

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



"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES
CULTIVADAS DE LOROCO (*Fernaldia* spp) EN EL SALVADOR"

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MIRNA ARELY CASTRO MARTÍNEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, ENERO DE 2008.

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



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES
CULTIVADAS DE LOROOCO (*Fernaldia* spp) EN EL SALVADOR”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MIRNA ARELY CASTRO MARTÍNEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESORA:

M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR ENERO DE 2008.

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



“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE POBLACIONES
CULTIVADAS DE LOROCO (*Fernaldia* spp) EN EL SALVADOR”

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

MIRNA ARELY CASTRO MARTÍNEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

ASESORA: M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ_____

JURADO: MASTER LASTENIA DE FLINT_____

JURADO: LIC. ROBERTO GUILLEN PAREDES_____

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR ENERO DE 2008.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR

Ing. RUFINO ANTONIO QUEZADA

SECRETARIO GENERAL

Lic. DOUGLAS VLADIMIR ÁLFARO CHACÓN

FISCAL GENERAL

Dr. RENÉ PERLA JIMENEZ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO

Dr. RAFAEL ANTONIO GÓMEZ ESCOTO

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M.Sc. NOEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR ENERO DE 2008.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	3
2.1. Generalidades del loroco.....	3
2.1.1. Origen y Distribución Geográfica	3
2.1.2. Clasificación Botánica	4
2.1.3. Descripción Botánica	4
2.1.3.1. Raíz.....	4
2.1.3.2. Tallo.....	4
2.1.3.3. Hojas.....	4
2.1.3.4. Flor	5
2.1.3.5. Fruto	5
2.1.3.6. Semilla	5
2.1.4. Ciclo vegetativo.....	6
2.1.5. Requerimientos climáticos y edáficos.....	6
2.1.6. Importancia económica	7
2.2. Caracterización de germoplasma	8
2.2.1. Marcadores Genéticos	9
2.2.2. Marcadores Moleculares.....	10
2.2.2.1. Ventajas de la caracterización molecular	11
2.2.3. Marcadores de ADN.....	12
2.2.4. Metodología PCR-RAPD.....	13
2.2.4.1. Marcadores RAPD	15
2.2.5. Aislamiento de ADN.....	18
2.2.6. Análisis de los datos moleculares.....	18
2.2.7. Marcadores morfológicos	21
2.2.7.1. Descriptores morfológicos	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	23

3.1. Área de Estudio	23
3.2. Metodología	23
3.2.0. Análisis Molecular	26
3.2.1. Material Vegetativo	26
3.2.2. Aislamiento de ADN	26
3.2.3. Electroforesis	26
3.2.3.1. Determinación de concentración de ADN	26
3.2.4. Amplificación de fragmentos de ADN con RAPD.....	27
3.2.5. Lectura y registro de los productos de la amplificación.....	28
3.2.6. Análisis de datos moleculares.....	28
3.3 Análisis morfológico.....	29
3.3.1. Colecta de material vegetal	29
3.3.2. Selección de los descriptores morfológicos	29
3.3.3. Evaluación de los descriptores morfológicos.....	29
3.3.3.1. Hojas.....	29
3.3.3.2. Flor.....	30
3.3.4. Análisis de datos Morfológicos.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Análisis molecular	33
4.1.1. Extracción de ADN	33
4.1.2. Análisis de los fragmentos RAPDs.	33
4.2. Análisis morfológico.	38
4.2.1. Evaluación de los descriptores morfológicos cuantitativos.	38
4.2.2. Evaluación de los descriptores morfológicos cualitativos ...	39
5. DISCUSIÓN	42
6. CONCLUSIONES	48
7. RECOMENDACIONES	49
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	50
9. APÉNDICES	

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro N ^o . 1. Propiedades de los diferentes marcadores moleculares de ADN más usados.....	13
Cuadro N ^o . 2. Actividades de campo y laboratorio para estudiar la diversidad genética de doce muestras vegetales de loroco provenientes de seis departamentos de El Salvador.	23
Cuadro N ^o . 3. Ubicación geográfica de los sitios de colecta para la caracterización molecular de poblaciones cultivadas de "Loroco" (<i>Fernaldia spp.</i>) en El Salvador	24
Cuadro N ^o . 4. Componentes de una reacción PC-RAPD utilizados en la caracterización molecular de loroco (<i>Fernaldia spp</i>) en El Salvador	27
Cuadro N ^o . 5 Descriptores cualitativos y cuantitativos utilizados en la caracterización de poblaciones de loroco.....	30
Cuadro N ^o . 6 Secuencia de los siete "Primers" con el número de bandas amplificadas y número de bandas polimórficas utilizados en la caracterización molecular de loroco (<i>Fernaldia spp</i>) en El Salvador.....	33
Cuadro N ^o . 7. Índice de diversidad genética de Neí (1978) para las 6 poblaciones de loroco en estudio.....	37
Cuadro N ^o . 8 Sitios de colecta y número de plantas evaluados en poblaciones cultivadas de "Loroco" (<i>Fernaldia spp</i>).....	38
Cuadro N ^o . 9 Descriptores de características cuantitativas y estadísticos simples en poblaciones de loroco (<i>Fernaldia spp</i>) de El Salvador	39
Cuadro N ^o . 10 Descriptores cualitativos para hoja de poblaciones cultivadas de loroco (<i>Fernaldia sp</i>) en El Salvador	40

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura N ^o . 1. Clasificación del los marcadores genéticos más representativos	9
Figura N ^o . 2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para la caracterización molecular de poblaciones cultivadas de loroco (<i>Fernaldia spp</i>) en El Salvador. 2006	25
Figura N ^o . 3. Descriptores de hoja de loroco (<i>Fernaldia spp</i>)	31
Figura N ^o . 4. Amplificación de ADN de <i>Fernaldia spp</i> con la técnica RAPD y los "primers" UBC-157 y UBC-101.....	34
Figura N ^o . 5. Amplificaciones de ADN de <i>Fernaldia spp</i> con la técnica RAPD, "primers" UBC-111, 66, 199, 04, y 135.....	35
Figura N ^o . 6. Dendograma y bootstrap de los agrupamientos de 12 genotipos de <i>Fernaldia spp</i> provenientes de seis departamentos de El salvador	36
Figura N ^o . 7. Dendograma y bootstrap de los agrupamientos de 6 poblaciones de <i>Fernaldia spp</i> provenientes de seis departamentos de El salvador	37
Figura N ^o . 8. Fenograma morfológico de los agrupamientos de poblaciones Cultivadas de Loroco	41

AGRADECIMIENTOS

**“A TOD@S MIS AMIG@S, FAMILIA, ASESORA Y DEMÁS
PERSONAS QUE CONTRIBUYERON A QUE CULMINARA CON
ÉXITO ESTA INVESTIGACIÓN”**

**“A LA ESCUELA DE BIOLOGÍA, AL CENTRO DE
INVESTIGACIONES Y DESARROLLO EN SALUD (CENSALUD) DE
LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR”**

HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA

RESUMEN

El loroco (*Fernaldia spp*) es una especie nativa de Mesoamérica pertenece a la familia *Apocynaceae*, es utilizada en alimentación humana en El Salvador y Guatemala, su distribución geográfica esta reportada por Damas (1984), desde el Istmo de Tehuantepec y Centro América (con excepción de Panamá) lugares en los cuales se encuentra en forma silvestre. En El Salvador se distribuye desde el nivel del mar hasta los 800 m.s.n.m., especialmente en la zona Central y Occidental (Osorio, 1991).

En Investigaciones anteriores se estudió sobre: manejo, control de plagas, descripciones morfológicas, producción, sin embargo con estos trabajos no se ha obtenido una mayor información de los genotipos que permita determinar la variabilidad del germoplasma de este cultivo.

La determinación de la variabilidad genética es importante ya que permite el entendimiento de la estructura genética de una especie, por lo que en este estudio se consideró estudiarla.

La investigación se desarrolló en el laboratorio de PCR del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Se estudió la variabilidad genética a nivel molecular y morfológico de 12 genotipos de Loroco provenientes de seis departamentos de El Salvador.

En el análisis molecular se aisló ADN de un gramo de hojas jóvenes con el método CTAB (Doyle y Doyle, 1987). Los polimorfismos se generaron con la metodología PCR-RAPD, con un volumen final de 25 μ l de solución. La amplificación se realizó en un termociclador Eppendorf AG 22331 y los productos se separaron por electroforesis en gel de agarosa a 1.2% se fotografiaron con una cámara Polaroid blanco y negro. se analizaron 51 "primers" (UBC).

El análisis molecular resaltó la estrecha similitud entre los materiales cultivados de loroco (*Fernaldia spp*) con amplificación de 7 "primers" polimórficos (38 bandas), indicando una variabilidad genética reducida los datos de distancia genética se encuentran en el rango de 0.098 a 0.2622.

Para el análisis morfológico se estudiaron características cuantitativas y cualitativas de hoja y flor. El cual mostró resultados similares al análisis molecular ya que los descriptores evaluados reflejan coeficientes de variación bajos en rango de 8% a 21%.

Tanto el análisis molecular como el cuantitativo demostraron que las procedencias estudiadas se separan en dos grupos muy parecidos aunque no implica que son genéticamente diferentes.

1. INTRODUCCIÓN

El "Loroco" (*Fernaldia pandurata* Woodson.) es un cultivo no tradicional que representa una alternativa viable para generar ingresos. Hasta hace algunos años sólo se encontraba en forma silvestre o cultivada en huertos caseros y por pequeños agricultores, sin una técnica adecuada de manejo y sin considerar su valor nutritivo, comercial así como sus múltiples usos (MAG, 2001).

En los últimos años la demanda de esta especie se ha incrementado debido al aumento del consumo interno así como para la exportación. Por lo que el cultivo de la misma se ha incrementado considerablemente (Azurdia, *et al.* 2001).

Con el propósito de brindar asistencia, capacitación técnica y agrupar a los productores de esta hortaliza se ha creado la Asociación de Productores de Loroco de El Salvador (APLORES).

Actualmente se han realizado investigaciones sobre manejo, control de plagas, descripciones morfológicas, sin embargo con estos trabajos no se ha obtenido una mayor información de la especie que permita determinar la variabilidad del germoplasma de este cultivo.

Las técnicas de biología molecular y particularmente el uso de los marcadores moleculares ha permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. En cuanto a los recursos genéticos, los marcadores moleculares han aportado información relevante en áreas clave de la conservación *in situ* y *ex situ* (Karp *et al.*, 1997).

Mediante la utilización de marcadores moleculares como PCR-RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa), se puede tener un registro del germoplasma existente en El Salvador, es decir, un estudio de la diversidad de la especie por lo cual en esta investigación se caracterizaron molecularmente seis poblaciones cultivadas de loroco en El Salvador, mediante la

técnica de marcadores moleculares PCR-RAPD (Reacción en Cadena de la Polimerasa – ADN polimórfico amplificado al azar) para determinar las diferencias genéticas entre ellas, además se realizó un ensayo utilizando descriptores morfológicos para las muestras en estudio.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Generalidades del “Loroco” (*Fernaldia spp*)

El loroco es una planta herbácea tipo liana (enredadera), nativa de Mesoamérica con importancia en alimentación humana, especialmente en El Salvador, Guatemala y Honduras. Produce flores formando racimos que son la parte comestible, preparada en diferentes formas según la localidad (Damas, M. 1984 y Azurdia, C. 2001).

Flores, (1978) explica que en El Salvador esta planta solo aparece registrada taxonómicamente por Calderón (1941) quien la nombra como *Urechites karwinskii Muller*, atribuyéndole a Padilla, reporte y distribución de esta planta para los departamentos de San Salvador y Ahuachapan.

2.1.1 Origen y Distribución Geográfica

Según Flores (1978), “Loroco” es una planta silvestre asociada a la Selva Baja Caducifolia y Mediana Subcaducifolia de El Salvador. Damas (1984), sostiene además que la distribución geográfica de esta planta está comprendida desde el Istmo de Tehuantepec y Centro América (con excepción de Panamá) lugares en los cuales se encuentra en forma silvestre.

Osorio (1991) y El Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA), reportan que en El Salvador se distribuye desde el nivel del mar hasta los 800 metros sobre el nivel del mar, especialmente en la zona Central y Occidental.

Sin embargo Parada *et al.*, (2002) agregan que se han encontrado cultivares de “Loroco” a 1,200 m.s.n.m. en Perkín, Departamento de Morazán, ampliándose así la factibilidad de cultivarlo en otras zonas.

2.1.2 Clasificación Botánica

Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	Tracheobionta
Superdivisión:	Spermatophyta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida - <i>Magnoliatae</i>
Sub-Clase:	<i>Asteridae</i>
Orden:	Gentianales
Familia:	<i>Apocynaceae</i>
Género:	Fernaldia Woodson – <i>Fernaldia</i>
Especie:	<i>pandurata, brachypharmynx</i>
Nombre Científico:	<i>Fernaldia pandurata</i> (A. DC.) Woodson

2.1.3 Descripción botánica del "Loroco" (*Fernaldia pandurata* Woodson)

2.1.3.1 Raíz

Esta planta desarrolla rizomas cuando alcanza aproximadamente los 6 meses de edad, emana un fuerte olor oleáceo que es tóxico y son ellos los responsables de los nuevos brotes cuando se inicia la época lluviosa, raíz fibrosa con sustancias alcaloides conocidas como: "Lorocina y Loroquina" (Flores, 1978).

2.1.3.2 Tallo

Es herbáceo, voluble, cafésoso, con fisuras y con muchas lenticelas, cuando la planta es adulta y cuando está seca, presenta muchas fibras en la corteza y un color cafésoso (Flores, 1978).

2.1.3.3 Hojas

Existen diferentes formas de hojas, aunque las más comunes son oblongas elípticas, opuestas y bastante acuminadas, con los bordes enteros un poco ondulados. De 4 a

22 centímetros de largo y de 10 a 12 centímetros de ancho. El haz por lo general es liso y el envés puede ser pubescente o glabro (Flores, 1978).

2.1.3.4 Flor

La inflorescencia se da en racimos y cada uno de ellos posee de 10 a 32 flores dando un promedio de 25 por racimo. Se puede cosechar de 30 a 40 racimos cada tres días por planta en su época de mayor floración normalmente esta planta produce flores de mayo a octubre, aunque si existe riego produce flores todo el año, entrando la planta a estado vegetativo en enero y febrero (Flores, 1978).

Los estudios realizados por el INCAP-ICNNID al analizar flores de loroco le encontraron un alto valor alimenticio, encontrando en él un buen contenido de proteínas, vitamina A activada, tiamina, calcio, cenizas, fibra, carbohidratos, grasa y alto valor energético (Apéndice 1)

2.1.3.5 Fruto

Es un folículo igual que el de la mayoría de apocináceas, cilíndrico, alargado, acuminado y curvado hacia adentro. Puede alcanzar de 10 a 25 centímetros de largo y cada uno posee hasta 200 semillas. Debe colectarse lo más maduro posible y es recomendable hacerlo cuando está seco, con la línea de dehiscencia bien marcada, de lo contrario las semillas no germinan (Flores, 1978).

2.1.3.6 Semilla

La semilla posee gran cantidad de vilano, el cual le sirve para que el viento las disperse; posee una gran viabilidad y el porcentaje de germinación es un promedio del 90%. El tiempo que tarda en germinar es de 10 a 15 días y se han obtenido mejores resultados haciéndolas germinar en arena y aplicándoles riego una vez por día; el crecimiento de las plántulas es rápido a tal grado que a los 10 días después de germinado puede haber alcanzado 5 centímetros (Flores, 1978) Ver apéndice 2.

2.1.4 Ciclo vegetativo

El ciclo vegetativo depende de la forma como se reproduzca, si se da por rizoma o camote, florece en un promedio de seis a siete meses; si es reproducida por semilla la producción de flores da inicio de los ocho a diez meses (Flores, 1978).

Para el establecimiento de las plantaciones, la mayoría de productores se autoabastecen de plántulas a través de la recolección de semillas de los cultivares que ellos reconocen como más productivos; aunque en algunos casos también compran plántulas o semillas a viveros. A la fecha no existen datos concluyentes del número y sistematización de variedades, lo que para los productores no representa ningún problema (Garza, *et al.*, 2003).

2.1.5 Requerimientos Agroclimáticos y Edáficos

Parada *et al* (2002), en su documento Guía técnica del cultivo de Loroco (*Fernaldia pandurata*) en el Salvador refieren los siguientes datos:

Precipitación: El cultivo del loroco se desarrolla mejor con una precipitación promedio anual de 1200 a 1800 mm.

Altitud: Este cultivo se adapta a un amplio rango de altitud, sin embargo su medio agroclimático puede variar de los 20 a 1200 msnm, encontrándose las mayores áreas cultivadas entre los 20 a 800 msnm.

Temperatura: La temperatura promedio ideal a que se adapta el loroco es de 20 a 32°C; temperaturas mayores o menores a estos rangos provocan estrés a la planta lo cual afecta su producción de flores.

Humedad relativa: El mejor rango de humedad relativa oscila entre 70 a 77% promedio anual.

Suelo: Se adapta a diversos tipos de suelo desde francos a francos arcillosos, con pH de 5.5 a 7.0.

2.1.6 Importancia Económica

El cultivo de loroco está adquiriendo una gran importancia económica, ya que hasta hace algunos años era cultivado en forma casera, tradicional, sin dársele una técnica adecuada en su manejo, ni considerársele su valor nutritivo, comercial y usos. Hoy en día las políticas del sector agropecuario se orientan a promover la diversificación agrícola del país, así como a promocionar la exportación de cultivos no tradicionales, ya que presentan nuevas alternativas de generar ingresos ayudando con ello a solventar en parte el problema económico de nuestros agricultores (FUSADES, 1992).

El cultivo del loroco representa una buena alternativa para generar ingresos, particularmente en unidades campesinas de escasos recursos, donde la mano de obra familiar puede atender este cultivo en la huerta casera, con excelente rentabilidad (US \$ 1.50/m²) (Parada *et al.* 2002; Osorio 2002).

Anteriormente al cultivo de loroco no se le daba el verdadero valor comercial y nutritivo que posee; pero en la actualidad dicho rubro representa una alternativa de buenos ingresos dada la demanda que presenta, ya sea en el mercado interno y en los Estados Unidos de Norteamérica, por lo que se considera una inversión rentable (CENTA, 1992).

El Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) 2007, reporta para el año 2006 un volumen de exportación de loroco de 228,477 kg. por un valor de \$1, 242 ,874. 15, significando un rubro más de ingresos para el país.

A medida que se incrementan las áreas cultivadas, se generan ciertos problemas que limitan el potencial del cultivo; y al ser un cultivo tradicional restringido a los trópicos secos centroamericanos, existe una fuerte necesidad de desarrollar conocimiento y tecnologías tendientes a resolver las limitantes dentro del contexto específico en los que se encuentran los productores (Garza, *et al.* 2003).

2.2 Caracterización de Germoplasma

La caracterización es la descripción o registro de las características morfológicas, citogenéticas, bioquímicas o moleculares de un individuo, las que son poco influenciadas por el medio ambiente en su expresión (Martínez, 2002).

Los procesos de caracterización y evaluación permiten conocer la variabilidad genética de las colecciones de germoplasma e identificar características de importancia económica para ser utilizados en programas de mejoramiento genético. (Fernández, 2004).

La variabilidad genética se estructura sobre varias formas (ejemplo: polimorfismos, series alélicas, poligenes, direccionalidad del flujo genético en plantas entomófilas, etc.) La variabilidad causada por el ambiente se manifiesta generalmente como plasticidad fenotípica, resultante de procesos moleculares que ocurren en el núcleo y en el citoplasma de esta, siendo por tanto, genotípicamente controlada (REMERFI, 2001).

Además de describir y dar a conocer el valor del germoplasma, también es importante en la identificación taxonómica correcta, la descripción morfológica, la evaluación de caracteres agronómicos, las estimaciones de la variabilidad fenotípica y las relaciones entre características (Sevilla y Holle, citado por López, 1999).

Chang (1979), afirma que los objetivos que se persiguen al describir plantas de determinada especie o grupos de especies son: identificar líneas para el mejoramiento, diferenciar entre varias entradas con nombres semejantes o idénticos, identificar entradas con características deseables, clasificar variedades, clones y otros tomando en cuenta criterios relevantes, establecer afinidades entre las características de un cultivo y entre grupos geográficos de variedades, hacer una estimación del grado de variación dentro de una colección varietal.

2.2.1 Marcadores Genéticos.

Un marcador genético se puede definir como cualquier diferencia en el fenotipo controlada genéticamente (Bueno *et al.*, 2001).

Tanksley (1983) menciona que existen dos clases de marcadores genéticos: los morfológicos y los moleculares, dentro de los marcadores moleculares se menciona la existencia de dos tipos: las proteínas (principalmente las isoenzimas) y los marcadores de ADN (Azofeifa, 2006) (ver figura 1).

Con el descubrimiento de técnicas para extraer, manipular y caracterizar ADN, la búsqueda de marcadores genéticos supera varias de las desventajas de los marcadores morfológicos; la capacidad de acceder directamente al genoma de un organismo permite independizar estos marcadores de la edad de la planta, el tejido y los factores medioambientales (Dávalos, 1997).

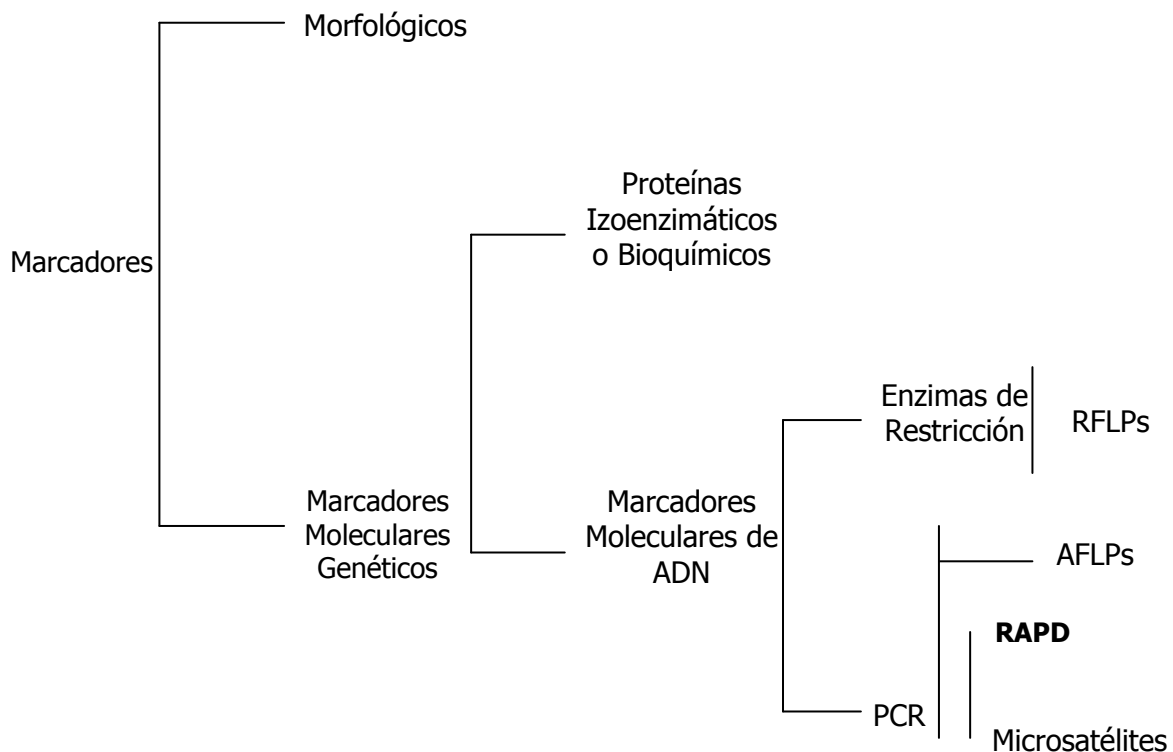


Figura 1. Clasificación de los Marcadores Genéticos más representativos (Fuente: Bueno *et al.*, 2001).

En las últimas décadas ha ocurrido un notorio aumento en los marcadores genéticos disponibles para estudios de diversidad genética. Algunos de ellos tienen diferentes bases moleculares, pero todos están enfocados a determinar la organización de la estructura genética en las poblaciones naturales y cultivadas. Además, ellos muestran la similitud entre y dentro de las poblaciones. (Bueno *et al.*, 2001).

2.2.2 Marcadores Moleculares

Las técnicas de biología molecular y particularmente, el uso de los marcadores moleculares, ha permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés (Karp *et al.*, 1997).

Un marcador molecular es definido por Walton (1993), como cualquier característica química o molecular medible que es heredada según un modelo mendeliano simple. Para Caetano-Anolles (1993), los marcadores moleculares son segmentos de ADN considerados como marcas o puntos de referencia para el análisis del genoma y que generalmente presentan variantes o sitios polimórficos que pueden ser identificados empleando estrategias generales tales como la hibridación molecular o la amplificación enzimática del ADN.

Estos marcadores funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma y son ampliamente utilizados en genética humana, vegetal, animal y microbiana. Permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstos o no su fenotipo (Bueno *et al.*, 2001).

El desarrollo de estos ha facilitado investigaciones en una variedad de disciplinas como taxonomía, filogenia, ecología, genética y mejoramiento de plantas. Las estrategias clásicas de evaluación de la variabilidad genética han sido mediante comparación de las semejanzas en el ámbito anatómico, morfológico, embriológico y fisiológico se ha venido complementando con técnicas moleculares (Weising *et al.* citado por Vásquez, 1998).

Además están basados en el estudio directo de la molécula de ADN, por lo tanto los resultados obtenidos son totalmente independientes de las condiciones ambientales, pudiendo ser utilizados para identificar correctamente un individuo, para establecer grados de similitud entre individuos o entre accesiones en una colección o para detectar la presencia de un gen o alelo en particular (Fernández, 2004).

Esta información puede utilizarse en múltiples formas en la genética vegetal, entre ellas, detección de híbridos, cuantificación de la diversidad genética intra e interespecífica, establecimiento de identidades genéticas, análisis de variación somaclonal, y en combinación con otros métodos la elaboración de mapas genéticos (Bueno *et al.*, 2001).

Además tienen aplicaciones en los programas de mejoramiento genético de especies de interés así como en la cuantificación de la variabilidad genética para promover la conservación genética (Weising *et al.*, citado por Vásquez, 1998).

Su aplicación en la caracterización de materiales genéticos constituye un aporte significativo al conocimiento de los recursos autóctonos, escasamente estudiados hasta ahora, y una innovación útil si se quiere profundizar en el conocimiento molecular detallado del genoma de los distintos bancos de germoplasma existentes (Fernández, 2004).

2.2.2.1 Ventajas de los Marcadores Moleculares

Entre las ventajas de los marcadores moleculares están:

- a) No es influenciada por el medio ambiente.
- b) Cualquier parte de la planta puede ser utilizada y en cualquier estado de crecimiento.
- c) El análisis es ilimitado.
- d) Se requiere de pequeñas cantidades de tejido.
- e) El ADN es altamente estable.

f) Se detecta alto polimorfismo y

g) Están distribuidos en todo el genoma (Powell, 1992; Rao & Riley, 1994; Citado por López, Y., 1999).

2.2.3 Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998)

Los marcadores de ADN son un grupo cada vez más numeroso, entre ellos se mencionan: RFLP (Polimorfismo en el Tamaño de los Fragmentos de Restricción), RAPD (DNA Polimórfico Amplificado al Azar), AP-PCR (PCR con oligonucleótidos arbitrarios), AFLP (Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos Amplificados), SSR (Repetición de Secuencias discretas), EST (Sitios etiquetados por la expresión), CAPS (Secuencia polimórfica amplificada y cortada), SCAR (Regiones amplificadas caracterizadas y secuenciadas), SSCP (Polimorfismo de conformaciones monocatenarias) sus aplicaciones son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos (Claros, 1998).

En el cuadro número 1 se describen algunas de las propiedades de los marcadores de ADN más usados actualmente.

Cuadro Número 1: Propiedades de los diferentes marcadores moleculares (Bueno *et al.*, 2001)

Marcador	RFLP	RAPD	SSR	AFLPs
Principio	Endonucleasas de restricción. Digestión.	amplificación de ADN con cebadores al azar	PCR de repetida secuencia simple	Endonucleasas de restricción. Adaptadores. Amplificación
Tipos de polimorfismo	Cambios en una sola base. Inserción. Delección	Cambios en una sola base. Inserción. Delección	Cambios en la longitud de la repeticiones	Cambios en una sola base. Inserción. Delección
Dominancia	Codominantes	Dominantes	Codominantes	Dominantes
Requiere información de la secuencia	No	No	Si	No
Cantidad de ADN requerida	50-100 ng	10-25 ng	10-25 ng	50-100 ng
Coste	Medio	Bajo	Alto	Alto
Abundancia en el genoma	Alta	Muy Alta	Media	Muy Alta
Automatización	Automatización Difícil.	Automatización Fácil.	Automatización Fácil.	Automatización Difícil.
Repetitividad	Repetitividad alta	Repetitividad no muy alta	Repetitividad alta	Repetitividad alta

2.2.4 Metodología PCR-RAPDs

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fue concebida por Kary Mullis a mediados de la década de los 80's y desde entonces causó una verdadera revolución en el campo de la Biología tanto en investigación como en áreas aplicadas. La facilidad, rapidez, versatilidad y sensibilidad de la PCR, la hace particularmente eficiente para estudios genéticos y moleculares que incluyen gran número de individuos de cualquier organismo vivo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Los RAPDs son una modificación de la PCR los cuales utilizan un único cebador al azar de las secuencias nucleotídicas (Williams & Col, 1990). Son ampliamente utilizados en

los laboratorios de Biología Molecular y son una técnica útil cuando hay que estudiar una alta variedad de muestras, con el fin de diferenciar especies, sin información previa de secuencia. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que los RAPDs presentan algunas desventajas, que obligan a una optimización perfecta del experimento, y a conseguir la reproducibilidad de los resultados en forma continuada (de Enrech, 2000)

La realización experimental de la PCR- RAPD es sencilla y no requiere información previa de la secuencia de los cebadores. Dado que el número posible de éstos es teóricamente ilimitado, basta probar una cierta cantidad de ellos hasta encontrar los que muestren las diferencias entre variedades más adecuadas.

Bueno *et al.*, (2001) sostienen que el principio de la PCR es muy simple ya que se basa en la función de una enzima llamada ADN Polimerasa, la cual sintetiza una nueva molécula de ADN a partir de una molécula molde de ADN. El producto de duplicación del ADN molde sirve a su vez como molde de una segunda ronda de duplicación.

Además es una reacción enzimática realizada *in vitro* y basada en la utilización como cebadores de oligonucleótidos sintéticos complementarios a cadenas opuestas y que definirán los dos extremos del fragmento a amplificar. La amplificación tiene lugar como consecuencia de una serie de ciclos repetidos en los que secuencialmente el ADN se desnaturaliza, se hibrida con los oligonucleótidos que servirán de cebadores. Se sintetiza el nuevo ADN como extensiones de los cebadores y de nuevo se desnaturaliza para dar comienzo al siguiente ciclo (Izquierdo, 1993).

Phillips Mora *et al.* (1995), plantea que desde su invención por Saiki *et al.*, en 1985, el análisis PCR revolucionó muchas de las técnicas tradicionales de la Biología Molecular debido a la gran cantidad de aplicaciones que se le han hecho.

Los RAPDs pueden ser utilizados para encontrar variabilidad a diferentes niveles tales como cambios en una sola base e inserciones y deleciones. Se caracterizan porque

el costo es bajo, además de ser un método rápido que utiliza pocos nanogramos de ADN (10 ng aproximadamente) y no necesita de una secuencia nucleotídica específica (de Enrech, 2000).

Los polimorfismos producidos con la técnica RAPD se denominan marcadores RAPD. Pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del "*primer*" (mutación puntual), lo cual impide que el "*primer*" se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Como regla general el tamaño de los variantes se detecta muy escasamente y los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus. En los estudios de herencia, los productos de amplificación se comportan como marcadores dominantes (Waugh y Powell, citados por Phillips *et al.* 1995)

2.2.4.1 Marcadores RAPDs

Williams y col. (1990) denominan el método que describen como Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) y a los polimorfismos que se producen deciden llamarlos "marcadores RAPD"

De Enrech, (2000) explica que la técnica RAPDs, consiste en el uso de un oligonucleótido corto de secuencia arbitraria (llamado "*primer*", iniciador o cebador), para cebar la amplificación de fragmentos de ADN.

El oligonucleótido puede cebar la amplificación a partir de un molde genómico uniéndose a sitios específicos en las hebras opuestas del ADN molde. Si existen diferencias en una o ambas hebras donde deben insertarse los cebadores, se da como resultado la no amplificación de la banda (de Enrech, 2000).

Son un tipo de marcador dominante, o sea que la aparición de una banda implica que existe una homología con el cebador usado, todos los demás alelos que no son homólogos al sitio de unión con el cebador, estarán representados por la ausencia de

la banda. El cebador regularmente amplifica varias bandas, cada una originándose en diferentes sitios del genoma (Williams *et al*, de Enrech, 2000).

Para una correcta aplicación deben tomarse diferentes precauciones, como el control estricto de las condiciones de trabajo y se recomienda (dada la naturaleza anónima de las bandas y la dificultad de establecer homologías) circunscribir su utilización a nivel específico o infraespecífico y al momento de establecer comparaciones, utilizar únicamente cálculos de distancia genética en los cuales no intervengan análisis parsimoniosos (de Enrech, 2000).

Según Phillips-Mora *et al.*, (1995) el análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos para llevarse a cabo, los cuales salvo a lo que se refiere a los "primer" son los mismos elementos necesarios para los PCR:

1. **ADN molde:** es el ADN de doble cadena proveniente del organismo que se quiere analizar.
2. **"Primers":** es un oligonucleótido, es decir, un segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Los más comúnmente utilizados en el análisis RAPD poseen una longitud de 10 nucleótidos y deben tener un contenido de al menos un 50% de Guanina-Citosina para funcionar correctamente.
3. **Desoxinucleótidos (dNTPS):** Se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena.
4. **Solución Buffer:** Las soluciones deben contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibrada generalmente a un pH de 8.4.
5. **Taq-polimerasa:** Es una enzima ADN-Polimerasa termoestable, originariamente se aislaba de la bacteria *Thermus acuaticus*, hoy se sintetiza por ingeniería genética. Su temperatura óptima es entre 75-80 °C. Se utiliza

para amplificar secuencias en PCR (Izquierdo, 1993) Esta enzima tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN mediante su síntesis a partir de un punto determinado fijado en este caso por el "*primer*".

Al igual que para la PCR durante el análisis RAPD se dan una serie de reacciones químicas repetidas en forma cíclica. Cada ciclo está compuesto por tres fases que son definidas por cambios de temperatura:

Fase 1: La desnaturalización del ADN o de los productos previamente sintetizados mediante la incubación a altas temperaturas, tras lo cual, las dos cadenas se separan y permanecen libres en solución hasta que la temperatura se reduce.

Fase 2: La unión del "*primer*" a sitios complementarios de la cadena disociada, lo cual se produce cuando la temperatura se reduce.

Fase 3: La síntesis en una dirección específica de (5' a 3') a partir del sitio de unión del "*primer*" de la doble cadena mediante la acción de la polimerasa y la presencia en la solución de desoxinucleótidos libres y otros elementos minerales esenciales como el magnesio y el potasio. Esta fase se produce a temperaturas óptimas para la Taq polimerasa, o sea 72 °C.

Cuando los tres pasos se repiten varias veces (30 – 40 veces), en solo unas pocas horas se pueden obtener fragmentos amplificados en el orden de microgramos, después de haber iniciado el proceso con cantidades tan reducidas como 5 ng de ADN (Phillips et al. 1995) (Apéndice 3).

La eficiencia de la técnica RAPD depende de cuatro factores:

1. Número de ciclos de amplificación: al respecto se debe tener en cuenta que en los primeros ciclos el producto se incrementa más rápidamente que en los ciclos finales.
2. Cantidad de ADN inicial: las muestras con concentraciones relativamente altas de ADN producen rendimientos más bajos de amplificación que las reacciones en que se usan bajas concentraciones.

3. Longitud del ADN: la eficiencia es inversamente proporcional a la longitud del ADN.
4. Temperatura: el proceso está regulado por este factor (Phillips *et al.* 1995).

2.2.5 Aislamiento de ADN.

La extracción y purificación de ADN es el paso inicial y básico para realizar trabajos en Biología Molecular. Es necesario contar con ADN de buena calidad para llevar a cabo estudios sobre aspectos tales como: Estructura física del ADN, identificación, aislamiento y mapeo de genes; ingeniería genética, estudios filogenéticos, etc. Un factor crítico en el aislamiento del ADN de las plantas es el rompimiento de la pared celular.

Existen diferentes métodos para obtener ADN de la calidad y pureza que demanda los objetivos del trabajo; dentro de estas metodologías más usuales de extracción y purificación se puede mencionar: método de gradientes de centrifugación con cloruro de cesio/bromuro de etidio; método del CTAB; método de la proteinasa y de las minipreparaciones (Phillips - Mora *et al.*, 1995).

2.2.6 Análisis de los datos moleculares

Según Martínez (1995) citado por Tapia, (1998), los métodos y procedimientos estadísticos disponibles para el análisis de los resultados provenientes de ensayos biotecnológicos se agrupan en las siguientes categorías:

1. Aquellos que tienen como propósito evaluar la variabilidad, clasificación, estructura y composición genética de las poblaciones.
2. Los desarrollados para la construcción de mapas cromosómicos o genómicos, cuando se utilizan marcadores genéticos moleculares, y
3. Los denominados QTL (Quantitative Trait Loci), los cuales son loci asociados con caracteres cuantitativos de importancia económica.

Los métodos estadísticos más utilizados formalmente son distancias genéticas, índices de similitud, dendogramas y coordenadas principales (Martínez, 1995) a partir de las

matrices de coeficientes de distancia o de similitud como: Neí, (1978), Rogers, Jaccard, etc. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El índice de similitud (S) más común es el calculado con base en la proporción de bandas que comparten dos genotipos usando la siguiente fórmula:

$$S = 2 n_{ab} / (n_a + n_b)$$

Donde:

n_{ab} = número total de bandas evaluadas

n_a y n_b = número total de bandas que tienen en común los dos genotipos.

S puede tomar valores entre 0 y 1, donde 0 significa "ninguna banda en común" y 1 significa "patrones idénticos" (Neí 1978 y Li, 1979; Wetton *et al*, 1987).

Otro coeficiente de similitud muy usado es el coeficiente de Jaccard, en el cual se toma en cuenta solamente los pares positivos en el cálculo, de acuerdo a la siguiente fórmula: (Patwary *et al*, 1993)

$$J_{ij} = C_{ij} / (n_i + n_j - C_{ij})$$

Donde:

C_{ij} = número de pares positivos entre dos individuos

n_i y n_j = total de número de bandas en los individuos i y j, respectivamente.

El objetivo de la construcción de un árbol filogenético o dendograma es dar la mejor estimación de la historia evolutiva de un grupo de OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas). Usualmente, esas OTUs son entre especies, pero recientemente la misma clase de análisis ha sido también aplicado al análisis entre individuos, cultivares o poblaciones dentro de especies.

Las coordenadas principales es un conjunto de técnicas estadísticas-matemáticas para encontrar una configuración de puntos a partir de una matriz de distancias. Para usar el escalamiento multidimensional, se requiere necesariamente que las distancias sean euclidianas.

Existen varios problemas asociados con la interpretación de los datos de los patrones de bandas:

1) No es usualmente conocido si una banda dada está en un estado homocigótico o heterocigótico (los marcadores RAPDs son tratados como caracteres dominantes); 2) puesto que los pares alélicos no pueden ser asignados mutuamente, no es posible calcular las frecuencias alélicas para un loci específico; 3) no es conocido si los patrones de bandas representan caracteres independientes (Harti, 1980; Weir, 1990).
Éxisten programas computacionales que permiten analizar los datos moleculares obtenidos como matrices de unos y ceros (1: banda presente y 0: banda ausente), tales como: Pop gene (Yeh *et al.*, 1997), MAPMAKER (E.S. Lander, Universidad de Harvard); Linkage -1 (K.A. Suiter, Universidad del Estado de Carolina del Norte), HyperGene (S.D. Tanksley, Universidad de Cornell), PHYLIP 3.5C, Mega3.1 (Kumar 2004) NTSYSpc 2.1(Rohlf, 2000) RAPDDIST – 1996 TreeView (Page 2001).

2.2.7 Marcadores Morfológicos

La medición de los caracteres cualitativos y cuantitativos de alta heredabilidad, o que se transmiten a la descendencia del germoplasma en cualquier ambiente, se conoce como caracterización y permite determinar el grado de similitud entre los individuos (accesiones) por medio de su apariencia morfológica o fenotipo y de variabilidad en la colección; esta variabilidad se mide con pocas o muchas variables o descriptores cuyos datos conforman una dispersión de puntos con una dirección o vector e interrelacionan para conformar las distancias genéticas entre las accesiones (Franco e Hidalgo, 2003).

Los marcadores morfológicos son características fenotípicas de fácil identificación visual como: forma, color, tamaño o altura. Muchos de ellos se convierten en importantes descriptores a la hora de inscribir nuevas variedades (Picca, *et al*, 2003).

Este tipo de marcadores contribuyó significativamente al desarrollo teórico del ligamiento genético y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Un gran número de marcadores morfológicos ha sido mapeado en tomate y maíz (Picca *et al.*, 2003).

Corresponden a características fácilmente observables en el fenotipo, que segregan de manera mendeliana, controladas generalmente por un solo gen. Los marcadores genéticos utilizados para desarrollar estos mapas han sido los que afectan la morfología de la planta, incluyendo genes para enanismo, albinismo y morfología foliar (Khush, 1990).

Sin embargo, este tipo de marcadores produce efectos mayores en el fenotipo de las plantas enmascarando los efectos de otros genes menores (Tanksley *et al.*, 1989); además los marcadores morfológicos a menudo dependen del estado de desarrollo de la planta, dificultando aun más su incorporación en un programa de mejoramiento (Dávalos, 1997).

Las principales limitaciones de los marcadores morfológicos se encuentran en:

- i) número reducido de marcadores disponibles en cada población,

- ii) bajo nivel de polimorfismo,
- iii) pueden producir alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta,
- iv) varios se hallan bajo control poligénico,
- v) dominancia,
- vi) muchos de ellos se expresan en estadio de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento.

No obstante, los marcadores morfológicos permanecen como caracteres útiles en la identificación de materiales dado que representan un conjunto de genes que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo (Picca *et al.*, 2003).

Son muy pocos los grupos de vegetales que cuentan con el sustento de la descripción integral del modo de transmisión o heredabilidad y la evolución de las características morfológicas que las distinguen. Se entiende, por tanto, que los caracteres morfológicos son indicadores que pueden portar errores sistemáticos en el análisis de la variabilidad y que es preciso contrarrestar con el cuidado en su selección y análisis (Perrier, 1998).

2.2.7.1 Descriptores morfológicos

Un descriptor es una característica o atributo cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión (Franco e Hidalgo, 2003).

Los descriptores son aplicados en la caracterización y evaluación de las accesiones debido a que ayudan a su diferenciación y a expresar el atributo de manera precisa y uniforme, lo que simplifica la clasificación, el almacenamiento, la recuperación y el uso de los datos (Franco e Hidalgo, 2003).

Estos descriptores han sido definidos para un gran número de especies cultivadas. El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) ha compilado y publicado en forma de manual listados de descriptores para más de 100 especies cultivadas (Franco e Hidalgo, 2003).

3.0 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

Los análisis moleculares se desarrollaron en el laboratorio de PCR del Centro de Investigaciones y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador esta investigación se ha apoyado por la caracterización morfológica de plantas de "loroco" *Fernaldia* spp. de poblaciones cultivadas en seis departamentos de El Salvador (Sonsonate, La Libertad, Chalatenango, Cuscatlán, San Vicente y Usulután).

3.2 Metodología

La investigación se desarrolló en dos fases las cuales se describen en el cuadro siguiente.

Cuadro Número 2. Actividades de campo y laboratorio para estudiar la diversidad genética de doce muestras vegetales de loroco provenientes de seis departamentos de El Salvador.2006

Análisis Molecular	Análisis Morfológico
1. Recolección de material vegetativo	1. Colecta de Material
2. Aislamiento de ADN	2. Selección de descriptores
3. Electroforesis	3. Evaluación de los descriptores
4 Análisis de los fragmentos RAPD (selección de "Primers" polimórficos)	4. Análisis de los datos morfológicos
5. Lectura y registro de los productos	
6. Análisis de datos moleculares	

Los sitios de colecta se identificaron con base a la experiencia previa del proyecto "Caracterización molecular de poblaciones silvestres y cultivadas de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) de El Salvador" (López *et al*, 2005), la ubicación geográfica se presentan en el cuadro Número 3 y se ilustra en la figura 2.

Cuadro 3. Ubicación geográfica de los sitios de colecta para la caracterización molecular de poblaciones cultivadas de "Loroco" (*Fernaldia* spp.) en El Salvador.

Departamento	Municipio/ Cantón	Nombre de la finca	Cultivo asociado	Topo- Grafía	Altitud (msnm)	Latitud N	Longitud Ho
Sonsonate	Nahuizalco	San Diego	Güisquil	Colinada	588	13°47.158'	89°43.123'
La Libertad	Chiltiupán	Termópilas	café y bálsamo	Colinada	518	13°33.598'	89°27.970'
Chalatenango	Flor Amarilla	Miramundo	Maíz	Plana	459	13°46.570'	89°24.018'
	Nueva Concepción	La Lomita	Maíz	Plana	262.8	14°03.686'	89°14.019'
Cuscatlán	San Rafael Cedros	El Paraíso	Musáceas , cítricos, papaya, coco	Colinada	798	14°18.335'	89°52.43'
San Vicente	La Galera	La Galera	Cultivos de maíz	Plana	32	13°35.494'	88°38.033'
Usulután	San Dionisio	Norio	papaya, limón pérsico, maíz, coco, plátano, cítricos, etc.	Plana	13	13°17.199'	88°26.850'

Tomado de López, 2005 (en prensa) Base de datos del proyecto "Caracterización molecular de poblaciones silvestres y cultivadas de Loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) El Salvador. UES, 2005.

Figura 2 Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para la caracterización molecular de poblaciones cultivadas de loroco (*Fernaldia spp*) en El Salvador. 2006.



- | | |
|-----------------|----------------|
| 1- Sonsonate | 4- Cuscatlán |
| 2- La Libertad | 5- San Vicente |
| 3- Chalatenango | 6- Usulután |

Fuente: Sistema de Información Geográfica, Escuela de Física UES, 2007

3.2.0 Análisis Molecular

3.2.1 Material Vegetativo

Se tomaron doce genotipos de "Loroco" (*Fernaldia* spp.) pertenecientes a las poblaciones antes referidas; de cada sitio de colecta se obtuvieron diez hojas jóvenes e intermedias las cuales fueron almacenadas en un *freezer* a -40°C para su conservación óptima hasta la extracción de ADN.

3.2.2 Aislamiento de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción Hexadecyltrimethylammonium Bromide (CTAB) minipreparaciones (Doyle & Doyle, 1987) modificado el cual se describe en el Apéndice 4. Para éste se tomó un gramo de hoja, del cual se obtuvo el ADN necesario para los análisis moleculares. Inmediatamente se obtuvo el polvo, se colocó en un tubo cónico para romper las membranas biológicas; finalmente se utilizaron diferentes sustancias y ritmos de centrifugación para eliminar impurezas y otros compuestos hasta obtener la pastilla de ADN la cual fue resuspendida en Tris-EDTA Buffer (TE) y almacenada a - 40°C para su posterior utilización. (Apéndice 5)

3.2.3 Electroforesis

3.2.3.1 Determinación de la concentración de ADN

Se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (Apéndice 6 y 7); este método fue basado en la cuantificación de la fluorescencia producida por bromuro de etidio y el ADN, se visualizó mediante el uso de luz ultravioleta de manera que se pudiera comparar una muestra de concentración desconocida con otra de concentración conocida. Estos datos se registraron con una cámara Polaroid blanco y negro.

3.2.4 Análisis de los fragmentos RAPDs

Se evaluaron un total de 51 "Primers" de la casa comercial University of British Columbia (UBC) con la finalidad de detectar polimorfismos claros y seguros (que reflejaron mayor nitidez y repetitividad). Los cuales se presentan en el Apéndice 8. La selección de "Primers" se hizo con tres muestras de ADN que se estaba analizando.

Las reacciones para la amplificación fueron preparadas a un volumen final de reacción de 25 µl. Cada tubo de PCR contenía los siguientes reactivos:(ver cuadro 4) Para los cuales se calculó las cantidades necesarias de los reactivos master mix, primers y Taq polimerasa para el experimento (+10%), se Rotularon los microtubos y se colocaron en una la placa de PCR sobre hielo molido se adicionó a cada tubo: 10 µl de master mix y 5 µl de AmpliTaq Stoffel fragment (Taq polimerasa 3 unidades/ µl) + 5 µl de "primer" + 5 µl de ADN (dilución en TE a 2 ng) teniendo cuidado de cambiar de puntas con cada muestra de ADN se cierran los tubos con sus respectivas tapas y se colocaron en el termociclador

Cuadro 4: componentes de una reacción PCR-RAPD utilizados en la caracterización molecular de loroco (*Fernaldia spp*) en El Salvador

REACTIVOS	VOLUMEN
Dinucleótido (100 mM) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	4 µl
Buffer	4 µl
Taq polimerasa (5 u)	0.5 µl
"Primer"	6.6 µl
agua (HPLC)	4.9 µl
ADN	5 µl
Volumen total	25 µl

La amplificación del ADN (PCR) se realizó en un Termoiciclador Eppendorf AG 22 331. Hamburg, el programa utilizado fue:

- un primer ciclo de 5 minutos a 94 °C,
- 40 ciclos compuestos por la siguiente secuencia:
- 5 segundos a 94°C (desnaturalización),
- 20 segundos a 35 °C (Unión de primer-ADN)
- 30 segundos a 72°C (extensión),
- un ciclo final de 5 minutos a 72 °C.

Este programa tuvo una duración de 2 horas, el siguiente paso fue visualizar los resultados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%.

3.2.5 Lectura y Registro de los productos de la amplificación

Los polimorfismos se detectaron evaluando los patrones de bandas obtenidas para cada individuo, tomando en consideración la presencia o ausencia de cada banda identificando con (1) la presencia de la banda y con (0) la ausencia de esta. Luego se generaron tablas o matrices de presencia/ausencia. Apéndice 9

3.2.6 Análisis de datos moleculares.

Con los datos obtenidos se generó una matriz de distancia entre poblaciones con el programa RAPDIST (Black, 1997). Se generó una matriz de distancia entre individuos con el programa RAPDPLOT (Black, 1998) el programa RAPDFST (Black 1997) para determinar el índice de fijación (Flujo genético) y 100 réplicas generadas implementando un algoritmo para bootstrap, posteriormente se construyó el consenso de mayoría usando Phylip (Felsenstein, 1993). La edición del fenograma se realizó con el programa Treeview (Page, 2001).

3.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

3.3.1 Colecta de material vegetativo

El material vegetativo para el estudio morfológico se colectó a partir de plantas de "Loroco" cultivadas, de las cuales se obtuvieron tres muestras con hojas y tallo de cada población, así como flores cuando hubo disponibilidad de ellas, se colocaron en una prensa para herbario para sus posteriores observaciones y mediciones de las características morfológicas y toma de datos utilizando los diferentes descriptores para hoja y flor respectivamente.

3.3.2 Selección de los descriptores morfológicos

Los descriptores morfológicos se seleccionaron de acuerdo a información proporcionada por agricultores, quienes han observado diferencias en algunos materiales de la misma plantación con respecto a otras; siendo las más notorias en su variación las diferentes formas de la hoja (acorazonada, ovalada), tipo de borde (liso o entero, festonado), textura (áspera, lustrosa, aterciopelada, etc.). En cuanto a la flor, se tomó como referencia el tamaño, número de flores por gajo y forma del gajo.

3.3.3 Evaluación de los descriptores morfológicos cuantitativos y cualitativos para hoja y flor.

3.3.3 1 Hojas

De cada planta se seleccionaron tres hojas maduras, de cada una de ellas se tomaron datos de:

- ✿ Tamaño de la hoja: longitud y ancho de hoja, de pecíolo, de base.
- ✿ La forma de la hoja (acorazonada, ovalada).
- ✿ Color del haz y envés de la hoja para lo cual se utilizó el mapa de Munsell (1977) para coloración de tejidos vegetales.

3.3.3.2 Flor

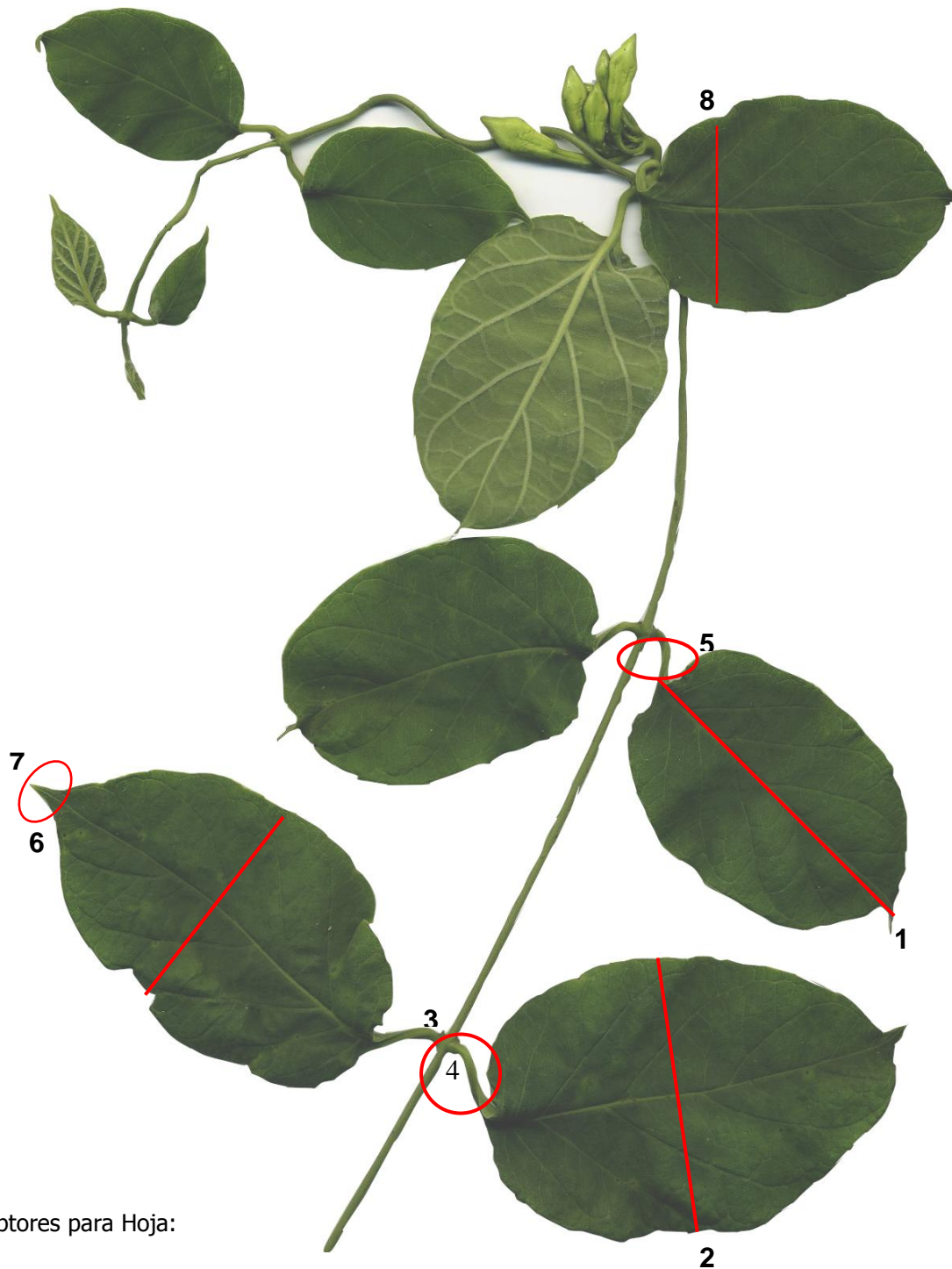
En cada muestreo se colectó una flor por cada muestra obtenida, el total de flores evaluadas fue de tres; los descriptores que se evaluaron en la flor fueron:

- ✿ Número de flores por gajo.
- ✿ Forma del gajo: redondo, largo.
- ✿ Tamaño de la flor: longitud de pedúnculo, longitud de la corola, longitud del filamento, longitud de la antera, tamaño de estambre.

Los descriptores morfológicos se ordenaron en: cuantitativos y cualitativos los cuales se presentan en el cuadro número 5. La medición de los datos cuantitativos se expresa en milímetros. Para hacer estas mediciones se utilizó una regla graduada (Ver figura 3).

Cuadro 5. Descriptores cuantitativos y cualitativos utilizados en la caracterización de Poblaciones cultivadas de loroco (*Fernaldia spp*)

Cuantitativos	Cualitativos
Longitud de hoja	Tipo de borde
Ancho de hoja	Textura de la hoja
Long pecíolo	Forma de la hoja
Ancho de pecíolo	Color del haz
Longitud ápice	Color del envés
Ancho de base	Forma de la flor
Ancho de ápice	
Long. Pedúnculo	
Long. Corola	
Long. Filamento	
Long. Antera	
Long. Estambre	
Número de racimo	



Descriptores para Hoja:

1. Longitud de la hoja
2. Ancho de la hoja
3. Longitud de hoja desde pecíolo
4. Longitud de pecíolo
5. Ancho de pecíolo
6. Longitud de ápice
7. Ancho de ápice
8. Ancho de base
9. Color de Haz
10. Color de envés
11. Textura del Haz
12. Textura del envés

Figura 3. Descriptores de hoja de loroco (*Fernaldia spp*)

Los datos cualitativos se tomaron y ordenaron en una tabla o matriz para datos binarios en el cual cada descriptor presenta dos estados presente =1 y ausente =0, los cuales son la base para la construcción del fenograma.

3.3.4 Análisis de datos morfológicos

Para los datos morfológicos de tipo cuantitativo se les aplicó un análisis descriptivo (media, desviación estándar, coeficiente de variación) con el programa STATS v1.1 y la varianza con el programa MENU (Olivares, 1989). Para los datos morfológicos cualitativos se ordenaron en el programa EXCEL, posteriormente se analizaron en el programa computacional NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) 2.10 con el cual se obtuvo el fenograma que presenta la formación de grupos clúster, para definir similitud entre los materiales genéticos.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis Molecular

4.1.1 Aislamiento de ADN

El aislamiento de ADN nuclear se obtuvo con el método CTAB minipreparaciones modificado, del cual se obtuvo el ADN necesario para las amplificaciones PCR-RAPD. La concentración de ADN vario en un rango de 28.42 µg/ml a 476.5 µg/ml.

4.1.2 Análisis de los fragmentos RAPDs

Se analizaron 51 "primers" de los cuales sólo 7 presentaron amplificación, los "primers" UBC 101, UBC 157, UBC 04 presentaron mayor número de bandas amplificadas, los "primer" UBC 111, UBC 135 son los que presentaron menor número de bandas amplificadas. En el cuadro N° 5 se presenta la secuencia de "primers" analizados.

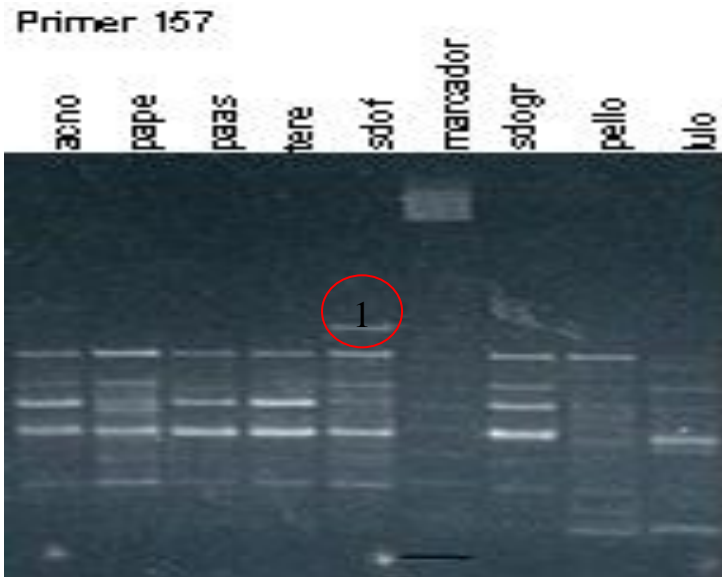
CUADRO 6. Secuencia de los siete "Primers" con el número de bandas amplificadas y número de bandas polimórficas utilizados en la caracterización molecular de loroco (*Fernaldia spp*) en El Salvador.

Nº	"Primers" UBC	SECUENCIA	Nº DE BANDA AMPLIFICADAS	Nº DE BANDA POLIMORFICAS
1	04	CCT GGG CTG G	10	7
2	66	GAG GGC GTG A	9	7
3	135	AAG CTG CGA G	5	2
4	157	CGT GGG CAG G	10	7
5	101	GCG GCT GGA G	12	7
6	111	AGT AGA CGG G	3	2
7	199	GCT CCC CCA C	9	6
Total			58	38

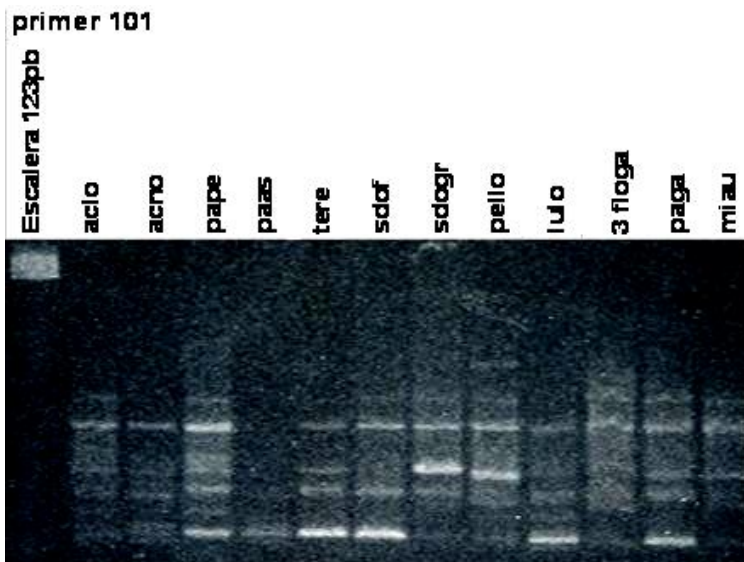
G: Guanina
T: Timina

A: Adenina
C: Citosina

El número de bandas polimórficas por "primers" estuvo entre 2 (UBC 111, UBC 135) y 7 (UBC 157, UBC 04, UBC 101, UBC 66). El total de bandas amplificadas a partir de los siete "primers" fue de 58, de las cuales 38 fueron las bandas polimórficas identificadas con mayor claridad. En la figura 4 y 5 se presentan las fotos de las amplificaciones con los "primers" que mostraron polimorfismos.



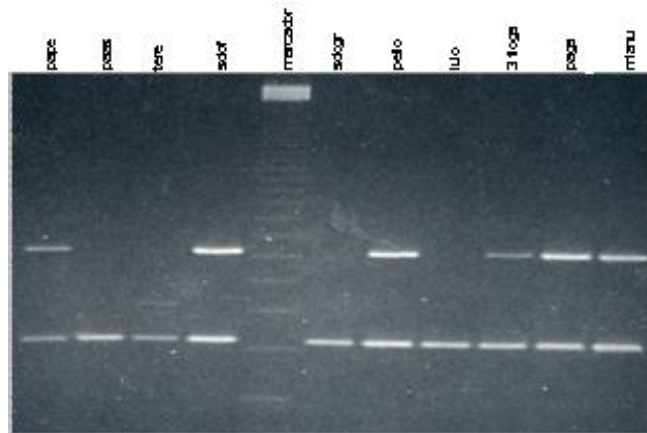
ACNO: acorazonada, Norio PAPE: peluda, Paraíso PAAS: aspera, Paraíso TERE: redonda, Termópilas SDOF: ovalada, San Diego SDOGR: ovalada, San Diego MARCADOR: 123 pb; PELLO: peluda, La Lomita LULO: lustrosa, La Lomita



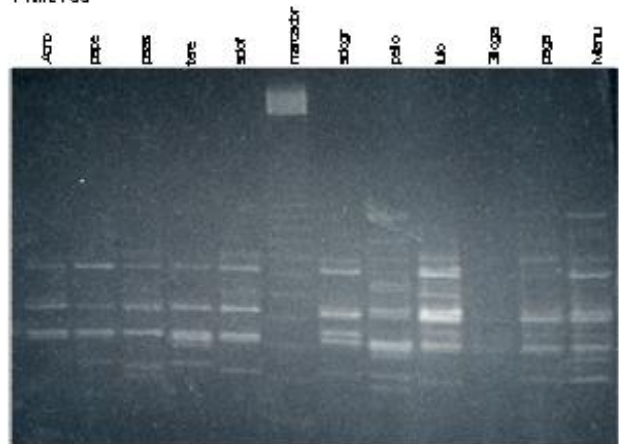
Escalera 123 pb; aclo: acorazonada, La Lomita; acno: acorazonada, Norio pape: peluda, El Paraíso pass: áspera, El Paraíso tere: redonda, Termópilas sdof: ovalada, San Diego pello: peluda, La Lomita lulo: lustrosa, La Lomita 3 floga: ancha, La Galera paga: peluda, La Galera mianu: ancha, Miramundo

Figura 4 Amplificación de ADN de *Fernaldia spp* con la técnica RAPD y los "primers" UBC-157 y UBC-101.

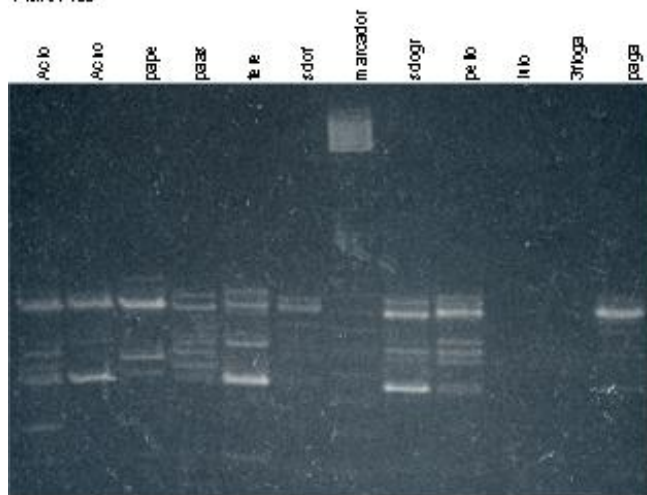
Primer 111



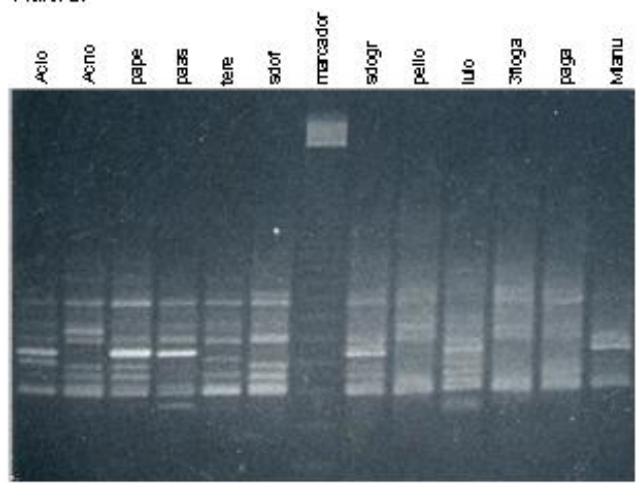
Primer 66



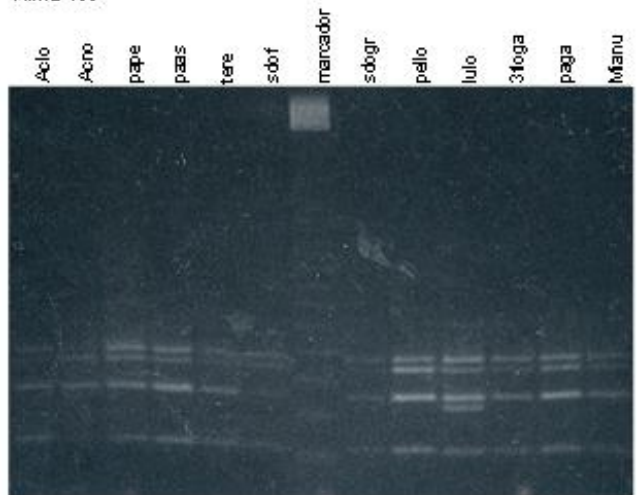
Primer 199



Primer 04



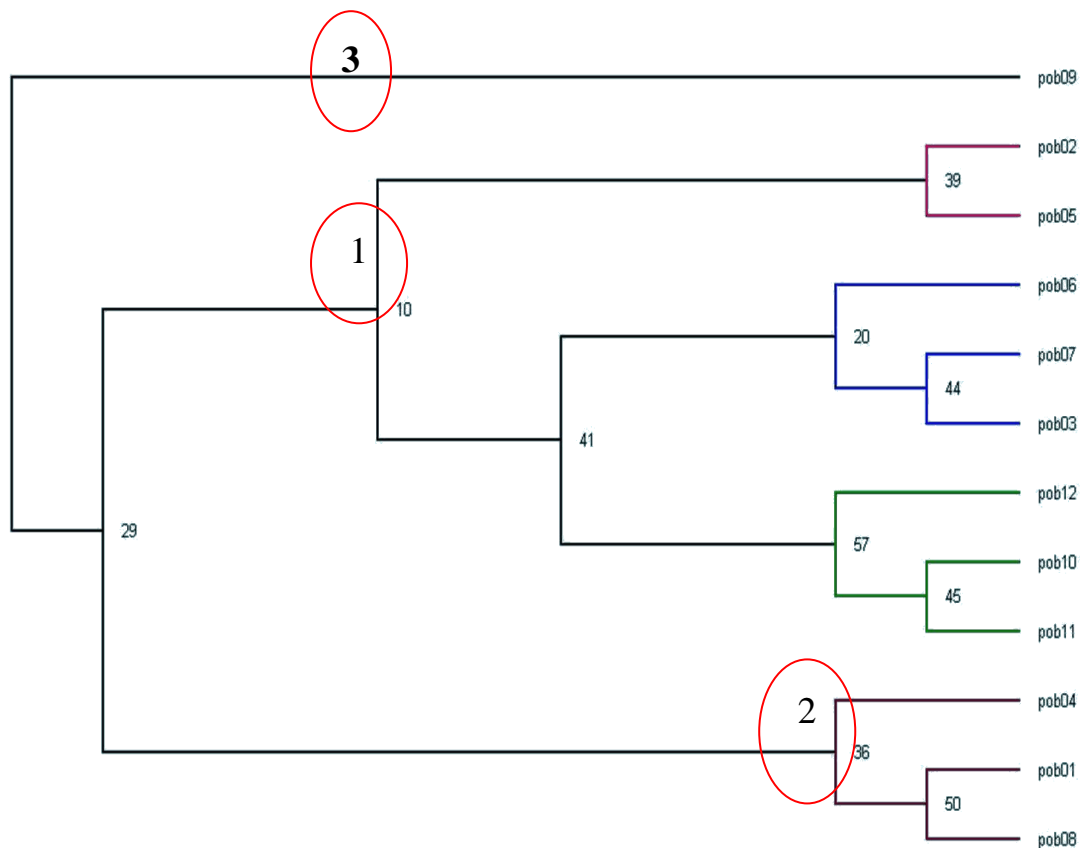
Primer 135



ACLO: acorazonada, La Lomita; ACNO: acorazonada, Norio
 PAPE: peluda, El Paraíso
 PASS: áspera, El Paraíso
 TERE: redonda, Termópilas
 SDOF: ovalada, San Diego
 MARCADOR: 123 pb.
 SDOGR: ovalada, San Diego
 PELLO: peluda, La Lomita
 LULO: lustrosa, La Lomita
 3 FLOGA: ancha, La Galera
 PAGA: peluda, La Galera
 MIANU: ancha, Miramundo

Figura 5 Amplificaciones de ADN de *Fernaldia spp* con la técnica RAPD y los "primer" UBC-111, UBC-66, UBC-199, UBC-4 y UBC-135.

De los análisis de los datos moleculares se obtuvieron dendogramas en los cuales muestran las distancias genéticas de los genotipos evaluados en la caracterización de Loroco



Pob09: lustrosa, La Lomota; **pob02:** acorazonada, Norio; **pob05:** redonda, Termópilas; **pob06:** festonada, San Diego; **pob07:** gajo redondo, San Diego; **pob03:** peluda, El Paraíso; **Pob12:** ancha, Miramundo; **pob10:** peluda, La Galera; **pob11:** 3flores, La Galera; **pob04:** áspera El Paraíso; **pob01:** acorazonada, La Lomita; **poib08:** peluda, La Lomita.

Figura 6 Dendrograma y bootstrap (100 repeticiones) del agrupamiento de los doce genotipos de *Fernaldia spp* provenientes de seis departamentos de El Salvador según la matriz de distancia y similitud de Neí (1978) utilizando el programa RAPDPlot (1996).

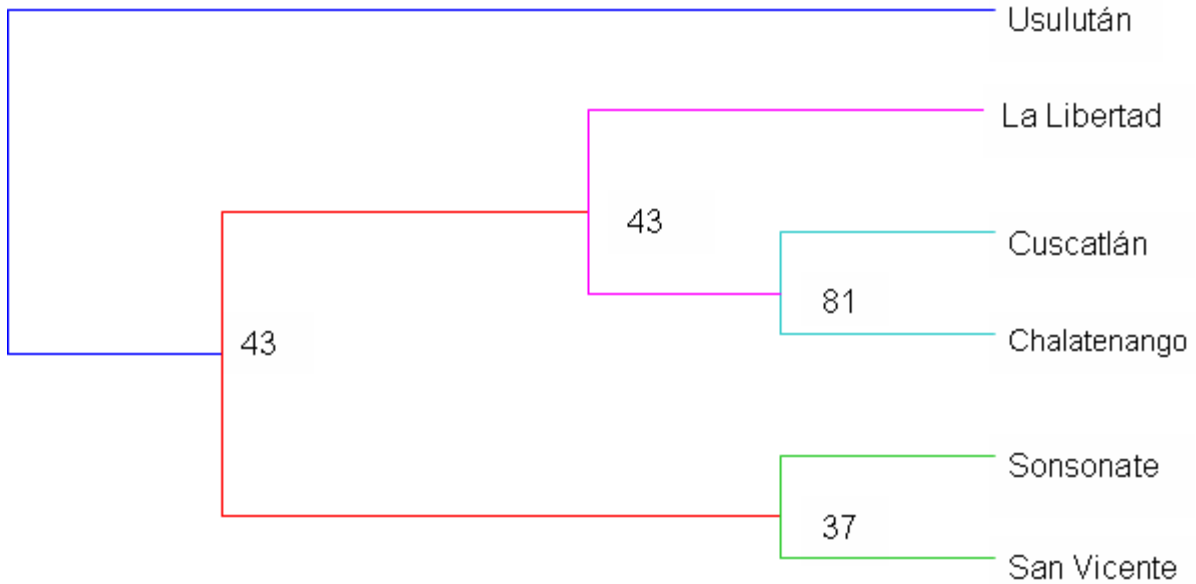


Figura 7. Dendrograma y bootstrap (100 repeticiones) del agrupamiento de las seis poblaciones de genotipos de *Fernaldia spp* provenientes de 6 departamentos de El Salvador según la matriz de distancia y similitud de Neí (1978) utilizando el programa RAPDIST(1996).

Cuadro 7. Están representadas las 6 poblaciones en estudio, en donde se estimó la variación existente dentro y entre las procedencias utilizando el índice de diversidad genética de Neí (1978), la distancia mínima es de 0.0982 y la máxima de 0.2622 y los valores de máxima similitud son: el menor fue de 0.769357 y el mayor fue de 0.906468.

	6 Chala	Cuscatlán	Sonso	San Vic	Usulután	La Lib
Chala		0.906468	0.810746	0.845861	0.769357	0.874678
Cusca	0.0982		0.803965	0.842737	0.771823	0.845861
Sonso	0.2098	0.2182		0.865195	0.790729	0.853252
San Vi	0.1674	0.1711	0.1448		0.818403	0.882762
Usulut	0.2622	0.259	0.2348	0.2004		0.802037
La Lib	0.1339	0.1674	0.1587	0.1247	0.2206	

índice de Nei (1978)
máxima similitud entre especies es 1

Distancia genética, mínima distancia genética es 0

4.2 Análisis Morfológico

El total de plantas evaluadas en los 7 sitios de colecta fue de 36, ver cuadro 8. Los descriptores evaluados fueron 21 en total, de los cuales 15 son parámetros cuantitativos y 6 son parámetros cualitativos para hoja y flor respectivamente. (ver cuadro 9)

Cuadro Número 8. Sitios de colecta y número de plantas evaluados en poblaciones cultivadas de "Loroco" (*Fernaldia spp*).

Sitios de colecta	Código	Característica	Nº plantas evaluadas	Cantidad de órganos evaluados	
				Hojas	Flores
Termópilas	Tere	Hoja redonda	3	9	3
Miramundo	Mianu	Hoja ancha	3	9	3
San Diego	Sdof	Hoja ovalada	3	9	3
	Sdogr	Hoja ovalada	3	9	
El Paraíso	Paas	Hoja áspera	3	9	3
	Pape	Hoja peluda	3	9	3
La Galera	Pega	Hoja peluda	3	9	0
	3Floga	Gajo de 3 flores	3	9	0
Finca Norio	Acno	Hoja acorazonada	3	9	3
La Lomita	Aclo	Hoja acorazonada	3	9	3
	Pello	Hoja peludita	3	9	3
	Lulo	Hoja lustrosa	3	9	3
Total			36	108	27

4.2.1 Evaluación de los descriptores morfológicos cuantitativos

En el cuadro 9 se presentan los descriptores y estadísticos simples aplicados a 13 características cuantitativas de las poblaciones cultivadas de loroco. Se observa que los caracteres longitud de ápice y número de flores por racimo presenta coeficiente de variación de 21.79 % y 21.09% por lo que son los que presentan los valores más altos sobre los demás descriptores. Los coeficientes de variación para la longitud de la corola 7.85% y longitud de estambre 8.63% son los que presentan los menores valores. El resto de descriptores están en el rango de 10 a 18 % de coeficiente de variación.

En general se puede decir que la mayoría de las variables presentan $CV < 20\%$ lo que indica que la especie tiene poca variabilidad en estos caracteres.

Cuadro Número 9. Descriptores de características cuantitativas y estadísticas simples en poblaciones de loroco (*Fernaldia spp*) de El Salvador.

Variables (descriptores)	Estadísticos				
	n	\bar{X}	S ²	r	CV (%)
Longitud de hoja (mm)	36	88.9	11.73	37.27	10.7418
Ancho de hoja (mm)	36	57.09	9.67	33.6	17.0997
Long pecíolo (mm)	36	11.8	1.39	3.4	12.2714
Ancho de pecíolo (mm)	36	2.42	0.33	1	16.4601
Longitud ápice (mm)	36	7.2	1.62	5.4	21.7984
Ancho de base (mm)	36	53.9	8.78	26.8	15.9771
Ancho de ápice (mm)	36	45.9	8.15	27.4	18.0515
Long. Pedúnculo (mm)	27	10.7	2.38	8.7	12.2813
Long. Corola (mm)	27	45.47	5.9	19	7.8539
Long. Filamento (mm)	27	21.5	1.8	5	9.8854
Long. Antera (mm)	27	5.95	0.75	2	14.8223
Long. Estambre (mm)	27	26.2	2.42	7.3	8.6372
Número de racimo	27	14.3	2.5	7.4	21.0983

n= número de muestras. \bar{x} =media aritmética. S²=desviación estándar. r= rango de variación. CV=coeficiente de variación.

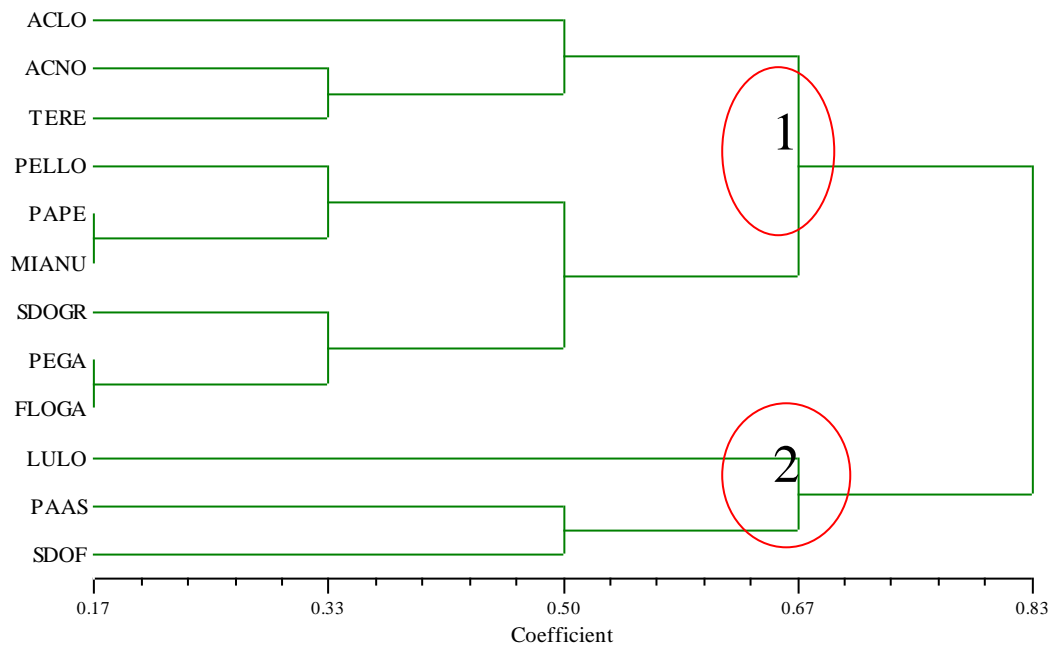
4.2.2 Evaluación de los descriptores morfológicos cualitativos

Las variables cualitativas número de anteras y número de sépalos fue de 5 para todas las plantas evaluadas, por lo cual no se tomó en los otros análisis; la variable "forma de la flor" fue diferente para la accesión procedente de San Diego presentada con el código Sdogr ya que su forma es un gajo redondo, para las demás accesiones la "forma larga" predominó.

Las variables cualitativas: tipo de borde, textura, forma y color de la hoja se detallan en el cuadro 10, las cuales también fueron utilizadas para generar el fenograma que se presenta en la figura 8.

Cuadro 10: Descriptores cualitativos para hoja de poblaciones cultivadas de loroco (*Fernaldia sp*)

DESCRPTORES									
GENOTIPO	Tipo de borde		Textura de hoja				Forma de la hoja	Color	
	Liso o entero	festonado	Con tricomas		Sin tricomas			Haz	Envés
			Haz	Envés	Haz	Envés			
1-ACLO		Si	Si	Si			Acorazonada	7.5 GY 4/4	7.5 GY 4/4
2-PELLO	Si		Si	Si			Ovalada	7.5GY 4/6	7.5 GY 5/4
3-LULO		Si		Si	Si		Ovalada	7.5 GY ¾	7.5 GY 5/6
4-PAPE	Si		Si	Si			Ovalada	7.5GY 5/8	7.5 GY 7/8
5-PAAS		Si		Si	Si		Ovalada	7.5 GY 4/6	7.5 GY 6/6
6-SDOF		Si		Si	Si		Ovalada	5 GY 5/8	7.5 GY 6/6
7-SDOGR	Si		Si	Si			Ovalada	7.5 GY 5/6	5 GY 6/6
8-PEGA	Si		Si	Si			Ovalada	7.5 GY 4/4	7.5 GY 5/6
9-3 FLOGA	Si		Si	Si			Ovalada	7.5 GY 4/4	7.5 GY5/6
10-ACNO	Si		Si	Si			Acorazonada	5GY 5/8	5 GY 6/6
11-TERE	Si		Si	Si			Acorazonada	7.5 GY 5/6	5 GY 5/8
12-MIANU	Si		Si	Si			Ovalada	7.5 GY 6/8	5GY 6/6
TOTAL	24 (66.6%)	12 (33.3%)	27 (75%)	36 (100%)	9 (25%)		27 (75%) 9 (25%)		



ACLO: acorazonada, La Lomita; Cha.; ACNO: acorazonada, Norio, Usu.; TERE: redonda, Termópilas, Lib.; PELLO: peluda, La Lomita, Cha.; PAPE: peluda, El Paraíso, Cus.; MIANU: ancha, Miramundo, Lib.; SDOGR: ovalada, San Diego, Son.; PEGA: peluda, La Galera, Vic.; 3 FLOGA: ancha, La Galera, Vic; LULO: lustrosa, La Lomita, Cha.; PAAS: áspera, El Paraíso, Cus.; SDOF: ovalada, San Diego, Son,

Figura 8. Fenograma y bootstrap (100 repeticiones) del agrupamiento de los doce genotipos de *Fernaldia spp* provenientes de 6 departamentos de El Salvador según la matriz de distancia y similitud de Neí (1978) utilizando el programa NTSYS pc 2.02 (Page, 2001)

5. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo dejan de manifiesto la baja variabilidad fenotípica y genotípica que existe entre las poblaciones de loroco seleccionadas. Resultados similares fueron observados por Azurdia, *et al.*, (2005) utilizando marcadores moleculares RAPD conducidos con materiales silvestres y cultivados mostrando que no existe una clara separación entre los materiales silvestres y los cultivados, lo cual implica que los llamados cultivados aun no han sufrido un proceso de domesticación significativo que los separe de los parientes silvestres.

En el caso que nos ocupa se hace referencia a una especie originaria de Mesoamérica, especialmente del sur de México, Guatemala, El Salvador y Honduras, en donde esta siendo objeto de domesticación debido a la alta demanda que dicha especie posee. (Azurdia *et al*/2001)

5.1 Análisis Molecular

Phillips-Mora *et al* (1995) plantea que la extracción de ADN es el proceso inicial y básico para realizar trabajos de biología molecular y por tanto buscar un método que produzca buen rendimiento y de alto peso molecular es esencial.

En la presente investigación la extracción de ADN se realizó con el método CTAB-minipreparaciones (Doyle & Doyle, 1987), dicho procedimiento es eficiente para una gran cantidad de organismos, se ha usado con éxito en muchas especies vegetales y animales.

Con este método se aisló ADN suficiente para las muestras seleccionadas obteniéndose en un rango de 28.42 µg/ml a 476.5 µg/ml para los análisis de ADN con los marcadores RAPD. Lo cual concuerda con Azurdia, *et al* (2005) ya que también obtuvieron resultados similares en la concentración de ADN para la caracterización molecular de poblaciones silvestres y cultivadas de loroco.

5.1.1 Análisis RAPD:

El dendograma generado para las doce selecciones de loroco evaluadas con siete "primers" polimórficos muestra claramente la estrecha variabilidad genética de estos genotipos observándose grupos muy parecidos, aparece reflejado en los dendogramas obtenidos para cada análisis. Lo cual concuerda con lo expresado por Azurdia *et al* (2005) ya que también obtuvo baja variabilidad genética en los materiales evaluados.

Los "primers" que mostraron amplificación fueron: UBC-157, UBC-101, UBC-111, UBC-135, UBC-199, UBC-04 y UBC-66; obteniendo un total de 38 bandas polimórficas, observando que el número de bandas por "primers" estuvo en el rango de 2 a 7 bandas. Estos resultados concuerdan con Azurdia *et al* (2005) quienes amplificaron un total de 8 "primers" uno más de los reportados en este trabajo, el "primers" UBC-06, en la caracterización molecular de poblaciones silvestres y cultivadas de loroco.

Los grupos que se forman mediante los análisis UPGMA muestran lo siguiente:

El grupo 1 lo conforman los genotipos codificados como: *Acno* (Acorazonada Norio Usulután), *tere* (redonda Termópilas, La Libertad), *sdof* (ovalada San Diego, Sonsonate), *sdogr* (ovalada San Diego, Sonsonate), *pape* (peludita Paraíso, Cuscatlán), *mianu* (ancha Miramundo, La Libertad), *pega* (peluda La Galera, San Vicente) y *floga* (3 flores La Galera, San Vicente); son características para formas de hojas: acorazonada, redonda, ovalada, ancha y peluditas. En cuanto a su ubicación se encuentran en los departamentos de Usulután, La Libertad, Sonsonate, Cuscatlán y San Vicente.

El grupo 2 está conformado por los genotipos: *Paas* (Áspera El Paraíso, Cuscatlán), *aclo* (Acorazonada Lomita, Chalatenango) y *pello* (peludita Lomita, Chalatenango) con características de hoja acorazonada, áspera y peludita respectivamente, pertenecientes a los departamentos de Cuscatlán y Chalatenango.

Además de estos dos grupos se observa que el genotipo lulo (lustrosa La Lomita, Chalatenango) está aparte de los dos grupos, siendo el grupo 3.

En términos generales, los grupos que se forman mediante los análisis UPGMA, tiene lógica si tomamos en consideración lo analizado por Azurdia *et al* (2005) que menciona que no hay agrupamiento como respuesta a altitudes de procedencia de las accesiones, y que materiales genéticos de la misma localidad (normalmente de la misma área cultivada) con diferente morfología de hoja se encuentran conformando diferentes grupos, ya que encontraron que los materiales están distribuidos en un rango de 26 a 836 msnm. Esto también es similar a lo reportado en la presente investigación ya que el rango de altitud esta comprendido de 13 a 798 msnm. Además Parada *et al*, (2002) reporta que el cultivo del loroco se adapta a un amplio rango de altitud, encontrándose mayores áreas cultivadas entre los 20 a 800 msnm.

Según los datos obtenidos en esta investigación en cuanto a las diferentes formas de hojas se mezclan en los grupos y no hay separación para esta característica. Si comparamos los resultados con los obtenidos por Azurdia *et al* (2005) plantea que la morfología de hoja parece no definir la formación de grupos. Es decir, en los diferentes grupos se pueden encontrar entremezclados materiales genéticos ya sea con hojas de forma alargada, pandurata, redondeada o acorazonada. Este elemento es importante tomarlo en consideración ya que se ha planteado frecuentemente en El Salvador la existencia de varias variedades basadas en la morfología de hoja.

Además en cuanto a las diferentes formas de hoja, durante las visitas de colecta a algunas plantaciones, se observó que algunas plantas presentan hojas alargadas en la base y a medida avanza el crecimiento de la liana, las hojas son anchas, lo que sugiere un dimorfismo foliar de esta especie, esta y otras características deben ser comprobadas en la caracterización morfológica (Azurdia *et al*, 2005).

Las plantas cultivadas sufren modificaciones tanto anatómicas, morfológicas y fisiológicas que las hacen convertirse en una población con características en parte

requeridas por el hombre, tal como mayor producción, incremento en el contenido de principios químicos, etc. Azurdia et al (2001)

En el dendograma donde se muestra las poblaciones de loroco por departamento se refleja que los materiales de los departamentos de La Libertad, Cuscatlán, Sonsonate, San Vicente y Chalatenango forman el grupo 1 y materiales de Usulután el grupo 2.

En cuanto a la distancia genética se encuentran en el rango de 0.098 a 0.2622 lo cual indica que son cercanas para las diferentes poblaciones estudiadas ya que la mínima distancia genética es 0. Los departamentos que muestran los valores de distancia más cercanos son: Cuscatlán y chalatenango; los que presentan valor de distancia más lejos son los departamentos de Usulután y Chalatenango respectivamente, lo cual se detalla en el cuadro 7.

En cuanto al índice de similitud (Nei, 1978) el rango de similitud es de 0.7693 a 0.9064 lo cual indica que la similitud entre los materiales evaluados de las diferentes poblaciones es alto ya que la máxima similitud entre especies es 1. Las poblaciones que mostraron mayor similitud son las de los departamentos de Chalatenango y Cuscatlán, en cambio los que presentan menor valor son las poblaciones de los departamentos de Chalatenango y Usulután respectivamente, se reflejan en el cuadro 7.

El análisis RAPD detectó similaridad genética en general, posiblemente debido a la forma de cultivo ya que su propagación puede hacerse por rizoma, además las selecciones que se hacen son de las mismas plantas y especialmente a que no existe actualmente resultado de programas de mejoramiento genético.

Azurdia, *et al* (2001) menciona que los materiales cultivados comercialmente no provienen de materiales mejorados, sino a partir de otras plantaciones ya establecidas de material creciendo en condiciones silvestres y en menor grado, a partir de huertos familiares. Por lo tanto las poblaciones silvestres y las cultivadas no deben presentar mayor diferenciación genética

5.2 Análisis Morfológico

Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo y cualitativo reflejan la existencia de baja variabilidad dentro de las procedencias evaluadas. Si bien es cierto que este resultado es coincidente con lo encontrado en el análisis molecular, las pocas variables que se analizaron no permitieron detectar un patrón de diferencias consistente entre las procedencias mediante pruebas estadísticas.

Los descriptores de características cuantitativas presentan coeficientes de variación bajos con los cuales se puede estimar la reducida variabilidad en las accesiones seleccionadas.

Los descriptores longitud de la corola, longitud del filamento, longitud de estambre, presentan coeficientes de variación $< 10\%$ siendo estos parámetros los que presentan los menores valores; Los descriptores longitud de hoja, longitud de pecíolo, longitud de pedúnculo, longitud de antera, ancho de base, ancho de pecíolo, ancho de hoja y ancho de ápice presentan coeficientes de variación de 10% a 18% respectivamente.

Los descriptores Longitud de ápice y número flores por racimo son los que presentan valores de CV de 21% siendo estos los mayores valores en comparación al resto de descriptores. Resultados similares fueron observados por Girón, (1995) tampoco observó variación significativa en la caracterización morfológica de 30 plantas de loroco en donde los caracteres cuantitativos indicaron que no existe diferencias entre las poblaciones estudiadas, sin embargo observaron alta variabilidad en relación con el número de inflorescencias por planta (rango de 1-5) y número de flores por inflorescencia (1-14).

El fenograma generado para los caracteres cualitativos muestra la formación de dos grupos muy similares, en donde las accesiones Aclo (Acorazonada Lomita, Chalatenango), Acno (Acorazonada Norio Usulután), Tere (redonda Termópilas, La Libertad), Pello (peludita Lomita, Chalatenango), Pape (peludita Paraíso, Cuscatlán),

Mianu (ancha Miramundo, La Libertad), Sdogr (ovalada San Diego, Sonsonate), pega (peluda La Galera, San Vicente) y floga (3 flores La Galera, San Vicente) están en el grupo 1 y las selecciones Lulo (lustrosa La Lomita, Chalatenango), Paas (Áspera El Paraíso, Cuscatlán), y Sdof (ovalada San Diego, Sonsonate) están en el grupo 2.

En general las características morfológicas cualitativas seleccionadas presentaron resultados de una baja variabilidad entre y dentro de las poblaciones estudiadas. Lo cual concuerda con la caracterización morfológica de 30 plantas de loroco que mostró que los caracteres cualitativos se manifestaron constantes, a excepción de la forma de la hoja, la cual reportó estar presente en los cinco estados posibles del descriptor (Azurdia *et al*/2001).

Por lo cual Flores, (1978) reporta que las hojas presentan borde entero o un poco ondulado, de 4 a 22 centímetros de largo y de 10 a 12 cm de ancho el haz es por lo general liso y el envés puede ser pubescente o glabro

García, (2006) en sus resultados demuestra que en la planta de Loroco se presentan transformaciones del limbo de las hojas en su desarrollo vegetativo, y difieren dichas modificaciones entre plantas, aunque procedan de una misma madre encontrando así Cuatro tipos de forma de limbo de las hojas que se identificaron como dominantes: tipo "violín H1", tipo "redondeada H2", tipo "alargada ancha H3" y tipo "alargada estrecha H4". Predominando en la fase inicial de desarrollo de la planta los tipos H1 y H2, que se transforman generalmente en tipos H3 Y H4, cuando la planta llega a la madurez. La planta tipo redondeada H2, presentó mejor desarrollo vegetativo y mayor presencia de flores y semilla.

Con base en la información anotada, se puede indicar que el loroco es una especie que esta sufriendo un proceso de domesticación particular. (Azurdia et al 2001)

6. CONCLUSIONES

1. El análisis molecular con la metodología PCR-RAPD resaltó la estrecha similitud entre los materiales cultivados de loroco (*Fernaldia spp*) con los siete "primers" polimórficos analizados, indicando una variabilidad genética reducida.
2. Tanto el análisis molecular como el cuantitativo demostraron que las procedencias estudiadas se separan en dos grupos muy parecidos aunque no implica que son genéticamente diferentes.
3. En general se puede decir que no hay diferencia genética significativa tomando en cuenta la morfología de la hoja entre los genotipos de loroco evaluados para poder separar unos materiales de otros.
4. Con este estudio no fue posible determinar la existencia de "variedades de loroco" en los materiales evaluados de El Salvador.

7. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios similares con otros marcadores y un mayor número de materiales para obtener estimaciones mas precisas sobre la diversidad genética de estas procedencias así como evaluar más "*primers*".
2. Iniciar estudios sobre mecanismos y patrones de polinización, biología reproductiva para determinar los factores relacionados con la variabilidad genética de las mismas y poder entender su comportamiento.
3. Completar la caracterización morfológica incluyendo más materiales y otros descriptores, para contrastarla con la caracterización molecular con el objeto de determinar una línea de investigación que incluya mapeo genético y programas de mejoramiento genético para esta especie.
4. Establecer programas de monitoreo de la especie para estudiar su proceso de domesticación, influencia de condiciones ambientales, aspectos fisiológicos, bioquímicas y reproductivos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azofeifa, D. 2006. Uso de Marcadores Moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico AGRONOMÍA MESOAMERICANA 17(2): 221-242. Disponible en: [http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/Agronomia_Mesoamericana/Vol.%2017 \(2\) %202006/rev_bibliografica/Azofeifa-marcadores.pdf](http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/Agronomia_Mesoamericana/Vol.%2017%20(2)%202006/rev_bibliografica/Azofeifa-marcadores.pdf)
- Azurdia, C., Leiva, M., Ayala, H., Ovando, W., López, E. 2001. El Loroco, *Fernaldia pandurata* (Apocinaceae), una especie en vías de domesticación. Tikalia (Guatemala) XIX (2): 39-54
- Azurdia, C.; López, Y. & Montes, L., 2005. Caracterización molecular de poblaciones silvestres y cultivadas de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) en El Salvador. Universidad de El Salvador, Agricultural Development International. Documento en prensa.
- Bueno, M.A.; Manzanera, J.A; Grau, J.M.; Gómez, A. & Sánchez, N. 2001. Marcadores Moleculares de ADN en *Populus sp.* INIA. Junta de Castilla y León. Salamanca, Pág. 53-74
- Black W. 1997. RAPDFST 4.0.1 - A FORTRAN Program to estimate F(ST) and effective migration rates among subpopulations using RAPD-PCR files. Department of Microbiology Colorado State University Fort Collins. February 27.
- Black, W. Antolin, M.1997. Explanation of RAPDDIST 1.0. Department of Microbiology Department of Biology Colorado State University Fort Collins, Colorado, USA.
- Black IV W. C. 1998 FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado State University, Fort Collins. Colorado, USA
- Caetano-Anolles, G., 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. In: PCR Methods and applications, (Cold Spring Harbor Lab.) Press ISSN: 85-94 pp.

Cenis J.L. 2005. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas (en línea). Murcia. Consultado 10 Dic. 2005. Disponible en: <http://www.terralia.com/revista12/pagina43.htm>

Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) s.a. Cultivo de Loroco Boletín informativo. 8pp.

_____ El Cultivo del Loroco Boletín Divulgativo N° 57 Noviembre de 1992. Departamento de Comunicaciones. San Andrés, La Libertad, El Salvador, 21 pp.

_____ El Cultivo de Loroco. Guía Técnica. Programa de Hortalizas División de Investigación, Departamento de Comunicaciones, Enero 1999. San Andrés, La libertad, El Salvador, 10 pp.

CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal). 2002. Cultivo del loroco. San Andrés, La Libertad, El Salvador. Guía técnica No. 9. 48 p.

Chang, 1979. Manual of genetic conservation of rice germoplasm for evaluation and utilization. Los Bolaños, Filipinas, IRRI. 77 pp.

Claros, M. 1998. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué vale. Encuentros en la Biología disponible en: <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros>.

Damas, M. 1984 Cultivo de Loroco (*Fernaldia pandurata Woodson*) Escuela Nacional de Agricultura Roberto Quiñónez Departamento de Fitotecnia, Unidad de Horticultura, Sub. Unidad de Hortalizas. 4pp.

Dávalos, L. M. 1997. Marcadores moleculares asociados a resistencia al virus presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogo. de la hoja blanca en arroz, (*Oryza sativa* L). Trabajo de Grado Universidad del Valle, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Santiago de Cali, Colombia, 112 pp.

- De Enrech, N. X. 2000. Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. Caracas Venezuela.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP: Phylogeny inference package, version 3.57c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington, USA
- Fernández H. 2004. Uso de Marcadores Moleculares RAPD en la Caracterización de Bancos de Germoplasma en Venezuela. REVISTA DIGITAL CENIAP HOY No. 5, mayo-agosto 2004. (en línea) Maracay, Aragua, Venezuela. Consultado 8 may. 2007. disponible en www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n5/arti/fernandez.htm
- Ferreira ME., & Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Embrapa Cenargen. Brasilia. 220 pp.
- Flores, J. 1978. Cultivo y algunos datos etnobotánicos de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson). San Salvador. Departamento de Biología Facultad de Ciencias Naturales y Humanidades. Universidad de El Salvador. Comunicaciones, Vol. II 76 pp.
- Flores, M., Flores, Z., García, B. y Gularte, Y. 1960. Tabla de composición de alimentos para Centro América y Panamá. 4a ed. Guatemala, C.A. INCAP. (Publicación E-246).
- Franco, T.L. e Hidalgo, R. (eds.) 2003. Analisis Estadísticos de datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- García, R.F. 2006. Transformaciones de las hojas en la planta de loroco (*Fernaldia Pandurata*) Universidad Técnica Latinoamericana. Santa Tecla. El Salvador con sultad.14/05/07 Disponible en: <http://www.utla.edu.sv/investigacionloroco.php>
- Garza, J.; Garza, S. Y Hartwich, F. 2003. Alianzas público privadas para la investigación y el desarrollo en cadenas agroindustriales: La situación en El Salvador. San José, Costa Rica. 102 p.

- Girón, J. 1995 Descripción de algunos factores ambientales y caracterización botánica de loroco (*Fernaldia pandurata*) en estado silvestre en la Aldea Pataché, Guastatoya, El Progreso. Informe del programa de Ejercicio profesional Supervisado, Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía 36p.
- González, D.O.; Palacios, N. & Tohme, J. 1995. Protocolos para Marcadores Moleculares. Unidad de Investigación en Biotecnología. Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia 78 pp.
- Harti, D. 1980. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.s.p.
- Izquierdo, R.M. 1993. Ingeniería Genética. Ediciones Pirámides S.A. Madrid, España. 220 pp
- Karp, A.; Kresovich, S.; Bhat, K. V.; Ayad, W. G.; Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Rome, Italy. 47 pp.
- Karp, A.; Edwards, K., 1998. DNA Markers: a global overview. In: G. Caetano-Anolles, P.M. eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gress-hoff. New York. 1-3 p.
- Kumar, S.; Tamura, K.; and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics 5:150-163.
- López, Y. 1999. Caracterización morfológica y molecular de Genotipos Silvestres de *Quassia amara* L. *Ex Blom*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Programa de Enseñanza para el Desarrollo y La Conservación. Escuela de Post –Grado. Turrialba, Costa Rica. 118 pp. (Tesis de Post –Grado)

- López, Y. 2005. Caracterización Molecular de Poblaciones Silvestres y Cultivadas de Loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) de El Salvador, UES, (comunicación personal)
- Martínez, L., 2002. Conservación de Recursos Filogenéticos disponible en:
www.agrariamanresa/f3n/20recurso/20/fitogen/Pdf
- Martínez, W. O. 1995. Análisis estadístico en biología molecular: Uso y aplicación en poblaciones vegetales. En: Memorias Simposio Internacional de Estadística en Agricultura y Medio Ambiente. CIAT, Cali, Colombia. p. 152-170.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), 2001 Guía Técnica del cultivo del loroco disponible en htt. www.agronegocios.gob.sv
- _____Anuario de estadísticas agropecuarias 2006-2007 edición 46 Dirección General de Economía Agropecuaria consultado febrero de 2008, disponible en:
<http://www.mag.gob.sv/publicaciones/05/ANUARIO2007.swf>
- Munsell Color. 1977. Munsell Color Charts for Plant Tissues, 2nd edition, revised. Munsell Color, Macbeth Division of Kollmorgen Corporation, 2441 North Calvert Street, Baltimore, Maryland 21218, EE.UU.
- MINISTERIO DE ECONOMÍA. 2001. Estudio de mercado de loroco y jocote. Disponible en: www.minec.gob.sv.
- Navarro, D. 1991. Estudio Técnico-Económico de las Prácticas Económicas de el Cultivo del Loroco y su Efecto en el Rendimiento en Los Departamentos de Sonsonate y San Salvador. Facultad de Ingeniería y Agricultura. Universidad Politécnica de El Salvador. San Salvador, El Salvador (Tesis de Ingeniero Agrónomo)
- NEI, M. Y LI, W. 1979. Mathematical model of studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:5269-5273.
- Osorio, E. 1991. Instructivo del Manejo de una Parcela de Verificación de loroco, Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) División de

- Investigación Agrícola Programa de Hortalizas. San Andrés, La Libertad, El Salvador, 7 pp.
- Osorio, E.; Parada, J.; Escamilla, M.; Cordón, E.; Zelaya, R.; Montenegro, T. 2002. Cultivo de loroco. Guía Técnica N° 9. Centro de Tecnología Agropecuaria y Forestal CENTA.
- Page R. D. M. 1996 TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Parada, M. E.; Sermeño, J. M. & Rivas, A. W. 2002. Manual Técnico: El cultivo del Loroco (*Fernaldia pandurata*) en El Salvador, Proyecto Regional de Fortalecimiento de la Vigilancia Fitosanitaria en cultivos de exportación no tradicional (VIFINEX) República de China-OIRSA, San Salvador, El Salvador, C. A. 29 pp.
- Perrier, X. 1998. Analyse de la diversité génétique: Mesures de dissimilarité et représentations arborées. Doctorat, Université Montpellier II. Montpellier. 192 p.
- Phillips-Mora, W.; Rodríguez, H. & Fritz, P. J. 1995. Marcadores de ADN: Teoría Aplicaciones y Protocolos de Trabajo con ejemplos de investigación en cacao (*Theobroma cacao*) Unidad de Biotecnología. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE) Turrialba, Costa Rica. 184 pp.
- Robles, S. R., 1995. Diccionario Genético y Fitogenético. Editorial Trillas. México D.F. 197 pp.
- Rosa, C. 1992. El cultivo de loroco. CENTA. División de Investigación Agrícola. San Andrés, La Libertad. Boletín Divulgativo No. 57. 21 pg.
- REMERFI, 2001. Estudios de la Agrodiversidad en Mesoamérica aspectos metodológicos,. Red mesoamericana de recursos filogenéticos Edit Priscila Henríquez San Salvador el salvador 50 pp

Wikipedia, Reacción en Cadena de la Polimerasa, consultado: octubre 2007 disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa

Tapia B., Cesar G. 1998 Caracterización Morfológica y Molecular de la Diversidad Genética de la Colección de *Pachyrhizus tuberosus* (Lam) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Programa de Enseñanza para el Desarrollo y La Conservación. Escuela de Post –Grado. Turrialba, Costa Rica. 157 pp. (Tesis de Post –Grado)

Tanksley, S., 1983. Molecular markers in plant breeding. Plant Molecular Biology Reporter 1:3-8.

Vásquez W., Simón A., 1998. Estudio de la Variabilidad Genética a nivel molecular y cuantitativo de seis procedencias de caoba (*Swietenia macrophylla* King) del área de Centroamérica y México. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Programa de Enseñanza para el Desarrollo y La Conservación. Escuela de Post –Grado. Turrialba, Costa Rica. 93 pp. (Tesis de Post –Grado)

Walton, M., 1993. Molecular Markers: wich one to use. Seed Word. 22-29 pp.

Weir, B. 1990. Genetic data analysis. Sinauer Associates, Suderland, M.A.s.p.

Willians, J.; Kubelik, A.; Rafalski, J. 1990. DNA Polimorphms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids research 6531-6535.

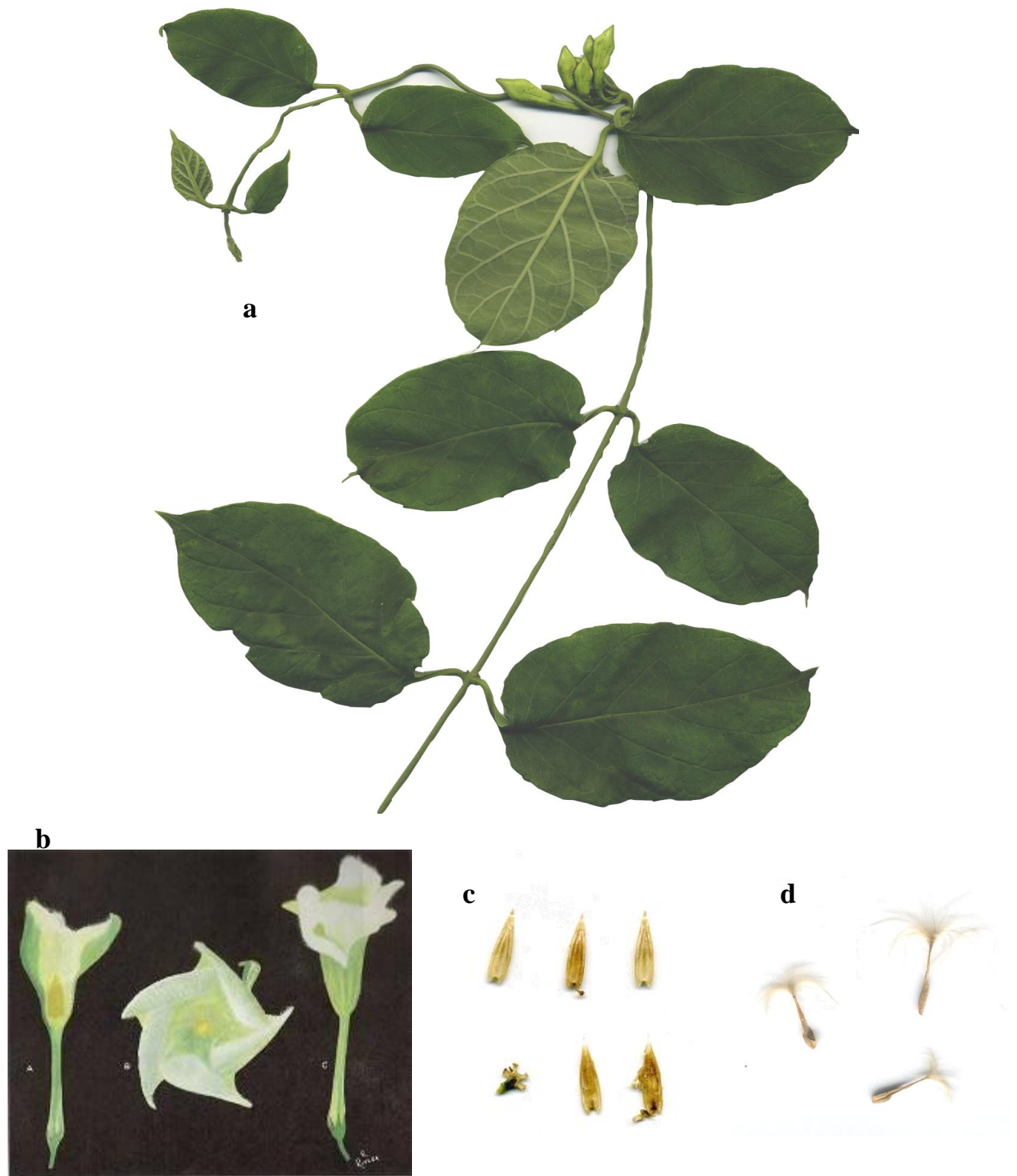
Yeh, F. ; YANG, R. ; BOYLE, T. 1997. PopGene version 1.21. Microsoft window-based freeware for population genetic análisis. A joun proyect development by Francis C. Yeh and Rang – Yang, University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research.

APÉNDICE 1

Cuadro No. 1. Contenido del "loroco" por cada 100 gramos de flores. (INCAP, análisis No. 208)

Muestra	Contenido
Valor energético	32 cal.
Humedad	89.2 g
Proteínas	2.6 g
Grasa	0.2 g
Hidratos de Carbono	1.4 g
Fibra	1.4 g
Cenizas	1.2 g
Calcio	58 g
Fósforo	46 mg
Hierro	55 mg
Vitamina "A" activada	1.1 mg
Tiamina	0.64 mg
Riboflavina	0.11 mg
Niacina	2.3 mg
Ácido ascórbico	12 mg

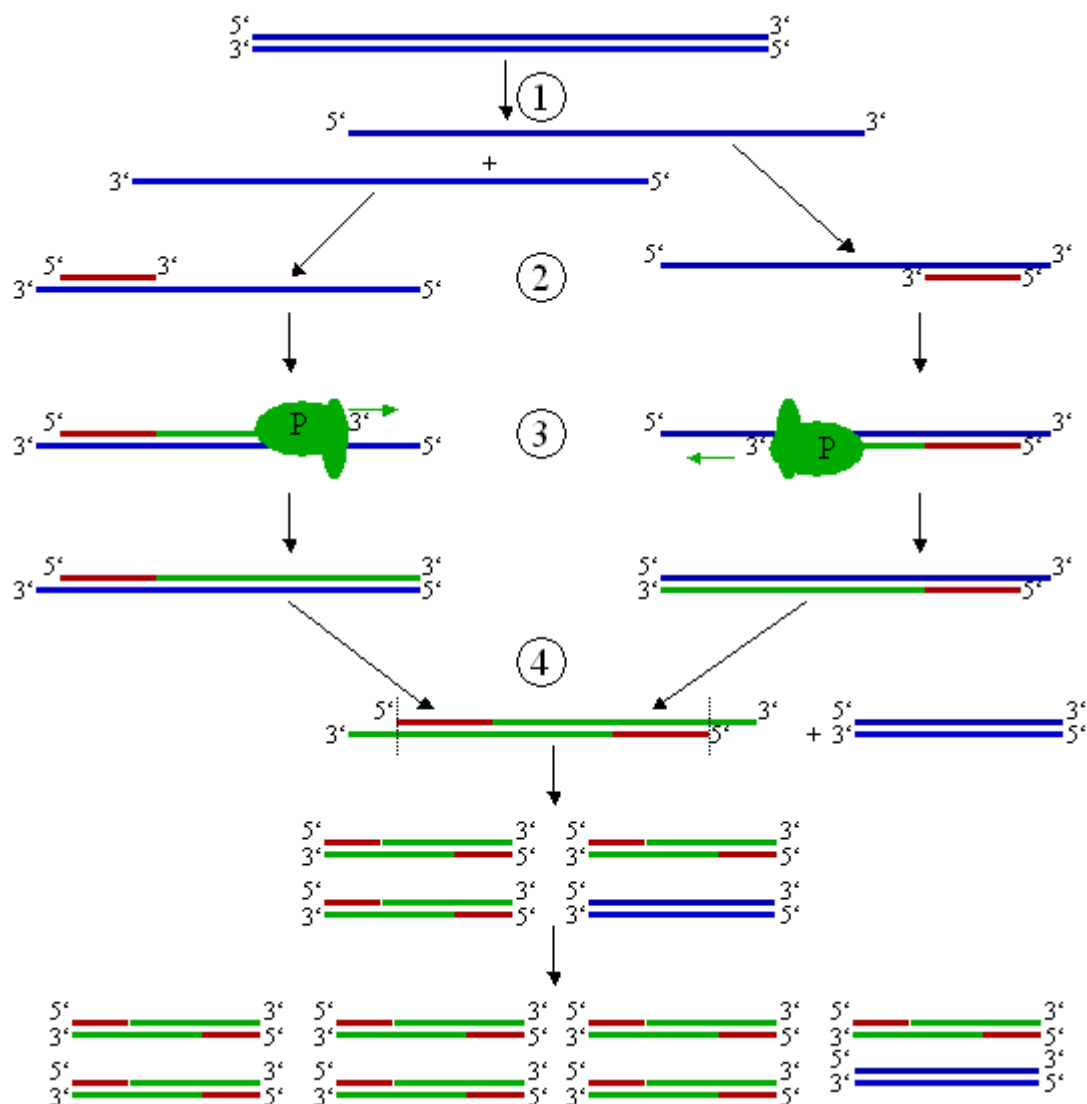
APÉNDICE 2



Diferentes partes de la planta de loroco (*Fernaldia pandurata*) **a**) rama con hojas, tallo y flores; **b**) flor de loroco; **c**) anteras **d**) semillas.

APÉNDICE 3

Esquema: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que muestra la amplificación del ADN. (http://es.wikipedia.org/wiki/Reacci%C3%B3n_en_cadena_de_la_polimerasa)



1. Denaturing at 96°C.
2. Annealing at 68°C.
3. Elongation at 72°C (P=Polymerase).
4. The first cycle is complete. The two resulting DNA strands make up the template DNA for the next cycle, thus doubling the amount of DNA duplicated for each new cycle.

APÉNDICE 4

Método CTAB mini preparaciones (Doyle & Doyle 1987) para extracción de ADN de loroco (*Fernaldia spp*) de El Salvador 2005

1. Pesar 1 g de hojas sanas
2. Estabilizar el baño María a 65°C
3. Lavar las hojas con agua destilada y eliminar con una tijera los pecíolos y nervaduras más gruesas.
4. Colocar la muestra en un mortero, agregar nitrógeno líquido y pulverizar cuidadosamente.
5. Colocar el polvo en un tubo cónico de 50 ml y agregar 5 ml de CTAB, macerar con un agitador de vidrio.
6. Agregar 5 ml de CTAB y agitar con el vortex
7. Agregar 10 µl de β - mercaptoetanol en la cámara extractora de gases y agitar en el vortex.
8. Colocar en baño María a 65°C por 60 minutos.
9. Sacar las muestras y dejar enfriar a temperatura ambiente por 10 minutos.
10. Agregar 2.5 ml de una solución de Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a temperatura ambiente (cámara extractora de gases) y agitar en el vortex.
11. Centrifugar a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos.
12. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo cónico limpio y repetir el paso 10 y 11.
13. Transferir el sobrenadante a un tubo cónico limpio con la ayuda de una micropipeta de 1 ml.
14. Agregar isopropanol (- 20°C) hasta un volumen de 15 ml en el tubo. Agitar suavemente con los dedos para precipitar el ADN y guardar en el congelador aproximadamente una hora (toda la noche se obtienen mejores resultados).
15. Centrifugar a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos.
16. Decantar el tubo y eliminar el isopropanol, con cuidado de no perder el pellet.
17. Agregar 5 ml de "buffer" de lavado (76% etanol y 10mM de acetato de amonio).
18. Agitar en el vortex hasta resuspender el pellet.
19. Dejar reposar a temperatura ambiente por 40 minutos
20. Centrifugar a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos.
21. Decantar el tubo y eliminar el "buffer" de lavado, con cuidado de no perder el pellet.
22. Invertir el tubo y dejar secar al aire a temperatura ambiente por aproximadamente 8 horas.
23. Disolver el pellet en 2 ml de TE (0.5 M, pH 7.4 y oscuridad) y resuspender agitando levemente.
24. Almacenar los tubos bien identificados en el congelador (- 40 °C).



Almacenamiento de hojas colectadas



Agregando nitrógeno líquido



Tejido de hoja de loroco pulverizado

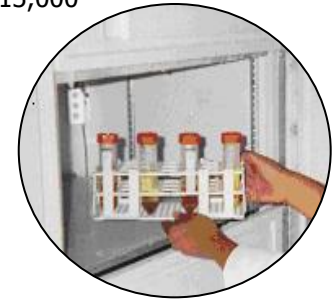


Centrifugar a 13,000 r.p.m. por 5'

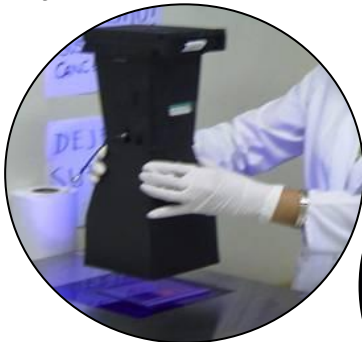


Colecta de hojas de loroco

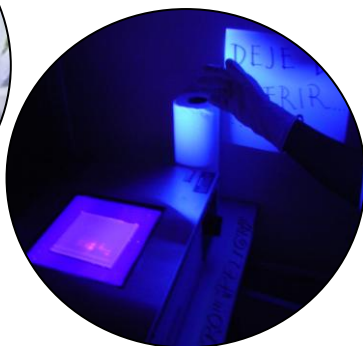
APÉNDICE 5. Extracción Y determinación de la concentración de ADN para la Caracterización Molecular de Poblaciones Cultivadas de Loroco en El Salvador 2006.



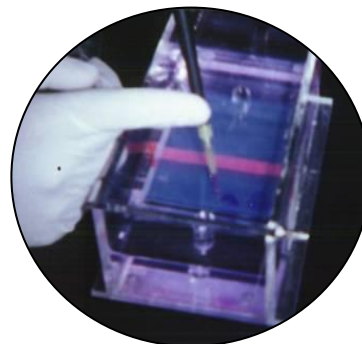
Agregar isopropanol y congelar 1 hora



Tomando foto de gel con cámara Poraroid



Gel en el transiluminador



Cámara de electroforesis



Secado de pellet (ADN) obtenido

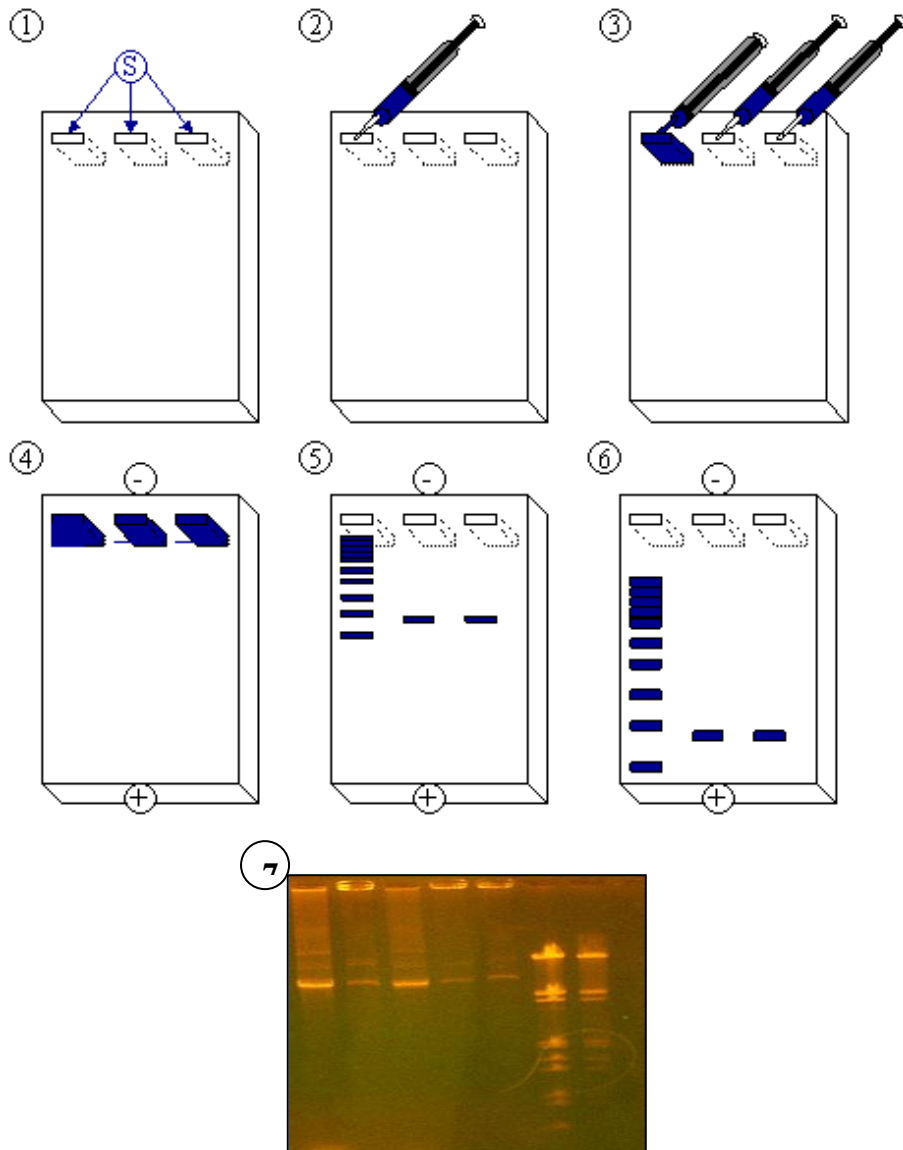
APÉNDICE 6

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA USADA EN EL ANÁLISIS RAPD (Tomado de Phillips *et.al.* 1995.)

1. Preparar suficiente Buffer TBE 0.5 X para la cámara de electroforesis y para el gel.
2. Preparar 200 ml de una solución de agarosa al 1.2% de TBE 0.5X. Calentar hasta que la agarosa se disuelva.
3. Cuando la solución se haya enfriado lo suficiente como para ser sostenida en la mano (50 - 50 °C), vacíela en la cubeta de electroforesis.
4. En un bloque multipozos adicione 2 μ l de "loading buffer" Bpb.
5. Adicione 20 μ l de la solución de ADN obtenida del PCR
6. Colocar 22 μ l de solución obtenida deL PCR en cada uno de los pozos del gel.
7. Colocar estratégicamente en uno de los pozos, 22 μ l del marcador de pesos moleculares "123 bp ladder" que se prepara así:
1 μ l del marcador + 2 μ l de Bpb + 19 μ l agua destilada.
8. Llene la cámara de electroforesis con el "bufer" TBE 0.5X hasta que alcance 1 mm por encima del gel.
9. Poner a funcionar la cámara de electroforesis y esperar a que las bandas muestren un avance suficiente en el gel. (160 miliamperios)
10. Colocar el gel en una solución de bromuro de etidio durante una hora.
11. Haciendo uso del transiluminador observar el resultado de la electroforesis y obtener la fotografía del gel.
12. Calcular el peso molecular de las bandas que aparecen en el gel mediante comparación con las bandas de la escalera de 123 pb.

APÉNDICE 7

Esquema muestra los pasos de la técnica de electroforesis en gel de agarosa



- 1) Preparación de los gels y formación de las cavidades para las siembras.
- 2) Sembrado del marcador de tamaño
- 3) Sembrado de las muestras a separar
- 4) Conexión de la fuente y aplicación del campo eléctrico
- 5) Avance de la corrida
- 6) Fin de la corrida y comparación de tamaño con el marcador
- 7) Foto real de un gel de agarosa, en el cual se observan los fragmentos de AND.

APÉNDICE 8

Lista de "Primers" evaluados para el análisis molecular de poblaciones cultivadas de loroco en El Salvador 2005

NO.	Primer UBC	Secuencia	NO.	Primer UBC	Secuencia
1	02	CCT GGG CTT G	27	115	TTC CGC GGG C
2	04	CCT GGG CTG G	28	121	ATA CAG GGA G
3	06	CCT GGG CCT A	29	123	GTC TTT CAG G
4	10	GGG GGG ATT A	30	127	ATC TGG CAG C
5	13	CCT GGG TGG A	31	135	AAG CTG CGA G
6	16	GGT GGC GGG A	32	153	GAG TCA CGA G
7	18	GGG CCG TTT A	33	146	ATG TGT TGC G
8	25	ACA GGG CTC A	34	149	AGC AGC GTG G
9	28	CCG GCC TTA A	35	155	CTG GCG GCT G
10	34	CCG GCC CCA A	36	156	GCC TGG TTG C
11	62	TTC CCC GTC G	37	157	CGT GGG CAG G
12	64	GAG GGC GGG A	38	159	GAG CCC GTA G
13	66	GAG GGC GTG A	39	163	CCC CCC AGA T
14	74	GAG CAC CTG A	40	165	GAA GGC ACT G
15	78	GAG CAC TAG C	41	169	ACG ACG TAG G
16	80	GTG CTC TAG A	42	173	CAG GCG GCG T
17	82	GGG CCC GAG G	43	175	TGG TGC TGA T
18	84	GGG CGC GAG T	44	185	GTG TCT TCA C
19	87	GGG GGG AAG C	45	188	GCT GGA CAT C
20	88	CGG GGG ATG G	46	189	TGC TAG CCT C
21	98	ATC CTG CCA G	47	193	TGC TGG CTT T
22	100	ATC GGG TCC G	48	195	GAT CTC AGC G
23	101	GCG GCT GGA G	49	197	TCC CCG TTC C
24	103	GTG ACG CCG C	50	199	GCT CCC CCA C
25	109	TGT ACG TGA C	51	200	TCG GGA TAT G
26	111	AGT AGA CGG G			

APÉNDICE 9

Lectura y registro de los productos de amplificación con la Técnica RAPD para las poblaciones de loroco (*Fernaldia spp*) de El Salvador, 2006

