

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUCACIÓN:

**Análisis de variabilidad genética mediante marcadores universales en cultivos de
Indigofera suffruticosa (Fabaceae) en El Salvador.**

PRESENTADO POR:

MILAGRO DOLORES REYES ROMERO.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA.

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUCACIÓN:

**Análisis de variabilidad genética mediante marcadores universales en cultivos de
Indigofera suffruticosa (Fabaceae) en El Salvador.**

PRESENTADO POR:

MILAGRO DOLORES REYES ROMERO.

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA.

ASESOR:

M.Sc. MIGUEL ÁNGEL MORENO MENDOZA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2023

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN TITULADO:

Análisis de variabilidad genética mediante marcadores universales en cultivos de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae) en El Salvador.

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TRIBUNAL EVALUADOR

Lic. JOSÉ ELÍAS RUMALDO CHINCHILLA

M. Sc. JOSÉ YADER SAGETH RUÍZ CRUZ

M.Sc. MIGUEL ÁNGEL MORENO MENDOZA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SANSALVADOR, FEBRERO DE 2023

**AUTORIDADES UNIVERSITARIAS
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

RECTOR:

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS

VICERRECTOR ACADÉMICO:

DOCTOR RAUL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO:

INGENIERO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL:

LICENCIADO FRANCISCO ALARCÓN

FISCAL:

LICENCIADO RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARÍN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

LIC. ERNESTO AMÉRICO HIDALGO CASTELLANOS

VICEDECANO:

M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA

SECRETARIO

LIC. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOZA

DIRECTORA INTERINA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA:

LICDA. MILAGRO ELIZABETH SALINAS DELGADO

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2023.

DEDICATORIA

A Dios y a la Sagrada Familia.

A mi abuelita María de la Cruz.

A mi mamá Milagro del Carmen.

A mi papá Félix Octavio.

A mis hermanos Tania del Carmen, Delmys Octavia, Oscar Arnulfo y María del Carmen.

A mis sobrinos Ángel Gabriel, Fátima Aleyda, Diego José, Félix Francisco y Nachito.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, Jesús, nuestra Madre y San José, por cuidar de los deseos de mi corazón.

A mis padres por guiarme en el camino del conocimiento y apoyarme con mucha paciencia.

A mis hermanos, sobrinos, cuñados y de manera especial a mis amigas Blanca Barahona, Iris Rivera, Reina Serrano que siempre me tienden su mano cuando lo necesito.

A la M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura, por haber creído en mi proyecto y aceptado ser mi asesora, por encaminarme en el área de mi interés, además de ser un ejemplo de profesional integral y para quien pido que brille siempre la luz perpetua.

Al M.Sc. Miguel Ángel Moreno Mendoza, por aceptar ser mi asesor, por su paciencia y comprensión guiándome en el proceso de mi investigación, a quien expreso profundo respeto y admiración por su calidad humana, su gran capacidad para hacer investigación científica y por creer en sus estudiantes.

A mis compañeros de Laboratorio de Biología Molecular: Romero, Roberto, Ligia, Leonel y Jonathan por coincidir en el reto de hacer tesis y brindarme su apoyo en mis momentos de dudas y dificultades.

Al personal Académico de la Facultad Multidisciplinaria Oriental de la Sección de Biología y de la Escuela de Biología del Departamento de Ciencias Naturales y Matemática, Sede Central, por haber contribuido en mi formación académica.

Al jurado: Lic. José Elías Rumaldo Chinchilla y M. Sc. José Yader Sageth Ruíz Cruz, por ser parte de este proceso y tomarse el tiempo de leer este trabajo.

A los agricultores que con mucha amabilidad me brindaron las muestras de tejido vegetal para llevar a cabo dicha investigación.

Al personal de limpieza de la Escuela de Biología contribuyendo con el mantenimiento de la institución y sus instalaciones.

A la “música” por ser mi fortaleza, refugio e inspiración.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE TABLAS..... | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | iv |
| | |
| ÍNDICE DE GRÁFICOS..... | v |
| ABREVIATURAS..... | vi |
| GLOSARIO..... | viii |
| RRESUMEN..... | 1 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2. OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1. OBJETIVO GENERAL..... | 3 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | 3 |
| 3. MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| 3.1. ANTECEDENTES..... | 4 |
| 3.1.1. <i>Estudios similares mediante técnicas moleculares.....</i> | <i>4</i> |
| CHAUHAN ET AL. (2013), USARON LA REGIÓN RIBOSOMAL NUCLEAR ITS PARA INFERIR LAS RELACIONES DE INDIAN <i>INDIGOFERA</i> . ELLOS REALIZARON ANÁLISIS DE PARSIMONIA Y BAYESIANOS DE LOS DATOS ITS REVELARON QUE EL GÉNERO <i>INDIGOFERA</i> ES MONOFILÉTICO. CONCLUYENDO QUE LA DIVERGENCIA Y LA RÁPIDA ESPECIACIÓN HACEN QUE LAS REGIONES ITS SEAN SIMILARES. EL FOLIOLLO PINNADAMENTE COMPUESTO ES UN RASGO NO HOMÓLOGO Y HA EVOLUCIONADO VARIAS VECES DE FORMA INDEPENDIENTE. | 5 |
| 3.2. FUNDAMENTO TEÓRICO..... | 6 |
| 3.2.1. <i>Aspectos generales sobre Indigofera suffruticosa.....</i> | <i>6</i> |
| 3.2.2. <i>Orígenes del añil.....</i> | <i>7</i> |
| 3.2.3. <i>Origen y distribución.....</i> | <i>9</i> |
| 3.2.4. <i>Características del suelo y clima para la siembra de I. suffruticosa.....</i> | <i>10</i> |
| 3.2.5. <i>Beneficios e importancia del cultivo de añil.....</i> | <i>10</i> |
| 3.2.6. <i>Composición química del índigo.....</i> | <i>10</i> |
| 3.3. GENÉTICA DE POBLACIONES..... | 12 |
| 3.3.1. <i>El flujo génico (migración).....</i> | <i>12</i> |
| 3.3.2. <i>Deriva genética.....</i> | <i>13</i> |
| 3.3.3. <i>Mutación.....</i> | <i>13</i> |
| 3.3.4. <i>Selección natural.....</i> | <i>14</i> |
| 3.4. TÉCNICA MOLECULAR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)..... | 14 |
| 3.5. MARCADORES MOLECULARES..... | 15 |
| 3.6. CODIGO DE BARRAS GENÉTICO..... | 16 |
| 4. METODOLOGÍA..... | 18 |
| 4.1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO..... | 18 |
| 4.2. FASE DE CAMPO..... | 19 |
| 4.2.1. <i>Recolecta de muestras.....</i> | <i>19</i> |
| 4.3. FASE DE LABORATORIO..... | 20 |
| 4.3.1. <i>Macerado de las hojas.....</i> | <i>20</i> |
| 4.3.2. <i>Aislamiento de ADN genómico.....</i> | <i>20</i> |
| 4.3.3. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la región ITS2.....</i> | <i>21</i> |
| 4.3.4. <i>Visualización del producto PCR.....</i> | <i>22</i> |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.3.5. | <i>Secuenciación</i> | 22 |
| 5. | ANÁLISIS DE DATOS | 24 |
| 5.1. | EDICIÓN DE SECUENCIAS..... | 24 |
| 5.2. | ALINEAMIENTO | 24 |
| 5.3. | METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO | 24 |
| 5.4. | ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA. | 25 |
| 5.4.1. | <i>Análisis haplotípico</i> | 25 |
| 5.4.2. | <i>Análisis de varianza molecular (AMOVA)</i> | 25 |
| 5.4.3. | <i>Estimación del índice de fijación por pares de población (F_{ST})</i> | 26 |
| 6. | RESULTADOS | 27 |
| 6.1. | OBTENCIÓN DE LAS COLECCIONES DE TEJIDO FOLIAR Y ADN. | 27 |
| 6.2. | AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN ITS2 | 28 |
| 6.3. | PROCESO DE SECUENCIACIÓN..... | 28 |
| 6.4. | ANÁLISIS FILOGENÉTICO | 29 |
| 6.5. | DIVERSIDAD GENÉTICA..... | 31 |
| 6.5.1. | <i>Análisis de Diversidad Haplotípica</i> | 31 |
| 6.5.2. | <i>Diferenciación genética entre poblaciones</i> | 31 |
| 6.5.3. | <i>Análisis de Haplotipos</i> | 33 |
| 6.5.4. | <i>Diseño y resultados de AMOVA</i> | 34 |
| 6.5.5. | <i>Estimación del índice de fijación por pares de población (F_{ST})</i> | 35 |
| 7. | DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 36 |
| 8. | CONCLUSIÓN | 39 |
| 9. | RECOMENDACIONES | 40 |
| 10. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |
| 11. | ANEXOS | 46 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| TABLA 1. DESCRIPCIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES QUE SE UTILIZAN PARA ESTUDIOS GENÉTICOS..... | 15 |
| TABLA 2. "PRIMER" COMÚNMENTE USADO PARA CÓDIGO DE BARRAS DE ADN EN PLANTAS, QUE SIRVE PARA EL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN <i>I. SUFFRUTICOSA</i> | 22 |
| TABLA 3. PROCEDENCIA, COLECCIÓN DE INDIVIDUOS Y CANTIDAD DE MUESTRAS FAVORABLES PARA PCR. | 27 |
| TABLA 4. DIVERSIDAD GENÉTICA POR LOCALIDAD DE <i>I. SUFFRUTICOSA</i> , BASADA EN UN SEGMENTO DE 315 PB DE LA REGIÓN RIBONUCLEAR ITS2. LAS ABREVIATURAS SON: TAMAÑO DE LA MUESTRA (N), NÚMERO DE HAPLOTIPOS (HN), DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA (Hd), NÚMERO PROMEDIO DE LAS DIFERENCIAS NUCLEOTÍDICAS POR HAPLOTIPO (K), DIVERSIDAD NUCLEOTÍDICA (π)..... | 31 |
| TABLA 5. DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE <i>I. SUFFRUTICOSA</i> , BASADA EN LOS 315 PB DE LA REGIÓN RIBONUCLEAR ITS2. REPRESENTADA EN LOS SIGUIENTES PARÁMETROS: PROMEDIO PONDERADO DE LA DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA DE LAS SUBPOBLACIONES (HST), PROMEDIO PONDERADO DE K1 Y K2 (KST), DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES (GST) Y COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA (FST). 32 | |
| TABLA 6. ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA) DE 47 SECUENCIAS DE <i>I. SUFFRUTICOSA</i> DE CINCO SITIOS DE CULTIVO, MEDIANTE LOS PROGRAMA RSTUDIO ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER AND LISCHER 2015)..... | 35 |
| TABLA 7. MÉTODO DE DISTANCIA: DIFERENCIA POR PARES DE LAS 5 POBLACIONES UTILIZANDO LOS PROGRAMAS RSTUDIO® Y ARLEQUIN 3.5, PARA DETERMINAR EL ÍNDICE DE FIJACIÓN (F_{ST}). SOBRE LA DIAGONAL VALORES DE P Y BAJO LA DIAGONAL VALORES F_{ST} , CB: CASA BLANCA, CPB: COOPERATIVA PINARES DE BERLÍN, CSF: CANTÓN SAN FRANCISCO, HN-A: HACIENDA LOS NACIMIENTOS AGUILARES, JB: JARDÍN BOTÁNICO. *: VALORES DE $P < 0.05$ | 35 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. HOJA, FLOR Y FRUTO DE <i>I. SUFFRUTICOSA</i> . (FOTO TOMADA DE MISSOURI BOTANICAL GARDEN 2019)..... | 6 |
| FIGURA 2. PRINCIPALES ESPECIES DEL GÉNERO <i>INDIGOFERA</i> PARA EXTRACCIÓN DEL COLORANTE. (1) <i>I. TINCTORIA</i> L. (2) <i>I. ARRECTA</i> HOSCHST. (3) <i>I. SUFFRUTICOSA</i> MILL SBSP. SUFFRUTICOSA (4) <i>I. ARGÉNTEA</i> L. (5) <i>I. GUATEMALENSIS</i> MOC. | 8 |
| FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN MUNDIAL DE <i>I. SUFFRUTICOSA</i> , CUYA PREDOMINANCIA SE UBICA EN LA FRANJA NEOTROPICAL. | 9 |
| FIGURA 4. DIAGRAMA QUE MUESTRA EL CAMBIO QUÍMICO DEL ÍNDIGO DEL MATERIAL VEGETAL. | 11 |
| FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LOS ESPACIADORES INTERNOS TRANSCRITOS (ITS) EN EL ADN RIBONUCLEAR (NRADN) PRESENTES EN EUCARIOTAS. | 17 |
| FIGURA 6. UBICACIÓN DE LAS DIFERENTES ÁREAS DE MUESTREO, DISTRIBUIDAS EN LAS DIFERENTES ZONAS DEL PAÍS, DESTACANDO LOS PUNTOS DE MUESTREO EN EL MUNICIPIO CORRESPONDIENTE (QGIS 3.24). | 18 |
| FIGURA 7. SÍNTESIS DE LAS PRINCIPALES ETAPAS DE LA METODOLOGÍA PARA EL PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DEL TEJIDO VEGETAL, EXTRACCIÓN, VISUALIZACIÓN, PCR Y SECUENCIACIÓN USADOS EN LOS DIFERENTES ANÁLISIS. | 23 |
| FIGURA 8. VISUALIZACIÓN DE 8 BANDAS DE ADN CORRIDAS EN GEL DE AGAROSA AL 1% (P/V), PERTENECIENTES AL GRUPO POBLACIONAL CANTÓN SAN FRANCISCO. FOTO OBTENIDA CON EL SISTEMA DE DOCUMENTACIÓN DE GELES DNR MINIBIS PRO®. | 27 |
| FIGURA 9A Y 9B. BANDAS EN GELES DE AGAROSA AL 2% (P/V) DEL PRODUCTO PCR. FOTOS OBTENIDAS MEDIANTE EL SISTEMA DE DOCUMENTACIÓN DE GELES DNR MINIBIS PRO®. 9.A MUESTRAS DEL JARDÍN BOTÁNICO Y 9.B MUESTRAS DE COOPERATIVA PINARES DE BERLÍN..... | 28 |
| FIGURA 10. RED DE HAPLOTIPOS CON SECUENCIAS DE <i>I. SUFFRUTICOSA</i> DE SEIS SITIOS DE CULTIVO DISTRIBUIDOS EN LAS TRES ZONAS DEL PAÍS, CONSTRUIDA EN POPART 1.7 CON LA RED DE UNIÓN MEDIANA USANDO UN SEGMENTO DE 315 PB DE LA REGIÓN RIBONUCLEAR ITS2, CADA CIRCULO REPRESENTA UN HAPLOTIPO, CADA COLOR UNA LOCALIDAD Y LAS LÍNEAS REPRESENTAN LOS PASOS MUTACIONALES. | 33 |
| FIGURA 11. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE HAPLOTIPOS EN LOS SITIOS DE CULTIVOS, CONSTRUIDA EN POPART 1.7 EN VISTA DE MAPA USANDO UN SEGMENTO DE 315 PB DE LA REGIÓN RIBONUCLEAR ITS2..... | 34 |

ÍNDICE DE GRÁFICAS

| | |
|---|----|
| GRÁFICA 1. RESULTADO GRÁFICO DE SECUENCIACIÓN POR ELECTROFORESIS CAPILAR, DE MUESTRA 1 CORRESPONDIENTE A CASA BLANCA, DESARROLLADA POR APPLIED BIOSYSTEMS MODELO "3730XL" GENERADO MEDIANTE EL SOFTWARE SNAPGENE®5.3.2..... | 29 |
| GRÁFICA 2. RESULTADO GRÁFICO DE SECUENCIACIÓN POR ELECTROFORESIS CAPILAR, DE MUESTRA 2 CORRESPONDIENTE A CASA BLANCA, DESARROLLADA POR APPLIED BIOSYSTEMS MODELO "3730XL" GENERADO MEDIANTE EL SOFTWARE SNAPGENE®5.3.2..... | 29 |
| GRÁFICA 3. RELACIONES EVOLUTIVAS DE LAS 48 SECUENCIAS DE NUCLEÓTIDOS DE LOS CINCO GRUPOS POBLACIONALES, MÁS EL GRUPO CONTROL, DESTACADOS EN LOS DIFERENTES CUADROS DE COLORES EN LOS QUE SE ENCUENTRAN. | 30 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| μL | Microlitro |
| AFLP | Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados |
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| BME | β-mercaptoetanol |
| CETAB | Bromuro de cetiltrimetilamonio |
| CI | Cloroformo/alcohol isoamílico |
| DnaSP | Polimorfismo de Secuencia de ADN |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetraacético |
| FST | Índice de Fijación |
| ISSR | Repeticiones de Secuencia Intersimple |
| ITS | Espaciadores Internos Transcritos |
| matK | Maturasa K |
| <i>rbcL</i> | Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa |
| tnrH-psbA | Fotosistema II <i>Atropa belladonna</i> (Región espaciadora intergénica) |
| MEGA | Molecular Evolutionary Genetics Analysis |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimol |
| msnm | Metros sobre el nivel del mar |
| NORs | Regiones Organizadoras Nucleares |
| pb | Par de bases |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PopART | Programa para el Análisis de población con árboles reticulados |

PVP Polivinilpirrolidona

RNasa Ribonucleasa

Rpm Revoluciones por minuto

SB Ácido bórico de sodio

SSR Secuencias Simples Repetidas.

TE Tris y EDTA

GLOSARIO

Acervo genético: El conjunto de la información genética que llevan todos los miembros de una población.

Coalescencia: Teoría que relaciona los patrones de ancestría común entre una muestra de genes y el tamaño y la estructura de la población total. Es decir, mientras más individuos se agregan a la muestra, es posible acercarse más al tiempo de coalescencia de la población.

Desnaturalización: etapa en la que se separan las dos cadenas del ADN. Mediante el calentamiento (94-95 °C) de la muestra, la temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de guanina y citosina que contenga la cadena, como también del largo de esta.

Diversidad de Nucleótidos: Se refiere a la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos tomados al azar sean diferentes. Es equivalente a la diversidad génica a nivel de nucleótidos.

Diversidad Genética: es la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de determinada especie o grupo de especies. La diversidad genética se puede medir utilizando la diversidad de genes, la heterocigocidad, o el número de alelos por locus.

Diversidad Haplotípica: mide el grado de polimorfismo dentro de una población.

DNA Barcode: Un Barcode se puede considerar como una secuencia corta de ADN, de una localidad uniforme del genoma, usada para identificar especies.

Estructura génica: cantidad y distribución de la variación genética presente en la misma. La estructura genética de una población se expresa en términos de frecuencias de esos alelos (frecuencias génicas) y, consecuentemente, genotípicas. La variabilidad está determinada por el número y la frecuencia de los distintos alelos del conjunto de genes de una población.

Extensión: o elongación de la cadena, en esta etapa actúa la polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN.

Filogenia: estudio de la evolución de una determinada especie desde su origen hasta su descendencia, analizando los aspectos moleculares y morfológicos a partir de los cuales es posible encontrar relaciones entre distintas especies.

Fragmento amplificado: Secciones de ADN amplificadas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa mediante un determinado oligonucleótido.

Gen: se considera la unidad básica de la herencia. Los genes se transmiten de los progenitores a la descendencia y contienen la información necesaria para especificar los rasgos físicos y biológicos.

GelRed: es un tinte fluorescente, de Biotium, para ácidos nucleicos ultrasensible, extremadamente estable y ambientalmente seguro, diseñado para reemplazar al altamente tóxico bromuro de etidio para la tinción de dsDNA, ssDNA o RNA en geles de agarosa o geles de poliacrilamida.

Haplotipo: conjunto de variaciones de ADN a lo largo de un cromosoma que tienden a ser heredados juntos porque están muy próximos. También, puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci.

Indigotina: compuesto químico que constituye el tinte del añil extraído de diversas especies de plantas, entre ellas "Indigofera".

Lisis: consiste en la rotura de la membrana celular mediante enzimas hidrolíticas provocando la salida del material celular, que puede ser por medios físicos y químicos.

Marcador molecular: son secuencias identificables de ADN que se encuentran en determinados lugares del genoma y que están relacionadas con la herencia de una característica o de un gen vinculado a ésta.

Máster Mix: mezcla que contiene los ingredientes (Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, ADN molde, Reverse, forward y agua ultrapura) para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las concentraciones de los reactivos que se colocan van en función de la cantidad de muestras a amplificar.

Polimorfismo: es la presencia de dos o más formas variantes de una secuencia específica de ADN que puede producirse entre diferentes poblaciones. El tipo más frecuente de polimorfismo implica la variación en un nucleótido único (también denominado polimorfismos de nucleótido único, o SNP). Otros polimorfismos pueden ser mucho más grandes y abarcar segmentos más largos de ADN.

“Primer” o cebador: es un fragmento corto de ADN monocatenario utilizado para determinadas técnicas de laboratorio, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Proteínasa K: es una proteasa de serina de amplio espectro. La enzima se descubrió en 1974 en extractos del hongo *Engyodontium album* (antes *Tritirachium album*). La proteínasa K puede digerir el cabello (queratina), de ahí el nombre de "proteínasa K".

Secuencia: sucesión de letras representando la estructura primaria de una molécula real o hipotética de ADN o banda, con la capacidad de transportar información.

Secuenciación por electroforesis capilar: es una herramienta de separación de biomoléculas; presenta la versatilidad de poder separar aminoácidos, ácidos orgánicos, iones inorgánicos, carbohidratos, esteroides, material genético, cuya finalidad es determinar el orden de los nucleótidos en un oligonucleótido de ADN.

Sitios segregantes: son sitios que poseen más de una variante nucleotídica de un conjunto de secuencias dadas.

Tampón de extracción: solución para la lisis química, que contiene sales y sustancias detergentes para provocar el proceso de lisis celular y poder extraer el contenido celular para separar los ácidos nucleicos de los demás componentes celulares.

Temperatura de Annealing: se refiere a la unión de los *primers* (que se encuentran en muy altas concentraciones) a la hebra del ADN monocatenario, al momento de descender la temperatura del termociclador. La fase de extensión la ADN polimerasa extiende el extremo 3' del primer y copia el ADN correspondiente.

“Smear”: nivel de degradación de una muestra de ADN en la que se observa la pérdida de la definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela a lo largo del gel.

Variabilidad genética: cambios que se registran en los genes de una especie o de una población.

Xiquilite: palabra náhuatl con el que los ancestros salvadoreños llamaban a la *Indigofera suffruticosa*.

RESUMEN

Esta investigación representa un primer acercamiento al estado genético de la planta *Indigofera suffruticosa*, que además de ser nativa, ha sido usada en épocas precolombinas y postcolombinas para la producción del colorante natural añil y fuente importante en la economía salvadoreña. Siendo el objetivo principal analizar la variabilidad genética de dicha planta en estado de cultivo. Para la realización de dichos análisis se tomaron muestras de tejido foliar de cinco cultivos, distribuidos en el territorio salvadoreño en los Departamentos de: Santa Ana, La Libertad, Cuscatlán, Usulután y San Miguel que representa un grupo control, los muestreos se realizaron en función de la época de cosecha en los diferentes sitios entre los meses de julio, agosto, septiembre y octubre.

Las muestras recolectadas fueron debidamente lavadas y desecadas, luego se pulverizaron y guardaron bajo refrigeración, posteriormente se les aplicó un protocolo de extracción de ADN a cada muestra registrada, recopilando un total de 49 muestras de ADN óptimas usadas en PCR para la amplificación del fragmento ITS2 que consta básicamente de 400 pb, mismos productos que fueron evaluados mediante electroforesis para realizar la respectiva secuenciación y análisis bioinformáticos.

El análisis de las poblaciones estudiadas de *I. suffruticosa* de los diferentes sitios de muestreo reveló mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic) una historia evolutiva en la que se diferencian dos grupos de nucleótidos de 31 y 16 respectivamente; una diversidad genética baja con dos haplotipos, una diversidad haplotípica de 0.46 y diversidad nucleotídica del 0.0044, siendo el Cantón San Francisco en Usulután el que aportó mayores valores de diversidad genética que el resto de las poblaciones en los índices antes mencionados. Se identifica una diversidad genética entre poblaciones predominantemente baja; por ejemplo, en el coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) en sus conjugaciones de poblaciones (CB/HNA, CB/JP, HNA/JP, con valores de 0.0; CB/CSF, CSF/HNA, CSF/JP con valores de 0.4); siendo que, en diez conjugaciones de poblaciones, únicamente tres de ellas (CB/CPB, CPB/HNA, CPB/JP, con valores de 1.0) muestran una notoria diferenciación muy significativa. Se edificó una red de haplotipos en la que se distinguen claramente dos haplotipos, concluyendo que este tipo de sistema de cultivo está altamente influenciado por la selección artificial y altos procesos endogámicos.

1. INTRODUCCIÓN

Se le asigna la palabra añil al extracto del colorante azul índigo que se puede obtener de diferentes variedades de plantas, pero comúnmente se le ha asignado este nombre al grupo de fabáceas que se utilizan en la agricultura, siendo las que predominan en los cultivos salvadoreños las especies *I. suffruticosa* e *I. guatemalensis* por sus contenidos de indigotina, muy importantes para la industria textil y la exportación. La especie nativa *I. suffruticosa*, de la que trata esta investigación, se encuentra presente desde el Sureste de Estados Unidos a Argentina y en las Antillas, ya era manipulada por los primeros pobladores y actualmente ha sido introducida en diversos países del mundo (CABI 2018).

Las investigaciones en este tipo de cultivos en El Salvador han estado enfocadas en la caracterización de la sostenibilidad del añil, procesos de optimización de la extracción del colorante, técnicas del cultivo y estrategias de comercialización y como recurso etnobotánico para curar enfermedades, sin embargo, se desconocen ciertos aspectos relacionados con el estado genético de la planta por el hecho de ser utilizada para cultivos (González 2005).

Históricamente esta planta ha sido cultivada en diferentes regiones del país y recientemente existen agricultores de zonas rurales que están impulsando la práctica para fortalecer sus economías, mucho del germoplasma o semilla que se usa es del que se guarda de cada cosecha o del que se intercambian entre agricultores, pero hay un grupo de agricultores que lo toman del medio silvestre es decir no procedente de cultivo. Al verse incrementadas dichas actividades, la diversidad genética de esta especie en cultivo podría estarse viendo incrementada, por lo que resulta indispensable la evaluación del estado genético actual.

Reconocer, salvaguardar y utilizar el potencial y la diversidad de la naturaleza son fundamentales para la seguridad alimentaria y la agricultura sostenible. Ahuja and Jain (2015) especifican que, a nivel de paisaje agrícola, los sistemas de monocultivo y la simplificación de los agroecosistemas representan una de las amenazas que lleva a la erosión genética; a nivel genético de población, la diversidad se mide como el número y la frecuencia de los alelos (es decir, diferentes formas de un gen), la erosión se expresa como una reducción en el número y la frecuencia de los alelos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Analizar la variabilidad genética mediante un marcador molecular universal, en cultivos de *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae) en El Salvador.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Describir las distancias evolutivas usando el método de grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA) de 47 individuos pertenecientes a los diferentes grupos poblacionales de cultivares de *I. suffruticosa*.
- Estimar la diversidad genética en cultivos de *I. suffruticosa* mediante las variaciones dentro y entre poblaciones, incluyendo los índices de diversidad haplotípica, nucleotídica, sitios polimórficos y el número de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias.
- Representar gráficamente las distancias génicas mediante árbol filogenético, la relación geográfica de la distribución haplotípica y genealógica de las diferentes poblaciones de cultivos de *I. suffruticosa* mediante redes de haplotipos.
- Determinar la estructura génica y diferenciación genética de las cinco poblaciones de cultivos de *I. suffruticosa* mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) y el uso del índice de fijación por pares de población (F_{ST}).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. ANTECEDENTES

3.1.1. Estudios similares mediante técnicas moleculares.

Otao et.al. (2016), en su estudio sobre el desarrollo y caracterización de 14 marcadores microsatélites para *Indigofera pseudotinctoria*, en la que evaluaron poblaciones nativas de poblaciones trasplantadas, para evaluar la estructura de las poblaciones y la diversidad genética en la cual se determinó que existía mayor polimorfismo en la población no nativa, así que entre nativas y no nativas no se compartían muchos alelos, esta investigación ayuda discriminar a individuos no nativos de los nativos de *I. pseudotinctoria* y determinar alteraciones genéticas causadas por especies introducidas.

Hariri et al. (2017), realizaron un estudio de diversidad genética de *I. tinctoria L*, en tres regiones de Indonesia, usando marcadores de repetición de secuencias inter-simples; se analizó la diversidad genética y la estructura poblacional de *I. tinctoria L*; concluyendo que, la diversidad genética en dos de los sitios fue relativamente alta (%P=68.3), sin embargo, es menor al interior de la población (37%) que la que existe entre las poblaciones (63%).

Choi et al. (2006), usó marcadores moleculares nucleares derivados de genes vinculados a mapas genéticos de leguminosas, en el que se utilizaron 15 genomas de leguminosas, se tomaron 274 secuencias génicas para el desarrollo de marcadores genéticos obtenidos mediante PCR. El grado de divergencia que se obtuvo al estudiar los intrones y exones que estaban distribuidos en cuatro categorías, indicaron que los marcadores pueden ser útiles para evaluar las relaciones filogenéticas a niveles taxonómicos diferentes, pero superpuestos. Los estudios filogenéticos ayudan a la comprensión de las secuencias amplificadas.

Fan et al. (2017), realizó un análisis de diversidad genética y patrón de estructura de *Indigofera pseudotinctoria* en Karst, hábitats de las montañas Wushan utilizando marcadores AFLP. La planta representa importancia económica con alto rendimiento de forraje, conteniendo una fuente de proteína y fuerte adaptabilidad por lo cual está sujeto a fragmentación de hábitat y perturbación humana. Por tal razón se llevó a cabo un estudio de las relaciones y diversidad genéticas

intraespecíficas para la colección, utilizando la tecnología de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP). Diferenciándose una estructura de 364 genotipos de *I. pseudotinctoria* de 15 sitios de recolecta, se generaron 324 bandas que en este caso fueron polimórficas, su contenido de información polimórfica varió de 0.694 a 0.890, con un promedio de 0.789 por. Se resolvió la estructura génica de la población estudiada por el árbol de UPGMA, con análisis de coordenadas principales y los análisis de conglomerados basados en Bayesianos irrefutables.

Chauhan et al. (2013), usaron la región ribosomal nuclear ITS para inferir las relaciones de Indian *Indigofera*. Ellos realizaron análisis de parsimonia y bayesianos de los datos ITS revelaron que el género *Indigofera* es monofilético. Concluyendo que la divergencia y la rápida especiación hacen que las regiones ITS sean similares. El foliolo pinnadamente compuesto es un rasgo no homólogo y ha evolucionado varias veces de forma independiente.

(Alharbi and Al-Qthanin 2020), documentaron por primera vez la especie *Indigofera cordifolia* Heyne ex Roth. En una expedición en la isla de Dumsuk (pertenece a Jīzān en Arabia Saudí). Con una identificación morfológica y molecular mediante la técnica del código de barras, basados en la región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosómico nuclear de esta especie; y aseguraron una alta eficiencia de discriminación a nivel de especie, ayudando al manejo de esta especie rara y nacional.

3.2. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.2.1. Aspectos generales sobre *Indigofera suffruticosa*.

3.2.1.1 Clasificación Taxonómica.

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Filo: Espermatofita

Subfilo: Angiospermas

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclass: Magnoliidae Novák ex Takht.

Superorden: Rosanae Takht

Orden: Fabales Bromhead

Familia: Fabaceae Lindl.

Subfamilia: Faboideae

Género: *Indigofera* L.

Especie: *Indigofera suffruticosa* Mill

(Missouri Botanical Garden 2019)



Figura 1. Hoja, flor y fruto de *I. suffruticosa*. (Foto tomada de Missouri Botanical Garden 2019).

3.2.1.2 Morfología.

I. suffruticosa es un arbusto perenne, leñoso, de hasta tres metros de altura, erecto muy ramificado en un ciclo de vida de cuatro años. Tolera una variedad de tipos de suelo y puede volverse dominante en hábitats perturbados. El número de cromosomas generalmente se da como $2n = 16$, pero puede haber tetraploidía esporádica con $2n = 32$ (Missouri Botanical Garden, 2019).

3.2.1.3 Raíz y tallo.

Su raíz es pivotante, poco profunda, de longitud de 40 a 60 cm. Cuenta con raíces secundarias en toda su extensión, además de nódulos nitrificantes. En la base crece un tallo semileñoso que después se ramifica en tres a cuatro ramas principales que conforman la estructura principal.

3.2.1.4 Hoja y flor.

Las hojas son imparipinnadas con (9-) 11-17 foliolos elípticos a oblanceolados, ocasionalmente abovados, en punta mucronada de envés pubescente y haz glabro de 4 cm de largo y 1 de ancho, pecíolo de 1.5 cm. sus brácteas son triangulares, pedicelo de 1 mm de largo, corola de 4 a 5 mm de largo (Stevens et al. 2009).

La floración ocurre dentro de 4-5 meses después de la germinación. Inflorescencia en racimo axilar, 2-6 cm de largo; brácteas estrechamente triangulares; pedicelo de hasta 1 mm de largo; corola de 4-5 mm de largo, salmón rosado a rojo; cáliz campanulado, 1 mm de largo, dientes triangulares, 1 mm de largo; pétalo estándar de ovado a orbicular, 4 mm x 3 mm, peludo café en el dorso; alas 3 mm x 1 mm, glabras; quilla de 3-4 mm x 1-2 mm, peluda; estambres 10, 1 libre, 9 connados en un tubo estaminal de 3-4 mm de largo; ovario peludo, estilo con estigma capitado. Estambres de 3-4 mm de largo (CABI 2018).

3.2.1.5 Fruto y Semilla.

Su fruta es una vaina de 4 a 8 semillas, curvada en forma de hoz con una longitud de 1.5 cm de largo, peluda. La germinación de semillas escarificadas es alta, a temperaturas de 15 ° C a 33. Las semillas son cúbicas de 1.5 mm x 2 mm, color marrón brillante (CABI 2018).

3.2.1.6 Fenología.

Las plántulas muestran germinación epigea y las primeras hojas que se forman son simples. La floración ocurre dentro de 4-5 meses después de la siembra y pueden florecer y fructificar todo el año.

3.2.2. Orígenes del añil.

El origen del añil reside en el viejo mundo, donde también se extrae el colorante para teñir a partir de diversas plantas. En Centroamérica el añil es nativo. En 1526, Fernández de Oviedo detalla en el Sumario de la Natural historia de las Indias, como los indígenas extraían de las plantas diversos colores para teñir sus telas, en uno de sus primeros registros se encuentra en un cedula en el siglo XVI, documento que data del año de 1558, en el que se muestra la orden de parte del Rey, para que se estudie la planta de la que los indígenas del nuevo mundo extraen el color para teñir el algodón.

Un tiempo después fray Bernardino de Sahagún, en su documento **Historia General de las Cosas de la Nueva España**, narra cómo los indígenas llamaban a la planta, Xiuhquiltl, reconocida como *Indigofera*, de la que se extraía el colorante azul para decorar sus vasijas, ropas y para hacer rituales. En nuestro país es el Dr. David J. Guzmán quién hace una descripción más detallada de dicha planta con sus características morfológicas y principales usos (Universidad Tecnológica 2012).

En Egipto ya se utilizaba el añil en el año 2200 A.C. Los romanos lo llamaban índicum (indio) de donde se originó la palabra índigo y compraban telas teñidas en el Nilo a precios muy elevados, es así como se empezó a exportar para el año 200 A.C. en el Mediterráneo y Grecia. Los árabes lo llamaban “sánscrito nil” y la convirtieron en añil (color azul) luego se fue propagando por el resto de Europa. En Mesoamérica en épocas de la conquista ya se hacía notar la presencia del azul del añil en la manera de vivir de los indígenas quienes en Náhuatl le llamaban “xiuhquilitl” hierba azul, de “xihuitl, color azul o verde, y “quilitl”, hierba, y que dio origen la palabra Xiquilite o Jiquilite (González 2005). *Indigofera suffruticosa* Mill es la especie americana que se ha utilizado desde tiempos precolombinos en el sur de México y Centroamérica como fuente de índigo natural hasta nuestros días; pero se reconocen las principales especies del género *Indigofera* para extracción del colorante (figura 2.) (Sandoval-Salas 2005).

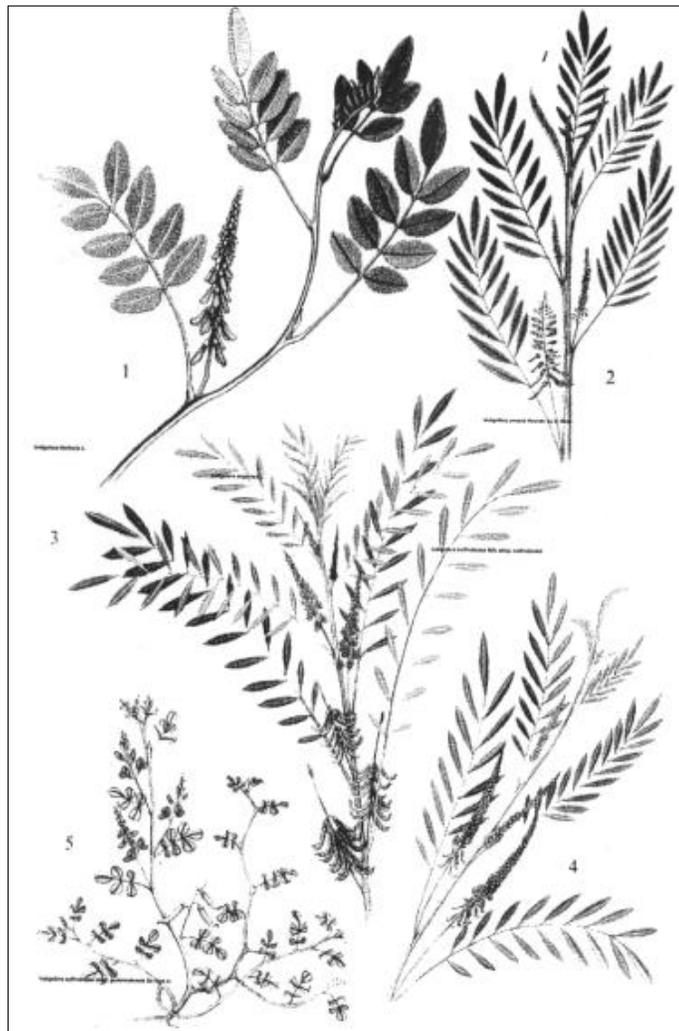


Figura 2. Principales especies del género *Indigofera* para extracción del colorante. (1) *I. tinctoria* L. (2) *I. arrecta* Hoschst. (3) *I. suffruticosa* Mill Sbsp. *suffruticosa* (4) *I. argétea* L. (5) *I. guatemalensis* Moc.

En El Salvador existen registros de la presencia de varias especies de *Indigoferas* encontradas en diferentes sitios del territorio salvadoreño: *I. guatemalensis* Mocino y Sensé que actualmente ha sido nombrada como *I. micheliana* Rose (Missouri Botanical Garden 2019), *I. lespedezioides* H. B. K. (Guapito), *I. mucronata* Sprengel, *I. suffruticosa* Miller (*Indigofera anil* L. Cornezuelo) (Calderón y Stanley 1941), *I. spicata* FORSSK, *I. Hirsuta* L, *I. jamaicensis*; la mayoría de estas especies se encuentran registradas en el Herbario LAGU de la Asociación Jardín Botánico La Laguna, incluyendo la especie reportada más reciente *I. costaricensis* (Galán 2020).

3.2.3. Origen y distribución.

La distribución de *I. suffruticosa* en forma nativa, está presente desde el Sureste de Estados Unidos a Argentina y en las Antillas, introducida y naturalizada en los trópicos del Viejo Mundo y en Australia (Missouri Botanical Garden 2019), pero es en la franja tropical donde existe una mayor presencia de esta especie, incidiendo en el Caribe Tropical y América Central. Esto se debe a que ha sido introducida deliberadamente por su uso tintóreo, produciéndose así en regiones como África, Asia, el Pacífico y también en Australia (figura 3).

La especie, *I. suffruticosa* puede considerarse invasivo fuera de su amplio rango de distribución natural, es abundante y se adapta fácilmente a diferentes ambientes, considerado habitante generalista que tolera otros cultivos, la presión de explotación, la mutilación, el fuego, tiene larga

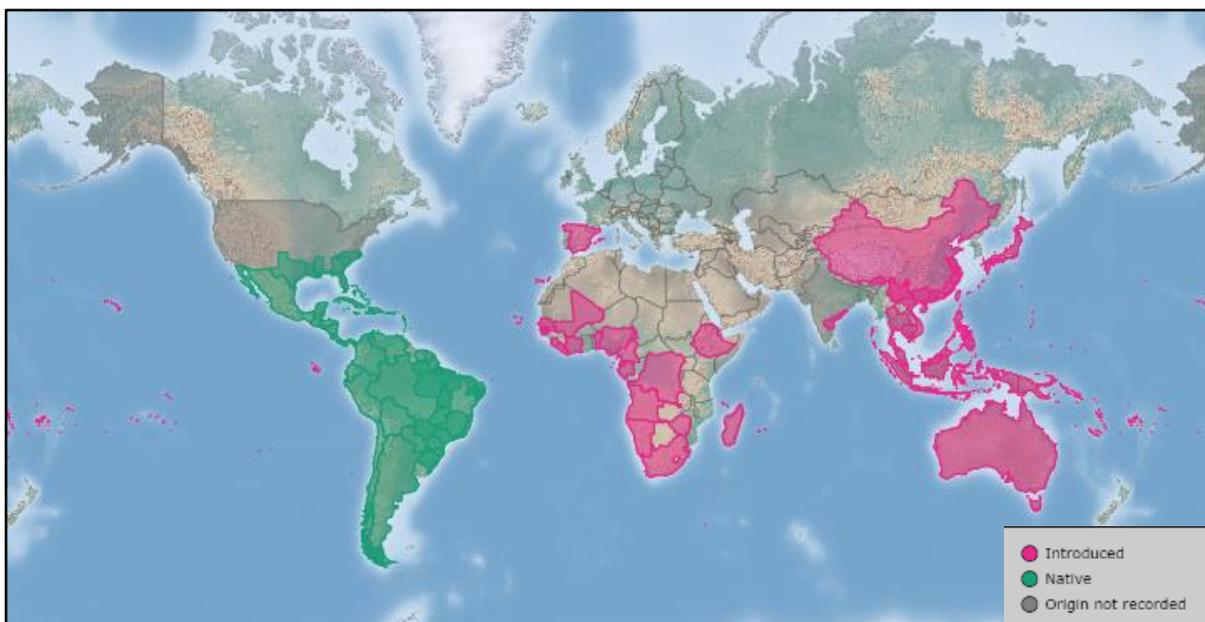


Figura 3. Distribución mundial de *I. suffruticosa*, cuya predominancia se ubica en la franja neotropical.

vida, pionera en sitios perturbados, posee un crecimiento rápido, además de un alto potencial reproductivo, sus propágulos pueden permanecer variables por más de un año (CABI, 2018).

3.2.4. Características del suelo y clima para la siembra de *I. suffruticosa*.

Se adapta a suelos francos arenosos y arcillosos, los rangos de altura idóneos están en los 50 – 1,200 msnm, puede crecer junto a otros cultivos y en sitios donde otros cultivos no pueden desarrollarse como suelos degradados por la agricultura intensiva, donde ha predominado el monocultivo por rangos de tiempo prolongados. Además de adaptarse a pendientes, suelos rocosos y soportar elevadas temperaturas de épocas secas, tal es el caso en zonas de El Salvador en la zona oriental en sitios donde las temperaturas alcanzan niveles de 35-37°C, con humedad relativa de 40 a 70%. Los suelos ideales deben poseer un pH cercano a 6.5 o mayor de 4.6, con una buena capacidad de drenaje ya que el jiquilite no soporta encharcamiento prolongado, le conviene un contenido de materia orgánica de 3.5%, un índice pluvial de 800-200 mm (González 2005).

3.2.5. Beneficios e importancia del cultivo de añil.

El cultivo de *I. suffruticosa* contribuye al medio ambiente, usado como alternativa de diversificación productiva, que fomenta la agricultura sostenible provocando un impacto positivo, contribuyendo a los desequilibrios ambientales que caracterizan los medios de vida rural, además por ser una planta semiperenne contribuye a evitar la erosión de los suelos al aumentar la cobertura vegetal. También, se adapta a toda clase de suelos como son los marginales y laderas; al rotar los cultivos, la fertilización del suelo mejora, de manera que, se obtienen mejores cosechas; debido a que tiene la capacidad de fijar nitrógeno al suelo, regenerando y mejorando sus nutrientes. No es necesario el uso de agroquímicos o abonos inorgánicos para su desarrollo, el valor histórico y económico representa un rubro importante en esta actividad agrícola y el valor cultural ancestral para realizar actividades diarias tanto en lo social como religioso (Rivera and Martínez 2006). Además de poseer propiedades insecticidas, antiepilépticas, febrífugas, antiherpéticas, antisépticas, purgantes, antiespasmódicas y antiparasitarias (Govín et al. 2006)

3.2.6. Composición química del índigo.

Añil es el nombre general de aquellas plantas que contienen gran cantidad de Indican (Indoxil-glucosido) y de las que se extrae el colorante índigo. Para la obtención del índigo el componente que es hidrolizado es el glucósido indican, provocado por la enzima a indoxilo que luego lo oxida para

dar lugar al color azul del índigo por oxidación al aire. El índigo es un pigmento insoluble al agua. Por tal razón al teñir la fibra textil, el azul índigo debe ser oxidado por el leuco índigo, este es incoloro y se disuelve en agua previo a la tinción. Después, el leuco índigo es oxidado por el aire y vuelve a ser azul índigo (figura 4). El componente esencial del índigo es la indigotina, responsable de la coloración, así que el añil de mejor calidad contiene más de 60% de indigotina, el de calidad mediana 40 a 50 % y el más inferior menos del 20% (Chanayath et al. 2012).

La enzima procede de las células de la planta, siendo que es en las hojas donde se produce la mayor cantidad de indigotina, y al macerarlas en su estado fresco libera el glucolítico, otra enzima de las células vegetales que ayudan a hidrolizar el glucano y dio indoxilo que se oxida con aire y crear el azul índigo. Cuando las hojas están semisecas la enzima podría inactivarse durante el proceso, por lo tanto, el rendimiento del tinte índigo puede tener un bajo rendimiento (Chanayath et al. 2012). Una vez que el colorante reducido se ha impregnado en la tela, tiene lugar el paso final de exposición a un oxidante (generalmente aire), con lo que la pieza se vuelve azul, dado que el leucoíndigo se transforma en índigo que queda fijado en el entramado de las fibras de la tela (Saura and Galindo 2016).

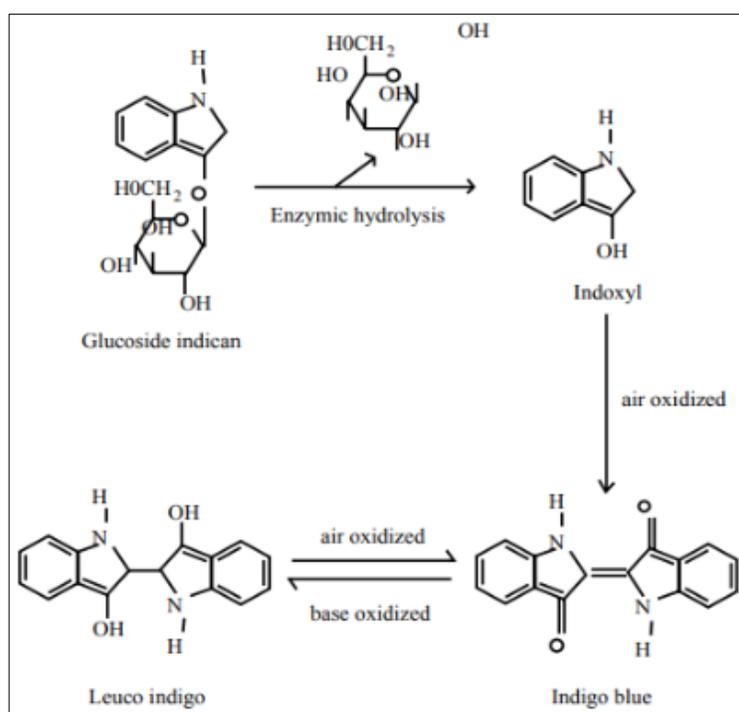


Figura 4. Diagrama que muestra el cambio químico del índigo del material vegetal.

Los precursores de la formación de índigo en plantas, no está presente en la planta al momento de la cosecha, las plantas de los géneros *Indigofera* (añil) y *Polygonum* acumulan un precursor incoloro soluble en agua llamado indican (Indoxil β -D-glucosido), que durante el proceso de extracción se hidroliza por acción de la enzima β -glucosidasa liberando por un lado el compuesto glicosídico y por el otro el indoxilo, posteriormente.

Fisiológicamente, el papel del indican en plantas de añil no se conoce exactamente, más bien se sugiere que hace un papel de intermediario en la formación de hormonas vegetales o bien que puede presentar el mecanismo de almacenamiento de la glucosa, esto también puede ser como un mecanismo de defensa contra herbívoros o insectos, así como ocurre con la acumulación de toxinas vegetales derivadas de aminoácidos producidas como metabolitos secundarios como función de defensa (glucósidos cianogénicos) (Sandoval-Salas 2005).

Existe la evidencia de la formación del colorante índigo a partir de otras plantas que poseen esta capacidad como la formación del índigo natural a partir de hojas de Woad (*Isatis tinctoria*) donde el principal precursor de añil se puede obtener del ambiente XAD16 en conformidad con una isoterma de Langmuir, pero los precursores de añil se degradan en esta y otras perlas de resina para producir compuestos índigo y rojo (García-Macias and John 2005).

3.3. GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones explora los niveles de variación genética dentro y entre las poblaciones que forman a las especies y explica sus patrones en términos de las fuerzas evolutivas. Las especies conforman una serie de poblaciones y se conectan por un flujo genético y el conjunto de todas las poblaciones entre las que hay flujo génico constituye a una especie. Cuando las poblaciones tienen altos niveles de variación genética, implica que son o han sido muy grandes y que existe elevado flujo génico de variación genética, implica que son muy grandes y que existe elevado flujo génico entre ellas; si al contrario las poblaciones que forman una especie son muy diferentes entre sí, es posible que sean pequeñas o que hay muy poco flujo génico entre ellas (Eguiarte et al. 2013).

3.3.1. El flujo génico (migración).

Las poblaciones no son sistemas cerrados por lo cual se produce cierta cantidad de transferencia de genes, así que es más probable que pase cuando las poblaciones se hallan estrechamente

relacionadas espacial y genéticamente. Entre las poblaciones adyacentes de una especie el flujo de genes puede ser grande, por lo que es de esperar que las poblaciones contiguas posean una composición génica más semejante que las que están más alejadas geográficamente. Por ello, la migración entre grupos geográficamente aislados es un suceso de gran importancia porque los complejos génicos de adaptación se rompen, las frecuencias alélicas se alteran y, en general, todas las diferencias genéticas entre las poblaciones se reducen. La eficacia del intercambio de genes depende de la estructura de las dos poblaciones (emigrante y receptora) y, más específicamente, de la cantidad de migración (índice de migración) y de la magnitud de la diferencia en frecuencias génicas entre las dos poblaciones (Cabrero and Camacho 2009).

3.3.2. Deriva genética.

El resultado de la deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones. Es necesario mencionar que la deriva genética tiende a formar una población homocigótica, además se tiende a eliminar los genotipos heterocigóticos. Son los cambios al azar en las proporciones de los alelos es decir las diferentes formas que puede tener un gen en una población; debido a que por puro azar algunos individuos dejan más hijos y copias de sus genes que otros; entre menos individuos dejen descendientes, mayores van a ser estos cambios azarosos. En el caso de los organismos, cuanto menor es el número de reproductores en una población, probablemente mayores serán los cambios en las frecuencias alélicas debidos a la deriva genética (Cabrero and Camacho 2009).

Para Herrera-Paz (2013) es un mecanismo de cambio de frecuencias alélicas de una generación a otra es similar a un error de muestreo: si las clases estudiadas son muchas, es muy probable que en una muestra pequeña no detectemos algunas de ellas, especialmente si su ocurrencia es baja. Como consecuencia las frecuencias alélicas cambiarán de una generación a otra, y los alelos tenderán a desaparecer paulatinamente del pozo genético disminuyéndose la variabilidad hasta que, después de un número n de generaciones, ocurrirá fijación y el gen se vuelve monoalélico.

3.3.3. Mutación.

Implica cambios al azar en la secuencia de nucleótidos o en la organización del ADN o ARN de un ser vivo o virus que puede llegar a producir cambios en él, las mutaciones son las que generan toda la variación genética (Eguiarte et al. 2013). Es decir, cambio heredable en la secuencia de nucleótidos del ADN, que resulta en el reemplazo de un alelo por otro diferente, a partir de errores en la

replicación del ADN que no son reparados. La mayoría de las mutaciones son deletéreas, y son gradualmente, pero no del todo eliminadas por la selección natural, de ahí que la frecuencia de los alelos deletéreos se mantiene baja, pero constante en la población, por medio del proceso denominado balance selección-mutación (Herrera-Paz 2013).

Las mutaciones son alteraciones del material genético y en ellas se incluyen desde simples sustituciones de un solo nucleótido hasta las deleciones o inserciones de uno o más nucleótidos. La mayoría de las mutaciones en animales no conllevan a cambios en el fenotipo, ya que, ocurren en regiones no codificantes (mutaciones silentes) (Aranguren-Méndez et al.).

3.3.4. Selección natural.

La teoría de la selección natural no sólo predice el cambio evolutivo, sino que también predice que los organismos adquirirán características que los harán capaces de sobrevivir y reproducirse mejor en el ambiente en que viven. La adaptación al ambiente es una consecuencia de la evolución por selección natural (Cabrerero and Camacho 2009).

Las proporciones de alelos que haya en las poblaciones se deben al balance deriva génica y el flujo génico (a mayor deriva génica habrá más diferencias en las poblaciones y mientras más alto sea el flujo génico serán más parecidas), sin embargo, si solo existen diferencias entre poblaciones en determinados genes, puede ser que sea por efecto de fuerzas como la selección natural (Herrera-Paz 2013) .

3.4. TÉCNICA MOLECULAR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que ha revolucionado el modo de manipular, clonar y detectar fragmentos de DNA, lo que le ha valido a su descubridor K.B. Mullis el Premio Nobel en 1983. Actualmente se ha convertido en una de las técnicas básicas de Biología Molecular, por su rapidez, especificidad, flexibilidad y aplicabilidad. Como no es necesario contar con ADN extremadamente puro para amplificar. Entre sus aplicaciones generales encontramos la generación de sondas, clonación, secuenciación, diagnóstico clínico y tipificación de individuos y microorganismos, siendo entonces muy utilizada en medicina forense y en estudios filogenéticos.

Al saber que es DNA es bicatenario puede desnaturalizarse, es decir que sus hebras pueden alinearse en la presencia de oligonucleótidos diseñados para ser complementarios a porciones de cada una

de las cadenas. La repetición de los ciclos de desnaturalización, alineamiento (hibridación o “annealing” en inglés) y polimerización es capaz de producir cantidades crecientes del producto, resultando una amplificación de orden exponencial de la secuencia enmarcada por los cebadores (Martínez and Zapata 2007). El número de copias de esta región se puede estimar de la siguiente manera:

$$N = N_0 \times (1-R)^c$$

N = número de copias obtenidas

N₀ = número de copias que se han depositado en la reacción inicialmente

R = rendimiento de cada ciclo expresado en tanto por uno (normalmente debe oscilar entre 0,7 y 0,85)

c = número de ciclos.

3.5. MARCADORES MOLECULARES

Existen diferentes tipos de análisis genéticos con marcadores moleculares como puntos de referencia de un cromosoma que pueden corresponder a un gen. En Biología Molecular se usan para detectar la variabilidad de la secuencia de ADN como: la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de ADN y las hibridaciones Carrera et al.(2004), citada por Páiz y Huete (2008) como pueden observarse en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción de los marcadores moleculares que se utilizan para estudios genéticos.

| | | |
|-------------------------------|--|---|
| MARCADORES MOLECULARES | 1. Marcadores basados en la hibridación del ADN | RFLP - restriction fragment length polymorphisms: (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN). |
| | | Los minisatélites o VNTR - variable number of tandem repeats: (número variable de repeticiones en tándem). |
| | 2. Marcadores basados en la amplificación del ADN mediante la reacción de PCR - polymerase chain reaction: (Reacción en cadena de la polimerasa de ADN). | RAPDs - random amplified polymorphic DNAs: (fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente). |
| | | DAF - DNA amplification fingerprinting y AP-PCR - arbitrary primer PCR: (primers arbitrarios en PCR). |
| | | SSR -simple sequence repeats: (microsatélites) |
| 3. Marcadores mixtos | AFLPs -amplified fragment length polymorphisms | |

3.6. CODIGO DE BARRAS GENÉTICO

El "DNA barcode" es una técnica para identificar especies. Un Barcode se puede considerar como una secuencia corta de ADN, de una localidad uniforme del genoma, usada para identificar especies. Diseñado en 2003 por investigadores de la Universidad Guelph en Ontario, Canadá; la región del gen que está siendo utilizada como Barcode estándar para grupos de animales es la región del gen mitocondrial citocromo oxidasa sub unidad 1 (COI) (Páiz and Huete 2008).

Para realizar estudios de código de barras estándar en plantas, existen regiones como: *rbcL* y *matK* más dos regiones suplementarias *mtrnH-psbA* y el espaciador transcrito interno (ITS) han demostrado niveles razonables de especies discriminación tanto en estudios de política como en estudios taxonómicos. Este código de barras proporcionará un marco universal para identificar especímenes contribuyendo al descubrimiento de especies de plantas terrestres que se pasan por alto.

Fazekas et al. (2012) revela una alta tasa de éxito para PCR y secuencias para regiones amplificadas por cebadores universales y altamente conservados (*plastid rbcL*, *trnH-psbA* y nuclear ribosomal ITS2). Por el contrario, la región de código de barras de ADN de *matK* necesita condiciones distintas para una amplificación por PCR exitosa. La región del gen *matK* es más difícil de amplificar y secuenciar que *rbcL* por varias razones. Primero, es aproximadamente 300 pb más largo que *rbcL*, y por lo tanto más sensible a la degradación del ADN; considerando lo anterior para esta investigación se toma espaciador transcrito interno (ITS) que ofrece niveles más altos de discriminación de especies en algunos grupos. Sin embargo, un riesgo es el de la contaminación por hongos.

La región de los ITS del nrADN en angiospermas y gimnospermas comprende: el ITS2, la subunidad 5.8S y el ITS1 (figura 5). Las copias de nrADN en el genoma de las plantas, están distribuidas en uno o varios loci cromosómicos denominados regiones organizadoras nucleares (NORs).

La región de los ITS ha sido considerada como una fuente muy útil en caracteres para estudios filogenéticos en angiospermas. Son varias las ventajas que proporciona el uso de este marcador molecular, dado que los ITS se encuentran altamente representados en el genoma, se pueden, amplificar con cantidades pequeñas de ADN. Las secuencias altamente conservadas dentro de la mayoría de los genes del nrADN son muy útiles en el diseño de oligonucleótidos ("primers") "universales", lo que facilita la amplificación de los ITS mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Quijada et al. 1997).

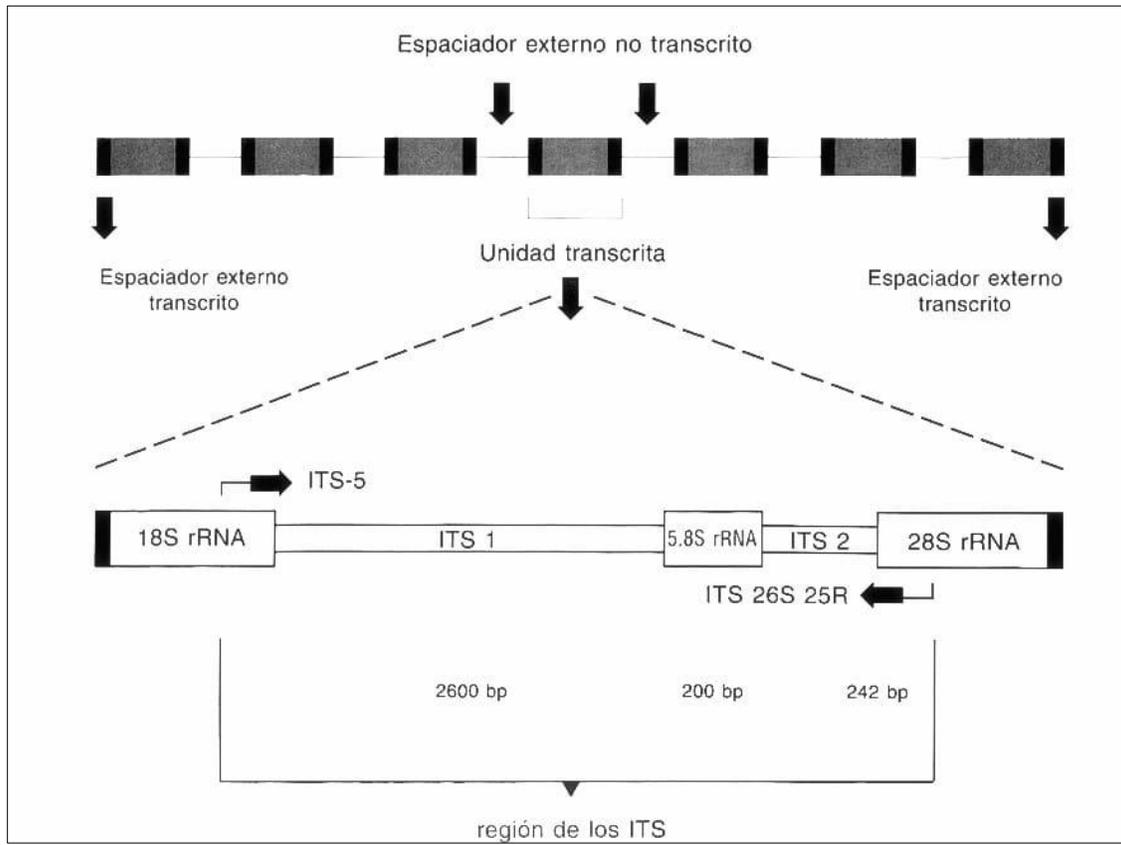


Figura 5. Representación de los espaciadores internos transcritos (ITS) en el ADN ribonuclear (nrADN) presentes en eucariotas.

4. METODOLOGÍA

4.1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Para la realización del estudio se visitaron seis sitios de cultivo de *I. suffruticosa* y entre ellos uno de *I. guatemalensis*, de los que se tomaron las muestras para sus respectivos análisis, ubicados en la Zona Occidental, Central y Oriental de El Salvador (figura 6).

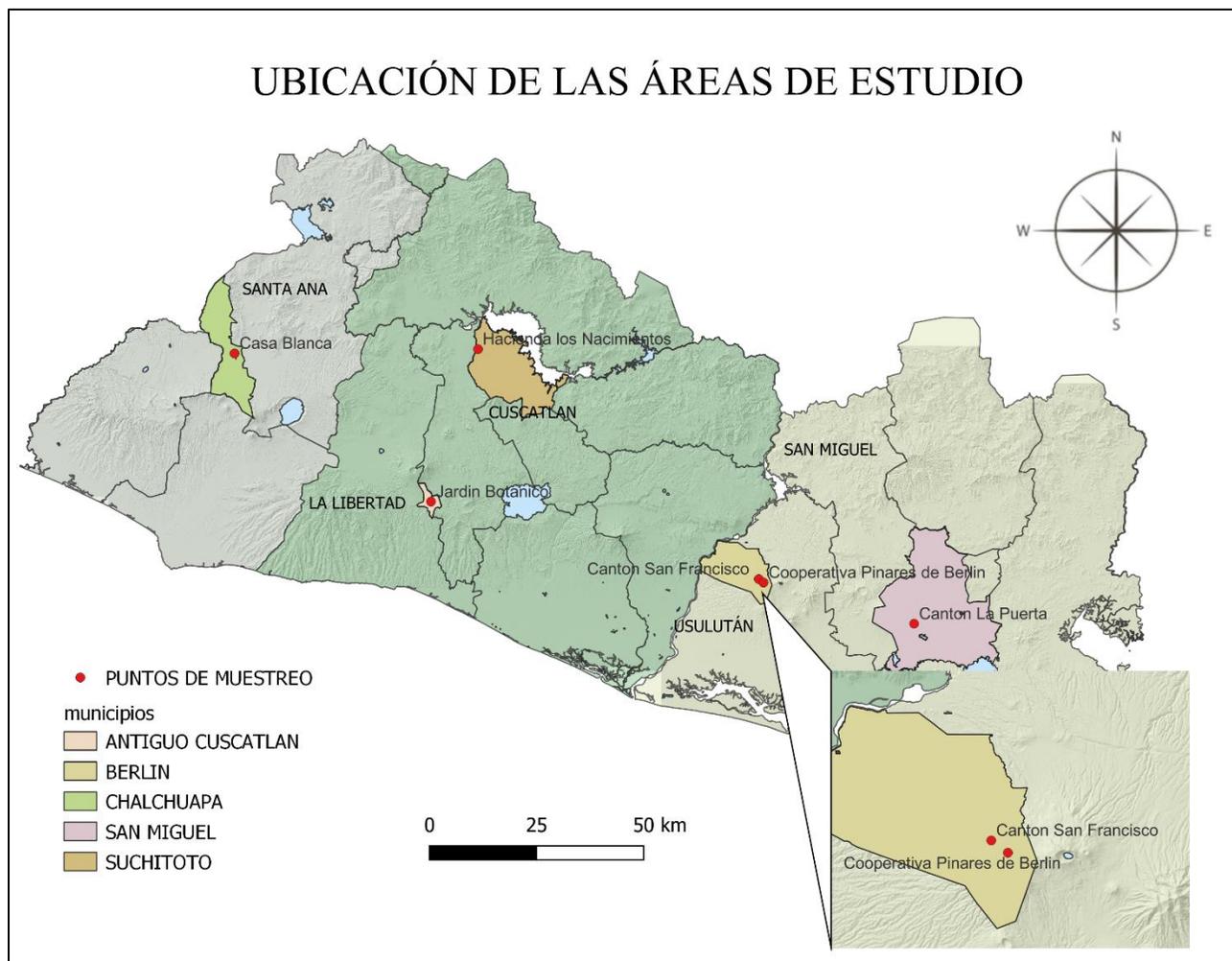


Figura 6. Ubicación de las diferentes áreas de muestreo, distribuidas en las diferentes zonas del país, destacando los puntos de muestreo en el municipio correspondiente (QGIS 3.24).

Las áreas de cultivo que facilitaron la recolección de las muestras se encuentran en:

Chalchuapa (Casa Blanca), Departamento de Santa Ana en las coordenadas: 13°59.34''N y 89°40.25''O, a 709 msnm.

Jardín Botánico La Laguna, Municipio de Antigua Cuscatlán, Departamento de La Libertad en las coordenadas: 13°40.1980' N y 89°14.8590' O a 809 msnm.

Hacienda Los Nacimientos: Municipio de Suchitoto Departamento de Cuscatlán en las coordenadas: 13°59.8910'N y 89°8.7890'O a 271 msnm.

Cantón San Francisco: Municipio de Berlín, Departamento de Usulután, en las coordenadas 13°30.1950' N, 88°32.5090' O a 972 msnm.

Cooperativa Pinares de Berlín: Cantón San Lorenzo, Municipio de Berlín, departamento de Usulután, en las coordenadas 13°29.7400' N y 88°31.8930' a 1,028 msnm.

Más una muestra control de la especie conocida comúnmente como *I. Guatemalensis* y llamada actualmente ***Indigofera micheliana* Rose**, Cantón la Puerta, Departamento de San Miguel en las coordenadas: 13°24.43''N y 88°12.44''O a 161 msnm (figura 6).

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Genética de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad de El Salvador ubicada en final avenida Héroes y Mártires del 30 de Julio, San Salvador, geográficamente ubicada a 13°43'12.06"N y 89°12'17.79"O.

4.2. FASE DE CAMPO

4.2.1. Recolecta de muestras.

Se seleccionó un total de 49 muestras de tejido de diferentes arbustos, 48 de *I. suffruticosa* y una de *I. Guatemalensis* que representa el grupo control, distribuidas en los seis sitios de muestreo, cumpliendo el criterio de: apariencia de hojas sanas y jóvenes no muy maduras o brotes muy tiernos, cortando por cada individuo de 7 a 10 hojas (dependiendo de la robustez de la hoja) las muestras se lavaron con agua limpia, se secaron y se guardaron en sobres de papel; colocándolas en un contenedor de plástico, donde se depositó el desecante (Humidex, agente controlador de humedad) así las hojas perdieron humedad, evitando que se contaminaran con hongos o bacterias, conservándose para posteriormente procesarlas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador.

Las muestras de *I. suffruticos* e *I. guatemalensis* extraídas de los diferentes sitios de muestreo que utilizaron para los respectivos análisis fueron identificadas por el curador del herbario del Jardín

Botánico LAGU (Asociación Jardín Botánico La Laguna) Licenciado Dagoberto Rodríguez Delcid, además de haber ingresado muestras representativas de las especies a dicho herbario (anexo 4).

4.3. FASE DE LABORATORIO

4.3.1. Macerado de las hojas.

El tejido vegetal totalmente deshidratado, se sacó de los sobres y se colocó en un mortero, se maceró con nitrógeno líquido hasta pulverizarlo, al obtener el tejido macerado, se guardó en tubos Eppendorf de 1.5 ml debidamente rotulados a -20°C en un freezer para conservarlos en buen estado, esto permitió realizar una buena extracción de ADN posteriormente.

4.3.2. Aislamiento de ADN genómico.

Para el aislamiento genómico se utilizó la metodología que consistía en la optimización de la extracción de ADN a partir de tejidos foliares frescos de una fabácea (Borges et al. 2012) con algunas modificaciones.

1. De cada una de las muestras de tejido pulverizado con nitrógeno líquido, se tomaron 50 mg de cada una de las muestras preservadas y se colocaron en tubos cónicos para reacciones químicas de 1.5 mL respectivamente.
2. Luego se le agregaron 700 µL del tampón de extracción (solución de extracción que consiste en: 1% de PVP; NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8.0; 2% de CTAB; 2% de 2-mercaptoetanol y 1 % proteinasa K).
3. Las muestras de tejido foliar se incubaron a 65 °C durante 30 minutos; dichos tubos se invirtieron cada 10 min, 10 veces. Luego se dejaron enfriar por 5 minutos antes del siguiente paso.
4. Se añadió un volumen de 700 µL de alcohol cloroformo-isoamílico 24: 1 (v/v), los microtubos se invirtieron 10-20 veces.
5. Los microtubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos.
6. Se transfirió cuidadosamente 500 a 450 µL de la fase sobrenadante y se colocó en otro tubo Eppendorf de 1,5 mL, a la que nuevamente se extrajo el ADN con 500 µL de CI con el respectivo ciclo de centrifugado.

7. De la fase sobrenadante se pipetearon de 450 a 400 μL , que se depositaron en un nuevo tubo cónico de reacciones químicas. Los ácidos nucleicos se precipitaron agregando dos tercios del volumen en frío al 95% de isopropanol.
8. Dejándolos reposar a 15 °C por 30 minutos, dando lugar a una mejor precipitación.
9. Luego, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.
10. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó con 1 mL de etanol al 70% y una vez en frío 90% de etanol y se dejó que evaporaran los tubos por una hora.
11. El sedimento se resuspendió en 50 μL de agua ultrapura (aunque algunas veces se usó tampón TE dando el mismo resultado). Luego, se realizó un tratamiento con RNasa a cada grupo del material extraído (tratando a cada muestra con: 20 μL de RNasa, incubados a 37°C por 30 minutos, luego se agregó 5 μL de acetato más dos volúmenes de alcohol al 70%, se centrifugó por 5 minutos y decantó, se volvió a lavar con etanol al 70%; por último, el sedimento se resuspendió en 50 μL de agua ultrapura).
12. Una alícuota de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). que contenía 0,5 μg / mL de GelRed, ayudando a revelar la integridad y pureza del ADN extraído.
13. Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C (Borges et al. 2012).

4.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la región ITS2.

Para la Reacción en Cadena de la Polimerasa, se utilizó un cebador estándar que forman parte de la metodología DNA Barcod, usado ampliamente para estudios genéticos e identificación de especies vegetales como es el caso de la región ITS2, que se ha empleado en este estudio y como también lo propone Fazekas et al (2012) en su trabajo: Métodos de código de barras de ADN para plantas terrestres. La región, nombre, secuencia y dirección de los *primers* se presenta en la tabla 2.

La cantidad total que se utilizó para la mezcla general de PCR fueron 25 μL , expresados de la siguiente manera: agua ultrapura 8.5 μL , Máster Mix: 12.5 μL , ADN: 3.0 μL , Reverse: 0.5 μL , Forward: 0.5 μL . Las condiciones del termociclador para ITS2 (AB101 / AB102) en sus etapas: iniciación 95 °C durante 3 min; desnaturalización 94 °C durante 0.30 min, alineamiento 59 °C durante 0.30 min, elongación 72 °C durante 0.45 min; extensión 72°C durante 10 min; extensión final 4°C, el resto del tiempo; en un total de 35 ciclos en un tiempo de 1 hora 34 minutos. Para una la reacción en cadena de la polimerasa, se tomaron dichas condiciones en función de la Master Mix utilizada “PROMEGA”,

establecidos en el certificado: PCR Master Mix Certificate of Analysis 9PIM750 (2016), realizando dichos ciclos en un termociclador MultiGene™ Mini.

Tabla 2. "Primer" comúnmente usado para Código de Barras de ADN en plantas, que sirve para el análisis de variabilidad genética en I. suffruticosa.

| Región | Nombre del Primer | Secuencia (5'-3') | Dirección |
|--------|-------------------|-------------------------------|-----------|
| ITS2 | AB101 | ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG | F |
| | AB102 | TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC | R |

4.3.4. Visualización del producto PCR.

Las amplificaciones obtenidas de la PCR fueron separadas mediante electroforesis, en un gel de agarosa a una concentración del 2.0% (p/v), al que se le adicionó 0.5 µL de la sustancia colorante GelRed®, con ayuda de una micropipeta de volumen variable; se corrió a 150 voltios por 15 minutos en solución amortiguadora SB (ácido bórico más bórax) a una concentración de 0.5X. El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó con la ayuda de un marcador de ADN comercial de 100bp DNA Ladder. Posteriormente se visualizaron y fotografiaron los geles revelados a través de luz ultravioleta en un sistema de documentación de geles DNR MiniBIS Pro®. Las amplificaciones se almacenaron en un freezer a una temperatura de -20°C.

4.3.5. Secuenciación.

La preparación de las muestras de ADN amplificadas que se usaron para la secuenciación, fueron organizadas de la siguiente manera: en una placa de 96 pozos se colocaron 20 µL de las amplificaciones, es decir, que en cada pozo, se colocó una alícuota de cada una de las muestras de las 49 en total que se procesaron mediante PCR, dicha placa fue sellada con una tira de 8 tapas por cada columna; que la aseguraban mientras fueron enviadas a la institución Macrogene Inc., a quien se le solicitó el servicio de secuenciación, que incluía una purificación previa de las muestras PCR, y el método que se utilizó fue el de secuenciación por electroforesis capilar, desarrollada por "Applied Biosystems", concretamente el modelo "3730XL". Los resultados de la secuenciación se descargaron en formato txt, en la web de la institución.

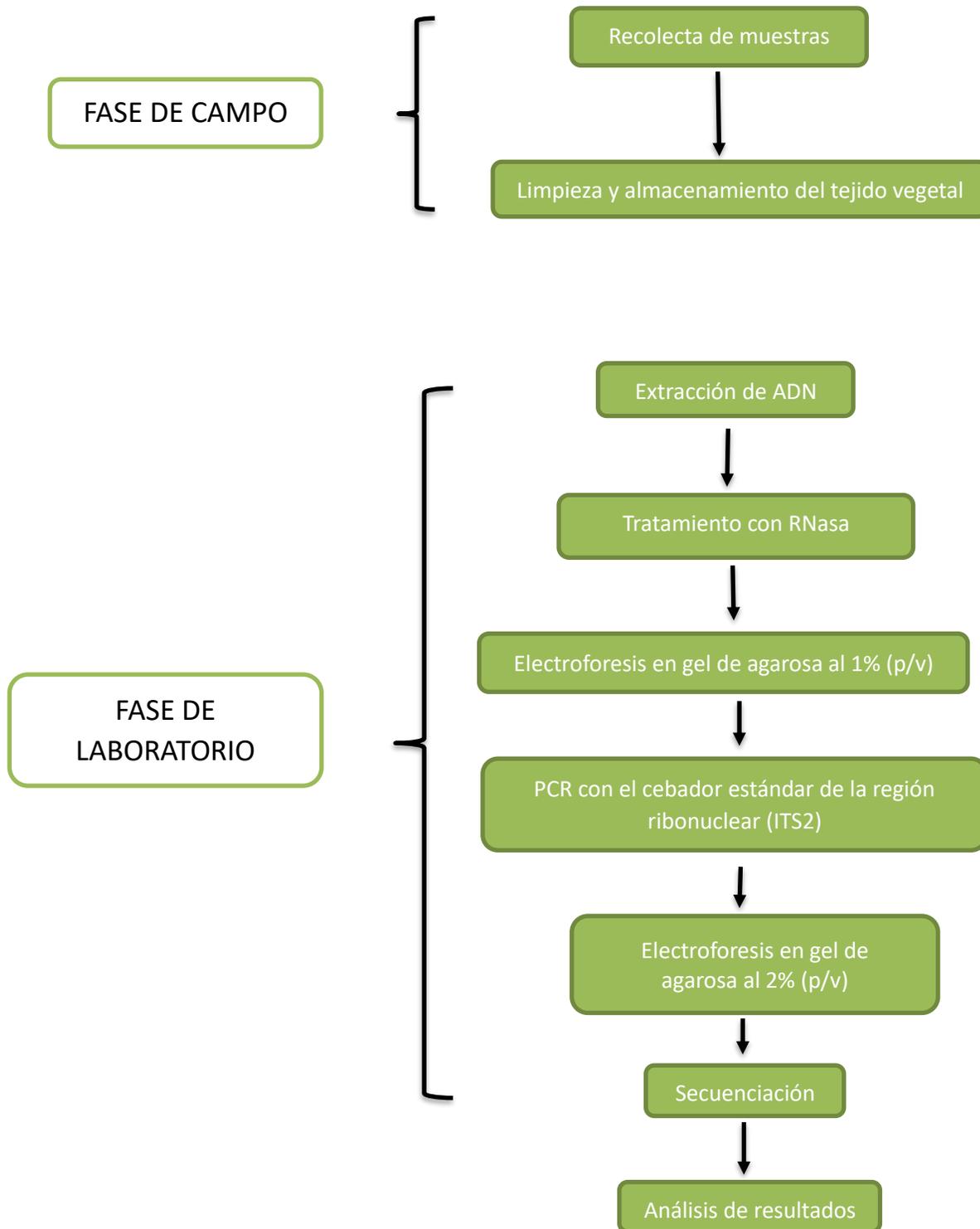


Figura 7. Síntesis de las principales etapas de la metodología para el procesamiento de las muestras del tejido vegetal, extracción, visualización, PCR y secuenciación usados en los diferentes análisis.

5. ANÁLISIS DE DATOS

5.1. EDICIÓN DE SECUENCIAS

Los electroferogramas de las secuencias de ADN fueron editadas por el programa bioinformático SnapGene® que mostraban el panorama gráfico del orden consecutivo de las bases, los datos generados por los picos pueden mostrar información sobre la calidad y limpieza, para considerar que un nucleótido tenía la calidad suficiente, se partió de los valores de calidad de 39 a 40 en adelante, un pico es tan alto como tan intensa sea su fluorescencia (un color por base, gráfica 1), con el que se puede determinar la calidad de los fragmentos, pudiendo eliminar los extremos de las secuencias no fiables con valores de baja calidad, dejando aquellas regiones mejor conservadas, posteriormente se descargó un documento en formato de texto FASTA con la secuencia para llevarla al siguiente paso.

Las secuencias de *I. suffruticosa* se compararon con secuencias depositadas en el banco de genes (GenBank) para confirmar la identificación de las especies, con la ayuda de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al. 1990) de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information).

5.2. ALINEAMIENTO

El alineamiento consistió en cargar el documento obtenido de la edición de secuencias en el programa bioinformático MEGA que permite cuantificar el grado de similitud del grupo de secuencias en estudio, además de poder cortar “Gaps” y generar la alineación con la implementación CLUSTALW integrada y el programa MUSCLE; al final se exportó en formato FASTA, para posteriores análisis en los diferentes programas bioinformáticos utilizados.

5.3. METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 11.0.11: con lo que se describió la historia evolutiva mediante el método UPGMA (método de grupos de pares no ponderados con media aritmética). Las distancias evolutivas se calcularon usando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio en el que se involucraron 48 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a+2^a+3^a sin codificación. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 317, pero sin los “Gaps” resultaron 315 posiciones en el conjunto de datos final.

5.4. ÍNDICES DE DIVERSIDAD GENÉTICA.

Para la interpretación de índices de diversidad genética se utilizó el software DnaSP (Polimorfismo de secuencia de ADN): programa bioinformático interactivo con el que se realizó el análisis de polimorfismo de ADN a partir de datos de secuencia de nucleótidos, se realizaron las estimaciones de las variaciones de secuencias de ADN dentro y entre las poblaciones.

La diversidad genética total y por localidad se estimó con la diversidad haplotípica (h = probabilidad de que dos haplotipos seleccionados al azar de una muestra sean diferentes) y la diversidad nucleotídica (π = número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias escogidas al azar; Nei 1987, usando el programa DnaSP. También se estimaron por localidad y en total, el número de sitios segregados o sitios polimórficos (S), el número promedio de las diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (K). También se realizó un análisis de la diferenciación genética entre poblaciones, en las que destacaron índices paramétricos haplotípicos y nucleótidos, con una estimación de flujo de genes y el coeficiente de diferenciación genética.

5.4.1. Análisis haplotípico.

PopART 1.7 (Análisis de población con árboles reticulados): programa bioinformático que ayudó a explicar los procesos de genética de poblaciones, en las variaciones encontradas de los diferentes grupos en estudio y edificar redes de haplotipos con las que se interpretaron relaciones genealógicas a nivel intraespecífico.

5.4.2. Análisis de varianza molecular (AMOVA).

AMOVA investiga la estructura génica de las poblaciones, con las varianzas de las frecuencias génicas y las mutaciones entre haplotipos moleculares. Un análisis de varianzas jerárquico parte la varianza total en componentes de covarianza debido a diferencias entre poblaciones, además de la variabilidad dentro y entre individuos de las poblaciones. Los componentes de covarianza se utilizan para estimar los índices de fijación.

Los índices de fijación (como los de F de Wrigth) se prueban utilizando las permutaciones no paramétricas (Excoffier and Lischer 2015) que consiste en permutar haplotipos, individuos o poblaciones, entre individuos, poblaciones o grupos de poblaciones. Al final de cada ronda de permutación y al estimar los estadísticos se puede obtener la distribución.

Para la interpretación de los resultados mediante el programa Arlequin 3.5 se procedió a realizar un flujo de trabajo: usando el programa RStudio se procesó el compendio de secuencias debidamente ajustadas en MEGA. Con el uso de comandos “Output” para generar el resumen del análisis AMOVA en un archivo final.

5.4.3. Estimación del índice de fijación por pares de población (F_{ST}).

Mide la reducción media de heterocigosis de una subpoblación relativa a la población total debida a la deriva genética entre subpoblaciones. Es, por tanto, una medida del grado de diferenciación genética existente entre subpoblaciones. Representa el porcentaje de la variación genética que es atribuible a las diferencias entre poblaciones. Varía entre 0 (no existen diferencias) a 1 (diferenciación completa, i.e., subpoblaciones fijadas para distintos alelos). Wright, S. (1969) sugirió unas pautas generales para la interpretación del F_{ST} , con las cuales:

$0 \leq F_{ST} < 0.05$ indica poca diferenciación genética.

$0.05 \leq F_{ST} < 0.15$ indicaría una diferenciación moderada.

$0.15 \leq F_{ST} < 0.25$ indicaría una gran diferenciación.

$0.25 \leq F_{ST}$ indicaría una diferenciación muy alta.

$$F_{ST} \text{ o índice de fijación: } F_{ST} = \theta = \frac{HT - HS}{HS}$$

Donde: HT = es la heterocigosis esperada de un individuo tomado al azar dentro del total de las poblaciones.

Dónde: HT= es la heterocigosis esperada de un individuo tomado al azar dentro del total de las poblaciones HS= es la heterocigosis media esperada en dicha población (Martínez 2008).

6. RESULTADOS

6.1. OBTENCIÓN DE LAS COLECCIONES DE TEJIDO FOLIAR Y ADN.

En el presente estudio se destinaron seis sitios de muestreo, distribuidos en las tres zonas del país ubicados en diferentes municipios; cada sitio de cultivo representó un grupo poblacional, de los que se pudo almacenar una colección de muestras del tejido foliar (tabla 3) a las que se les aplicó el protocolo de extracción CETAB sugerido por Borges et al. (2012) con modificaciones; las consideraciones que se tomaron en cuenta al determinar que el ADN observado en gel tenía una integridad adecuada para llevarlo a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue: presencia de banda bien definida en la parte superior del gel y un ligero “smear” (Martínez and Zapata 2007), como lo muestra la fotografía del gel de agarosa con corridas electroforéticas de extracciones de ADN del grupo poblacional Cantón San Francisco, los carriles 1, 2, 4 y 6 presentan bandas con mayor fluorescencia y se debe a que hay una mayor concentración de ADN a diferencia de los carriles 3, 5, 7 y 8 cuyas bandas son más delgadas debido a una menor concentración (figura 8).

Tabla 3. Procedencia, colección de individuos y cantidad de muestras favorables para PCR.

| Departamento | Municipio/ Cantón o sitio | Nº de individuos recolectados | Muestras favorables para-PCR |
|--------------|---|-------------------------------|------------------------------|
| Santa Ana | Chalchuapa (Casa Blanca) | 10 | 10 |
| La Libertad | Antiguo Cuscatlán (Jardín Botánico La Laguna) | 10 | 6 |
| Cuscatlán | Suchitoto (Hacienda los Nacimientos) | 10 | 10 |
| Usulután | Berlín (Cantón San Francisco) | 12 | 11 |
| Usulután | Berlín (Cantón san Lorenzo) | 12 | 11 |
| San Miguel | San Miguel (Cantón La Puerta) | 2 | 1 |

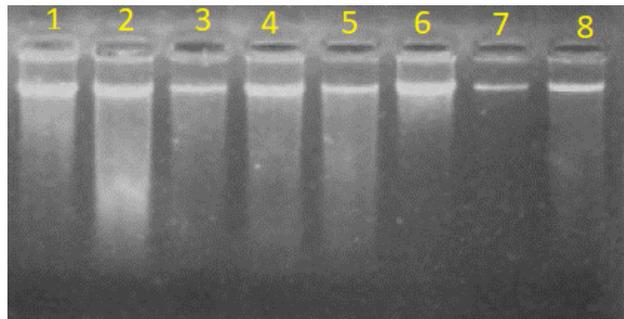


Figura 8. Visualización de 8 bandas de ADN corridas en gel de agarosa al 1% (p/v), pertenecientes al grupo poblacional Cantón San Francisco. Foto obtenida con el sistema de documentación de geles DNR MiniBIS Pro®.

6.2. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LA REGIÓN ITS2

De las extracciones realizadas, 49 fueron las que se usaron para ser procesadas mediante PCR de la región ITS2, y se revelaron a través de electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) que se observan en las siguientes imágenes (figuras 9.A y 9.B). Para determinar el peso molecular e indicar el número de pares de bases, se colocó una escalerilla de 100pb en el pozo 1; 2 y 3 son de control en la primer imagen (9.A), los carriles: 4, 5, 6, 7, 8 y 9 corresponden a producto PCR de la región ITS2 de muestras del Jardín Botánico; la segunda imagen (9.B) pozo 1 escalerilla, y carriles: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 corresponden al producto PCR de la región ITS2 en muestras de Cooperativa Pinares de Berlín; por lo tanto, la técnica utilizada produjo satisfactoriamente bandas bien definidas como consecuencia de la amplificación y el manejo correcto de los oligonucleótidos de la región de interés cuyo peso molecular es de 400 pb tal como lo muestra la corrida en gel.

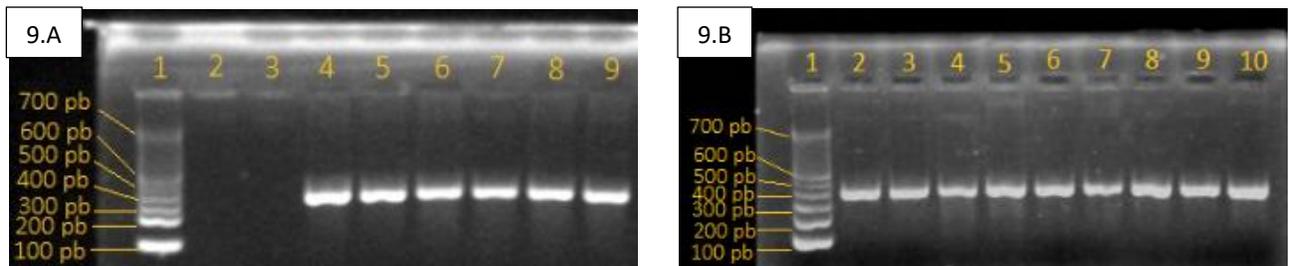
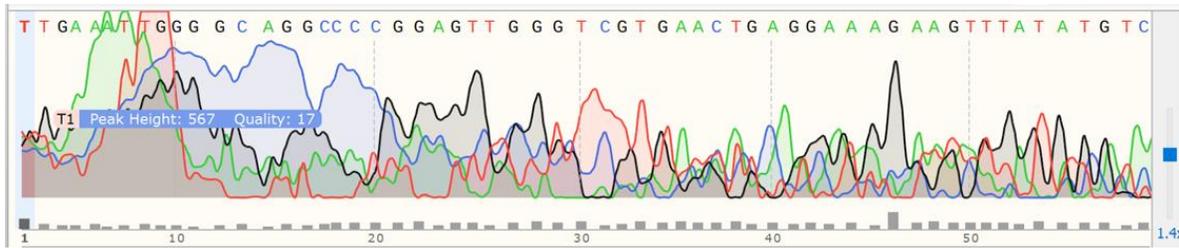


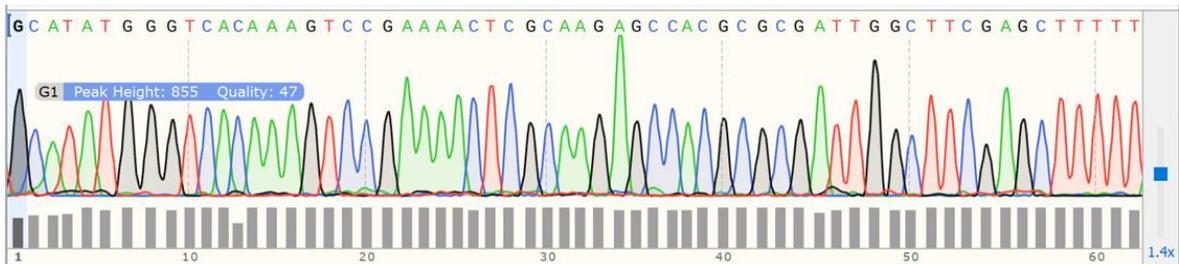
Figura 9A y 9B. Bandas en gels de agarosa al 2% (p/v) del producto PCR. fotos obtenidas mediante el sistema de documentación de gels DNR MiniBIS Pro®. 9.A muestras del Jardín Botánico y 9.B muestras de Cooperativa Pinares de Berlín.

6.3. PROCESO DE SECUENCIACIÓN

Del producto PCR obtenido, se secuenciaron 49 muestras, que fueron purificadas previamente, el método que se utilizó fue el de secuenciación por electroforesis capilar. Al descargar las secuencias en formato FASTA, se revisaron en el programa SnapGene mediante la visualización en cromatogramas; pero la primer secuencia que corresponde al grupo poblacional de Casa Blanca, no cumplió con los estándares de calidad como lo muestran las curvas de fluorescencia no mayores a 40 (gráfica 1), por tal razón, dicha secuencia no se incluyó en los demás análisis; a diferencia del resto, las 48 secuencias, mostraron valores óptimos en rangos de 39 a 40 en adelante (gráfica 2, secuencia 2 de Casa Blanca).



Gráfica 1. Resultado gráfico de secuenciación por electroforesis capilar, de muestra 1 correspondiente a Casa Blanca, desarrollada por Applied Biosystems modelo “3730XL” generado mediante el Software SnapGene®5.3.2.

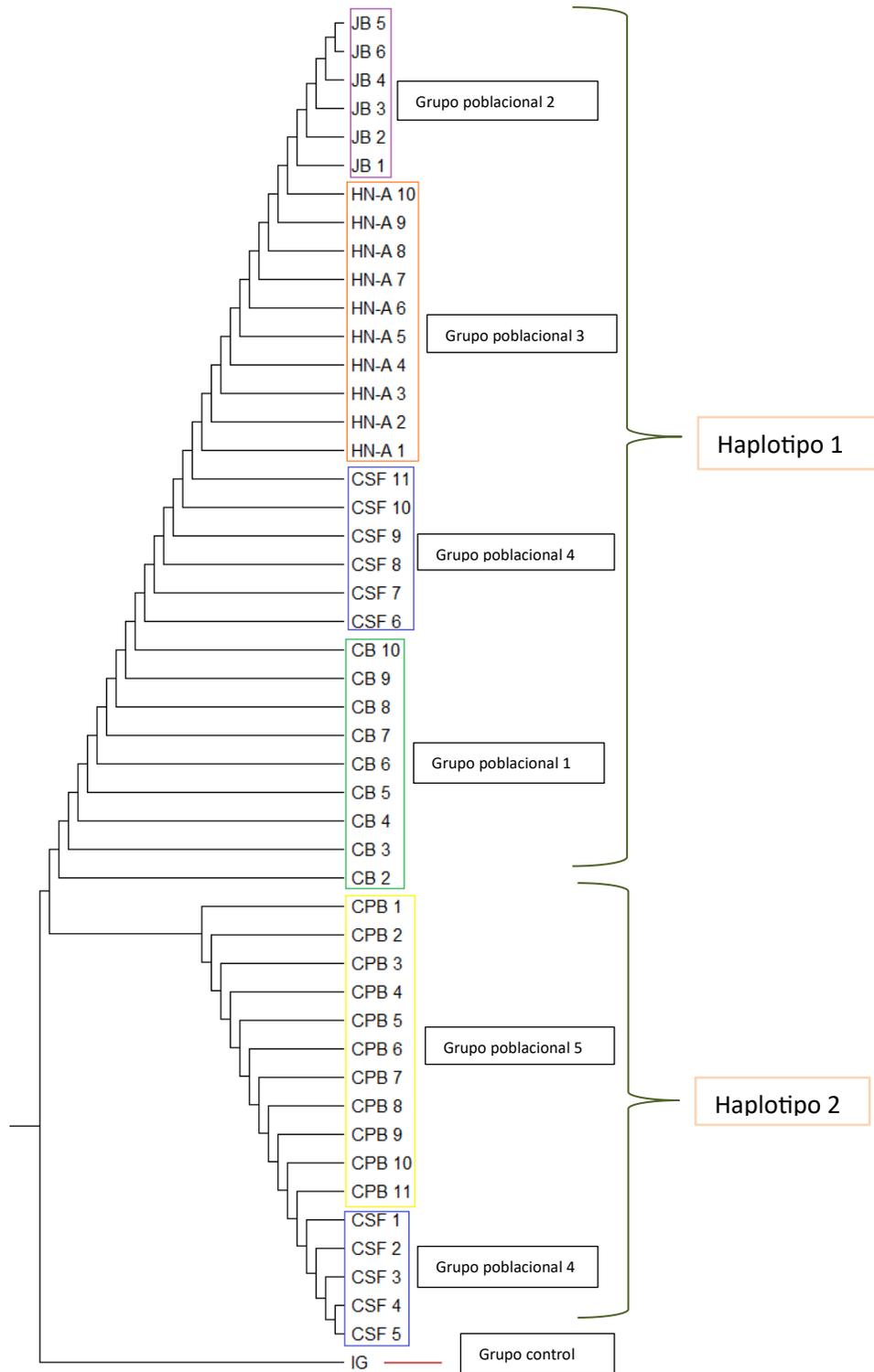


Gráfica 2. Resultado gráfico de secuenciación por electroforesis capilar, de muestra 2 correspondiente a Casa Blanca, desarrollada por Applied Biosystems modelo “3730XL” generado mediante el Software SnapGene®5.3.2.

6.4. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La historia evolutiva se infirió utilizando el método UPGMA, mostrando un árbol óptimo, en el que se observan tres grupos diferentes que subyacen de sus nodos; los tres agrupamientos están constituidos por las 48 secuencias nucleotídicas que representan los seis grupos que conforman las poblaciones en estudio: Casa Blanca (CB), Jardín Botánico (JB), Hacienda Los Nacimientos (HN-A), Cantón San Francisco (CSF), Cooperativa Pinares de Berlín (CPB) y San Miguel (IG) que representa el grupo control con la especie *I. guatemalensis*.

En la distribución de los dos haplotipos encontrados en los cultivos de *I. suffruticosa* (gráfica 3), el primer haplotipo destaca las secuencias más parecidas genéticamente, está representado por 31 secuencias nucleotídicas: nueve, pertenecen a CB (grupo poblacional 1), seis que corresponden a CSF (secuencias: 6, 7, 8, 9, 10 y 11, grupo poblacional 4), diez que integran a HN-A (todas del grupo poblacional 3) y seis de JB (grupo poblacional 2). El haplotipo dos está integrado por 16 secuencias pertenecientes a CSF (secuencias: 1, 2, 3, 4 y 5, grupo poblacional 4) y CPB (grupo poblacional 5). Entonces, entre los haplotipos 1 y 2, el número uno agrupa más secuencias parecidas genéticamente; siendo el grupo poblacional 4, el único que comparte secuencias con los dos haplotipos. El haplotipo 3, como es evidente corresponde a la especie *I. guatemalensis*.



Gráfica 3. Relaciones evolutivas de las 48 secuencias de nucleótidos de los cinco grupos poblacionales, más el grupo control, destacados en los diferentes cuadros de colores en los que se encuentran.

6.5. DIVERSIDAD GENÉTICA

6.5.1. Análisis de Diversidad Haplotípica.

La cantidad de haplotipos (**n**) encontrados en las poblaciones de *I. suffruticosa* pertenecientes a cultivos fue un total de dos, el primer haplotipo se encuentra en 4 grupos poblacionales (CB, CPB, HN-A y JB) y el segundo en el grupo poblacional de Cantón San Francisco (CSF). La diversidad haplotípica global (**Hd**) fue de 0.45883; de forma individual, únicamente la población del Cantón San Francisco presenta una diversidad haplotípica mayor a 0.0 de 0.54545. El número medio de diferencias de nucleótidos (**K**) ha sido de 1.37650 a nivel de poblaciones individuales, la población que manifestó tener mayor diferencia ha sido el Cantón San Francisco con un valor de 1.63636. La diversidad nucleotídica total (**π**) está representada por un valor de 0.00437; y de las cinco poblaciones de manera individual, únicamente el Cantón San Francisco refleja una diversidad nucleotídica de 0.00519, por lo tanto, es el que muestra mayor polimorfismo, a diferencia del resto que posee un notable valor de 0.0; con lo que se puede decir que estos cultivos presentan muy bajo polimorfismo en sus poblaciones (tabla 4).

Tabla 4. Diversidad genética por localidad de *I. suffruticosa*, basada en un segmento de 315 pb de la región ribonuclear ITS2. Las abreviaturas son: tamaño de la muestra (*n*), número de Haplotipos (*Hn*), diversidad Haplotípica (*Hd*), número promedio de las diferencias nucleotídicas por haplotipo (*K*), diversidad nucleotídica (*π*).

| Poblaciones | <i>N</i> | <i>Hn</i> | <i>Hd</i> | <i>K</i> | <i>π</i> |
|------------------------------------|-----------|-----------|-------------|-------------|--------------|
| Casa Blanca | 9 | 1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Cooperativa Pinares de Berlín | 11 | 1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Cantón San Francisco | 11 | 2 | 0.56 | 1.64 | 0.005 |
| Hacienda los Nacimientos Aguilares | 10 | 1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Jardín Botánico | 6 | 1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Total: | 47 | 2 | 0.46 | 1.38 | 0.004 |

6.5.2. Diferenciación genética entre poblaciones.

Según el modelo de Hudson et al. (1992) se realizó la diferenciación genética entre las poblaciones. Los primeros se basan en el valor $H_{ST} = 1 - (HS / HT)$, **HS** es el promedio ponderado de la diversidad haplotípica de las subpoblaciones y **HT** es la estimación de la diversidad haplotípica de la población

total. Y para las conjugaciones: CB/CPB, CB/HNA, CB/JB, CPB/HNA, CPB/JB, HNA/JB existe una nula diversidad haplotípica por cada par conjugado; en los pares siguientes: CB/CSF (0.30682), CPB/CSF (0.27273), CSF/HNA (0.28877), CSF/JB (0.37762) se observan cifras significativas con las que se constata que de igual manera en los análisis anteriores, la población que aporta mayor diversidad es la del Cantón San Francisco cuando se relaciona con cualquiera de las diferentes poblaciones y la que representa mayor diversidad se encuentra en Cantón San Francisco versus Jardín Botánico.

También se estimó el valor de $K_{ST} = 1 - (KS / KT)$, donde **KS** es el promedio ponderado de K1 y K2 (número promedio de las diferencias entre las secuencias en subpoblaciones 1 y 2, respectivamente) y **KT** es el promedio de las diferencias entre dos secuencias de la muestra total (Hudson et al. 1992). En el coeficiente de diferenciación genética (**G_{TS}**), cinco de los pares combinados están en valores de 1.0, es decir son los más diferenciados, siendo el menos diferenciado CSF/JB con 0.19. Para el coeficiente de diferenciación genética (**F_{ST}**) entre las poblaciones relacionadas seis de ellas presentan poca diferenciación, una de ellas indica una diferenciación moderada y tres conjugaciones presentan una diferenciación muy grande, esta relación indica que la diferenciación genética en general es predominantemente baja (tabla 5).

Tabla 5. Diversidad genética entre poblaciones de I. suffruticosa, basada en los 315 pb de la región ribonuclear ITS2. Representada en los siguientes parámetros: promedio ponderado de la diversidad haplotípica de las subpoblaciones (HST), promedio ponderado de K1 y K2 (KST), Diferenciación genética entre poblaciones (GST) y coeficiente de diferenciación genética (FST).

| POBLACIONES | HST | KST | GST | FST |
|-------------|---------|---------|---------|----------------|
| CB/CPB | 0.00000 | 0.00000 | 1.00000 | 1.00000 |
| CB/CSF | 0.30682 | 0.90000 | 0.23107 | 0.40000 |
| CB/HNA | 0.00000 | 0.00000 | 1.00000 | 0.00000 |
| CB/JB | 0.00000 | 0.00000 | 1.00000 | 0.00000 |
| CPB/CSF | 0.27273 | 0.81818 | 0.33333 | 0.50000 |
| CPB/HNA | 0.00000 | 0.00000 | 1.00000 | 1.00000 |
| CPB/JB | 0.00000 | 0.00000 | 1.00000 | 1.00000 |
| CSF/HNA | 0.28877 | 0.85714 | 0.24103 | 0.40000 |
| CSF/JB | 0.37762 | 1.05882 | 0.19411 | 0.40000 |
| HNA/JB | 0.00000 | 0.00000 | 1.00000 | 0.00000 |

6.5.3. Análisis de Haplotipos.

5.5.3.1 Red de Haplotipos.

En la figura 10, cada círculo representa un haplotipo, el tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de las secuencias que se encuentran en él, por tal razón el círculo más grande es el haplotipo uno; el análisis filogenético confirma que en el haplotipo uno se encuentran cuatro poblaciones (colores: morado CSF, rojo CB, rosado JB y amarillo HN-A) que reúne 31 secuencias, el haplotipo dos posee 16 secuencias conformadas por los grupos CPB (color verde) y CSF (morado); el haplotipo tres representa únicamente la secuencia de la especie *I. guatemalensis* (color ocre).

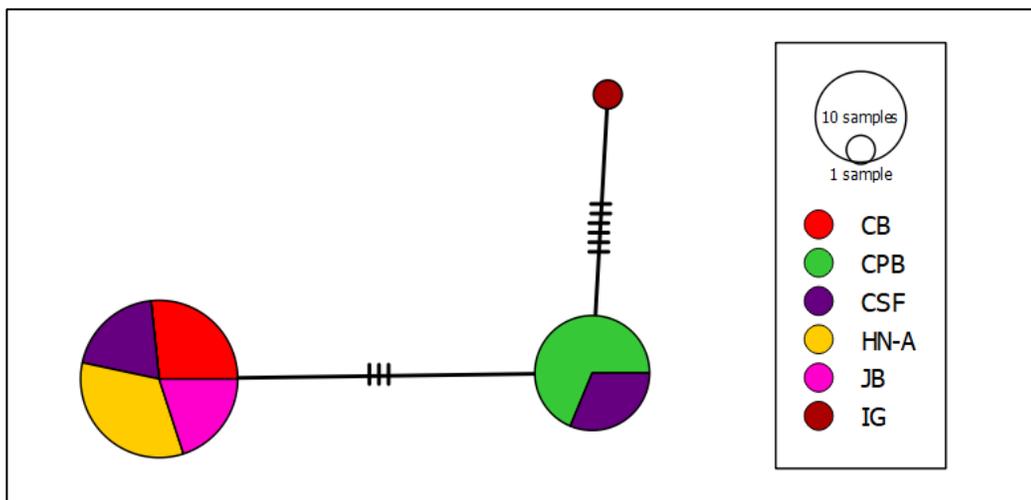


Figura 10. Red de haplotipos con secuencias de *I. suffruticosa* de seis sitios de cultivo distribuidos en las tres zonas del país, construida en PopART 1.7 con la red de unión mediana usando un segmento de 315 pb de la región ribonuclear ITS2, cada círculo representa un haplotipo, cada color una localidad y las líneas representan los pasos mutacionales.

5.5.3.2 Distribución Geográfica de Haplotipos.

El haplotipo uno denominado así por poseer la mayor cantidad de secuencias, se encuentra distribuido en cuatro sitios de muestreo (figura 11), esto se traduce a que ha tenido mucho más tiempo disponible distribuyéndose en las diferentes regiones de cultivo de dicha planta; caso contrario el haplotipo dos que se denomina más reciente y solo se encuentra en dos sitios de muestreo, están relativamente cerca y en la Zona Oriental, Este haplotipo resulta ser privado para dicha zona del país por no haber tenido las mismas facilidades de dispersión, por ende menos

utilizado para fines agrícolas. Y el haplotipo tres como especie control perteneciente a la Zona Oriental.



Figura 11. Distribución geográfica de haplotipos en los sitios de cultivos, construida en PopART 1.7 en vista de mapa usando un segmento de 315 pb de la región ribonuclear ITS2.

6.5.4. Diseño y resultados de AMOVA.

Para determinar cómo está repartida la variación genética se realizó la prueba de AMOVA para 3 sitios segregantes o polimórficos, que se han estimado mediante los análisis de variabilidad genética. Este análisis reveló una notable diferenciación en el índice de variación porcentual de **77.15 %** de la variación genética repartida entre individuos de las poblaciones; mientras que el **22.85 %** se debe a variaciones dentro de las poblaciones. Por lo tanto, se mostró que la mayoría de la variación genética observada reside en las diferencias entre las poblaciones y menos diferencias dentro de las poblaciones (tabla 6).

Tabla 6. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de 47 secuencias de *I. suffruticosa* de cinco sitios de cultivo, mediante los programa RStudio Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer 2015).

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Componentes de la varianza | Variación porcentual |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|----------------------|
| Entre la población | 46.956 | 0.62067 | 77.15 % |
| Dentro de las poblaciones | 16.364 | 0.18386 | 22.85 % |
| Total | 63.319 | 0.80453 | 100% |

6.5.5. Estimación del índice de fijación por pares de población (F_{ST}).

La matriz de distancia génica que está en la tabla 7, muestra los resultados que surgieron al medir el grado de diferenciación genética entre las diferentes poblaciones, según las estimaciones con las que se puede catalogar la diferenciación genética, existen tres pares de poblaciones que tienen un valor F_{ST} de 1.0 (CPB/CB, HN-A/CPB y JB/CPB), por lo tanto su diferenciación es muy alta; los valores de F_{ST} de 0.5 (CSF/CPB), 0.4 (CSF/CB y HN-A/CSF respectivamente), 0.35 (JB/CSF) también aportan una diferenciación genética muy alta; se evidencian tres pares de poblaciones (HN-A/CB, JB/CB y JB/HN-A) que reflejan una estimación del F_{ST} de 0.0 cuya diferenciación genética resulta ser poca.

Los valores de P en la prueba de significancia basada en 1,023 permutaciones, en los diez casos posibles de las comparaciones, seis de ellos presentan valores significativos, deduciendo que en la mayoría de los casos conjugados la variación ocurre más entre algunas poblaciones.

Tabla 7. Método de distancia: diferencia por pares de las 5 poblaciones utilizando los programas RStudio® y Arlequin 3.5, para determinar el índice de fijación (F_{ST}). Sobre la diagonal valores de P y bajo la diagonal valores F_{ST} , CB: Casa Blanca, CPB: Cooperativa Pinares de Berlín, CSF: Cantón San Francisco, HN-A: Hacienda Los Nacimientos Aguilares, JB: Jardín Botánico. *: valores de $p < 0.05$.

| POBLACIONES | CB | CPB | CSF | HN-A | JB |
|--------------------------------------|---------|--------------|----------------|----------------|--------------|
| CASA BLANCA | - | *0.00 | *0.0105 | 0.0994 | 0.0994 |
| COOPERATIVA PINARES DE BERLÍN | 1.00000 | - | *0.0023 | *0.00 | *0.00 |
| CANTON SAN FRANCISCO | 0.40091 | 0.52381 | - | *0.0062 | 0.0457 |
| HACIENDA LOS NACIMIENTOS | 0.00000 | 1.00000 | 0.41515 | - | 0.099 |
| JARDIN BOTÁNICO | 0.00000 | 1.00000 | 0.35135 | 0.00000 | - |

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Siguiendo los criterios sugeridos por Martínez y Zapata (2007) para una debida evaluación de los ácidos nucleicos extraídos en muestras de tejido vegetal y llevarlos a una correcta aplicación de técnicas moleculares, se pudo determinar que las bandas del ADN extraído de *I. suffruticosa* cumplieron con un estándar óptimo (presencia de banda bien definida en la parte superior del gel y un ligero “smear”), por lo tanto, se comprobó que la extracción de ADN genómico y amplificación aportaron buenos resultados en la secuenciación del material genético del grupo poblacional 1 Casa Blanca: con 10 muestras, grupo poblacional 2: Jardín Botánico con 6 muestras, grupo poblacional 3: Hacienda los Nacimientos con 10 muestras; grupo poblacional 4: Cantón San Francisco con 11 muestras; grupo poblacional 5: Cooperativa Pinares de Berlín con 11 muestras, más la muestra perteneciente a la especie *I. guatemalensis*, haciendo un total de 49 muestras procesadas por PCR, que fueron utilizadas para la secuenciación, 48 de ellas cumplieron con los estándares requeridos para la aplicación de los diferentes índices, sin embargo la primer muestra del grupo poblacional 1 Casa Blanca, fue excluida por no cumplir requisitos esperados como lo muestra el gráfico 1.

Las poblaciones de *I. suffruticosa* estudiadas presentan un alto flujo genético, esto se puede explicar por la alta movilidad del germoplasma debido a un proceso de selección artificial constante en las diferentes zonas de cultivo, revelados por los valores generales muy bajos de diversidad haplotípica ($H_d = 0.46$) y nucleotídica ($\pi = 0.004$); y, por consiguiente, una variabilidad genética baja. Estos valores están asociados a procesos endogámicos y de autopolinización típicos de sistemas de monocultivos, como también lo describe Ruíz et al. (2018) en su estudio de variabilidad genética en especies cultivadas y silvestres de amaranto, en la que discute datos de baja diversidad genética producida por el alto porcentaje de autopolinización.

Sin embargo, al comparar la diversidad genética por localidad en el caso del Cantón San Francisco, presenta valores de diversidad haplotípica ($H_d = 0.56$) y nucleotídica ($\pi = 0.005$) mayormente significativos frente a los demás datos y la presencia de dos haplotipos, esto es, por que a diferencia de las demás poblaciones este germoplasma se ha tomado de su medio silvestre y ha sido incorporado a sistemas agrícolas más recientes en zonas rurales (como atestiguan los agricultores de dicho sitio) debido a la necesidad de diversificar cultivos para mejorar sus ingresos económicos. La diversidad genética “entre” poblaciones según los parámetros establecidos de diversidad

haplotípica (Hst) con la destacada diferencia que ofrece Cantón San Francisco al relacionarlo con cualquier otro grupo poblacional (CB/CSF (0.30682), CPB/CSF (0.27273), CSF/HNA (0.28877), CSF/JB (0.37762)) aporta datos con mayor significado debido a sus diferenciados rasgos genéticos que conservan las plantas que no han sido utilizadas para cultivos; en el caso del índice de diferenciación genética F_{ST} representado en la Tabla 5, es predominantemente baja es decir que solo tres de las diez conjugaciones de pares de poblaciones aportan datos de diferenciación genética muy notable, esto es destacable al reconocer que dichas poblaciones a nivel genético son bastante homogéneas.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza molecular (AMOVA) que se realizó a las cinco poblaciones, destacan que el mayor porcentaje de variabilidad se detectó entre poblaciones (77.15%), a diferencia de la variación dentro de las poblaciones que ha sido menor (22.85%), lo anterior puede esperarse ya que niveles bajos de varianza molecular dentro de poblaciones tiene como consecuencia diversidad haplotípica baja, como ya lo reflejan los análisis de índices de diversidad genética. La baja diversidad genética podría deberse a la autopolinización, sistema de reproducción propios de *I. suffruticosa*; esto también ha ocurrido en cultivos con otras especies como *Indigofera tinctoria* L. al realizar la comparación con el estudio de Diversidad genética de *I. tinctoria* L. en las islas de Java y Madura, basado en marcadores de repetición de secuencia intersimple (Hariri et al. 2017b), el análisis de varianza molecular mostró que el 63% de la variación genética residía entre las poblaciones, mientras que el 37% residía dentro de la población. Por tal razón, a esta baja diversidad se le atribuye a que las plantas autopolinizantes comúnmente exhiben una menor variación genética dentro de su población que entre las poblaciones.

Al realizar la estimación del índice de fijación por pares de población (F_{ST}) se ha encontrado claramente diferenciación genética muy alta, por ejemplo, para los casos de Cooperativa Pinares de Berlín y Casa Blanca; Hacienda Los Nacimientos y Cooperativa Pinares de Berlín con un $F_{ST}=1.0$; y Cantón San Francisco con Casa Blanca con un $F_{ST}=0.4$. Al parecer entre mayor sea la distancia geográfica mayor ha sido la diferenciación genética; coherente con lo anterior en el caso de Hacienda los Nacimientos y Casa Blanca se ha encontrado un $F_{ST}=0.00$ resultó ser poca, debido a que geográficamente se encuentran más cerca. Sin embargo y contrario a lo anterior, en el caso de El Cantón San Francisco y Cooperativa Pinares de Berlín muestran alta diferenciación genética $F_{ST}=0.5$ aunque dichos cultivos se encuentran en una misma zona geográfica, esto se debe a que existe un flujo génico menor y partiendo del hecho que provienen de grupos haplotípicos diferentes y uno en

común, dichos cultivares están tan diferenciados genéticamente por que el germoplasma no se está mezclando, y aunque se encuentren geográficamente cercanos están a una distancia tal que no es posible intercambiar material genético por medios naturales.

La topología de la red de la figura 10 muestra tres haplotipos, el haplotipo uno se encuentra presente en la mayoría de las secuencias, además está en casi todas las regiones muestreadas, por tal razón se considera el más usado para fines de cultivo, por lo tanto, ha sido sometido a una presión de selección artificial para la producción agrícola, lo que le ha permitido tener un mayor desplazamiento o flujo génico. Al pasar al haplotipo dos se observan tres pasos mutacionales por lo que se deduce probablemente un proceso de expansión reciente tal como lo muestra también la genealogía en el Dendrograma (gráfica 3) que geográficamente se encuentra en un único departamento en la zona oriental, denominado haplotipo privado. La dinámica entre los dos haplotipos plantea la hipótesis que el haplotipo uno ha sido utilizado en la agricultura salvadoreña por más tiempo que el haplotipo dos, por cuanto la frecuencia del H1 es mayor que la del H2. Existen seis pasos mutacionales entre el haplotipo dos de la especie *I. suffruticosa* y haplotipo tres de la especie *I. guatemalensis*, este es un dato muy importante pues se deduce que son más cercanos y revelan que para el evento de especiación solo se necesitó el doble de pasos mutacionales que dividen los haplotipos uno y dos. Es importante mencionar que esta interpretación debe restringirse a la región del gen ITS2 evaluada en este estudio, pero plantea claramente la necesidad de realizar más estudios de este tipo con el uso de otros marcadores moleculares.

8. CONCLUSIÓN

El protocolo de extracción de ADN de tejido vegetal usado en hojas de *I. suffruticosa*, demostró ser favorable, facilitando la amplificación de la región ribonuclear ITS2 mediante PCR, dando como resultado una secuenciación exitosa que permitió la realización de los demás análisis.

Los valores dados sobre diversidad haplotípica y nucleotídica resultaron ser bajos, debido a la alta movilidad del germoplasma, propiciado por la selección artificial, lo que explica su baja variabilidad genética en la mayoría de las poblaciones.

Los análisis realizados a las diferentes poblaciones de cultivos de *I. suffruticosa*, hablan de una baja variabilidad genética y la presencia de muy pocos haplotipos. Esto indica una notable disminución de la diversidad genética en el germoplasma usado en este rubro por el hecho de ser monocultivos y estar expuestos a eventos de autopolinización, además de la presión de selección artificial.

La baja diversidad genética observada también fue comprobada con el AMOVA realizado, al saber que la mayor variabilidad genética reside entre poblaciones, y la menor variación se detectó dentro de las poblaciones; por lo tanto, niveles bajos de varianza molecular dentro de poblaciones es consecuencia de diversidad haplotípica baja.

La diferenciación genética dada por el índice de fijación por pares de población (F_{ST}) revela que, entre mayor sea la distancia geográfica en la que se encuentren las poblaciones de cultivos, la diferenciación genética será mayor y viceversa; pero en el caso de Cantón San Francisco y Cooperativa Pinares de Berlín existe una diferenciación genética alta a pesar de que se ubican en una región geográfica relativamente cercana, esto ocurre porque posiblemente entre ellas no existe una facilidad flujo génico.

Se encontraron dos haplotipos de la especie *I. suffruticosa*, concluyendo que el haplotipo uno ha sido mayormente usado en la agricultura salvadoreña por estar mayormente distribuido, dicho germoplasma conserva las cualidades óptimas para la producción del tinte. En cambio, el haplotipo dos encontrado solamente en la zona oriental, ha sido tomado del medio silvestre e incorporado de manera más reciente a cultivos. Por tal razón es importante conocer características genéticas que puedan ser usadas en conveniencia como de conservación.

9. RECOMENDACIONES

- Continuar y priorizar investigaciones mediante la técnica barcoding para plantas e incluir diferentes tipos de marcadores moleculares en *I. suffruticosa*, para la obtención de nuevos datos e incrementar su valor en la identificación de loci asociados con características cuantitativas que puedan resultar de valioso interés y conocimiento sobre el estado genético de la planta en el país.
- Realizar investigaciones en especies que no procedan de cultivos y cultivadas de *I. suffruticosa* e incluir más sitios de muestreo de diferentes áreas geográficas del país, con una mayor cantidad de accesiones para ampliar el conocimiento sobre el estado genético de dicha planta y tener un mejor manejo para fines agrícolas como de conservación.
- Diseñar planes de mejoramiento para la producción de añil en estado de cultivo, correlacionando el porcentaje de indigotina con los diferentes haplotipos encontrados de la especie *I. suffruticosa*.
- Rastrear el origen de *I. suffruticosa* mediante técnicas moleculares, muestreado poblaciones silvestres, con el fin de conocer su ancestro común y relacionarlo con su forma de distribución.
- Diseñar programas de conservación que involucren la agroecología rural como sector valioso en los que se conservan in situ reservas de germoplasma tradicional no solo de la especie *I. suffruticosa* sino también otros diferentes géneros que son usados para la producción del añil.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahuja MR, Jain SM. 2015. Diversity and Erosion in Plants. Indicators and Prevention. Botany Department, M.L. Sukhadia University, Udaipur, Rajasthan, India.
- Alharbi SA, Al-Qthanin RN. 2020. New records of *Indigofera cordifolia* Heyne ex Roth. (Fabales: Fabaceae) in Saudi Arabia based on morphological and molecular evidence. *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*.
- Aranguren-Méndez JA, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión.
- Arenivar B, Gutierrez C. 2009. Diseño de estrategia para mejora de procesos de industrialización y diversificación de productos del cacao en la asociación cooperativa de producción agrícola hacienda “la carrera”, en el Departamento de Usulután”. [San Salvador, el salvador]: Universidad “Dr. José Matías delgado” facultad de agricultura e investigación agrícola “Julia Hill de O’sullivan” Maestria en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Azofeifa-Delgado - 2006 - Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaci.pdf. Azofeifa-Delgado Á. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agrón Mesoam.
- Borges DB, Amorim MB, Waldschmidt AM, Mariano-Neto E, Vivas CV, Pereira DG. 2012. Methodology Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). *Genet Mol Res*.
- CABI. 2018. *Indigofera suffruticosa* (Anil índigo).

- Cabrero J, Camacho JPM. 2009. Evolución La base de la Biología. Manuel Soler, editor.
- Calderón S, Stanley PC. 1941. Flora salvadoreña: lista preliminar de plantas de El salvador. 2a. edición notablemente corregida y aumentada. San Salvador: Imprenta Nacional.
- CARRERA, A.; HELGUERA, M.; PICCA, A. & SALOMÓN, N. (2004) "Marcadores moleculares". En Echenique, V.; Rubinstein, C. & Mroginski, L. (Ed). Biotecnología y Mejoramiento vegetal. Buenos Aires: Ediciones INTA.
- Chanayath N, Lhieochaiphant S, Phutrakul S. Pigment Extraction Techniques from the Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and Chemical Structure Analysis of Their Major Components.
- Chauhan V, Subramaniam S, Pandey A. 2013. Relationships of Indian *Indigofera* L. (Fabaceae) based on ITS Sequences of nuclear ribosomal DNA. *Phytomorphology: An International Journal of Plant Morphology*.
- Choi H-K, Luckow MA, Doyle J, Cook DR. 2006. Development of nuclear gene-derived molecular markers linked to legume genetic maps. *Mol Genet Genomics*.
- Delgado Dr. JM. Trabajo de graduación "Diseño de estrategia para mejora de procesos de industrialización y diversificación de productos del cacao en la asociación Cooperativa de Producción Agrícola Hacienda 'La Carrera', en el Departamento de Usulután."
- Eguiarte LE, Aguirre-Liguori JA, Jardón-Barbolla L, Aguirre-Planter E, Souza V. 2013. Genómica de Poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP Revista especializada en ciencias químico-biológicas*.
- Excoffier L, Lischer. 2015. Arlequin 3.5. Instituto Suizo de Bioinformática: Institute of Ecology and Evolution University of Berne.

- Fan Y, Zhang C, Wu W, He W, Zhang L, Ma X. 2017. Analysis of Genetic Diversity and Structure Pattern of *Indigofera Pseudotinctoria* in Karst Habitats of the Wushan Mountains Using AFLP Markers. *Molecules*.
- Fazekas AJ, Kuzmina ML, Newmaster SG, Hollingsworth PM. 2012. DNA Barcoding Methods for Land Plants. In: Kress WJ, Erickson DL, editors. *DNA Barcodes*. Vol. 858. Totowa, NJ: Humana Press. p. 223–252.
- Galán P. 2020 Jul 15. DIEZ NUEVOS REGISTROS PARA LA FLORA VASCULAR DE EL SALVADOR. *Phytoneuron*.:1–14.
- García-Macias P, John P. 2005. Formation of Natural Indigo Derived from Woad (*Isatis tinctoria L.*) in Relation to Product Purity. *Journal of agricultural and food chemistry*.
- González JM. 2005. Guía Técnica: Cultivo de Jiquilite (*Indigofera spp.*) en El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- Govín E, Pérez Lamas AM, Chávez Figueredo D, Rodríguez Ferradá CA, Gámez Guerrero M, Reyes Arias M. 2006. Caracterización farmacognóstica de *Indigofera suffruticosa* Mill (añil cimarrón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Hariri MR, Chikmawati T, Hartana A. 2017. Genetic Diversity of *Indigofera tinctoria L.* in Java and Madura Islands as Natural Batik Dye based on Inter-simple Sequence Repeat Markers. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*.
- Herrera-Paz EF. 2013. LA GENÉTICA DE POBLACIONES Y EL ORIGEN DE LA DIVERSIDAD HUMANA. *REV MED HONDUR*.
- Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*.
- Martínez AEC, Zapata PD. 2007. EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR. 1a edición.

Universidad Nacional De Misiones, Argentina: EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES.

- Martínez DG. 2008. DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTABLECIMIENTO DE PRIORIDADES EN ESQUEMAS DE CONSERVACIÓN. EJEMPLO DE APLICACIÓN EN LA RAZA DE LIDIA.
- Missouri Botanical Garden. 2019. Tropicos. Tropicos.
- Otao T, Kobayashi T, Uehara K. 2016. Development and characterization of 14 microsatellite markers for *Indigofera pseudotinctoria* (Fabaceae)1. *Appl Plant Sci.* de Quintanilla RE.
- Páiz L, Huete J. 2008. DNA Barcode, una alternativa para identificar especies del Complejo Midas Cichlidae en Nicaragua. *Encuentro.*:13.
- PCR Master Mix Certificate of Analysis 9PIM750. 2016. PCR Master Mix Certificate of Analysis 9PIM750. <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/pcr-master-mix-protocol.pdf?la=en>.
- Quijada A, Méndez G, Ortíz S, Álvarez E. 1997. LA REGIÓN DE LOS ITS DEL ADN RIBOSOMAL DEL NÚCLEO (NRADN), FUENTE DE CARACTERES MOLECULARES EN LA SISTEMÁTICA DE LAS GIMNOSPERMAS. (159–168).
- Rivera, Martínez. 2006. La experiencia del Añil en El Salvador.
- Ruíz VCR, Solano JPL, Castellanos JS, Olan M de la O. 2018. Variabilidad genética en algunas especies cultivadas y silvestres de amaranto. *Revista mexicana de ciencias agrícolas.*
- Sandoval-Salas F. 2005. Caractérisation de la production et optimisation du processus d'extraction des colorants de la plant de Añil (*Indigofera suffruticosa* Mill) [thesis]. Toulouse, INPT. Saura AV, Galindo F. 2016. Utilización del colorante índigo en el laboratorio docente de Química Orgánica. *Educación Química.*
- Tropicos | Name - *Indigofera micheliana* Rose. <http://legacy.tropicos.org/Name/13006064>.

- Stevens W, Montiel O, Pool A, Gómez L, Arbaláez A, Hollowell V. 2009. Flora de Nicaragua. St. Louis, MO: Missouri botanical garden Press.
- Universidad Tecnológica (San Salvador ES. 2012. Recopilación investigativa 2011). San Salvador, El Salvador: Universidad Tecnológica de El Salvador.
- Vázquez-Domínguez E, Castañeda-Rico S, Garrido-Garduño T, Gutiérrez-García TA. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. Revista chilena de historia natural.
- Wright, S. 1969. Evolution and Genetics of Populations. vol. 2. University of Chicago Press, Chicago.

11. ANEXOS



1. Selección y toma de muestras de tejido foliar de *I. suffruticosa*.



2. Lavado de las hojas seleccionadas para evitar contaminación.



3. Secado de las hojas



4. Preservación de hojas en sobres para tratarlas con el desecante.



5. Selección de muestras para herbario.

1. Selección y recolecta de muestras de *I. suffruticosa* para extracción de ADN y preparación de herbario, Hacienda los Nacimientos, Departamento de Cuscatlán, Municipio de Suchitoto, Cantón San Lucas.



1. Macerado de hojas deshidratadas.



2. Pesado de tejido molido.



3. Adición de buffer de extracción.



4. Digestión de las muestras a 65°C, 30 min.



5. Centrifugado para separar fases.



6. Trasegado de la fase acuosa.



7. Tratamiento con solventes orgánicos.



8. Lavados con etanol al 70% y 90%.

2. Proceso de extracción de ADN de hojas de *I. suffruticosa*. En el laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Escuela de Biología.



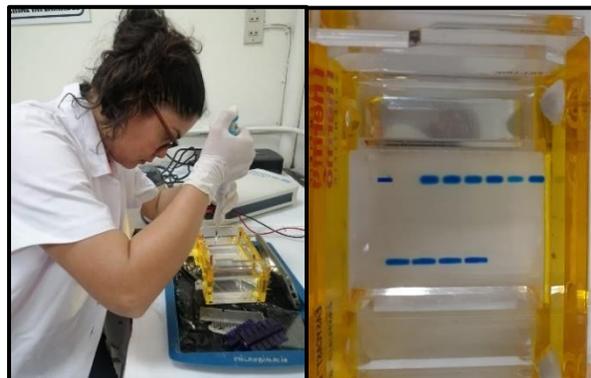
1. Elaboración de Máster Mix para PCR.



2. Rotulado de tubos, previo a la PCR.



3. Programado del termociclador.



4. Sembrado de carga de amplificaciones para corrida en electroforesis en gel de agarosa al 2%.



5. Visualización del producto PCR a través del Transiluminador, y documentado de las fotografías con las bandas del gen ITS2.



6. almacenaje de los productos PCR para el envío a secuenciar a una T° de -20 C.

3. Ejecución de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); visualización del ADN de las amplificaciones con el gen ITS2, en gel de agarosa al 2% y almacenaje de las muestras para el envío de secuenciación. En el laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Escuela de Biología.

4. Parte de las colecciones de *Indigofera suffruticosa* e *Indigofera guatemalensis*, que se tomaron de los diferentes cultivos muestreados y que están depositadas en herbario del Jardín Botánico LAGU (Asociación Jardín Botánico La Laguna)



HERBARIO
JARDIN BOTANICO LA LAGUNA
No. JBL08204
Det. D. Rodriguez
13-12-2021
EL SALVADOR, C.A.



Flora of El Salvador

Indigofera suffruticosa MILL. Fabaceae

Depto. Usulután, Mpio. Berlin, Cón. San Francisco

88°32'30.6"W, 13°30'11.71"N

Arbusto con frutos verdes

Leg.: Reyes, M.D. 0 [JBL08204]

12 Jul 2021

Det.: D. Rodriguez (LAGU) 2021-03

Nombre común local: añil

Herbaria: LAGU





HERBARIUM
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
CALLE LA PAZ
SAN MIGUEL, DEPARTAMENTO DE SAN MIGUEL
TEL: (503) 2222 2222

Flora of El Salvador Fabaceae
Indigofera michelliana Rose
Depto. San Miguel, Mpio. San Miguel, Cón. La Puerta
88°12'26.3"W, 13°24'26"N 173 m
Arbusto
Leg.: Reyes, M.D. s.n. (JBL08259) 16 Oct 2021
Det.: D. Reyes (UES) 2021-10
Herbaria: B K LAGU MEXU MHES MO