentes en bancos de germoplasma y colecciones *ex situ*, empleando análisis combinados para la identificación del grado de similaridad entre los materiales evaluados bajo estos dos métodos. En general, se ha contemplado el análisis estadístico de conglomerados, por medio del método UPGMA (Solano *et al*., 2012) o Ward (Aguilar, 2012) y la distancia Gower, para el análisis de datos consenso de los dos tipos de marcadores. Al revisar la agrupación producto de los dos métodos de comparación y el análisis combinado, se observa que no existe coincidencia, debido entre otros aspectos, a que los rasgos fenotípicos están influenciados por el ambiente.

Sin embargo, la caracterización y evaluación morfológica y molecular de accesiones de Annonaceae en Colombia, es un recurso fundamental para la implementación de un programa de fitomejoramiento y resalta lo expuesto en los capítulos anteriores. Al respecto, Lobo (2006), afirma que para los frutales andinos “es importante relacionar los procesos de fenotipificación y genotipificación para la utilización del recurso germoplásmico y el desarrollo de programas de mejoramiento”. El presente estudio, contribuye en la generación del conocimiento como base para su implementación.

El desarrollo de la evaluación morfológica y molecular en la colección de trabajo de especies de la familia Annonaceae, específicamente en las especies *A. squamosa* y *A. reticulata*, ha permitido la identificación de similaridad a nivel inter e intraespecífico, así como de la proporción de la variabilidad genética a nivel poblacional, observando que ésta es superior al interior de las regiones, lo que sugiere el desarrollo de nuevos estudios moleculares con una mayor intensidad de muestreo. Estos resultados son de gran utilidad en la conformación y evaluación de los bancos de germoplasma de Anonáceas en el país, así como para el desarrollo de investigaciones a nivel continental, que complementen los estudios ya desarrollados en *A. cherimola* (p.e. Scheldeman y van Zonneveld, 2010) y se constituyan en una herramienta para el monitoreo de la biodiversidad y la implementación de estrategias de conservación.

3.6 Conclusiones

En el proceso de estandarización del método de extracción de ADN de especies de la familia Annonaceae de la población *in situ*, se identificó que los mejores resultados se obtienen con material vegetal de madurez intermedia, fresco y macerado con nitrógeno líquido, empleando perlas en el proceso de lisis celular. Y que a mayor tiempo de almacenamiento del material vegetal luego de la colecta, menor es el rendimiento del método y la calidad del ADN en el proceso de aislamiento. Estos aspectos son relevantes en la evaluación molecular, ya que incrementarán la efectividad del proceso de extracción, la calidad del ADN obtenido y por ende el desarrollo de procesos de PCR y PAGE.

En especies de la familia Annonaceae en Colombia, se identificó que para *A. squamosa* y *A. reticulata* el protocolo de extracción de ADN modificado de Doyle y Doyle (1987) resultó ser de utilidad, mientras que para las especies *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A. squamosa x A. cherimola* y *Rollinia sp.*, los protocolos modificados de extracción de Escribano *et al*. (2004) y de purificación de Fang *et al.* (1992), fueron los más efectivos. Aunque actualmente se cuenta con reportes de protocolos de extracción para algunas de estas especies por parte de otros investigadores, los resultados aquí obtenidos brindan soportes para el desarrollo de nuevos estudios en el área, al identificar las características óptimas del material vegetal a colectar de seis especies y un híbrido interespecífico, en una población *in situ* en el país.

La técnica de amplificación cruzada de los 20 SSR reportados por Escribano *et al.* (2004 y 2008) para *A. cherimola* en especies del género *Annona* de la población *in situ*, permitió la identificación de diferencias interespecíficas, aunque se observó una transferibilidad media a baja y la presencia de alelos nulos en algunos genotipos. Los resultados obtenidos en el estudio revelan que los SSR LMCH1, LMCH6, LMCH29, LMCH69, LMCH71 y LMCH144 fueron transferibles en la mayoría de especies de la población *in situ*, siendo los SSR LMCH6, LMCH29, LMCH71 y LMCH144, en los que predominó una fuerte amplificación con claros alelos en todas las especies, principalmente de las accesiones morfológicamente contrastantes.

En la evaluación molecular de la población *in situ* de anonáceas en Colombia, se identificaron siete marcadores SSR (LMCH1, LMCH16, LMCH29, LMCH43, LMCH69, LMCH71 y LMCH79) útiles en el análisis de diversidad genética inter e intrapoblacional de las especies *A. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola*. Así mismo, se identificaron 10 SSR posiblemente útiles para las especies *A. glabra, A. muricata, A. squamosa x A. cherimola* y *Rollinia sp.* La corroboración de dicha utilidad, facilita el desarrollo de otras investigaciones en el área para algunas de estas especies, que no contaban en el país, con un estudio específico como el desarrollado. De igual manera, brinda herramientas para la evaluación molecular de las colecciones de trabajo establecidas en el proyecto de investigación, al no ser completamente necesario el diseño de nuevos marcadores SSR; lo que agiliza el proceso.

Los parámetros de diversidad genética intrapoblacional, denotan para las especies *A. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola*, una menor diversidad genética a la teórica máxima, un déficit de individuos heterocigotos (excepto en *A. cherimola*) y un alto porcentaje de loci polimórficos, así como un número variable de alelos por locus. En la población *in situ*, la especie *A. squamosa* presenta mayor riqueza alélica y mayor

diversidad, probablemente debido al número de accesiones evaluadas y a su alta representatividad en la población *in situ*.

Los loci empleados en la evaluación molecular de las especies *A. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola* (seis, siete y seis respectivamente) resultaron ser altamente informativos y el marcador LMCH1 resultó ser discriminativo para *A. squamosa y A. reticulata*, mientras que para *A. cherimola* lo fue el SSR LMCH69. No obstante, es preciso contemplar que se presenta un sesgo estadístico (posiblemente debido al tamaño de muestra y a la baja transferibilidad de los SSR), que se evidencia en el bajo valor del número de alelos efectivos en el conjunto de accesiones por especie.

En la población *in situ*, se detecta una desviación significativa del Equilibrio Hardy-Weinberg (P<0,001) en cinco, dos y un locus para las especies A*. squamosa, A. reticulata* y *A. cherimola*, con un déficit de heterocigotos en cuatro, dos y un locus respectivamente. Esto podría atribuirse a que las accesiones provienen de diferentes áreas geográficas, que posiblemente pertenezcan a diferentes acervos genéticos. Sin embargo, es preciso recordar que la población *in situ* de anonáceas no es una población natural, sino que por el contrario, está conformada por individuos procedentes de una amplia zona de distribución geográfica del país, en la que predominan los individuos provenientes de ciudades, centros poblados, y fincas, por lo que han sido objeto de un proceso de selección antrópica.

A nivel interpoblacional, los valores de variación genética reportados para las especies más representativas de la población *in situ* (*A. squamosa y A. reticulata*), dejan ver que la mayor variación se presenta dentro de las poblaciones *a priori* (Andina Centro y Oriental, Andina Occidental y Caribe)*,* siendo nulo o menor el porcentaje de varianza molecular entre poblaciones. De igual manera, se observa que no hay evidencia de una diferenciación genética entre poblaciones (en términos de frecuencias alélicas) y se presenta deficiencia de heterocigotos.

Con respecto a la subestructura poblacional de las especies más representativas, se observa que en *A. squamosa* hay un parecido entre los individuos de las tres regiones (*a priori*) en cuanto a su ancestría a partir de cada una de las seis poblaciones hipotéticas, excepto por algunos individuos de la región Andina Occidental y Caribe, que lucen genéticamente diferentes al resto de individuos de *A. squamosa* pero similares entre sí. En tanto que en *A. reticulata,* los individuos de las dos regiones geográficas definidas *a priori* (Andina Centro y Oriental, Andina Occidental) son muy similares entre sí para los diferentes K evaluados, evidenciando en parte, una aparente ausencia de estructura poblacional para los grupos geográficos definidos.

Al contrastar los resultados de la evaluación morfológica y molecular para las especies más representativas de la población *in situ*, se observó que las agrupaciones de las accesiones difieren notoriamente, aunque la procedencia es una característica de relevancia en el análisis individual. Para *A. squamosa*, las accesiones procedentes de Cundinamarca y Tolima comparten características morfológicas similares a las de otros departamentos, mientras que en *A. reticulata*, son las accesiones de Santander y Valle del Cauca las que se agrupan, pero hacen parte de dos clados diferentes. El análisis combinado denota un mayor grado de similaridad entre accesiones provenientes de estos departamentos y la incidencia de los rasgos de forma y tamaño de hojas y frutos en los conglomerados obtenidos (3 grupos por especie).

El proceso de evaluación morfológica y molecular de la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae, se constituye en un importante insumo para el análisis de la variabilidad genética y la caracterización de especies frutales de importancia alimenticia y medicinal, contribuyendo en el conocimiento de sus recursos fitogenéticos. De igual manera, sienta las bases para el desarrollo de futuros estudios en el área, así como en la formulación e implementación de un programa de fitomejoramiento en anonáceas en Colombia.

Se resalta la importancia del desarrollo del primer estudio molecular en una población in situ de especies de la familia Annonaceae en Colombia, a partir de la cual se establecieron colecciones de trabajo útiles para la implementación de un plan de mejoramiento genético y la conservación de sus recursos fitogenéticos.

3.7 Recomendaciones

Aunque a través de la investigación se identificaron protocolos de extracción de ADN útiles para las especies de estudio y se observó que algunos materiales provenientes de diferentes zonas del país presentaban mejores resultados en la efectividad del proceso, se recomienda evaluar con mayor detalle la incidencia de metabolitos secundarios en la extracción del ADN y la posible relación que exista entre la procedencia del material vegetal, asociada a posibles condiciones de estrés abiótico que se presenten en los individuos en campo. Para las especies estudiandas, se recomienda evaluar en material fresco, el protocolo de extracción con guanidina empleando columnas de extracción de sílica, reportado por Vega-Vela y Chacón-Sánchez (2011), como de utilidad en la eliminación de metabolitos secundarios como polisacáridos y polifenoles que típicamente co-aíslan con el ADN.

Aunque la técnica de amplificación cruzada permitió la identificación de diferencias interespecíficas en la población *in situ* de anonáceas, la baja y media transferibilidad de los SSR empleados y el variable grado de amplificación de alelos claros de algunos SSR las especies de estudio (entre otros aspectos mencionados), denota la necesidad de desarrollar marcadores SSR especie específicos en futuros estudios y de evaluar nuevamente el éxito de esta técnica, por medio de la inclusión de un mayor número de individuos por especie. Lo anterior, corrobora lo sugerido en el capítulo de prospección y colecta de recursos fitogenéticos, así como en el de la evaluación morfológica, con respecto al enriquecimiento de la población *in situ* del país y de las colecciones de trabajo, por medio del incremento de regiones visitadas en la etapa de prospección, la inclusión de individuos silvestres y cultivados, y el incremento del número de accesiones por especie, con el objetivo de evaluar la variabilidad y la diversidad genética con mayor profundidad.

Para la implementación del programa de mejoramiento genético en especies de la familia Annonaceae en Colombia, se recomienda llevar a cabo el enriquecimiento de las colecciones por medio de nuevas colectas, la evaluación de los bancos de germoplasma (representados en las colecciones de trabajo) y la multiplicación de materiales, con el objetivo de obtener genotipos con características deseables relacionadas con la calidad de fruto (forma, simetría, grados brix y pH). Paralelamente, podrían desarrollarse marcadores moleculares (tipo microsatélite) especie específicos y la posterior evaluación

molecular de las colecciones, siguiendo las metodologías desarrolladas en el presente estudio.

El análisis de subestructura poblacional en especies de la familia Annonaceae en Colombia, resulta ser la primera aproximación a la identificación de rasgos de constitución genética de la población *in situ*, no obstante, se recomienda complementar estudios posteriores con el muestreo de individuos en hábitats naturales, la evaluación de un mayor número de accesiones y subpoblaciones por especie, así como la modificación de parámetros de análisis (periodo de burning, número de repeticiones, número de iteraciones) y la comparacón del F_{ST} con otros estudios realizados (si los hay) en las especies.

En futuros estudios en especies de la familia Annonaceae, a partir de colecciones enriquecidas en número de accesiones por sitio de colecta y por especie, se recomienda que el análisis estadístico de los marcadores morfológicos y moleculares (especie específicos), se acompañe de un análisis combinado como el empleado por Álvarez, *et al*. (2005), para evaluar accesiones de *Psidium guajava* L., en el cual se comparó la matriz cofenética de características morfológicas, con la matriz de similitud de los marcadores moleculares. Estos métodos podrían ser de utilidad en la evaluación de los recursos fitogenéticos de una colección enriquecida de accesiones de Annonaceae.

A. Anexo A: Descriptores empleados en la documentación de los recursos fitogenéticos de Anonáceas

Definción y uso de los descriptores: en el trabajo con recursos genéticos se usa la palabra “descriptor” para definir una característica o un atributo que se observa en las accesiones dentro de una colección de germoplasma y están codificados en los denominados “estados de un descriptor” (Bioversity International y CHERLA, 2008).

La documentación de los recursos fitogenéticos de especies de anonáceas, contempló el uso de los descriptores definidos por Bioversity International y CHERLA (2008) para *A. cherimola*, empleando información de pasaporte, sitio y medio ambiente e información de caracterización (descriptores de planta). En el presente estudio, los descriptores de pasaporte se emplearon para el registro de la información básica de identificación de las accesiones y su manejo en los bancos de germoplasma; complementándose con la información del sitio y del medio ambiente, que será de utilidad en futuras pruebas de caracterización y evaluación. Mientras que los descriptores de caracterización se emplearon en la evaluación morfológica de la población *in situ,* ya que “permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos” (Bioversity International y CHERLA, 2008).

- Conjunto de descriptores empleados en el estudio.

DESCRIPTOR	ASPECTO	N° DE DESCRIPTORES
Pasaporte	Accesión, recolección y etnobotánica	28
Sitio y medio ambiente	Ambiente del sitio	7
Planta	Árbol, flor, fruto, semilla	32
N° total de descriptores		**67**

- Listado descriptores empleados en el estudio.

DESCRIPTOR	ASPECTO	CARACTERÍSTICA
PASAPORTE	ACCESIÓN	Código del instituto recolector
		Nombre del instituto recolector
		Nombre científico
		Nombre común
		Datos ancestrales
		Nombre de la accesión
		Fecha de adquisición (DD/MM/AA)
		Tipo de material recibido
	RECOLECCIÓN	Código del instituto recolector
		Nombre del instituto recolector
		Nombre de la accesión
		Fecha de recolección de la muestra (DD/MM/AA)
		País de origen
		Departamento
		Municipio
		Ubicación del sitio de recolección
		Localización
		Latitud
		Longitud
		Elevación (msnm)
		Fuente (o procedencia) de recolección
		Condición biológica (status) de la accesión
		Sistema de cultivo
	ETNOBOTÁNICA	Grupo étnico
		Nombre local o vernáculo
		Historia del uso de la planta
		Parte de la planta utilizada
		Uso de la planta
	FOTOGRAFÍA	Registro tomado
SITIO Y MEDIO AMBIENTE	AMBIENTE DEL SITIO	Topografía
		Forma del terreno
		Elementos del suelo y posición
		Pendiente
		Tipo de agricultura
		Vegetación general en los alrededores y el sitio
		Drenaje del suelo

DESCRIPTOR	ASPECTO	CARACTERÍSTICA
PLANTA	ÁRBOL	Altura Árbol (cm) – AH
		CAP (50 cm)
		Altura de copa (cm) – AC
		Longitud de la copa (sentido NS) – cm – LCNS
		Longitud de la copa (sentido EW) – cm (LCEW)
		Ramificación – RAM
		Serpeo – SERP
	HOJA	Forma hoja – FH
		Base hoja – BH
		Ápice hoja – AH
		Longitud (mm) – LH
		Anchura (mm) – ANH
	FLOR	Longitud pétalo (mm) – LP
		Anchura pétalo (mm) – AP
	FRUTO	Hábito fructificación – HABF
		Forma fruto – FF
		N° frutos – NF
		Peso fruto (g) – PF
		Simetría – SIM
		Diámetro pol. (mm) – DPOL
		Diámetro ecu. (mm) – DECU
		Tipo exocarpo – TEXO
		Color exocarpo – CEXO
		Peso exocarpo (g) – PEXO
		Grosor exocarpo (mm) – GEXO
		Peso raquis (g) – PR
		Peso pulpa (g) – PP
		°Brix – BRIX
		Acidez – ACID
		pH
	SEMILLA	Peso semillas (g) – PS
		N° Semillas – NS

Adicionalmente, en la evaluación se emplearon los descriptores de porcentaje de exocarpo y de pulpa.

Fuente: Bioversity International y CHERLA (2008). Modificado por el autor.

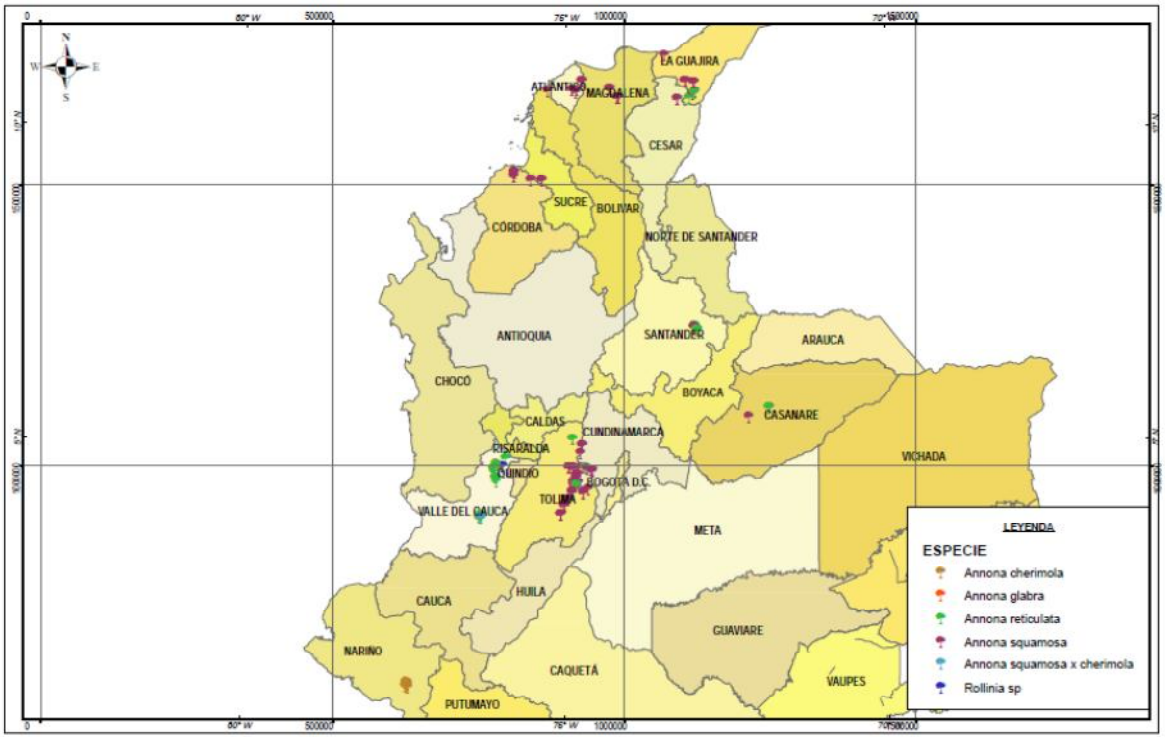
B. Anexo B: Accesiones que conforman la población *in situ* de especies de la familia Annonaceae en Colombia

ID	DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	NOMBRE CIENTÍFICO	COORDENADAS (LAT/LONG)	ALTURA (MSNM)
T10AS107	Tolima	Guamo	*Annona squamosa*	4°2´19.5"N - 74°57´48.1"W	329
T1AS114	Tolima	Alvarado	*Annona squamosa*	4°33´42.0"N - 74°57´05.3"W	434
T1AS115	Tolima	Alvarado	*Annona squamosa*	4°33´37.2"N - 74°56´50.5"W	462
T12AS116	Tolima	Piedras	*Annona squamosa*	4°33´01.6"N - 74°55´03.8"W	431
T12AS117	Tolima	Piedras	*Annona squamosa*	4°32´49.3"N - 74°52´49.6"W	407
T12AS118	Tolima	Piedras	*Annona squamosa*	4°32´37.7"N - 74°52´48.5"W	416
T12AS119	Tolima	Piedras	*Annona squamosa*	4°32´50.2"N - 74°52´43.8"W	410
T12AS120	Tolima	Piedras	*Annona squamosa*	4°32´53.5"N - 74°52´29.8"W	407
T1AS150	Tolima	Alvarado	*Annona squamosa*	4°33´51.3"N - 74°57´15.2"W	458
T4AS151	Tolima	Carmen de Apicalá	*Annona squamosa*	4°8´47.7"N - 74°43´17.4"W	331
T4AS152	Tolima	Carmen de Apicalá	*Annona squamosa*	4°8´47.9"N - 74°43´17.1"W	331
T11AS153	Tolima	Melgar	*Annona squamosa*	4°11´59.2"N - 74°38´51.1"W	339
C5AS154	Cundinamarca	Girardot	*Annona squamosa*	4°18´05.6"N - 74°47´44.9"W	296
C5AS155	Cundinamarca	Girardot	*Annona squamosa*	4°18´05.6"N - 74°47´44.8"W	298
C10AS156	Cundinamarca	Nariño	*Annona squamosa*	4°26´11.3"N - 74°49´46.7"W	285
C5AS157	Cundinamarca	Girardot	*Annona squamosa*	4°16´07.6"N - 74°52´28.8"W	310
C5AS158	Cundinamarca	Girardot	*Annona squamosa*	4°18´04.7"N - 74°52´18.8"W	312
C5AS159	Cundinamarca	Girardot	*Annona squamosa*	4°18´04.9"N - 74°52´18.9"W	312
C5AS160	Cundinamarca	Girardot	*Annona squamosa*	4°19´01.4"N - 74°52´00.6"W	306
C5AS161	Cundinamarca	Girardot	*Annona squamosa*	4°19´00.8"N - 74°52´01.1"W	306
C10AR162	Cundinamarca	Nariño	*Annona reticulata*	4°20´03.9"N - 74°51´18.5"W	274
C10AS163	Cundinamarca	Nariño	*Annona squamosa*	4°20´05.9"N - 74°51´18.1"W	279
C10AS164	Cundinamarca	Nariño	*Annona squamosa*	4°23´54.6"N - 74°49´44.2"W	281
C10AS165	Cundinamarca	Nariño	*Annona squamosa*	4°23´54.6"N - 74°49´44.4"W	281
C6AS166	Cundinamarca	Guataquí	*Annona squamosa*	4°27´33.3"N - 74°48´10.3"W	279
C7AS167	Cundinamarca	Jerusalén	*Annona squamosa*	4°33´03.1"N - 74°44´53.1"W	287
C7AS168	Cundinamarca	Jerusalén	*Annona squamosa*	4°33´38.6"N - 74°42´27.6"W	323
C7AS169	Cundinamarca	Jerusalén	*Annona squamosa*	4°33´46.4"N - 74°41´45.4"W	316
C7AR170	Cundinamarca	Jerusalén	*Annona reticulata*	4°33´41.4"N - 74°41´29.3"W	322
C7AS171	Cundinamarca	Jerusalén	*Annona squamosa*	4°31´54.2"N - 74°39´36.9"W	678
T9AS172	Tolima	Flandes	*Annona squamosa*	4°15´38.8"N - 74°49´33.7"W	298
T9AR173	Tolima	Flandes	*Annona reticulata*	4°15´38.6"N - 74°49´33.8"W	299
T8AS174	Tolima	Espinal	*Annona squamosa*	4°8´42.7"N - 74°53´50.8"W	339
T13AS175	Tolima	Saldaña	*Annona squamosa*	3°56´47.5"N - 75°0´35.2"W	335
T13AS176	Tolima	Saldaña	*Annona squamosa*	3°56´17.3"N - 75°1´05.7"W	327
T13AS177	Tolima	Saldaña	*Annona squamosa*	3°56´19.3"N - 75°1´15.5"W	335
T7AS178	Tolima	Coyaima	*Annona squamosa*	3°48´18.1"N - 75°4´12.7"W	337
T7AS179	Tolima	Coyaima	*Annona squamosa*	3°48´17.0"N - 75°4´11.6"W	341
T7AS180	Tolima	Coyaima	*Annona squamosa*	3°48´11.3"N - 75°4´13.0"W	341
T7AS181	Tolima	Coyaima	*Annona squamosa*	3°48´11.5"N - 75°4´12.8"W	341
CA2AS182	Casanare	Yopal	*Annona squamosa*	5°22´46.6"N - 72°9´37.7"W	215
C4AS183	Cundinamarca	Cambao	*Annona squamosa*	4°54´20.1"N - 74°44´17.2"W	245
C4AS184	Cundinamarca	Cambao	*Annona squamosa*	4°54´19.4"N - 74°44´16.6"W	249
C4AS185	Cundinamarca	Cambao	*Annona squamosa*	4°54´19.2"N - 74°44´16.3"W	248
T1AS186	Tolima	Ambalema	*Annona squamosa*	4°47´05.0"N - 74°45´45.0"W	260
T3AS187	Tolima	Armero	*Annona squamosa*	5°1´30.2"N - 74°53´25.9"W	294
T3AR188	Tolima	Armero	*Annona reticulata*	5°1´30.6"N - 74°53´25.9"W	293
V8AR189	Valle del Cauca	Zaragoza	*Annona reticulata*	4°41´59.5"N - 75°55´28.8"W	949

ID	DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	NOMBRE CIENTÍFICO	COORDENADAS (LAT/LONG)	ALTURA (MSNM)
V4AR190	Valle del Cauca	Obando	*Annona reticulata*	4°34´43.1"N - 75°58´35.9"W	957
V4AS191	Valle del Cauca	Obando	*Annona squamosa*	4°34´41.4"N - 75°58´31.7"W	960
V4R192	Valle del Cauca	Obando	*Rollinia sp*	4°34´41.9"N - 75°58´31.3"W	962
V3AS193	Valle del Cauca	La Victoria	*Annona squamosa*	4°31´50.1"N - 76°2´02.3"W	953
V5AR194	Valle del Cauca	Roldanillo	*Annona reticulata*	4°29´47.4"N - 76°6´01.1"W	940
V5AR195	Valle del Cauca	Roldanillo	*Annona reticulata*	4°29´45.8"N - 76°6´03.4"W	941
V2AR196	Valle del Cauca	La Unión	*Annona reticulata*	4°31´51.0"N - 76°6´50.0"W	1013
V2AR197	Valle del Cauca	La Unión	*Annona reticulata*	4°31´19.9"N - 76°4´37.0"W	936
V2AR198	Valle del Cauca	La Unión	*Annona reticulata*	4°32´11.7"N - 76°6´15.1"W	981
V2AS199	Valle del Cauca	La Unión	*Annona squamosa*	4°32´27.5"N - 76°5´50.2"W	972
V2AR200	Valle del Cauca	La Unión	*Annona reticulata*	4°32´27.4"N - 76°5´51.0"W	972
V2AR201	Valle del Cauca	La Unión	*Annona reticulata*	4°32´27.1"N - 76°5´50.8"W	971
V7AC202	Valle del Cauca	Toro	*Annona cherimola*	4°36´21.0"N - 76°4´20.0"W	968
V7AR203	Valle del Cauca	Toro	*Annona reticulata*	4°36´07.7"N - 76°4´03.4"W	968
V9AR204	Valle del Cauca	Zarzal	*Annona reticulata*	4°23´36.3"N - 76°4´47.8"W	931
V9AR205	Valle del Cauca	Zarzal	*Annona reticulata*	4°23´35.7"N - 76°4´48.1"W	934
V9R206	Valle del Cauca	Zarzal	*Rollinia sp*	4°23´34.6"N - 76°4´48.9"W	935
V9AS207	Valle del Cauca	Zarzal	*Annona squamosa*	4°23´34.5"N - 76°4´48.7"W	936
V9AR208	Valle del Cauca	Zarzal	*Annona reticulata*	4°23´48.6"N - 76°4´24.4"W	939
V9AR209	Valle del Cauca	Zarzal	*Annona reticulata*	4°18´59.5"N - 76°4´16.1"W	953
V6AR210	Valle del Cauca	Sonso	*Annona reticulata*	3°48´11.0"N - 76°18´28.4"W	990
V1AS211	Valle del Cauca	Guacarí	*Annona squamosa*	3°45´43.6"N - 76°19´55.5"W	997
V1AR212	Valle del Cauca	Guacarí	*Annona reticulata*	3°45´46.5"N - 76°20´02.6"W	990
V1AS213	Valle del Cauca	Guacarí	*Annona squamosa*	3°44´47.7"N - 76°18´34.4"W	1017
V1AS214	Valle del Cauca	Guacarí	*Annona squamosa*	3°44´47.6"N - 76°18´35.0"W	1019
V1AR215	Valle del Cauca	Guacarí	*Annona reticulata*	3°44´47.7"N - 76°18´34.9"W	1021
V1ASC216	Valle del Cauca	Guacarí	*Annona squamosa x A. cherimola*	3°45´22.6"N - 76°18´11.7"W	1032
T8AS217	Tolima	Espinal	*Annona squamosa*	4°9´12.0"N - 74°53´33.0"W	346
T10AS218	Tolima	Guamo	*Annona squamosa*	4°1´21.0"N - 74°58´08.9"W	339
T10AS219	Tolima	Guamo	*Annona squamosa*	4°1´21.1"N - 74°58´09.0"W	339
T10AS220	Tolima	Guamo	*Annona squamosa*	4°2´03.6"N - 74°58´03.3"W	337
T10AS221	Tolima	Guamo	*Annona squamosa*	4°2´03.3"N - 74°58´03.1"W	336
T10AS222	Tolima	Guamo	*Annona squamosa*	4°2´05.1"N - 74°58´04.1"W	337
T10AS223	Tolima	Guamo	*Annona squamosa*	4°2´05.6"N - 74°58´04.4"W	335
C2AS224	Cundinamarca	Apulo	*Annona squamosa*	4°30´25.1"N - 74°35´06.8"W	670
C2AS225	Cundinamarca	Apulo	*Annona squamosa*	4°30´24.9"N - 74°35´06.7"W	674
C2AS226	Cundinamarca	Apulo	*Annona squamosa*	4°30´24.5"N - 74°35´06.4"W	676
C2AS227	Cundinamarca	Apulo	*Annona squamosa*	4°30´06.5"N - 74°35´14.3"W	617
C2AS228	Cundinamarca	Apulo	*Annona squamosa*	4°30´30.5"N - 74°36´26.4"W	565
T8AS229	Tolima	Espinal	*Annona squamosa*	4°9´12.3"N - 74°53´33.0"W	346
S2AS230	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´31.3"N - 73°0´07.0"W	602
S2AR231	Santander	Piedecuesta	*Annona reticulata*	6°49´31.3"N - 73°0´08.2"W	590
S2AR232	Santander	Piedecuesta	*Annona reticulata*	6°49´29.4"N - 73°0´10.0"W	579
S2AS233	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´33.8"N - 73°0´10.0"W	579
S2AS234	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´34.1"N - 73°0´09.7"W	577
S2AS235	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´34.2"N - 73°0´09.8"W	578
S2AS236	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´34.0"N - 73°0´09.9"W	576
S2AS237	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´34.7"N - 73°0´09.9"W	575
S2AS238	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´34.7"N - 73°0´09.9"W	575
S2AR239	Santander	Piedecuesta	*Annona reticulata*	6°49´49.3"N - 73°0´17.4"W	597
S2AR240	Santander	Piedecuesta	*Annona reticulata*	6°49´48.3"N - 73°0´17.1"W	594
S2AS241	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´39.8"N - 73°0´13.7"W	581
S2AS242	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´39.8"N - 73°0´13.9"W	580
S2AS243	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´39.8"N - 73°0´14.0"W	581
S2AS244	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´39.9"N - 73°0´13.9"W	581
S2AS245	Santander	Piedecuesta	*Annona squamosa*	6°49´39.8"N - 73°0´14.2"W	581
S1AR246	Santander	Cepitá	*Annona reticulata*	6°46´03.2"N - 72°57´30.1"W	852
S1AS247	Santander	Cepitá	*Annona squamosa*	6°46´07.8"N - 72°57´28.1"W	873
S1AS248	Santander	Cepitá	*Annona squamosa*	6°46´07.8"N - 72°57´28.2"W	875
S1AR249	Santander	Cepitá	*Annona reticulata*	6°46´07.9"N - 72°57´28.2"W	880
CA1AS250	Casanare	Trinidad	*Annona squamosa*	5°31´36.7"N - 71°51´14.2"W	194
CA1AS251	Casanare	Trinidad	*Annona squamosa*	5°31´36.5"N - 71°51´14.3"W	196
CA1AR252	Casanare	Trinidad	*Annona reticulata*	5°31´36.6"N - 71°51´17.9"W	183
N2AC253	Nariño	Yacuanquer	*Annona cherimola*	1°4´16.9"N - 77°26´43.1"W	1996
N2AC254	Nariño	Yacuanquer	*Annona cherimola*	1°3´59.3"N - 77°26´42.6"W	2042
N2AC255	Nariño	Yacuanquer	*Annona cherimola*	1°3´59.0"N - 77°26´43.2"W	2041
N2AC256	Nariño	Yacuanquer	*Annona cherimola*	1°3´57.2"N - 77°26´42.1"W	2045

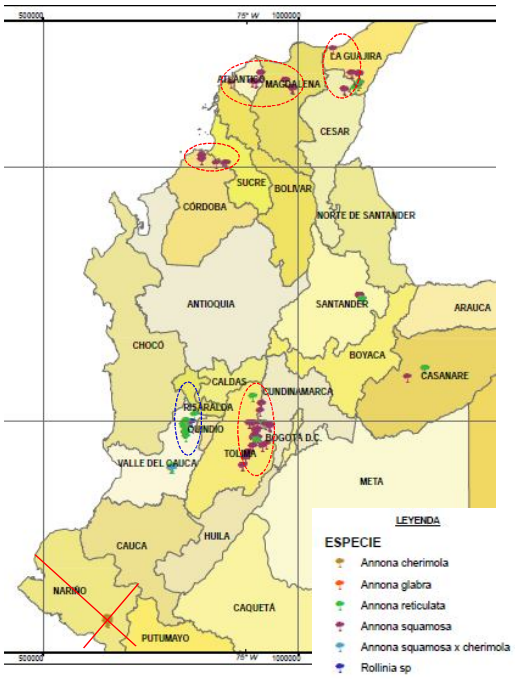
ID	DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	NOMBRE CIENTÍFICO	COORDENADAS (LAT/LONG)	ALTURA (MSNM)
N2AC257	Nariño	Yacuanquer	*Annona cherimola*	1°4´59.1"N - 77°26´21.5"W	1991
N2AC258	Nariño	Yacuanquer	*Annona cherimola*	1°5´00.8"N - 77°26´22.3"W	1982
N2AC259	Nariño	Yacuanquer	*Annona cherimola*	1°5´38.2"N - 77°26´48.0"W	2104
N1AC260	Nariño	Funes	*Annona cherimola*	1°1´41.0"N - 77°27´42.2"W	1782
N1AC261	Nariño	Funes	*Annona cherimola*	1°0´30.1"N - 77°25´56.5"W	1969
N1AC262	Nariño	Funes	*Annona cherimola*	1°0´29.4"N - 77°25´55.2"W	1978
N1AC263	Nariño	Funes	*Annona cherimola*	1°2´49.4"N - 77°25´32.7"W	1961
CO4AS146	Córdoba	San Antero	*Annona squamosa*	9°18´26.7"N - 75°48´20.4"W	73
CO4AR147	Córdoba	San Antero	*Annona reticulata*	9°18´26.6"N - 75°48´20.3"W	66
CO4AG148	Córdoba	San Antero	*Annona glabra*	9°18´26.7"N - 75°48´20.4"W	59
CO4AS264	Córdoba	San Antero	*Annona squamosa*	9°18´34.0"N - 75°48´25.7"W	63
CO4AS265	Córdoba	San Antero	*Annona squamosa*	9°18´33.1"N - 75°48´29.1"W	64
CO2AS266	Córdoba	Lorica	*Annona squamosa*	9°14´51.1"N - 75°48´45.0"W	41
CO2AS267	Córdoba	Lorica	*Annona squamosa*	9°14´39.6"N - 75°48´46.7"W	33
CO5AS268	Córdoba	Tuchín	*Annona squamosa*	9°11´10.6"N - 75°33´14.6"W	61
SU1AS127	Sucre	Sampues	*Annona squamosa*	9°10´39.0"N - 75°22´55.0"W	161
SU1AS269	Sucre	Sampues	*Annona squamosa*	9°11´19.5"N - 75°22´24.3"W	166
SU1AS270	Sucre	Sampues	*Annona squamosa*	9°11´19.1"N - 75°22´24.3"W	164
CE3AS129	Cesar	Valledupar	*Annona squamosa*	10°29´03.5"N - 73°15´14.3"W	201
CE3AS128	Cesar	Valledupar	*Annona squamosa*	10°29´28.2"N - 73°16´09.1"W	227
GJ2AR130	Guajira	La Jagua del Pilar	*Annona reticulata*	10°30´46.9"N - 73°4´22.3"W	221
GJ4AS144	Guajira	Urumita	*Annona squamosa*	10°33´37.6"N - 73°0´59.8"W	255
GJ5AS145	Guajira	Villanueva	*Annona squamosa*	10°36´12.3"N - 72°59´01.3"W	252
GJ5AR271	Guajira	Villanueva	*Annona reticulata*	10°35´49.1"N - 72°59´19.5"W	246
GJ3AS131	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°45´57.7"N - 73°0´12.0"W	227
GJ3AS272	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°46´01.6"N - 73°0´08.6"W	225
GJ3AS273	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°46´01.1"N - 73°0´10.5"W	225
GJ3AS132	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°46´09.4"N - 73°0´07.0"W	226
GJ3AS83	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°46´00.9"N - 72°59´58.8"W	224
GJ3AS133	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°46´35.5"N - 73°7´26.6"W	317
GJ3AS274	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°46´29.3"N - 73°7´21.8"W	317
GJ3AS134	Guajira	San Juan del Cesar	*Annona squamosa*	10°46´28.5"N - 73°8´50.7"W	354
GJ1AS136	Guajira	Dibulla	*Annona squamosa*	11°12´19.7"N - 73°27´45.9"W	92
MG3AG275	Magdalena	Fundación	*Annona glabra*	10°30´30.5"N - 74°10´57.7"W	66
MG3AG276	Magdalena	Fundación	*Annona glabra*	10°30´26.4"N - 74°10´57.6"W	64
MG3AS277	Magdalena	Fundación	*Annona squamosa*	10°30´22.5"N - 74°10´57.6"W	64
MG3AR278	Magdalena	Fundación	*Annona reticulata*	10°30´22.5"N - 74°10´57.9"W	64
MG3AS279	Magdalena	Fundación	*Annona squamosa*	10°30´22.0"N - 74°10´56.6"W	65
MG2AS280	Magdalena	El Retén	*Annona squamosa*	10°39´06.0"N - 74°18´59.4"W	16
MG2AS281	Magdalena	El Retén	*Annona squamosa*	10°39´05.9"N - 74°18´58.8"W	18
MG2AS282	Magdalena	El Retén	*Annona squamosa*	10°38´55.7"N - 74°19´12.2"W	16
MG3AS283	Magdalena	Fundación	*Annona squamosa*	10°30´55.8"N - 74°12´03.9"W	68
MG3AS284	Magdalena	Fundación	*Annona squamosa*	10°30´55.5"N - 74°12´03.8"W	65
MG3AS285	Magdalena	Fundación	*Annona squamosa*	10°30´55.3"N - 74°12´03.4"W	64
AT3AS286	Atlántico	Sabanagrande	*Annona squamosa*	10°47´21.9"N - 74°45´25.6"W	11
AT3AS287	Atlántico	Sabanagrande	*Annona squamosa*	10°47´21.7"N - 74°45´26.4"W	13
AT3AS137	Atlántico	Sabanagrande	*Annona squamosa*	10°47´06.2"N - 74°45´21.7"W	3
AT2AS138	Atlántico	Ponedera	*Annona squamosa*	10°37´34.5"N - 74°49´43.2"W	50
AT4AS139	Atlántico	Sabanalarga	*Annona squamosa*	10°35´49.8"N - 74°51´05.4"W	63
AT4AS140	Atlántico	Sabanalarga	*Annona squamosa*	10°38´01.8"N - 74°54´27.1"W	113
AT4AS288	Atlántico	Sabanalarga	*Annona squamosa*	10°38´01.2"N - 74°54´25.9"W	114
BO3AS142	Bolívar	Santa Catalina	*Annona squamosa*	10°36´03.7"N - 75°17´18.3"W	46

C. Anexo C: Mapa de distribución geográfica de las accesiones que conforman la población *in situ* de especies de Annonaceae en Colombia

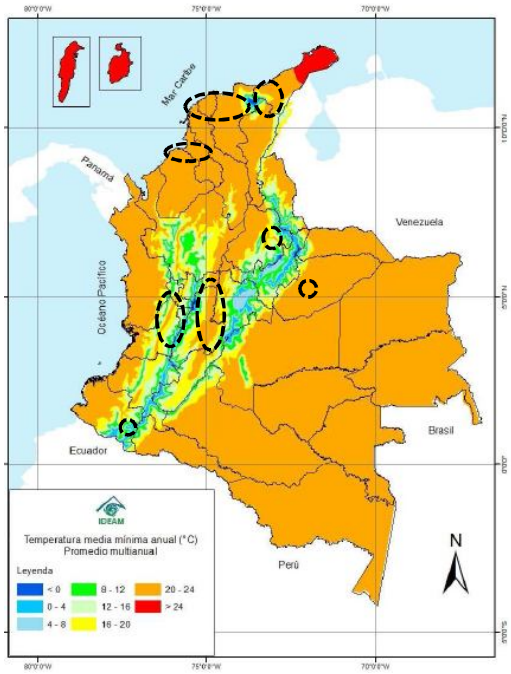


D. Anexo D: Distribución geográfica de la población *in situ* y comparación con indicadores climatológicos

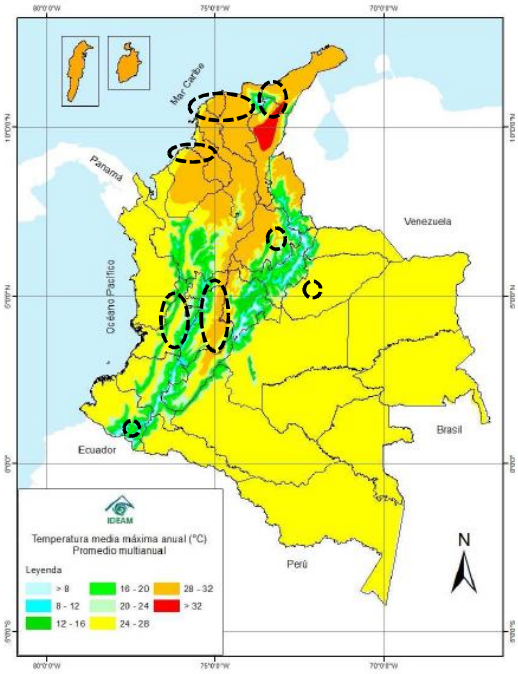
- Distribución geográfica de la población *in situ* de anonáceas y distribución espacio temporal de la temperatura en Colombia.



Distribución geográfica de la población *in situ*

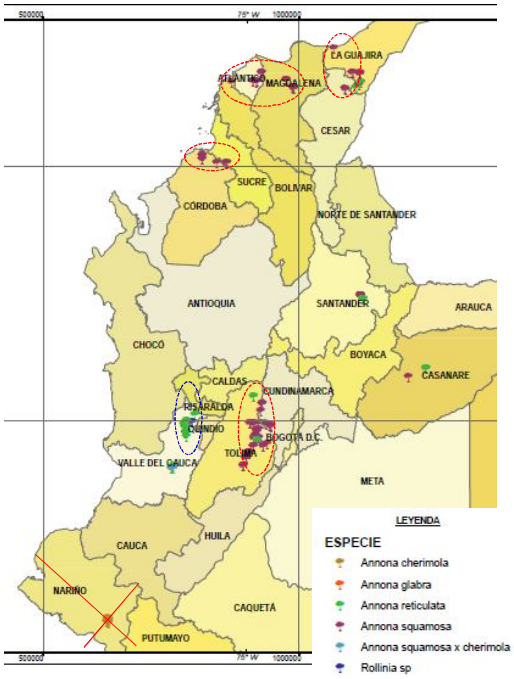


T° mínima media promedio multianual
IDEAM, 2011. Serie histórica (1971 – 2000)

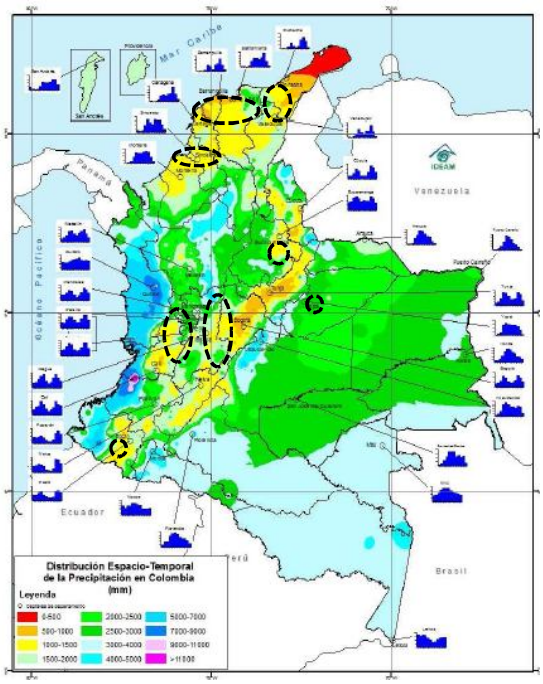


T° máxima media promedio multianual
IDEAM, 2011. Serie histórica (1971 – 2000)

- Distribución geográfica de la población *in situ* de anonáceas y distribución espacio temporal de la precipitación en Colombia.

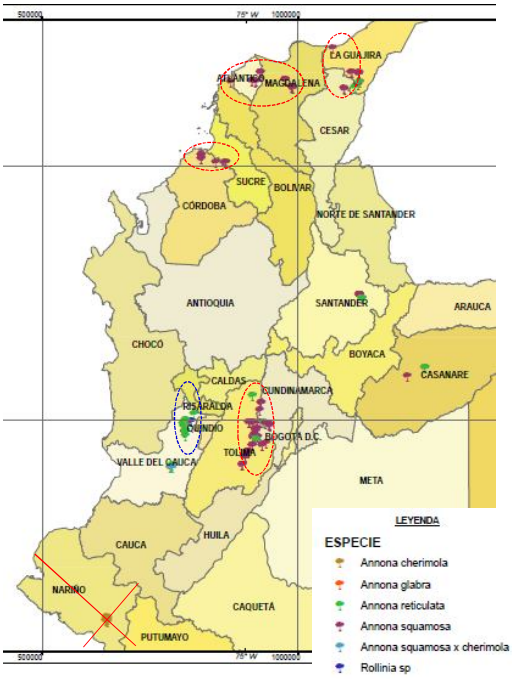


Distribución geográfica de la población *in situ*

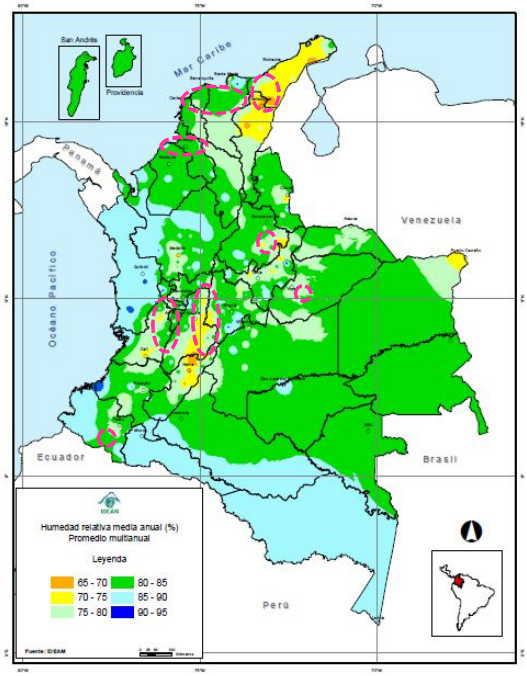


Lluvia promedio anual. Distribución en 1 año
IDEAM, 2011. Serie histórica (1971 – 2000)

- Distribución geográfica de la población *in situ* de anonáceas y distribución espacio temporal de la humedad (%) en Colombia.

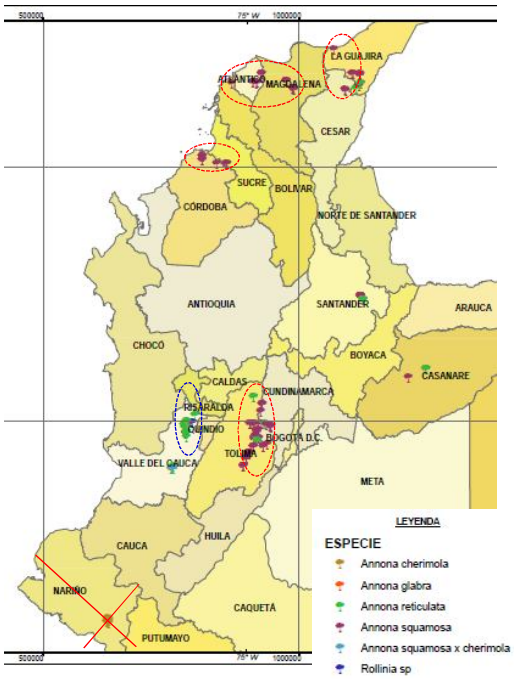


Distribución geográfica de la población *in situ*

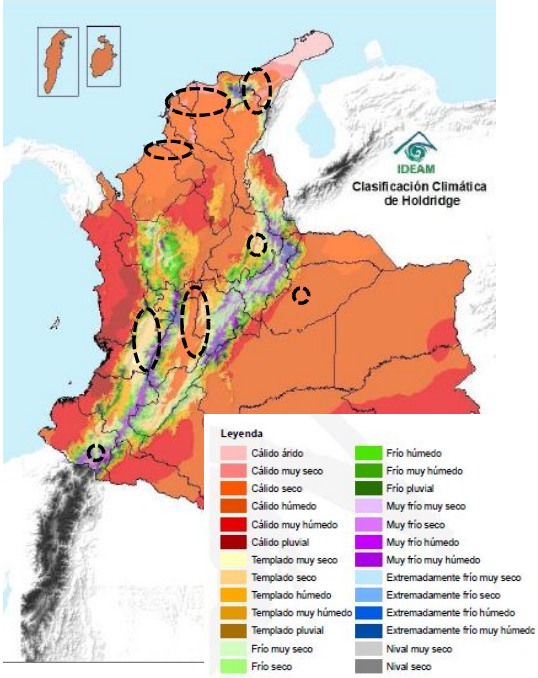


Humedad relativa media anual (%) - Promedio multianual
IDEAM, 2011. Serie histórica (1971 – 2000)

- Distribución geográfica de la población *in situ* de anonáceas y distribución espacial de la clasificación climática según Holdridge en Colombia.



Distribución geográfica de la población *in situ*



Clasificación climática de Holdridge
IDEAM, 2011.

E. Anexo E: Resultados del análisis univariado y multivariado de datos morfológicos

- Estadística descriptiva de las principales características de los frutos en especies de la familia Annonaceae.

Annona cherimola

	PF	*BRIX*	*%P*	*NS*
N	5	5	5	5
Min	71,10	14,30	0,11	7,00
Max	195,45	19,55	0,80	27,50
Sum	658,68	82,37	2,81	74,17
Mean	131,74	16,47	0,56	14,83
Std. error	23,87	0,86	0,12	3,61
Variance	2848,23	3,72	0,07	65,31
Stand. dev	53,37	1,93	0,26	8,08
Median	146,60	16,40	0,63	12,00
25 prcntil	76,70	14,98	0,37	8,50
75 prcntil	179,34	18,01	0,72	22,59
Skewness	-0,14	1,06	-1,78	1,14
Kurtosis	-2,30	2,16	3,80	0,84
Geom. mean	122,31	16,39	0,47	13,25

Annona glabra

	PF	*BRIX*	*%P*	*NS*
N	3	3	3	3
Min	124,00	6,27	0,26	75,33
Max	176,13	10,80	0,51	105,33
Sum	457,90	26,77	1,19	285,33
Mean	152,63	8,92	0,40	95,11
Std. error	15,27	1,36	0,07	9,89
Variance	699,17	5,58	0,02	293,55
Stand. dev	26,44	2,36	0,13	17,13
Median	157,77	9,70	0,42	104,67
25 prcntil	124,00	6,27	0,26	75,33
75 prcntil	176,13	10,80	0,51	105,33
Skewness	-0,84	-1,32	-0,80	-1,73
Kurtosis	-2,33	-2,33	-2,33	-2,33
Geom. mean	151,04	8,69	0,38	94,00

Annona reticulata

	PF	*BRIX*	*%P*	*NS*
N	18	18	18	18
Min	91,07	8,45	0,26	7,67
Max	504,00	29,70	0,58	95,00
Sum	4811,89	360,58	7,79	820,01
Mean	267,33	20,03	0,43	45,56
Std. error	26,57	1,38	0,02	6,48
Variance	12706,40	34,14	0,01	754,71
Stand. dev	112,72	5,84	0,10	27,47
Median	267,36	20,49	0,44	48,67
25 prcntil	169,80	18,40	0,35	17,38
75 prcntil	345,28	24,03	0,52	64,17
Skewness	0,31	-0,69	-0,09	0,22
Kurtosis	-0,39	0,27	-0,98	-1,16
Geom. mean	242,93	19,01	0,42	36,25

Annona squamosa

	PF	*BRIX*	*%P*	*NS*
N	70	70	70	70
Min	29,80	10,83	0,00	7,00
Max	399,57	30,70	0,61	84,67
Sum	9080,64	1314,63	21,81	2634,50
Mean	129,72	18,78	0,31	37,64
Std. error	7,96	0,49	0,01	2,46
Variance	4437,02	17,15	0,02	425,02
Stand. dev	66,61	4,14	0,12	20,62
Median	118,95	18,78	0,30	36,13
25 prcntil	83,96	16,43	0,25	19,50
75 prcntil	159,07	20,07	0,37	53,00
Skewness	1,49	0,44	0,25	0,29
Kurtosis	3,27	0,63	0,57	-0,91
Geom. mean	115,20	18,33	0,00	31,15

Software PAST 2.17.

Para realizar el análisis univariado se procedió a depurar la información por especie, dejando solamente las accesiones con información en los descriptores analizados.
Las especies *A. squamosa x A. cherimola y Rolinia sp., no cuentan con este análisis ya que presentan una sola accesión (con registro de los descriptores evaluados).*

- Estadística descriptiva de los descriptores morfológicos contemplados en el análisis de calidad de fruto en especies de la familia Annonaceae.

	FF	*PF*	*SIM*	*BRIX*
N	97	97	97	97
Min	1,00	29,80	0,00	6,27
Max	4,00	680,10	1,00	30,70
Sum	268,00	15708,30	34,00	1802,24
Mean	2,76	161,94	0,35	18,58
Std. error	0,09	10,80	0,05	0,48
Variance	0,72	11303,90	0,23	22,27
Stand. dev	0,85	106,32	0,48	4,72
Median	3,00	135,65	0,00	18,68
25 prcntil	3,00	91,56	0,00	15,79
75 prcntil	3,00	191,90	1,00	20,49
Skewness	-1,18	2,05	0,64	0,02
Kurtosis	0,68	5,94	-1,63	0,36
Geom. mean	2,57	136,40	0,00	17,92

Software PAST 2.17.

Para realizar el análisis univariado se procedió a depurar la información por especie, dejando solamente las accesiones con información en los descriptores de calidad de fruto analizados.

- Parámetros para la clasificación de los frutos de especies de Anonáceas, según sus características morfológicas y organolépticas.

RASGO	CARACTERÍSTICA	CLASE
Forma del fruto	Cordiforme o redonda	1
	No cordiforme o redonda	2
Simetría respecto al eje peduncular	Simétrico	1
	Asimétrico	2
Peso unitario (g)	Superior al promedio para los frutos de la especie	1
	Inferior al promedio para los frutos de la especie	2
Contenido de grados brix	Superior a 15° brix	1
	Inferior a 15° brix	2

Como producto de la asignación de las clases y el cruce de los valores por clase para los descriptores analizados, se obtiene una matriz con la clasificación final (frutos superiores y comunes) para el grupo de accesiones de la población *in situ*, que permite la identificación de la procedencia para cada categoría.

CATEGORÍA	VALORES PARA LAS CLASES DE FORMA / SIMETRÍA / PESO / ° BRIX	CARACTERÍSTICAS
Frutos superiores	1111	Frutos que presentan una forma cordiforme o redonda, con una tendencia simétrica respecto al eje peduncular, cuyo peso unitario es superior al promedio para los frutos de la especie y presentan un contenido de grados brix superior a 15°
Frutos comunes	2222, 1222, 1112, 1121, 1211, 1212, 1221, 1222	Frutos de forma diferente a cordiforme o redonda, con una tendencia asimétrica respecto al eje peduncular, cuyo peso unitario es inferior al promedio para los frutos de la especie y presentan un contenido de grados brix inferior a 15°

A continuación se presenta la relación de número de accesiones por categoría de fruto, obtenida de la matriz de clasificación de los frutos (Orden APA/3120/2002):

ESPECIE	PROCEDENCIA	CATEGORÍA DE FRUTOS	
		COMUNES	SUPERIORES
		N° ACCESIONES	N° ACCESIONES
A. cherimola	Nariño	5	
A. squamosa x A. cherimola	Valle del Cauca	1	
A. glabra	Córdoba	1	
	Magdalena	2	
A. reticulata	Córdoba	1	
	Cundinamarca	2	
	Santander	2	
	Tolima	1	1
	Valle del Cauca	8	2
A. squamosa	Atlántico	5	
	Casanare	1	
	Cesar	1	
	Córdoba	6	
	Cundinamarca	20	1
	Guajira	6	
	Magdalena	6	
	Sucre	2	
	Tolima	17	1
	Valle del Cauca	4	
Rollinia sp.	Valle del Cauca		1
TOTAL		**91**	**6**

- Estadística descriptiva para los 39 descriptores definidos en especies de la familia Annonaceae (98 accesiones evaluadas).

	H	*CAP*	*AC*	*LCNS*	*LCEW*	*RAM*	*SERP*	*TOP*	*FT*	*ESP*	*P*	*TA*
N	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00
Min	180,00	7,00	0,00	90,00	100,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00
Max	1200,00	160,00	400,00	1200,00	1300,00	3,00	2,00	6,00	7,00	30,00	8,00	3,00
Sum	55350,00	3565,97	15255,00	49220,00	52840,00	204,00	46,00	163,00	186,00	1118,00	249,00	241,00
Mean	564,80	36,39	155,66	502,25	539,18	2,08	0,47	1,66	1,90	11,41	2,54	2,46
Std. error	18,88	2,39	9,31	20,08	21,59	0,08	0,05	0,14	0,18	1,00	0,16	0,05
Variance	34936,60	557,64	8501,44	39520,70	45700,40	0,65	0,29	1,81	3,14	98,12	2,40	0,25
Stand. dev	186,91	23,61	92,20	198,80	213,78	0,81	0,54	1,35	1,77	9,91	1,55	0,50
Median	550,00	31,00	160,00	500,00	500,00	2,00	0,00	1,00	1,00	5,00	2,00	2,00
25 prcntil	400,00	22,00	70,00	400,00	400,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00
75 prcntil	700,00	44,00	202,50	600,00	625,00	3,00	1,00	2,00	2,00	21,00	3,00	3,00
Skewness	0,47	2,85	0,04	0,75	0,78	-0,15	0,52	2,11	2,20	0,30	1,63	0,17
Kurtosis	0,16	11,75	-0,65	0,84	0,87	-1,45	-0,93	3,61	3,74	-1,61	2,32	-2,01
Geom. mean	533,52	31,27	0,00	462,60	496,82	1,90	0,00	1,36	1,46	6,13	2,19	2,41

	VEGS	DRE	FH	AH	BH	LH	ANH	HABF	NF	FF	PF	SIM	DPOL
N	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00	98,00
Min	2,00	3,00	1,00	1,00	1,00	62,23	30,22	1,00	1,00	1,00	29,80	0,00	41,13
Max	7,00	7,00	4,00	3,00	3,00	236,60	84,50	3,00	48,00	4,00	680,10	1,00	108,84
Sum	488,00	522,00	238,00	138,00	222,00	11930,90	4554,44	182,00	1835,00	248,00	15974,40	34,00	6637,98
Mean	4,98	5,33	2,43	1,41	2,27	121,74	46,47	1,86	18,72	2,53	163,00	0,35	67,73
Std. error	0,16	0,17	0,14	0,08	0,10	3,68	1,32	0,08	1,02	0,09	10,74	0,05	1,47
Variance	2,49	2,94	2,00	0,66	0,92	1323,57	170,18	0,56	101,93	0,75	11298,10	0,23	210,58
Stand. dev	1,58	1,72	1,41	0,81	0,96	36,38	13,05	0,75	10,10	0,86	106,29	0,48	14,51
Median	6,00	5,00	2,00	1,00	3,00	110,10	42,93	2,00	17,50	3,00	136,96	0,00	65,93

	VEGS	DRE	FH	AH	BH	LH	ANH	HABF	NF	FF	PF	SIM	DPOL
25 prcntil	3,00	3,00	1,00	1,00	1,00	96,52	37,86	1,00	12,00	2,00	91,81	0,00	57,68
75 prcntil	6,00	7,00	4,00	1,00	3,00	137,06	49,55	2,00	24,00	3,00	193,52	1,00	76,56
Skewness	-0,57	-0,32	0,14	1,49	-0,56	1,27	1,26	0,24	0,61	-1,08	2,01	0,65	0,72
Kurtosis	-1,39	-1,57	-1,90	0,23	-1,70	1,19	0,79	-1,16	0,22	-0,46	5,78	-1,61	0,25
Geom. mean	4,68	5,02	1,99	1,25	2,01	117,12	44,92	1,70	15,38	2,32	137,34	0,00	66,27

Software PAST 2.17.

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA para las especies de Annonaceae de la población *in situ* (98 accesiones evaluadas).

PC	Valores propios (eigenvalue)	% varianza	% varianza acumulada
1	7,86	20,16	20,16
2	4,10	10,52	30,68
3	3,87	9,93	40,61
4	2,75	7,06	47,67
5	2,06	5,29	52,96
6	1,96	5,04	58,00
7	1,72	4,41	62,41
8	1,66	4,26	66,67
9	1,44	3,68	70,35
10	1,22	3,12	73,47
11	1,11	2,83	76,30
12	1,03	2,63	78,93
13	0,95	2,43	81,36
14	0,80	2,04	83,40
15	0,73	1,88	85,27
16	0,62	1,59	86,87
17	0,57	1,47	88,34
18	0,54	1,38	89,71
19	0,47	1,21	90,93
20	0,44	1,12	92,04
21	0,36	0,93	92,98
22	0,36	0,92	93,89
23	0,32	0,82	94,72
24	0,26	0,67	95,38
25	0,25	0,64	96,03
26	0,23	0,59	96,61
27	0,19	0,50	97,11
28	0,18	0,47	97,58
29	0,16	0,40	97,98
30	0,15	0,38	98,36
31	0,14	0,35	98,71
32	0,12	0,30	99,01
33	0,09	0,24	99,25
34	0,08	0,22	99,47
35	0,06	0,17	99,63
36	0,06	0,16	99,79
37	0,05	0,12	99,92
38	0,03	0,08	100,00
39	0,00181478	0,004653	100,00

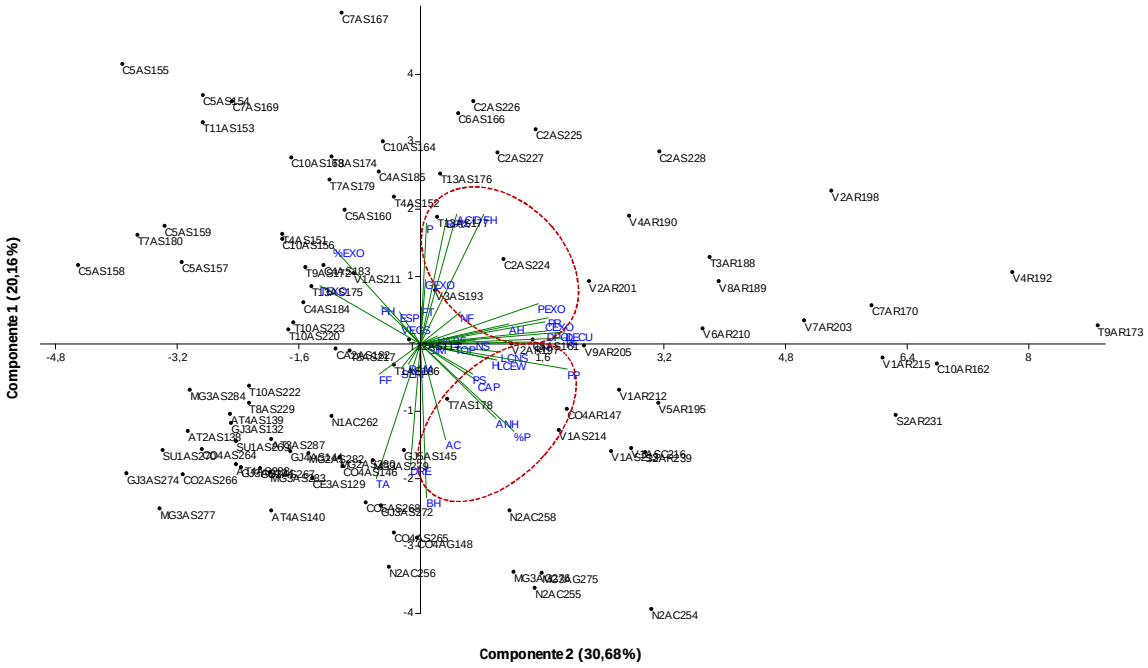
Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Variables más informativas por componente principal, en especies de la familia Annonaceae (98 accesiones evaluadas).

VARIABLES INFORMATIVAS															
CP1	**CP2**	**CP3**	**CP4**	**CP5**	**CP6**	**CP7**	**CP8**	**CP9**	**CP10**	**CP11**	**CP12**	**CP13**	**CP14**	**CP15**	**CP16**
LH	P	PS	LCEW	RMA	AC	VEGS	FF	SIM	DRE	H	HABF	%EXO	CAP	BH	CAP
PF	TA		TOP	SERP	LCNS			TEXO		PH	NF			ESP	ANH
DPOL	FH		FT		AH			CEXO							
DECU	BRIX				%P			GEXO							
PEXO	ACID							NS							
PR															
PP															
1 PC (20,16%)															

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Vectores de valores propios de los 16 primeros componentes principales, en especies de la familia Annonaceae (98 accesiones evaluadas).



Software PAST 2.17.

- Valores de las variables cualitativas y cuantitativas por grupo obtenido en el análisis de conglomerados (UPGMA) para las 98 accesiones de Annonaceae.

VARIABLES	CONGLOMERADO ANNONACEAE							
	A	B	C	D	E	F	G	H
FH	4	4	4	1	2	4	2	2
AH	3	1	1	1	1	3	1	3
BH	1 y 3	3	1	3	3	3	3	3
LH	165,29	150,27	108,25	103,67	108,81	177,08	124,50	221,09
ANH	68,01	37,94	39,47	41,53	52,44	58,04	69,75	75,82
HABF	2 y 3	2	2	2	2	1	3	1
NF	16	25	21	16	18	24	14	1
FF	2 y 3	1, 3 y 4	3	3	1	3	3	1
PF	260,69	438,62	137,60	120,89	157,13	233,49	131,74	680,10
SIM	0 y 1	0	1	0	1	0	0	1
DPOL	82,34	106,01	66,36	63,12	68,25	75,29	56,23	102,55
DECU	86,61	93,22	64,70	62,19	65,11	80,56	64,13	128,48
TEXO	2	1	3	3	1	2	2	4
CEXO	4 y 11	11	1	1	2	6	2	3
PEXO	79,14	169,25	80,52	66,61	59,03	119,24	36,02	408,00
GEXO	6,60	11,06	6,72	6,48	2,87	5,28	4,07	7,70
PR	15,28	22,62	5,32	4,06	8,02	7,42	2,05	25,40
PP	151,50	231,91	41,47	41,68	63,26	7,42	73,44	235,20
BRIX	8,45	20,29	21,61	17,49	9,63	21,86	16,47	21,87
ACID	4,99	5,93	5,51	4,00	3,13	5,23	2,99	3,52
PH	4,21	5,29	5,47	5,43	5,00	5,13	5,44	5,76
%EXO	0,31	0,38	0,61	0,58	0,38	0,50	0,36	0,60
%P	0,57	0,53	0,27	0,32	0,39	0,41	0,56	0,35
PS	14,78	14,85	9,92	9,58	26,81	8,45	5,13	11,50
NS	51	74	44	36	85	32	15	12

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA (38 descriptores), para la especie *A. squamosa*.

PC	Valores propios (eigenvalue)	% varianza	% varianza acumulada
1	6,65	17,50	17,50
2	5,56	14,63	32,13
3	3,57	9,41	41,53
4	2,81	7,38	48,92
5	2,50	6,59	55,51
6	1,80	4,75	60,26
7	1,60	4,22	64,48
8	1,51	3,97	68,45
9	1,30	3,43	71,88
10	1,11	2,91	74,79
11	1,04	2,74	77,53
12	0,91	2,40	79,93
13	0,82	2,16	82,09
14	0,78	2,04	84,13
15	0,73	1,91	86,04
16	0,62	1,63	87,66
17	0,61	1,61	89,27
18	0,58	1,54	90,81
19	0,51	1,33	92,14
20	0,43	1,13	93,26
21	0,31	0,81	94,08
22	0,30	0,78	94,85
23	0,26	0,68	95,53
24	0,25	0,65	96,18
25	0,23	0,62	96,80
26	0,21	0,55	97,35
27	0,19	0,51	97,86
28	0,17	0,44	98,30

PC	Valores propios (eigenvalue)	% varianza	% varianza acumulada
29	0,14	0,37	98,67
30	0,12	0,31	98,98
31	0,10	0,27	99,26
32	0,08	0,20	99,46
33	0,07	0,17	99,63
34	0,06	0,15	99,78
35	0,04	0,11	99,89
36	0,03	0,07	99,96
37	0,02	0,04	100,00
38	0,00	0,00	100,00

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA (24 descriptores), para la especie *A. squamosa*.

PC	Valores propios (eigenvalue)	% varianza	% varianza acumulada
1	6,20	25,83	25,83
2	3,33	13,89	39,72
3	2,66	11,07	50,79
4	2,12	8,83	59,62
5	1,53	6,37	65,99
6	1,22	5,08	71,07
7	1,12	4,65	75,72
8	0,92	3,84	79,56
9	0,80	3,33	82,89
10	0,74	3,08	85,97
11	0,65	2,71	88,68
12	0,47	1,97	90,65
13	0,44	1,84	92,49
14	0,38	1,60	94,09
15	0,31	1,29	95,38
16	0,26	1,08	96,47
17	0,23	0,96	97,42
18	0,21	0,86	98,28
19	0,15	0,64	98,92
20	0,10	0,42	99,34
21	0,08	0,35	99,68
22	0,05	0,19	99,87
23	0,03	0,12	100,00
24	0,00	0,00	100,00

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Variables informativas por componente principal, en *A. squamosa*.

VARIABLES INFORMATIVAS									
CP1	**CP2**	**CP3**	**CP4**	**CP5**	**CP6**	**CP7**	**CP8**	**CP9**	**CP10**
PF	FH	AH	LH	SIM	NF	HABF	HABF	GEXO	
DPOL	BH	CEXO	ANH						
DECU	FF		PH						
PEXO	BRIX								
PR	ACID								
PP									
%EXO									
%P									
PS									
NS									
1 PC (25,83%)									

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Valores de las variables cualitativas y cuantitativas por grupo obtenido en el análisis de conglomerados (UPGMA) para la especie *A. squamosa*.

VARIABLES	CONGLOMERADO (*Annona squamosa*)					
	A	B	C	D	E	F
FH	4	1	4	4	2	1
AH	1	1	3	1	1	1
BH	1	1	1	1	3	3
LH	106,24	87,28	145,93	104,80	148,89	104,98
ANH	41,46	36,85	50,50	37,65	78,62	42,84
HABF	3	3	1	2	1	2
NF	14	15	24	22	25	16
FF	3	3	3	3	3	3
PF	399,57	290,20	71,83	111,09	276,41	125,70
SIM	1	0	0	0	0	0
DPOL	89,78	86,89	46,51	62,22	71,84	64,55
DECU	93,05	87,35	61,45	61,37	79,41	62,78
CEXO	2	4	2	1	2	1
PEXO	259,72	126,37	36,54	67,61	105,32	67,74
GEXO	5,86	7,58	4,59	7,32	4,56	6,15
PR	17,93	3,37	2,12	4,53	3,02	4,12
PP	97,38	180,67	31,41	30,45	160,16	43,87
BRIX	17,20	13,03	19,58	21,28	20,13	17,36
ACID	4,50	8,90	4,67	5,73	4,41	3,55
PH	5,19	5,24	5,35	5,49	5,35	5,42
%EXO	0,65	0,48	0,50	0,65	0,38	0,56
%P	0,24	0,61	0,45	0,24	0,58	0,33
PS	24,53	13,13	4,22	8,99	7,91	9,75
NS	85	50	15	41	13	36

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA (39 descriptores), para la especie *A. reticulata*.

PC	Valores propios (eigenvalue)	% varianza	% varianza acumulada
1	9,44	24,19	24,19
2	5,93	15,22	39,41
3	4,13	10,60	50,01
4	3,19	8,18	58,19
5	2,77	7,10	65,30
6	2,28	5,86	71,15
7	2,15	5,51	76,67
8	1,97	5,06	81,73
9	1,62	4,15	85,87
10	1,56	4,01	89,88
11	1,09	2,81	92,68
12	0,84	2,16	94,84
13	0,62	1,59	96,43
14	0,48	1,23	97,66
15	0,36	0,93	98,60
16	0,32	0,83	99,43
17	0,22	0,57	100,00

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Vectores de valores propios de la varianza explicada en el PCA (25 descriptores), para la especie *A. reticulata*.

PC	Valores propios (eigenvalue)	% varianza	% varianza acumulada
1	8,65	34,61	34,61
2	3,55	14,21	48,82
3	2,78	11,13	59,95
4	2,20	8,78	68,73
5	1,65	6,59	75,32
6	1,40	5,60	80,92
7	1,19	4,75	85,67
8	0,88	3,50	89,17
9	0,78	3,11	92,28
10	0,60	2,40	94,69
11	0,41	1,64	96,33
12	0,34	1,37	97,70
13	0,24	0,96	98,66
14	0,13	0,51	99,17
15	0,10	0,38	99,56
16	0,07	0,28	99,83
17	0,04	0,17	100,00

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Variables informativas por componente principal, en *A. reticulata*.

VARIABLES INFORMATIVAS						
CP1	**CP2**	**CP3**	**CP4**	**CP5**	**CP6**	**CP7**
AH	FH	ANH	HABF	FF	NF	
LH	BH	BRIX	ACID			
PF	SIM	PH				
DPOL	GEXO	%EXO				
DECU		%P				
TEXO						
CEXO						
PEXO						
PR						
PP						
PS						
NS						
1 PC (34,61%)						

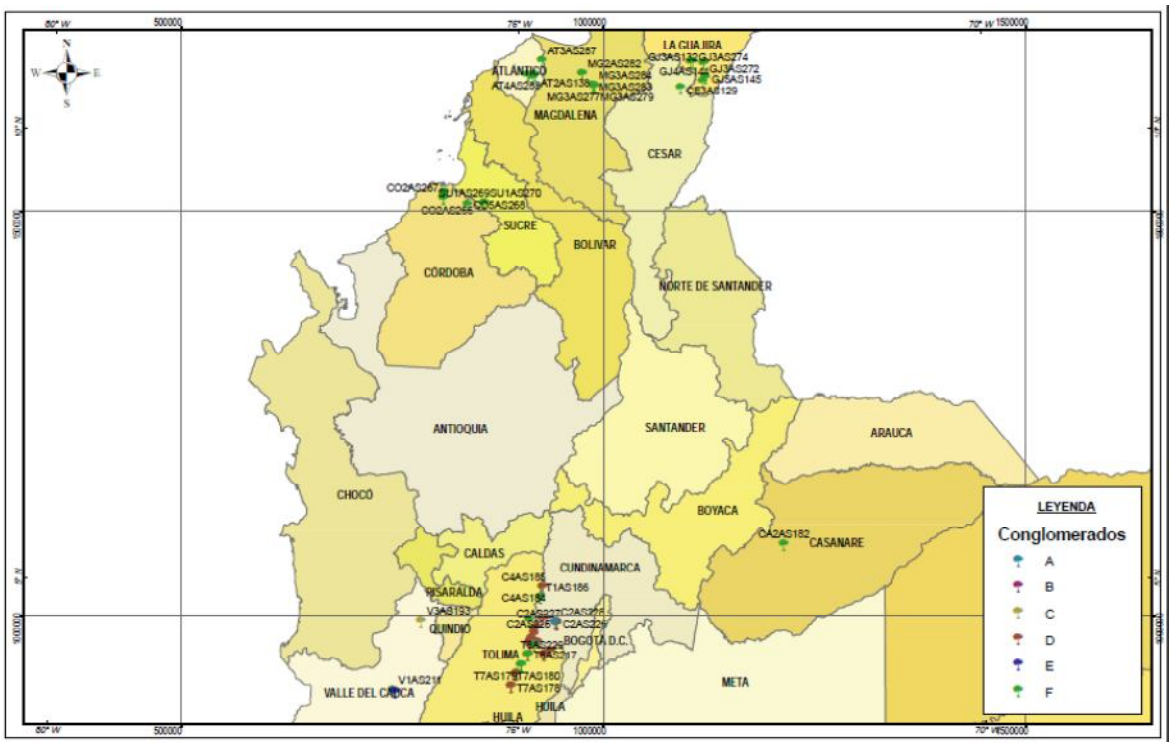
Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Valores de las variables cualitativas y cuantitativas por grupo obtenido en el análisis de conglomerados (UPGMA) para la especie *A. reticulata*.

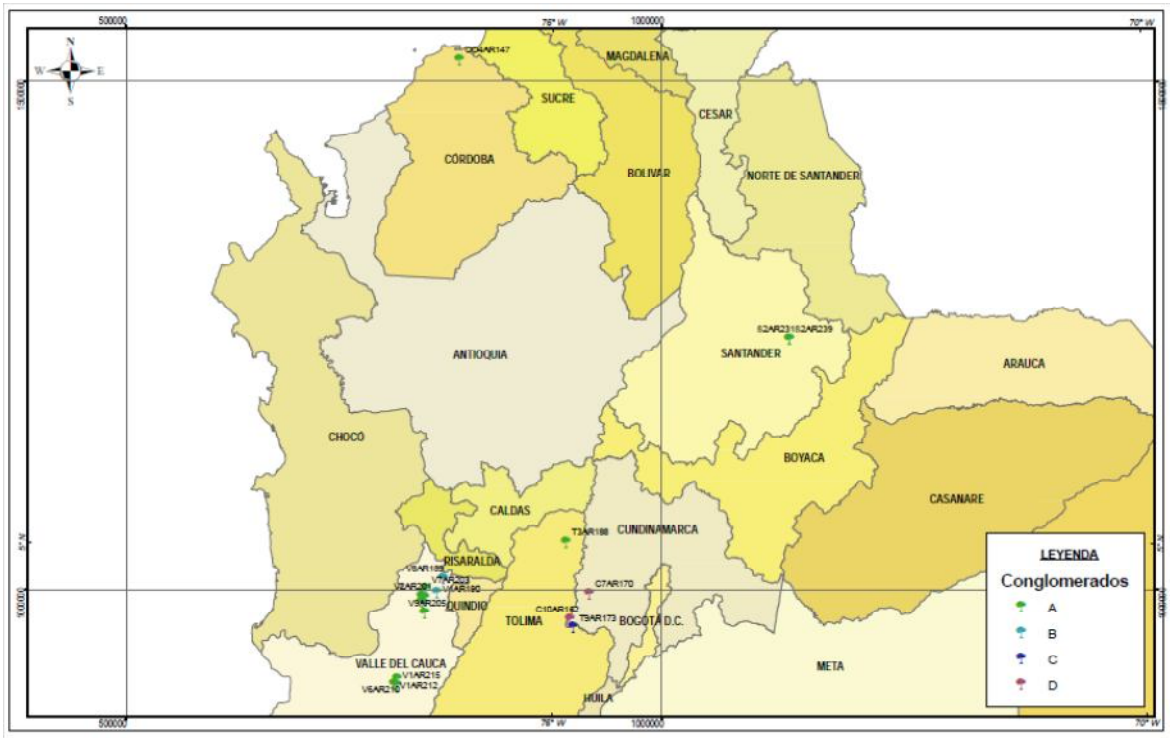
VARIABLES	CONGLOMERADO (*Annona reticulata*)			
	A	B	C	D
FH	4	4	4	1
AH	3	3	1	1
BH	3	1	2	3
LH	187,39	168,36	176,82	137,00
ANH	56,07	52,70	43,41	35,21
HABF	3	1	2	1
NF	21	23	26	25
FF	1	3	1	3
PF	207,06	304,57	504,00	405,93
SIM	0	1	1	0
DPOL	76,27	79,12	108,84	104,59
DECU	77,53	89,40	98,44	90,61
TEXO	2	2	1	1
CEXO	6	4	12	11
PEXO	108,68	135,37	218,91	144,42
GEXO	5,69	5,70	3,06	15,06
PR	7,93	15,07	26,15	20,85
PP	83,03	139,79	239,00	228,37
BRIX	19,30	21,85	21,20	19,83
ACID	5,29	5,61	6,46	5,67
PH	5,01	5,01	4,85	5,52
%EXO	0,49	0,46	0,44	0,35
%P	0,40	0,44	0,47	0,57
PS	7,42	14,35	19,95	12,30
NS	31	63	95	63

F. Anexo F: Mapas de distribución geográfica de los conglomerados identificados de las especies representativas

- Mapa de distribución geográfica de los grupos de accesiones de *A. squamosa* (análisis de conglomerados, método de agrupamiento UPGMA).



- Mapa de distribución geográfica de los grupos de accesiones de *A. reticulata* (análisis de conglomerados, método de agrupamiento UPGMA).



G. Anexo G: Protocolos de extracción de ADN e imágenes de geles

Protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1987) modificado

** Protocolo de extracción útil en *A. squamosa* y *A. reticulata*, a partir de material vegetal fresco macerado con NL2 (nitrógeno líquido).

Procedimiento:

- Tomar una muestra de 500 mg de tejido fresco macerado con nitrógeno líquido. Utilice perlas de cristal si requiere.
- Precalentar en baño de maría (65°C) el buffer de extracción CTAB (previamente autoclavado). Buffer: CTAB 2%, NaCl 1.4M, β-mercaptoetanol 2%, EDTA 10 mM, TRIS:HCl pH 8.0 100 mM.
- Adicionar 800 µl de buffer de extracción CTAB.
- Agregar β-mercaptoetanol (2%).
- Agitar en vórtex.
- Incubar las muestras a 65°C en baño maría durante 45 minutos. Durante este tiempo, agite las muestras ocasionalmente y suavemente (aproximadamente 3 veces, cada 15 min).
- Dejar enfriar a t° ambiente.
- Agregar 400 µl de SDS 20%.
- Agitar en vórtex.
- Incubar las muestras a 65°C en baño maría durante 45 minutos. Durante este tiempo, agite las muestras ocasionalmente y suavemente (aproximadamente 3 veces, cada 15 min).
- Dejar enfriar a t° ambiente.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 20 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar al sobrenadante fenol (1:1).
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 20 min.
- Adicionar al sobrenadante igual volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 20 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar 2/3 volúmenes de isopropanol. Mezclar por inversión.
- Incubar over night (24 horas) a -20°C.

Periodo de precipitación:

- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 400 µl de ETOH 70%. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 400 µl de ETOH 90%. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar completamente el pellet. Hágalo en una cabina hasta que seque completamente.
- Resuspender el ADN en 25 µl de la solución de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).
- Adicionar 1 µl de RNAsa (10 mg/µl).
- Incubar a 37°C por 15 min.

Protocolo de extracción de ADN de Escribano *et al.* (2004) y Fang *et al.* (1992), modificado

** Protocolo de extracción útil en *A. cherimola, A. glabra, A. muricata, A. squamosa x A. cherimola y Rollinia sp*, a partir de material vegetal fresco macerado con NL2 o material previamente almacenado (-20°C) macerado con NL2.

Procedimiento:

- Tomar una muestra de material vegetal de 500 mg de tejido macerado con nitrógeno líquido. Utilice perlas de cristal si requiere.
- Precalentar en baño de maría (65°C) el buffer de extracción CTAB (previamente autoclavado). Buffer de extracción: CTAB 2%, NaCl 1.4M, EDTA 0,02 M, Tris:HCl pH 8.0 0,1M, PVP 2%, bisulfito de sodio 1%.
- Adicionar 800 µl de buffer de extracción CTAB.
- Adicionar 50 µl de Proteinasa K (20 mg/ml).
- Agregar β-mercaptoetanol (5%).
- Agitar en vórtex.
- Incubar las muestras a 65°C en baño maría durante 45 minutos. Durante este tiempo, agite las muestras ocasionalmente y suavemente (aproximadamente 3 veces, cada 15 min).
- Dejar enfriar a t° ambiente.
- Agregar 200 µl de SDS 20% y agitar en vórtex.
- Incubar las muestras a 65°C en baño maría durante 45 minutos. Durante este tiempo, agite las muestras ocasionalmente y suavemente (aproximadamente 3 veces, cada 15 min).
- Dejar enfriar a t° ambiente.
- Adicionar 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar 50 µl de CTAB 10% (previamente precalentado a 65°C en baño de maría). Mezclar por inversión.
- Incubar las muestras a 65°C en baño maría x 5 minutos y dejar enfriar a t° ambiente.
- Adicionar 600 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Adicionar 40 µl de Acetato de Na (3M), 100 µl de NaCl (5M) y 600 µl de isopropanol (frío). Mezclar por inversión cuidadosamente.
- Incubar over night (48 horas) a -20°C.

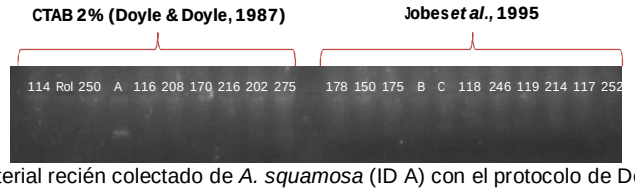
Periodo de precipitación:

- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 1000 µl de ETOH 70%. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el sobrenadante.
- Adicionar 1000 µl de ETOH 90%. Mezclar por inversión.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar completamente el pellet. Hágalo en una cabina hasta que seque completamente.
- Resuspender el ADN en 25 µl de la solución de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4).
- Adicionar 1 µl de RNAsa (10 mg/µl).
- Incubar a 37°C por 15 min.

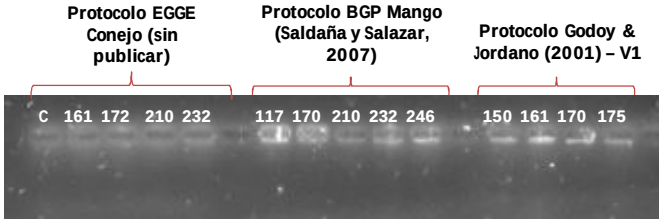
Purificación:

- Adicionar 100 µl NaCl (5M) y TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) hasta completar un volumen de 500 µl.
- Incubar a 65ºC por 5 min, para que pellet se resuspenda, si es necesario.
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 10 min, para precipitar las impurezas (proteínas, polisacáridos, etc.)
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Descartar el precipitado.
- Adicionar al sobrenadante 400 µl de isopropanol (frío) y homogenizar cuidadosamente.
- Incubar a -20°C por 15min.
- Agitar cuidadosamente y dejar nuevamente por 15 min (-20°C).
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el isopropanol.
- Lavar el pellet con etanol 70% (500 µl).
- Centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 5 min. Repetir el lavado en más de una ocasión con etanol 70% y centrifugar nuevamente, si el pellet no se despeja de la base del tubo o aún está oscuro.
- Lavar con etanol 100% (500 µl) y centrifugar a 14000 rpm (4°C) por 15 min.
- Descartar el sobrenadante y dejar secar completamente el pellet.
- Resuspender el ADN en 25 µl de la solución de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).
- Incubar a 37°C por 15 min.
- Cuantificar.

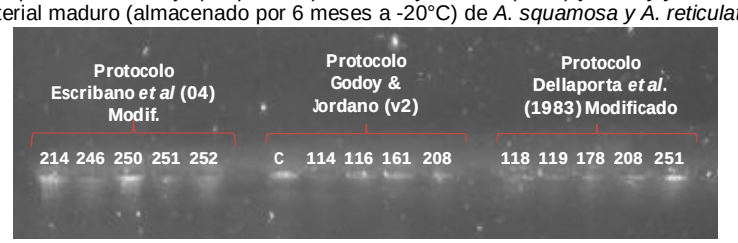
- Principales resultados de la estandarización del protocolo de extracción de ADN (geles de agarosa).



Obtención de ADN de material recién colectado de *A. squamosa* (ID A) con el protocolo de Doyle y Doyle (1987). Con el material previamente almacenado no se observan resultados favorables.

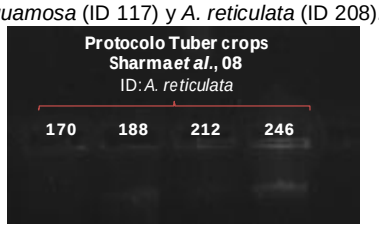


Nula efectividad de los protocolos Conejo (sin publicar), Saldaña y Salazar (2007) y Godoy y Jordano (2001) a partir de material maduro (almacenado por 6 meses a -20°C) de *A. squamosa y A. reticulata*.

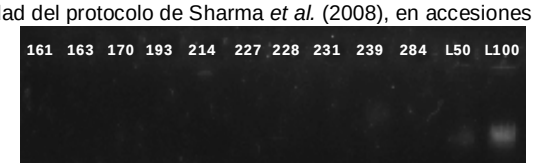


Nula efectividad de los protocolos Escribano *et al.* (2004), Godoy y Jordano (2001) y Dellaporta (1983) a partir de material maduro (almacenado por 6 meses a -20°C) de *A. squamosa y A. reticulata*.

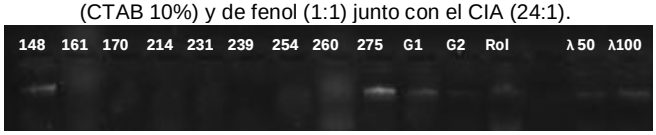
Parcial efectividad de los protocolos de Díaz *et al.* (2008), Hilje (2008) y Sharma *et al.* (2008), en accesiones de *A. squamosa* (ID 117) y *A. reticulata* (ID 208).



Parcial efectividad del protocolo de Sharma *et al.* (2008), en accesiones de *A. reticulata*.

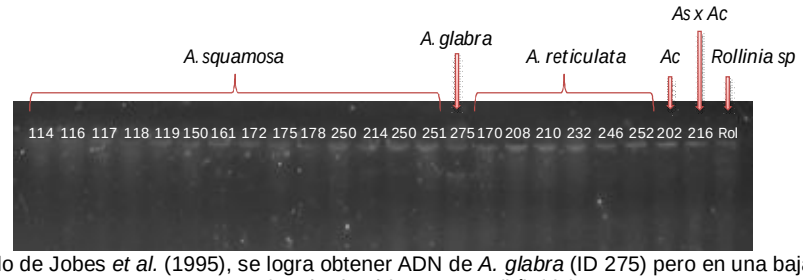


Protocolo de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones en el buffer de extracción (CTAB 10%), el uso de un segundo buffer (CTAB 10%) y de fenol (1:1) junto con el CIA (24:1).

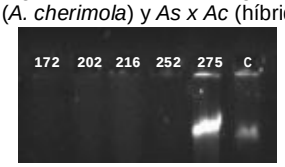


Alcalina (Sambrook y Russell, 2001)

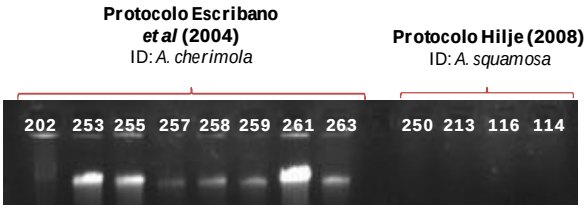
- Imágenes ejemplo de la visualización en geles de agarosa, de la extracción de ADN por especie.



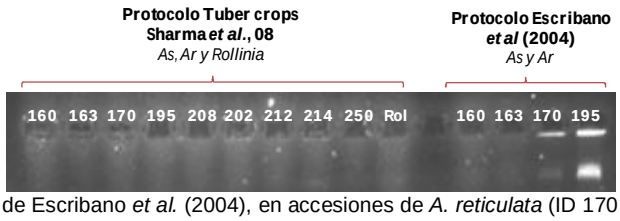
Con el protocolo de Jobes *et al.* (1995), se logra obtener ADN de *A. glabra* (ID 275) pero en una baja concentración. Ac (*A. cherimola*) y *As x Ac* (híbrido).



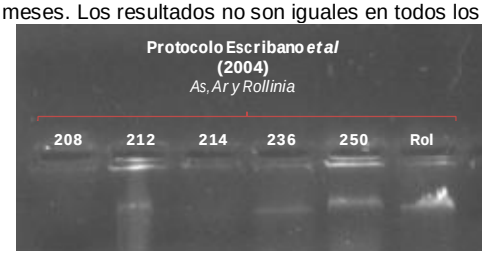
ADN de *A. glabra* (ID 275) y *A. squamosa* (material recién colectado, ID C)con el protocolo Doyle y Doyle (1990)



Efectividad del protocolo de Escribano *et al.* (2004), en accesiones de *A. cherimola*.



Efectividad del protocolo de Escribano *et al.* (2004), en accesiones de *A. reticulata* (ID 170 y 195) a partir de material maduro almacenado por 6 meses. Los resultados no son iguales en todos los materiales de esta especie.



ADN obtenido en *A. squamosa* (ID 236 y 250), *A. reticulata* (212) y *Rollinia* sp (Rol) con el protocolo de Escribano *et al.* (2004), a partir de material maduro almacenado por 6 meses.

H. Anexo H: SSR seleccionados para el estudio de la colección Colombiana de Anonáceas

SSR	Secuencia (5'-3')	T° anillamiento (°C) reportada	T° anillamiento (°C) calculada	Repetición	Tipo de repetición	Tamaño (bp)	Reportado por
LMCH1	Fw: CTCTTCAAAGGTACGACTTC Rv: TTGAGAAAAGGATAAGGATT	55	47	(CT)20	2	291-312	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH3	Fw: TCTGTGAAAATACTCTCGTA Rv: TCTCCACTGAATAATCTTTAAT	55	45	(GA)13	2	225-248	Escribano *et al*. (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH4	Fw: ATTAGAACAAGGACGAGAA Rv: CCTGTGTCTTTCATGGAC	55	47	(GA)14	2	112-128	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH5	Fw: CCCACTCTTCTACCCTCAAC Rv: CAAGTCCCTGTAAGAATCAGA	55	51	(CT)10	2	155-160	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH6	Fw: GGCATCCTATATTCAGGTTT Rv: TTAAACATTTTGGACAGACC	55	49	(CT)14	2	220-254	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH8	Fw: AATTACGCAGATCACAGTAGC Rv: CATCTTGCCTTGCTCTCTAC	55	51	(GA)8	2	247-251	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH9	Fw: TCAAACACGTATAGAAAACC Rv: TATGTGAAAGATCAAAAAGAG	55	44	(GA)6	2	170-172	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH11	Fw: TACCTCTCGCTTCTCTTCCT Rv: GATGATTAGACACAAGTGGATG	55	51	(CT)10	2	173-176	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH14	Fw: GCTAAGTTCTAGTTTGCAGGTT Rv: CTCCCTCGACACTCTCTCTT	55	51	(GA)8	2	98-116	Escribano *et al.* (2004)
LMCH16	Fw: TGAAAAATAACAAGAATGTAA Rv: GGATAAACAAAGCAGTAAATC	55	43	(GA)20	2	216-230	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH29	F: GTACCATCTTTTAGGAAATC R: TGCAATCTATGTTAGTCAC	45	43	(GA)9	2	185-195	Escribano *et al.* (2004); Escribano *et al.* (2007)
LMCH43	F: CTAGTTCCAAGACGTGAGAGAT R: ATAGGAATAAGGGACTGTTGAG	55	50	(GA)9	2	210-216	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH53	F: GATGACGATGATAAGAATTT R: GTGCTCAGTTCTACACTAACT	55	45	(GA)8	2	117-119	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH69	F: AGCTTTAGCCATGAATTAGA R: GAAAGGCTGACGAGATATAA	55	50	(GA)9 (GT)3	2	147-187	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH71	F: AGATAACACCCGCCCACTAT R: ACAACTTTTCTCCCAACCTATC	55	54	(GA)14	2	272-290	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH78	F: ATTTGATTGATTGATTTCCTA R: CTTTTGCTTTCTTTCACATC	55	48	(GA)9	2	159-161	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH79	F: GAAGCAAGTAGACACGTAGTA R: AGGGTTGGTATTTCTTTATAGT	55	46	(CT)12	2	206-210	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH119	F: CAGAAAATTAGCAGAGGACTCA R: GTGGGTTGGGTTTTTAGGTC	55	53	(GA)12	2	191-212	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH122	F: AGCAAAGATAAAGAGAAGATAA R: ATCCAAGCCTATTAACAACT	55	46	(GA)9	2	177-210	Escribano *et al.* (2008a)
LMCH144	F: GTTTGGAAGAGTCGCAGGAT R: ACTGTAAAACGCAGACCAAGAT	55	55	(CT)12	2	176-202	Escribano *et al.* (2008a)
Factor de transcripción INO	F: TGCACTGAAATGGGAAATGA R: ATTGCGAAAAGGGAGGAAAT	60 (t°: 60,8 - t°: 59,7)	56			344	

I. Anexo I: Accesiones empleadas en el análisis molecular

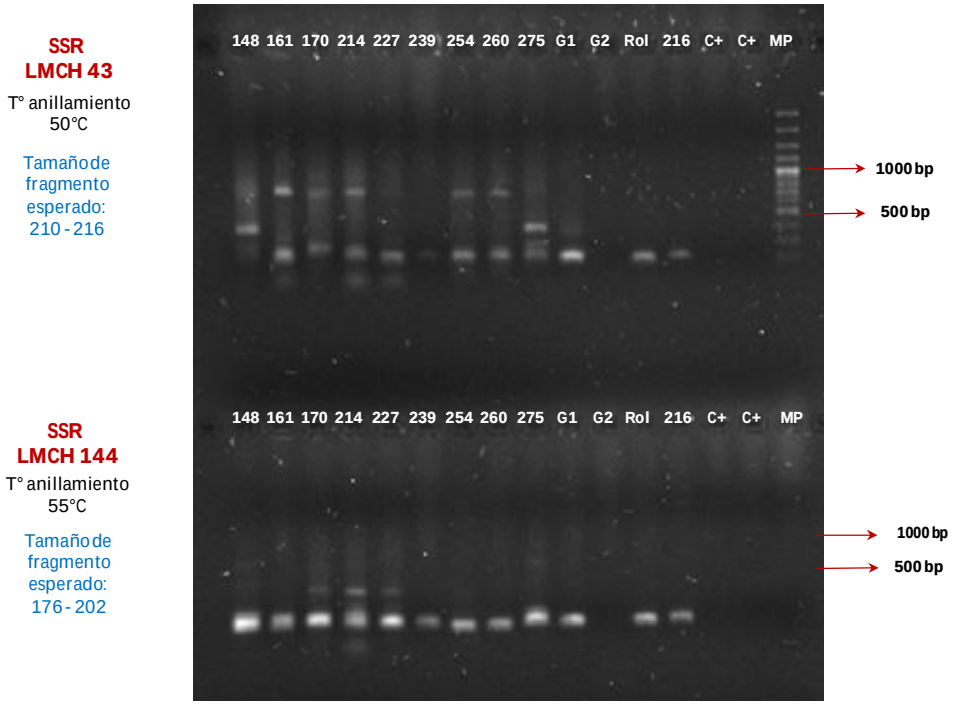
- Listado de accesiones de Anonáceas (PCR 2011).

Accesiones (PCR 2011)					
N1AC260	V4AR190	C4AS184	CO4AS265	S2AS230	T12AS120
N2AC254	V5AR194	C4AS185	CO5AS268	S2AS233	T13AS175
N2AC256	V6AR210	C5AS154	GJ3AS272	S2AS234	T13AS176
MG3AG275	V8AR189	C5AS159	GJ3AS273	S2AS237	T13AS177
C7AR170	V9AR208	C6AS166	GJ3AS83	S2AS238	T3AS187
CA1AR252	V9AR209	C7AS167	GJ4AS144	S2AS241	T7AS178
GJ5AR271	AT2AS138	C7AS168	GJ5AS145	S2AS242	T7AS179
MG3AR278	AT3AS286	C7AS169	MG2AS280	S2AS243	T7AS180
S1AR246	AT4AS140	CA1AS251	MG2AS281	S2AS244	T7AS181
S1AR249	AT4AS288	CA2AS182	MG2AS282	S2AS245	T9AS172
S2AR231	BO3AS142	CE3AS128	MG3AS277	SU1AS270	V3AS193
S2AR232	C10AS156	CO2AS266	MG3AS284	T12AS116	V4AS191
S2AR239	C10AS164	CO2AS267	MG3AS285	T12AS117	
S2AR240	C10AS165	CO4AS146	S1AS247	T12AS118	
V1AR215	C4AS183	CO4AS264	S1AS248	T12AS119	

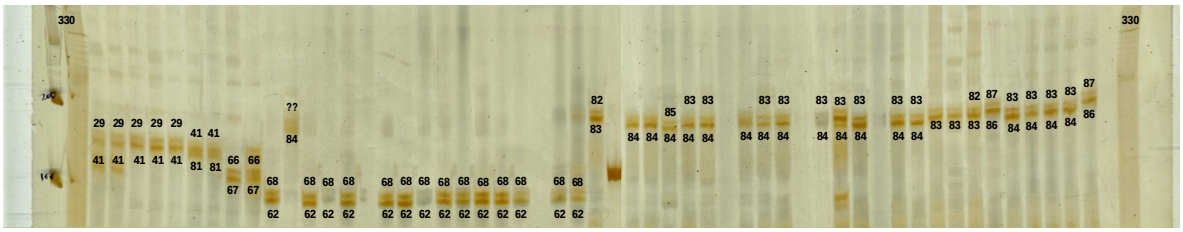
- Listado de accesiones de Anonáceas (PCR 2012 y 2013).

Accesiones (PCR 2012 y 2013)		
N1AC261	V2AR197	S1AS248
N1AC262	V4AR190	S2AS233
N1AC263	V5AR195	S2AS234
N2AC253	V6AR210	S2AS235
N2AC255	V8AR189	S2AS236
N2AC256	V9AR208	S2AS237
N2AC257	V9AR209	S2AS238
N2AC258	AT2AS138	S2AS241
N2AC259	AT4AS288	S2AS242
V7AC202	C10AS163	S2AS244
MG3AG276	C2AS224	S2AS245
C10AR162	C2AS225	T10AS220
CA1AR252	C5AS155	T12AS117
S1AR246	C6AS166	T1AS114
S2AR231	C7AS167	T1AS150
S2AR232	CA1AS250	T7AS179
S2AR240	CA1AS251	V3AS193
T9AR173	GJ3AS131	V4AS191
V1AR212	S1AS247	

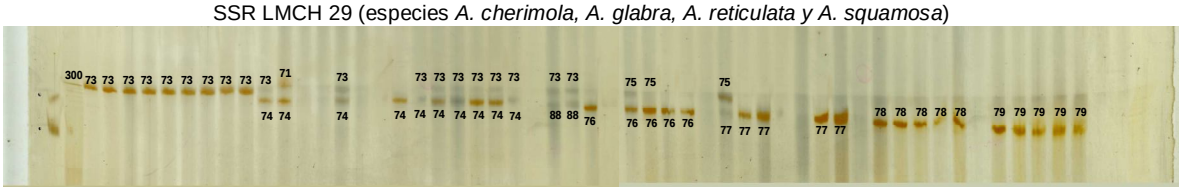
- Imagen ejemplo de la visualización de productos de PCR con los SRR LMCH 43 y LMCH 144.



- Imágenes de algunos geles de acrilamida en accesiones de anonáceas



SSR LMCH 29 (especies *A. cherimola, A. glabra, A. reticulata y A. squamosa*)



SSR LMCH 71 (especies *A. cherimola, A. glabra, A. reticulata y A. squamosa*)

J. Anexo J: Resultados del análisis estadístico a nivel molecular

- Accesiones de Anonáceas empleadas para el análisis estadístico molecular.

A. squamosa		*A. reticulata*	*A. cherimola*
AT2AS138	S2AS237	C10AR162	N1AC261
AT4AS288	S2AS238	C7AR170	N1AC262
C10AS163	S2AS241	CA1AR252	N1AC263
C2AS225	S2AS242	S1AR246	N2AC253
C5AS161	S2AS244	S2AR231	N2AC254
C6AS166	S2AS245	S2AR232	N2AC255
C7AS167	T10AS220	S2AR239	N2AC256
CA1AS250	T12AS117	S2AR240	N2AC257
CA1AS251	T1AS114	T9AR173	N2AC258
GJ3AS131	T1AS150	V1AR212	N2AC259
S1AS247	T7AS179	V4AR190	V7AC202
S2AS233	V3AS193	V5AR195	
S2AS235	V4AS191	V6AR210	
		V8AR189	
		V9AR208	
		V9AR209	

- Resultados "HWE Probability test" – GenAlex 6.5 en *A. squamosa* (población *in situ*).

SSR	DF	Chi²	P-Value	Observación
LMCH1	45	94,98	0,0000	***
LMCH16	10	24,10	0,0073	**
LMCH29	15	53,69	0,0000	***
LMCH69	3	24,00	0,0000	***
LMCH71	15	82,72	0,0000	***
LMCH79	1	21,00	0,0000	***

*Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001*

Esta información se corroboró con el programa GenePop 4.2

			FIS ESTIMATES	
SSR	**P-Value**	**S.E.**	**W&C**	**R&H**
LMCH1	0,00	0,00	-0,01	0,00
LMCH16	0,01	0,00	0,46	0,31
LMCH29	0,00	0,00	-0,21	-0,08
LMCH69	0,00	0,00	10.000,00	10.909,00
LMCH71	0,00	0,00	0,84	0,77
LMCH79	0,00	0,00	10.000,00	10.500,00

* Estimation of exact P-Values by the Markov chain method.

POP N°	DF	Chi²	P-Value
1	12	Infinity	High. Sign.

- Resultados "HWE Probability test" – GenAlex 6.5 en *A. reticulata* (población *in situ*).

SSR	DF	Chi²	P-Value	Observación
LMCH1	6	15,00	0,0203	*
LMCH16	3	4,00	0,2615	ns
LMCH29	1	13,00	0,0003	***
LMCH43	6	7,92	0,2443	ns
LMCH69	1	2,00	0,1573	ns
LMCH71	6	20,44	0,0023	**
LMCH79	3	26,00	0,0000	***

*Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001*

Esta información se corroboró con el programa GenePop 4.2

FIS ESTIMATES

SSR	P-Value	S.E.	W&C	R&H
LMCH1	0,00	0,00	10.000,00	12.500,00
LMCH16	0,33	0,00	0,50	0,50
LMCH29	0,00	0,00	-10.000,00	-10.000,00
LMCH43	0,19	0,01	0,25	0,31
LMCH69	0,33	0,00	10.000,00	20.000,00
LMCH71	0,00	0,00	-0,05	0,12
LMCH79	0,00	0,00	10.000,00	10.833,00

* Estimation of exact P-Values by the Markov chain method.

POP N°	DF	Chi²	P-Value
1	14	70,8322	0,0000

- Resultados "HWE Probability test" – GenAlex 6.5 en *A. cherimola* (población *in situ*).

SSR	DF	Chi²	P-Value	Observación
LMCH1	6	10,00	0,1247	ns
LMCH16	3	2,40	0,4945	ns
LMCH29	10	33,00	0,0003	***
LMCH43	6	15,16	0,0190	*
LMCH69	6	18,25	0,0056	**
LMCH71	Monomorphic			
LMCH79	1	0,14	0,7077	ns

*Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001*

Esta información se corroboró con el programa GenePop 4.2

SSR	P-Value	S.E.	W&C	R&H
LMCH1	0,00	0,00	-10.000,00	-10.000,00
LMCH16	0,01	0,00	-0,32	-0,16
LMCH29	0,03	0,01	-0,35	-0,13
LMCH43	0,43	0,01	-0,30	-0,14
LMCH69	0,65	0,01	-0,40	-0,20
LMCH71	0,03	0,00	-10.000,00	-10.000,00

* Estimation of exact P-Values by the Markov chain method.

POP N°	DF	Chi²	P-Value
1	12	36,901	0,0002

- Estadísticos F (Wright) sobre todas las poblaciones para cada locus evaluado en *A. squamosa*.

Locus	Ht	Mean He	Mean Ho	Fis	Fit	Fst
LMCH1	0,86	0,81	0,89	-0,10	-0,03	0,06
LMCH16	0,58	0,44	0,40	0,10	0,31	0,24
LMCH29	0,64	0,60	0,74	-0,23	-0,16	0,06
LMCH69	0,56	0,52	0,00	1,00	1,00	0,09
LMCH71	0,81	0,75	0,15	0,80	0,81	0,08
LMCH79	0,44	0,42	0,00	1,00	1,00	0,04
			Mean	0,43	0,49	0,09
			SE	0,23	0,21	0,03

- Resultados "Genic differentiation (exact G test)" – GenePop 4.2 en *A. squamosa*.

Locus	P-Value
LMCH1	0,073
LMCH16	0,002
LMCH29	0,800
LMCH69	0,108
LMCH71	0,352
LMCH79	0,911

Chi²	DF	P-Value
25,2655	12	0,0136

P-value across all loci (Fisher's method).

- Alelos únicos por población de *A. squamosa* – GenAlex 6.5.

Pop	Locus	Allele	Freq
1	LMCH1	113	0,100
1	LMCH16	135	0,250
2	LMCH1	124	0,083
2	LMCH1	126	0,083
2	LMCH1	128	0,083
2	LMCH29	185	0,071
2	LMCH29	186	0,143
2	LMCH29	187	0,143
2	LMCH69	101	0,250
3	LMCH16	139	0,200

- Rangos de interpretación de los Estadísticos F, planteados por Wright (1978).

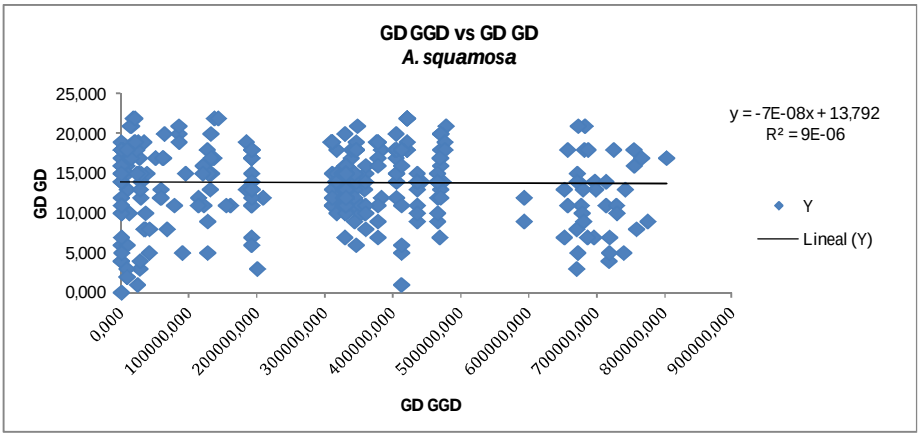
RANGOS DE Fst	GRADO DE DIFERENCIACION POBLACIONAL
0,00 - 0,05	Indicativo de poca diferenciación genética
0,05 - 0,15	Indica una diferenciación genética moderada
0,15 - 0,25	Indica una gran diferenciación genética
0,25 - 1,00	Indica una diferenciación genética muy grande

- Matriz de distancia genotípica en la colección de *A. squamosa*.

	C10A S163	C2A S225	C5A S161	C6A S166	C7A S167	CA1A S250	CA1A S251	T10A S220	T12A S117	T1A S114	T1A S150	T7A S179	V3A S193	V4A S191	AT2A S138	AT4A S288	GJ3A S131	S1A S247	S2A S233	S2A S235	S2A S237	S2A S238	S2A S241	S2A S242	S2A S244	S2A S245
C10AS163	0																									
C2AS225	13	0																								
C5AS161	7	14	0																							
C6AS166	11	10	8	0																						
C7AS167	14	13	15	15	0																					
CA1AS250	18	21	21	19	22	0																				
CA1AS251	14	21	17	19	14	10	0																			
T10AS220	13	18	10	14	15	21	17	0																		
T12AS117	7	11	13	12	16	14	18	17	0																	
T1AS114	3	12	5	11	13	18	14	12	9	0																
T1AS150	14	21	15	19	18	12	14	13	19	14	0															
T7AS179	9	13	9	11	18	14	18	17	7	9	18	0														
V3AS193	14	17	13	15	14	12	12	17	11	13	18	6	0													
V4AS191	12	16	13	13	6	20	12	11	15	11	16	16	12	0												
AT2AS138	10	12	11	11	18	10	14	17	6	10	18	6	10	14	0											
AT4AS288	14	20	15	19	14	16	10	13	18	14	6	18	14	10	16	0										
GJ3AS131	15	18	12	12	19	7	15	14	12	15	15	11	11	17	7	19	0									
S1AS247	14	20	15	19	18	12	14	13	18	14	2	18	18	14	16	4	15	0								
S2AS233	14	20	15	19	18	12	14	13	18	14	2	18	18	14	16	4	15	0	0							
S2AS235	11	10	10	8	19	17	17	18	12	9	19	7	9	17	11	19	16	19	19	0						
S2AS237	5	14	1	8	15	21	17	10	11	4	15	11	15	13	11	15	12	15	15	12	0					
S2AS238	8	15	3	5	12	22	18	11	14	7	16	12	16	10	12	16	13	16	16	13	3	0				
S2AS241	3	14	4	8	15	19	15	10	8	5	15	11	15	13	11	15	12	15	15	12	2	5	0			
S2AS242	18	16	20	15	17	11	5	20	17	17	18	18	12	15	14	14	15	18	18	13	20	21	19	0		
S2AS244	18	7	15	11	20	22	22	19	18	17	22	18	22	22	18	22	19	22	22	15	15	16	15	17	0	
S2AS245	9	13	9	11	18	13	17	17	7	8	18	1	5	16	6	18	11	18	18	5	11	12	11	17	18	0

GenAlex 6.5

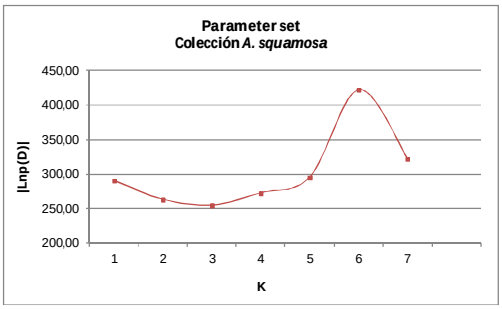
- Correlación (r^2) entre distancia genética y distancia geográfica utilizando la prueba de Mantel (1967) para *A. squamosa*.



GD corresponde a la matriz de datos genéticos y GGD a la matriz de datos geográficos

SSx	SSy	SPxy	Rxy	P(rxy-rand >= rxy-data)
15435890030342,800	6957,151	-1008132,256	-0,003	0,516

- Comportamiento del logaritmo de probabilidad (|lnP(D)|) en función del número de poblaciones (K) para el grupo de 6 SSR en *A. squamosa*.



- Estadísticos F (Wright) sobre todas las poblaciones para cada locus evaluado en *A. reticulata*.

Locus	Ht	Mean He	Mean Ho	Fis	Fit	Fst
LMCH1	0,66	0,31	0,00	1,00	1,00	0,52
LMCH16	0,91	0,31	0,25	0,20	0,72	0,66
LMCH29	0,50	0,50	1,00	-1,00	-1,00	0,00
LMCH43	0,55	0,36	0,38	-0,04	0,32	0,35
LMCH69	0,88	0,25	0,00	1,00	1,00	0,71
LMCH71	0,68	0,65	0,76	-0,16	-0,11	0,05
LMCH79	0,45	0,43	0,00	1,00	1,00	0,05
			Mean	0,28	0,42	0,34
			SE	0,29	0,28	0,12

- Resultados "Genic differentiation (exact G test)" – GenePop 4.2 en *A. reticulata*.

Locus	P-Value
LMCH1	0,068
LMCH29	1,000
LMCH43	0,422
LMCH71	0,096
LMCH79	0,267

Chi²	DF	P-Value
14,4170	10	0,1548

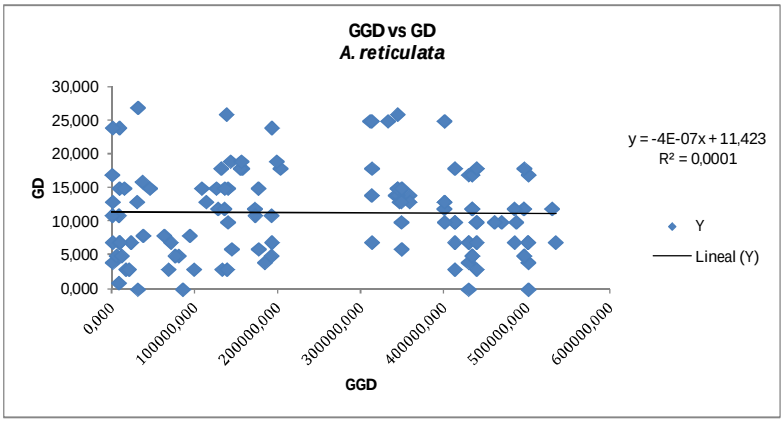
- Alelos únicos por población de *A. reticulata* – GenAlex 6.5.

Pop	Locus	Allele	Freq
1	LMCH1	113	0,250
1	LMCH1	114	0,500
1	LMCH1	122	0,250
1	LMCH16	132	0,500
1	LMCH16	133	0,250
1	LMCH16	139	0,250
1	LMCH43	143	0,250
1	LMCH43	146	0,375
1	LMCH43	151	0,125
1	LMCH69	157	0,500
1	LMCH69	158	0,500
1	LMCH71	171	0,286
2	LMCH1	117	1,000
2	LMCH71	188	0,200
2	LMCH79	196	0,250
2	LMCH79	196	0,250

- Matriz de distancia genotípica en la colección de *A. reticulata*.

	C10AR162	C7AR170	CA1AR252	S1AR246	S2AR231	S2AR232	S2AR239	S2AR240	T9AR173	V1AR212	V4AR190	V5AR195	V6AR210	V8AR189	V9AR208	V9AR209
C10AR162	0															
C7AR170	27	0														
CA1AR252	14	25	0													
S1AR246	14	25	4	0												
S2AR231	15	14	11	11	0											
S2AR232	14	25	5	1	11	0										
S2AR239	26	7	24	24	13	24	0									
S2AR240	15	18	7	7	4	7	17	0								
T9AR173	15	16	13	13	10	13	15	6	0							
V1AR212	15	18	7	7	4	7	17	0	6	0						
V4AR190	12	19	10	10	7	10	18	3	3	3	0					
V5AR195	15	18	7	7	4	7	17	0	6	0	3	0				
V6AR210	12	19	12	12	5	12	18	5	11	5	8	5	0			
V8AR189	15	26	10	10	13	12	25	13	18	13	15	13	15	0		
V9AR208	15	18	12	12	5	12	17	5	10	5	7	5	7	8	0	
V9AR209	12	19	10	10	7	10	18	3	3	3	0	3	8	15	7	0

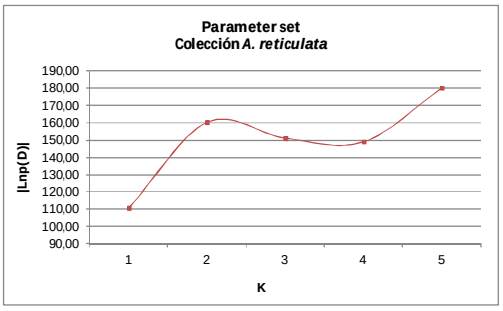
- Correlación (r^2) entre distancia genética y distancia geográfica utilizando la prueba de Mantel (1967) para *A. reticulata*.



GD corresponde a la matriz de datos genéticos y GGD a la matriz de datos geográficos

SSx	SSy	SPxy	Rxy	P(rxy-rand >= rxy-data)
3761291284761,300	4959,967	-1582555,194	-0,012	0,494

- Comportamiento del logaritmo de probabilidad (|lnP(D)|) en función del número de poblaciones (K) para el grupo de 7 SSR en *A. reticulata*.



K. Anexo K: Resultados del contraste entre la evaluación morfológica y molecular

- Estadística descriptiva de las 11 accesiones de *A. squamosa*.

	FH	*AH*	*BH*	*LH*	*ANH*	*HABF*	*NF*	*FF*	*PF*	*SIM*	*DPOL*	*DECU*	TEXO
N	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Min	1,00	1,00	1,00	87,28	30,24	1,00	14,00	1,00	81,70	0,00	50,99	45,96	3,00
Max	4,00	3,00	3,00	162,42	55,14	3,00	48,00	3,00	290,20	0,00	86,89	87,35	3,00
Sum	29,00	15,00	19,00	1204,12	446,13	23,00	268,00	28,00	1447,68	0,00	701,86	736,90	33,00
Mean	2,64	1,36	1,73	109,47	40,56	2,09	24,36	2,55	131,61	0,00	63,81	66,99	3,00
Std. error	0,47	0,24	0,30	6,67	2,36	0,25	3,58	0,25	20,49	0,00	3,47	3,23	0,00
Variance	2,45	0,65	1,02	489,08	61,14	0,69	140,66	0,67	4618,11	0,00	132,67	114,99	0,00
Stand. dev	1,57	0,81	1,01	22,12	7,82	0,83	11,86	0,82	67,96	0,00	11,52	10,72	0,00
Median	4,00	1,00	1,00	99,27	38,33	2,00	20,00	3,00	93,87	0,00	59,62	69,81	3,00
25 prcntil	1,00	1,00	1,00	96,09	36,25	1,00	15,00	2,00	84,07	0,00	53,36	58,98	3,00
75 prcntil	4,00	1,00	3,00	118,24	48,61	3,00	38,00	3,00	180,50	0,00	75,37	72,78	3,00
Skewness	-0,21	1,92	0,66	1,65	0,56	-0,19	1,08	-1,50	1,51	0,00	0,88	-0,17	0,00
Kurtosis	-2,44	2,04	-1,96	2,53	-0,41	-1,49	-0,16	0,63	1,75	0,00	-0,16	1,15	0,00
Geom. mean	2,13	1,22	1,49	107,71	39,89	1,92	22,14	2,37	119,22	0,00	62,92	66,17	3,00

	CEXO	PEXO	GEXO	PR	PP	BRIX	ACID	PH	%EXO	%P	PS	NS
N	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
Min	1,00	46,27	4,28	1,60	15,26	13,03	2,74	4,47	0,45	0,17	2,66	11,00
Max	5,00	126,37	9,70	11,00	180,67	30,70	8,90	6,77	0,77	0,61	18,90	76,00
Sum	31,00	757,23	75,88	43,75	576,83	216,05	56,31	58,65	6,23	3,75	103,21	446,32
Mean	2,82	68,84	6,90	3,98	52,44	19,64	5,12	5,33	0,57	0,34	9,38	40,57
Std. error	0,48	7,79	0,53	0,86	14,42	1,65	0,59	0,21	0,03	0,04	1,67	7,30
Variance	2,56	668,09	3,13	8,05	2286,25	29,80	3,88	0,47	0,01	0,01	30,65	585,83
Stand. dev	1,60	25,85	1,77	2,84	47,81	5,46	1,97	0,69	0,09	0,12	5,54	24,20
Median	4,00	59,67	7,23	2,97	34,40	19,10	4,40	5,24	0,55	0,33	9,43	50,00
25 prcntil	1,00	49,80	5,47	2,03	24,90	15,92	3,42	4,67	0,50	0,27	3,77	13,40
75 prcntil	4,00	90,80	7,99	5,87	71,76	21,15	6,55	5,79	0,62	0,40	13,73	63,67
Skewness	-0,18	1,38	0,15	1,75	2,22	1,01	0,56	0,84	1,05	0,94	0,26	0,04
Kurtosis	-2,03	1,11	-1,04	3,12	5,51	0,67	-0,74	0,46	0,63	1,79	-1,21	-1,75
Geom. mean	2,32	65,19	6,69	3,31	39,89	19,01	4,79	5,29	0,56	0,32	7,72	32,81

Software PAST 2.17.

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA para las 11 accesiones de *A. squamosa*.

PC	VALORES PROPIOS (EIGENVALUE)	% VARIANZA	% VARIANZA ACUMULADA
1	7722,34	84,11	84,11
2	769,30	8,38	92,49
3	413,52	4,50	97,00
4	139,21	1,52	98,51
5	74,39	0,81	99,32
6	29,63	0,32	99,65
7	15,47	0,17	99,82
8	11,56	0,13	99,94
9	4,48	0,05	99,99
10	0,95	0,01	100,00

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Variables más informativas por componente principal, para las 11 accesiones de *A. squamosa*.

VARIABLES INFORMATIVAS									
CP1	**CP2**	**CP3**	**CP4**	**CP5**	**CP6**	**CP7**	**CP8**	**CP9**	**CP10**
AH			PEXO	BRIX	DECU		DPOL	FH	CEXO
BH			PP		%EXO		GEXO	ACID	PR
LH									PH
ANH									%P
PF									
1 PC (84,11%)									

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Valores de las variables cualitativas y cuantitativas de 11 accesiones de *A. squamosa*, por medio de el análisis de conglomerados (UPGMA).

VARIABLES	CONGLOMERADO (*Annona squamosa*)		
	A	**B**	**C**
FH	1 y 4	4	1
AH	1	1	1
BH	1 y 3	1	1
LH	105,91	115,54	87,28
ANH	40,45	41,25	36,85
HABF	2	1, 2 y 3	3
NF	19	30	15
FF	3	1, 2 y 3	3
PF	107,48	121,26	3,00
SIM	0	0	0
DPOL	59,83	62,61	86,89
DECU	62,72	66,45	87,35
TEXO	3	3	3
CEXO	2	3	4
PEXO	62,03	63,79	126,37
GEXO	7,62	6,30	7,58
PR	4,29	3,87	3,37
PP	31,49	45,03	180,67
BRIX	16,45	22,87	13,03
ACID	3,51	5,56	8,90
PH	5,12	5,49	5,24
%EXO	0,61	0,55	0,48
%P	0,27	0,34	0,61
PS	9,67	8,57	13,13

VARIABLES	CONGLOMERADO (*Annona squamosa*)		
	A	B	C
NS	43,60	36,99	50,00

Software PAST 2.17.

- Características generales de los grupos de accesiones de *A. squamosa*.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS (Accesiones de *Annona squamosa*)
A	Procedentes de Tolima y Atlántico (4 accesiones, equivalentes a 36,36%). Hojas ovadas o lanceoladas, de ápice y base de predominantemente agudos, hábito de fructificación medio, frutos cordiformes, de menor tamaño, menor acidez, y pH, menor porcentaje de pulpa.
B	Procedentes de Cundinamarca, Tolima y Valle del Cauca (6 accesiones, equivalentes al 54,55%). Hojas lanceoladas, de ápice y base agudos, y de mayor tamaño. Hábito de fructificación variable , frutos de mayor peso y tamaño promedio, mayor contenido de grados brix y pH, menor peso y número de semillas.
C	Procedente de Cundinamarca (1 accesión, equivalente al 9,09%). Hojas lanceoladas, de ápice y base agudos, y de menor tamaño. Hábito de fructificación superior, frutos cordiformes, de menor peso y mayor tamaño, mayor porcentaje de pulpa, mayor acidez, mayor peso y número de semillas.

- Estadística descriptiva de las 10 accesiones de *A. reticulata*.

	FH	*AH*	*BH*	*LH*	*ANH*	*HABF*	*NF*	*FF*	*PF*	*SIM*	*DPOL*	*DECU*
N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Min	1,00	1,00	1,00	124,73	34,75	1,00	4,00	1,00	104,90	0,00	64,24	68,96
Max	4,00	3,00	3,00	236,60	79,68	3,00	40,00	4,00	504,00	1,00	108,84	98,44
Sum	36,00	24,00	23,00	1711,97	504,07	17,00	192,00	24,00	2898,15	4,00	865,24	858,82
Mean	3,60	2,40	2,30	171,20	50,41	1,70	19,20	2,40	289,82	0,40	86,52	85,88
Std. error	0,31	0,31	0,30	10,29	4,68	0,21	3,89	0,34	39,89	0,16	4,99	2,70
Variance	0,93	0,93	0,90	1058,92	219,00	0,46	151,07	1,16	15914,20	0,27	249,48	72,72
Stand. dev	0,97	0,97	0,95	32,54	14,80	0,67	12,29	1,07	126,15	0,52	15,80	8,53
Median	4,00	3,00	3,00	167,08	46,35	2,00	18,50	3,00	268,98	0,00	85,27	84,89
25 prcntil	3,75	1,00	1,00	146,57	39,73	1,00	8,00	1,00	172,95	0,00	72,13	81,94
75 prcntil	4,00	3,00	3,00	190,86	60,11	2,00	28,25	3,00	394,62	1,00	102,94	92,22
Skewness	-2,66	-1,04	-0,74	0,61	1,12	0,43	0,46	-0,35	0,22	0,48	0,20	-0,34
Kurtosis	7,19	-1,22	-1,64	0,50	0,44	-0,28	-1,04	-1,27	-0,69	-2,28	-1,33	0,87
Geom. mean	3,38	2,16	2,07	168,50	48,67	1,58	15,34	2,13	262,63	0,00	85,23	85,49

	TEXO	CEXO	PEXO	GEXO	PR	PP	BRIX	ACID	PH	%EXO	%P	PS	NS
N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Min	1,00	2,00	53,96	3,06	4,20	42,20	8,45	3,52	4,21	0,15	0,26	0,80	12,00
Max	2,00	12,00	218,91	22,67	26,15	239,00	29,70	6,46	5,56	0,61	0,58	19,95	95,00
Sum	17,00	71,00	1204,28	73,70	145,51	1433,60	193,53	49,79	49,56	3,96	4,75	114,77	508,33
Mean	1,70	7,10	120,43	7,37	14,55	143,36	19,35	4,98	4,96	0,40	0,47	11,48	50,83
Std. error	0,15	1,19	16,35	1,82	2,57	23,46	2,16	0,32	0,15	0,04	0,03	1,88	8,97
Variance	0,23	14,10	2672,88	33,07	66,29	5502,86	46,52	1,06	0,24	0,02	0,01	35,44	803,82
Stand. dev	0,48	3,76	51,70	5,75	8,14	74,18	6,82	1,03	0,49	0,13	0,11	5,95	28,35
Median	2,00	6,00	120,42	5,04	14,52	123,08	20,32	5,04	5,11	0,39	0,49	12,33	54,17
25 prcntil	1,00	4,00	69,05	4,18	6,99	74,15	14,19	3,81	4,47	0,31	0,39	8,09	20,63
75 prcntil	2,00	11,00	157,11	8,45	21,83	224,13	24,03	5,97	5,36	0,50	0,57	15,48	70,38
Skewness	-1,04	0,19	0,42	2,47	0,04	0,16	-0,52	-0,03	-0,57	-0,13	-0,94	-0,71	0,06
Kurtosis	-1,22	-1,89	-0,11	6,74	-1,89	-1,74	-0,13	-1,16	-0,97	0,20	0,26	0,19	-1,15
Geom. mean	1,62	6,12	110,00	6,15	12,19	124,22	18,00	4,88	4,93	0,37	0,46	8,66	42,09

Software PAST 2.17.

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA para las 10 accesiones de *A. reticulata*.

PC	VALORES PROPIOS (EIGENVALUE)	% VARIANZA	% VARIANZA ACUMULADA
1	9,55	38,21	38,21
2	4,28	17,12	55,33
3	3,62	14,50	69,83
4	2,18	8,71	78,54
5	1,80	7,19	85,73
6	1,51	6,04	91,77
7	1,09	4,36	96,13
8	0,61	2,44	98,57
9	0,36	1,43	100,00

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Variables más informativas por componente principal, para las 10 accesiones de *A. reticulata*.

VARIABLES INFORMATIVAS									
CP1	**CP2**	**CP3**	**CP4**	**CP5**	**CP6**	**CP7**	**CP8**	**CP9**	**CP10**
AH	FH	ANH	FF	NF		%EXO			
LH	BH	HABF		%P					
PF	SIM	BRIX							
DPOL	GEXO	PH							
DECU									
TEXO									
CEXO									
PEXO									
PR									
PP									
ACID									
PS									
NS									
1 PC (38,21%)									

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Valores de las variables cualitativas y cuantitativas de 10 accesiones de *A. reticulata*, por medio de el análisis de conglomerados (UPGMA).

VARIABLES	CONGLOMERADO (*Annona reticulata*)		
	A	**B**	**C**
FH	4	4	4
AH	1	3	3
BH	3	3	1
LH	150,02	188,60	168,92
ANH	37,15	56,09	55,29
HABF	2	2	1
NF	29,00	17,75	15,00
FF	1, 3 y 4	1 y 3	2 y 3
PF	424,79	175,72	293,13
SIM	0	0	1
DPOL	104,83	76,84	79,96
DECU	94,25	79,05	87,65
TEXO	1	2	2
CEXO	11	6	4
PEXO	160,05	81,13	124,01
GEXO	10,16	5,76	5,83
PR	21,72	6,48	17,24
PP	228,91	81,78	136,92

VARIABLES	CONGLOMERADO (*Annona reticulata*)		
	A	B	C
BRIX	20,18	17,76	20,54
ACID	5,72	4,88	4,16
PH	5,36	4,77	4,87
%EXO	0,37	0,37	0,45
%P	0,55	0,45	0,44
PS	14,11	6,33	14,97
NS	71,17	22,79	65,17

Software PAST 2.17.

- Características generales de los grupos de accesiones de *A. reticulata*.

GRUPO	CARACTERÍSTICAS (Accesiones de *Annona reticulata*)
A	Procedentes de Tolima y Cundinamarca (4 accesiones, equivalentes al 36,36%). Hojas lanceoladas, de ápice agudo, base obtusa y de menor tamaño. Hábito de fructificación medio, frutos asimétricos y de forma variable. Mayor número de frutos, peso y tamaño de frutos, acidez, pH, porcentaje de pulpa y número de semillas.
B	Procedentes de Santander y Valle del Cauca (4 accesiones, equivalentes al 36,36%). Hojas lanceoladas, de ápice acuminado y base obtusa, y de mayor tamaño. Hábito de fructificación medio, frutos asimétricos y de forma variable, de menor peso y tamaño, pH, menor peso y número de semillas.
C	Procedentes de Santander y Valle del Cauca (3 accesiones, equivalentes al 27,27%). Hojas lanceoladas, de ápice acuminado y base aguda. Hábito de fructificación inferior, frutos simétricos y de forma variable, menor número de frutos, de tamaño y peso promedio, mayor contenido de grados brix, porcentaje de exocarpo y peso de semillas. Menor acidez y porcentaje de pulpa.

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA para las 10 accesiones de *A. squamosa* (análisis combinado).

PC	VALORES PROPIOS (EIGENVALUE)	% VARIANZA	% VARIANZA ACUMULADA
1	9,07	25,92	25,92
2	6,86	19,59	45,51
3	4,51	12,90	58,41
4	4,05	11,56	69,97
5	3,01	8,61	78,58
6	2,45	7,00	85,57
7	2,15	6,16	91,73
8	1,27	3,63	95,36
9	0,93	2,66	98,02
10	0,69	1,98	100,00

El análisis univariado denota a las variables SIM y TEXO como constantes, motivo por el cual son extraídas del análisis de componentes principales.

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Variables más informativas por componente principal, para las 10 accesiones de *A. squamosa* (análisis combinado).

VARIABLES INFORMATIVAS									
CP1	**CP2**	**CP3**	**CP4**	**CP5**	**CP6**	**CP7**	**CP8**	**CP9**	**CP10**
PF	FH	LH	%EXO	LMCH16	%P	AH	HABF	DECU	GEXO
DPOL	BH	ANH	PS	LMCH71	LMCH69	LMCH79		CEXO	PR
PEXO	NF	FF	NS						ACID
PP	BRIX	PH	LMCH1						
	LMCH29								
1 PC (25,92%)									

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el PCA para las 11 accesiones de *A. reticulata* (análisis combinado).

PC	VALORES PROPIOS (EIGENVALUE)	% VARIANZA	% VARIANZA ACUMULADA
1	11,71	30,03	30,03
2	9,62	24,66	54,70
3	4,94	12,66	67,36
4	3,57	9,16	76,51
5	3,16	8,11	84,62
6	2,29	5,88	90,50
7	1,69	4,34	94,83
8	1,12	2,87	97,70
9	0,90	2,30	100,00

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

- Variables más informativas por componente principal, para las 11 accesiones de *A. reticulata* (análisis combinado).

VARIABLES INFORMATIVAS								
CP1	**CP2**	**CP3**	**CP4**	**CP5**	**CP6**	**CP7**	**CP8**	**CP9**
AH	PEXO	LMCH1	PH	BH	FH	ANH	HABF	BRIX
PF	LMCH16	LMCH43	%P	SIM	LH	NF	DPOL	LMCH29
TEXO	LMCH69		LMCH79		GEXO	FF	DECU	
CEXO					LMCH71	ACID	PS	
PR						%EXO		
PP								
1 PC (30,03%)								

Software PAST 2.17. Corroborado con SAS 9.1.

Bibliografía

ADAMS, R. 1997. Conservation of DNA: DNA banking. Biotechnology and Plant Genetic Resources Conservation and Use. CAB International, Wallingford, Reino Unido. Pp. 163–174.

AGUILAR, Z. 2012. Caracterización morfológica y molecular de la colección de *Dioscorea spp*. del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 79p.

ALAVÉZ-LÓPEZ, M. *et al*. 2000. Horticultural characterization of cherimola tres *in situ*. Revista Chapingo, Serie Horticultura 6(2): 179-193.

ÁLVAREZ, J. *et al*. 2005. Variabilidad genética según RAPD de árboles de guayabo 'media china' procedentes de cuatro plantaciones y su respuesta morfológica a baja disponibilidad de nutrimentos. Revista Chapingo Serie Horticultura 11(2): 329-343.

ANDRADE, R. 2009. Caracterización morfoagronómica y molecular de la colección de chirimoya *Annona cherimola* Mill., en la Granja Experimental Tumbaco INIAP – Ecuador. Tesis de Pregrado. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Sangolquí, Ecuador. 99p.

ANDRADE-CETTO, A. y HEINRICH, M. 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. Journal of Ethnopharmacology 99, 325–348.

ANDRÉS-AGUSTÍN, J. *et al.* 2004. Variación morfológica de la hoja del chirimoyo. Revista Chapingo. Serie Horticultura 10(2): 103-110.

ANDRÉS-AGUSTÍN, J. *et al*. 2006. Morphometry of the organs of cherimoya (Annona cherimola Mill.) and analysis of fruit parameters for the characterization of cultivars, and Mexican germplasm selections. Scientia Horticulturae 107. 337–346.

ARAÚJO FILHO, G. *et al*. 1998. Instruções Técnicas para o cultivo da Ateira. Embrapa Agroindústria Tropical, v.1, p.1-9.

ARAÚJO, F. *et al*. 2002. Implantação do Banco Ativo de Germoplasma de Pinheira (*Annona squamosa* L.) na Região do Submédio São Francisco. En: CD ROM. Memorias, Congresso Brasileiro De Fruticultura., 17., Belém.

ARMOUR, A. *et al*. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. Human Molecular Genetics 3(4):599-605.

ASENSIO, L. 1988. Técnicas de análisis de datos multidimensionales. Bases teóricas y aplicaciones en agricultura. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Madrid. Madrid, España. 297p.

AUSUBEL, F. *et al*. 2003. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc. Purification of DNA by Anion-Exchange Chromatography. 2.1.16. Suplement 42. USA.

BALLESTEROS, G. *et al.* 2006. Diversidad de las Ilamas (*Annona diversifolia* Saff.) de la tierra caliente de Balsas, México. Proyecto SAGARPA-SINAREFI. Instituto Tecnológico de CD. Altamirano. Guerrero, México. 55p.

BENAVIDES, G. 2004. Caracterización numérica de germoplasma de guanábana (*Annona muricata* L.) muestreado *in situ* en el Pacífico y Norte de Nicaragua. Revista Científica de la Universidad Nacional Agraria 4: 29-35.

BIOVERSITY INTERNATIONAL y CHERLA. 2008. Descriptores para Cherimoyo (*Annona cherimoya* Mill.). Bioversity International, Roma, Italia. Proyecto CHERLA, Málaga, España. 51p.

BOTSTEIN, D. *et al*. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphisn. American Journal of Human Genetics, 32, 314-331.

BROPHYA, J.; GOLDSACKA, R. y FORSTERB, P. 2004. Essential Oils from the Leaves of Some Queensland Annonaceae. Journal of Essential Oil Research. 16 (2), 95-100.

BROWN, J.; LAURENTÍN, H. y DÁVILA, M. 2003. Genetic relationships between nine *Annona muricata* L. accessions using RAPD markers. Fruits, vol. 58, p. 255–259.

CAB INTERNATIONAL. 2001. Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants. Ed. R.J. Henry. London. 272p.

CAVALCANTE, I. *et al*. 2011. Seleção preliminar de genótipos de pinheira em Bom Jesus-Pi. Revista de Ciências Agrárias [online]. Vol.34, n.1, pp. 173-181.

CERESPAIN. 2011. Variedades de chirimoyas. En: http://www.cerespain.com/variedades_de_chirimoyas.html; consulta octubre de 2011.

CHATROU, L. 1999a. The Annonaceae and the Annonaceae project: a brief overview of the state of affairs. Acta Horticulturae. 497, 43-49.

CHATROU, L. 1999b. Breeding Strategies for atemoya and cherimoya. First International Symposium on Cherimoya. Acta Horticulturae 497.

CHATROU, L. *et al*. 2009. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. Molecular Phylogenetics and Evolution 53:726–733.

CHÁVEZ, J. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica, p 72-77. En: Franco, T. e Hidalgo, R. (eds.). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. 89p.

COLTMAN, D.; BOWEN, D. y WEITH, J. 1996. PCR primers for harbour seal (*Phoca vitulina* concolour) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. Molecular Ecology 5:161-163.

CORPORACIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y FOMENTO FORESTAL –CONIF. 1996. Recolección y procesamiento de semillas forestales. Programa de investigación en semillas de especies forestales nativas. Serie Técnica N° 34. Santafé de Bogotá. 60p.

DELLAPORTA, S.; WOOD, J. y HICKS, J. 1983. A plant minipreparation: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-20.

DÍAZ, B. *et al*. 2008. Obtención de ADN de cactáceas: comparación de dos métodos de extracción en *Ferocactus histrix*. p 123-129. En: Libro de resúmenes, XIX Semana Nacional de la Investigación Científica, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México.

DIERINGER, D. y SCHLÖTTERER, C. 2003. Microsatellite analyser (MSA): A platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. Molecular Ecology Notes. 3, 167-169.

DOYLE, J. y LE THOMAS, H. 1997 Phylogeny and geographic history of Annonaceae.Ge´ogr. Phys. Quatern. 51, 353–361.

DOYLE, J. y DOYLE, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15. Download pdf (from Doyle lab). En: http://irc.igd.cornell.edu/Protocols.html; consultado en marzo de 2011.

DOYLE, J. y DOYLE. J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

EGUIARTE, L.; SOUZA, V. y AGUIRRE, X. 2007. Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 571p.

ENGELS, J. y VISSER, L. (eds.). 2007. Guía para el manejo eficaz de un banco de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 6. Bioversity International, Roma. 190p.

ENCINA, C. *et al*. 1994. In Vitro morphogenesis of juvenile *Annona cherimola* Mill., bud explants. Hort. Science 69: 1053-1059.

ESCRÍBANO, P.; VIRUEL, M. y HORMANZA, J. 2004. Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae). Molecular Ecology Notes. 4, 746–748.

ESCRIBANO, P; VIRUEL, M. y HORMAZA, J. 2008a. Development of 52 new polymorphic SSR markers from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): transferability to

related taxa and selection of a reduced set for DNA fingerprinting and diversity studies. Molecular Ecology Resources. 8, 317–321.

ESCRIBANO, P.; VIRUEL, M. y HORMAZA, J. 2008b. Comparison of different methods to construct a core germplasm collection in woody perennial species with SSR markers. A case study in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae), an underutilized subtropical fruit tree species. Ann Appl Biol. 153, 25–32.

ESPAÑA. MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2002, 27 de noviembre). "Orden APA/3120/2002", por la que se ratifica el Reglamento de la denominación de origen protegida «Chirimoya de la Costa Tropical de Granada-Málaga». [En línea] "disponible en": http://legislacion.derecho.com/orden-27-noviembre-2002-ministerio-de-agricultura-pesca-y-alimentacion-56052

EVANNO, G., REGNAUT, S. y GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology 14: 2611-2620.

FANG, G.; HAMMAR, S. y GRUMET, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques, 13(1):52-4, 56.

FAO e IPGRI. 1994. Normas para Bancos de Genes. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma; Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma. 14p.

FAO. 1992. Cultivos Marginados. Otras perspectiva desde 1492. Colección FAO: Producción y protección vegetal, N° 26. Roma. Capítulo II: La Agricultura en Mesoamérica. En: http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/home9.htm; consulta marzo de 2013.

FAO, 2012. Visión del proyecto de normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. En: http://typo3.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/PGR/ITWG/ITWG6/working_docs/spanish/CGRFA_WG_PGR_6_12_4_es.pdf; consulta en marzo de 2013.

FAO, 2013. AGP - Conservación de los Recursos Fitogenéticos. Conservación de los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura. En: http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/seeds-pgr/conservation/es/; consulta en febrero de 2013.

FERREIRA, F. 2001. "Conservação de germoplasma de espécies frutíferas no campo". [Portuguese] en: III SIRGEALC – Simposio de Recursos Genéticos para América Latina e Carib. Londrina, IAPAR. Pp38-40.

FRANCO, T. e HIDALGO, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. 89p.

GENTRY, A. 1993. A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of North west South America (Colombia, Ecuador, Peru). University Of Chicago Press. Estados Unidos. 895p.

GEORGE, A. y NISSEN, R. 1987. Propagation of *Annona* species: A review. Sci. Hort. 33, 75-85.

GEORGE, A. *et al*. 1999. Breeding strategies for atemoya and cherimoya. First International Symposium on Cherimoya. Acta Horticulturae 497.

GEORGE, E. 1993. Plant propagation by tissue culture: part I-the technology. 2ed. Edington. Exegetics limited. 574p.

GUERRERO, E. y FISCHER, G. 2007. Manejo integrado en el cultivo de anón (*Annona squamosa* L.). Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas - Vol. 2, No.1 - pp. 154-169.

GODOY, J. y JORDANO, P. 2001. Seed dispersal by animals: exact identification of source trees with endocarp DNA microsatellites. Mol Ecol Notes 10: 2275–2283.

GOLSTEIN D. y POLLOK D. 1994. Least-squares estimation of molecular distance − noise abatement in phylogenetic reconstruction. Theoretical Applied Genetics 12:432-440.

GOLSTEIN D. *et al*. 1996. Stadistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. Molecular Biology and Evolution 13:1213-1218.

GOTTSBERGER, G. 1999. Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. Plan Species Biology. 14, 43-152.

GOWER, J. 1971. A general coefficient of similarity and some of its properties. Biometrics, Washington, V.27, N.4, p.857-871.

GUPTA, M. *et al*. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical. Applied Genetics 89:998-1006.

HAMMER, Ø y D. HARPER. 2006. Paleontological Data Analysis. – Blackwell Publishing, Oxford. 351pp.

HILJE, R. 2008. Diversidad genética del árbol *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal (Annonaceae) utilizando microsatélites como marcadores moleculares. Universidad de Costa Rica. Facultad de Ciencias Escuela de Biología. Costa Rica, 80p.

HORMANZA, J. *et al.* 2007. Molecular analysis of genetic diversity and geographic origin within an *ex situ* germplasm collection of cherimoya by using SSRS. Journal of the American Society for Horticultural Science. 132(3):357–367.

HOYOS, J. 1989. Frutales en Venezuela. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Monografía 36, pp. 35–48.

INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES – IDEAM. 2011. En: Mapas Clima. Indicadores climatológicos, http://institucional.ideam.gov.co/jsp/mapas-y-graficos-del-tiempo-y-el-clima_882; consulta febrero de 2013.

IPGRI. 2000. Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera edición. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Roma. 361p.

IPGRI y CORNELL UNIVERSITY. 2004. Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas. Módulos de aprendizaje sobre marcadores moleculares. Volumen 1 y Volumen 2. En: http://www.bioversityinternational.org/nc/publications/publication/issue/modulos_de_aprendizaje_sobre_marcadores_moleculares_vol_1_y_2.html; consulta en noviembre de 2010.

JOBES, D.; HURLEY, D. y THIEN, L. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA. Taxon 44: 349-386.

JORDÁN, M. 1988. Multiple shoot formation and rhizogenesis from cherimola (*Annona cherimola* L.) hypocotyls and petiole explants. En: Gartenbauwissen-schaft. 53:234-237.

JORDÁN, M.; ITURRAGA, L. y GOREUX, A. 1991. Promotion on *Annona cherimola in vitro* shoot morphogenesis as influenced by antioxidants. En: Gartenbauwissen-schaft. 53:224-227.

JUDÉZ, L. 1989. Técnicas de anáisis de datos mutildimensionales. Bases teóricas y aplicaciones en agricultura. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Secretaría General Técnica, Madrid, 301p.

KESSLER, P. 1993. Annonaceae. The families and genera of vascular plants 2:93-129.

KHANLOU, K. *et al.* 2011. Towards an optimal sampling strategy for assessing genetic variation within and among white clover (*Trifolium repens* L.) cultivars using AFLP. Genet Mol Biol. 34(2):252-8.

KWAPATA, K. *et al.* 2007. Genetic diversity of *Annona senegalensis* Pers. populations as revealed by simple sequence repeats (SSRs). African Journal of Biotechnology. Vol. 6 (10), pp. 1239-1247.

LIGARRETO, G. 2003. Caracterización del germoplasma, p 77-84. En: Franco, T.L. e Hidalgo, R. (eds.). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín Técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. 89p.

LITZ., R.E. 2005. (ed) *Annona* spp., Atemoya, Chirimoya. Soursoup and Sugar Apple. En: Biotechnology of fruits and Nutscrops. Biotechnology in Agriculture Series. No. 29. CABI Publishing. Wallingford, Oxfordshire. England. 707p.

LOBO, M. 2006. Recursos genéticos y mejoramiento de frutales andinos: una visión conceptual. Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 7(2), 40-54.

LOBO, M. *et al.* 2007. Categorización de la germinación y la latencia en semillas de chirimoya (*Annona cherimola* L.) y guanábana (*Annona muricata* L.), como apoyo a programas de conservación de germoplasma. Agronomía Colombiana 25(2):231-244.

LORA, J. *et al*. 2011. Seedless fruits and the disruption of a conserved genetic pathway in angiosperm ovule development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the Unite States of America - PNAS. 108 (13), 5461–5465.

LOZANO, S. *et al.* 2003. Producción y calidad frutícola de guanábanos (*Annona muricata* L.) provenientes de semilla de Jiutepec, Morelos, México. Revista Chapingo. Serie Horticultura 9(1): 69-79.

MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res.27: 209-220.

MÁRQUEZ, C. 2009. Caracterización fisiológica, físico-química, reológica, nutraceútica, estructural y sensorial de la guanábana (*Annona muricata* L. cv. Elita). Doctor en Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Medellín, Colombia. 252p.

MARTÍNEZ, W. 2007. Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Magister Scientiae. Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 70p.

MARTÍNEZ, F. 2012. Caracterización morfoanatómica de semillas de anón (*Annona squamosa* L.) y evaluación de algunos parámetros fisiológicos del proceso de germinación y latencia. Tesis de maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

MEJÍA, J. *et al*. 2002. Caracterización molecular y agromorfológica de la variabilidad genética nativa de guanábana (*Annona muricata*) y especies Anonáceas relacionadas: Informe técnico final. Corporación BIOTEC; Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Cali, CO. 102p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL DE COLOMBIA -MADR. 1995. Informe nacional para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos. Bogotá, 94p.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL DE COLOMBIA- MADR. 2005. La cadena de los frutales de exportación en Colombia. Observatorio Agrocadenas de Colombia. Documento de trabajo No. 67.

MORALES, A.; CUEVAS, B. y AQUINO, S. 2004. Genetic diversity and geographic distribution of *Annona cherimola* in Southern Ecuador. Lyonia, Volume 7 (2): 159-170.

MURILLO, J. y RESTREPO, D. 2000. Las anonáceas de la región de Araracuara Estudios en la Amazonia Colombiana XX Tropenbos-Colombia. Bogotá. 218p.

MURILLO. J. 2001. Las Annonaceae de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C., Colombia. En: Biota Colombiana 2 (1) 49 – 58.

NAGATA, T.; LÖRZ, H. y WIDHOLM, J. 2004. Molecular marker systems in plant breeding and crop development. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer. Berlin, 473p.

NAGORI, R. y DUTTA, S. 2012. An improved method for DNA isolation from polyphenols rich leaf samples of *Annona squamosa* L. J. Plant Biochem. Biotechnol. 21(1), 140–143.

NARVÁEZ-TRUJILLO, A. *et al*. 2007. Tracing the genetic base of cherimoya (*Annona cherimola*) commercial cultivars through AFLP analysis of diversity at the species' putative center of origin. Biotechnol. Temp. Fruit Crops & Trop. Species. Acta Hort. 738.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70:3321–3323.

OTHA, T. y KIMURA, M. 1973. The model of mutation appropriate to stimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. Genetic Research 22: 201-204.

OWENS, K. 2003. Genetic diversity of *Annona cherimola* Mill in South Central Bolivia. Master of Science In Forestry. Michigan Technological University. Michigan, Estados Unidos. 109p.

PADILLA, I. y ENCINA, C. 2004. Micropropagation of adult cherimoya (*Annona cherimola* Mill) CV. Fino de Jete. En: In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. 40: 210–214.

PAINTING, K. *et al.* 1993. Guía para la documentación de recursos genéticos: Un enfoque autodidáctico para la comprensión, análisis y desarrollo de la documentación de los recursos genéticos. IBPGR, Roma. 305p.

PALLAZO, M. *et al*. 2009. Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of six species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. Rec. Nat. Prod. 3(3), 153-160.

PEAKALL, R. y SMOUSE, P. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes. 6, 288-295.

PERFECTTI, F. y PASCUAL, L. 2005. Genetic diversity in a worldwide collection of cherimoya cultivars. Genetic Resources and Crop Evolution. 52: 959–966.

PERRIER, X.; FLORI, A. y BONNOT, F. 2003. Data analysis methods. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier. p 43 - 76.

PIERPOINT, W. 2004. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. Meth. Mol. Biol. 244: 65-74.

PINTO, A. *et al*. 2005. *Annona* species. International Centre of Underutilised Crops. University of Southampton. Southampton, UK. 247p.

PIRIE, M. *et al*. 2006. Andeancentred' genera in the short-branch clade of Annonaceae: testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction and molecular dating. Journal of Biogeography. 33, 31–46.

PIRIE, M. *et al*. 2007. Ancient paralogy in the $_{CP}$DNA $_{TRN}$L-F region in Annonaceae: implications for plant molecular systematic. American Journal of Botany 94(6): 1003–1016.

PORRAS-HURTADO, L. *et al*. 2013. An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. Front Genet. 4: 98.

PRITCHARD, J.; STEPHENS, M. y DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155, 945-959.

QIAGEN. 2006. DNeasy® Plant Handbook. 07. Qiagen. 55p.

QUEESLAND HORTICULTURE INSTITUTE. 1999. Custard Apple information kit. Series: Agrilink you growing guide to better farming. Department of Primary Industries, Queesland. 217p.

RAHMAN, M.; YAMADA, M. y YOSHIDA, M. 1997. Relationship of *Annona* speciesas revelated by PCR-RFLP analysis. Breeding Science 47: 335-339.

RAHMAN, M. *et al*. 1998. Genetic diversity of cherimoya cultivars revelated by amplified fragment lenght polymorphism (AFLP) analysis. Breeding Science 48: 5-10.

RAMÍREZ, R. *et al*. 2011. Composición química y actividad larvicida del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.). Rev Fac Farm. 53 (2): 2-6.

RAO, N. *et al.* 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma. 164p.

RASCOE, D. *et al.* 2004. Assessment of the utility of ISSR Markers for evaluating genetic relationships among members of *Asimina* and *Annona*. 101st Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. HortScience, Vol 39 (4).

RICHARDSON, J. *et al*. 2004. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 359: 1495-1508.

RODRÍGUEZ-MEDINA, N. *et al*. 2003. Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de cultivares de aguacatero (*Persea americana* Mill.) en Cuba. pp. 47-53. En: Proceedings V World Avocado Congress (Actas V Congreso Mundial del Aguacate). Granada-Málaga, España. [En línea] "disponible en": http://www.avocadosource.com/WAC5/WAC5_TOC.htm

ROUSSET, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Mol. Ecol. Resources 8: 103-106.

ROUT, G. *et al*. 2002. An Alternative Method of Plant DNA Extraction of Cashew (*Anacardium occidentale* L.) for Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. Gartenbauwissenschaft, 67 (3): 114 – 118.

SAITOU, N. y NEI, M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4 (4): 406-425.

SALAZAR, C.; VARGAS-MENDOZA, C. y FLORES J. 2010. Estructura y diversidad genética de *Annona squamosa* L en huertos familiares mayas de la Península de Yucatán. Revista Mexicana de Biodiversidad 81: 759 – 770.

SALDAÑA, G. y SALAZAR, E. 2007. Aislamiento de adn de calidad para la amplificación al azar de ADN polimórfico de mango. Agronomía Tropical. 57(4): 281-286.

SAMBROOK, J. y RUSSELL, D. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratories. Nueva York, USA. 2344 p.

SHARMA, K. *et al.* 2008. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (8), pp. 1018-1022.

SCHELDEMAN, X y VAN ZONNEVELD, M. 2010. Training Manual on Spatial Analysis of Plant Diversity and Distribution. Bioversity International, Rome, Italy. 167p.

SCHELDEMAN, X. 2002. Distribution and potential of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and Highland papayas (*Vasconcellea spp*.) in Ecuador. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences. Department Plant Production. Laboratory of Tropical and Subtropical Agronomy and Ethnobotany. Belgium. 159p.

SIEGFRIED, K. *et al*. 1999. Members of the YABBY gene family specify abaxial cell fate in Arabidopsis. Development 126:4117–4128.

SOLANO, J. *et al*. 2012. Análisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa (*Solanum tuberosum* L.). Rev. Fitotec. Mex. Vol. 35 (4): 267-277.

SOUZA, D. *et al*. 2010. Identification of hybrids of intra and interspecific crosses in Annonaceae by RAPD markers. Crop Breeding and Applied Biotechnology. 10: 110-115.

SUZUKI, J-I,; HERBEN, T. y MAKI, M. 2004. An under-appreciated difficulty: sampling of plant populations for analysis using molecular markers. Evolutionary Ecology. 18: 625–646.

TACÁN, M. 2007. Caracterización agromorfológica e identificación de zonas potenciales de conservación y producción de guanábana (*Annona muricata*) y chirimoya (*Annona cherimola*) en fincas de agricultores y condiciones *ex situ* en Costa Rica. Magister Scientiae en Manejo y Conservación de Bosques Tropicales y Biodiversidad. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 72p.

TAPIA, P. y LEGARIA S. 2007. Variabilidad genética en cultivares de guayabo (*Psidium guajava* L.). Revista Fitotecnia Mexicana. Vol 30 (4): 391-401.

TAZZARI, L. *et al*. 1990. Propagation techniques for *Annona cherimola* Mill. En: Acta Horticulturae, 275:315-221.

THOMPSON, J. 1999. Specific Hypotheses on the Geographic Mosaic of Coevolution. The American Naturalist. 153, pp. S1–S14.

TRILLOS, G. *et al.* 2008. Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva (*Physalis peruviana* L.), en Antioquia (Colombia). Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 708-715.

TURREL, F. 1946. Tables of surfaces and volumes of spheres and of prolates and oblates spheroides and spheroidal coefficients. Berkeley. Univer. Calif. Press.

VEGA-VELA, N. y CHACÓN-SÁNCHEZ, M. 2011. Isolation of high-quality DNA in 16 aromatic and medicinal Colombian species using silica-based extraction columns. Agronomía Colombiana. 29:3, 349-357.

VENDRAMIN, G. *et al*. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. Molecular Ecology 5:595-598.

VILLANUEVA, J. *et al*. 1999. INNER NO OUTER regulates abaxial-adaxial patterning in Arabidopsis ovules. Genes Dev 13:3160–3169.

WAPLES, R. y GAGGIOTTI, O. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. Molecular Ecology 15, 1419–1439.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL. 590p.

WRIGHT, J. 1995. Conservación genética *ex situ* de especies arbóreas autóctonas de Colombia. (en línea). Revista FAO - Recursos Genéticos Forestales. N° 22, http://www.fao.org/docrep/006/v3965s/V3965S06.htm; consulta marzo de 2013.

ZAVALA, F. *et al.* 2009. Caracterización isoenzimática de seis poblaciones de *Annona cherimola* Mill. de la Región La Libertad, Perú. Revista Peruana de Biología. 16(2): 195-201.