

Estudio de la diversidad genética en cultivos de *Indigofera suffruticosa* en El Salvador

Milagro Dolores Reyes-Romero^{1,5}
Miguel Ángel Moreno-Mendoza^{1,2}

1 Grupo de Investigación en Genética para la Conservación Biológica-Universidad de El Salvador. Final avenida Héroes y Mártires del 30 de Julio, San Salvador.

2 Escuela de Biología-Facultad de Ciencias Naturales y Matemática-Universidad de El Salvador. Final avenida Héroes y Mártires del 30 de Julio, San Salvador. (miguel.moreno@ues.edu.sv).

Autora para correspondencia: milagro.reyes@ues.edu.sv.

Resumen

El añil es un arbusto leñoso que pertenece a la familia de las fabáceas. Se reconoce como nativa y contribuye a la agricultura sostenible de muchas regiones rurales de El Salvador, por su capacidad de fijar nitrógeno al suelo y preferida por producir indigotina de calidad que es exportada a diferentes partes del mundo. Actualmente, se desconoce su estado genético, el objetivo de esta investigación fue analizar la variabilidad genética del añil en cultivos en El Salvador. Las muestras fueron colectadas en de cinco localidades con cultivares de la especie durante el año 2021. La extracción de ADN se realizó mediante protocolo CETAB con modificaciones, seguido de la amplificación por PCR de la región ribonuclear ITS2. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen (Corea) para su secuenciación. Las secuencias fueron editadas y analizadas mediante programas bioinformáticos. Los análisis revelaron dos haplotipos distribuidos en el territorio salvadoreño y unos índices de diversidad genética baja ($Hd= 0.46$, $\pi= 0.004$). Además, se ha encontrado diferenciación génica muy alta principalmente entre la localidad CPB y el resto de las localidades ($F_{st} \geq 0.5$). Los resultados son concluyentes respecto de un a baja diversidad genética, la presencia de muy pocos haplotipos y una estructura génica basada en diferencias mayoritariamente entre poblaciones.

Palabras clave:

Indigofera suffruticosa, diversidad haplotípica, región ribonuclear ITS2.



El cultivo del añil y la producción de su tinta fueron la columna vertebral de la economía de exportación de Centroamérica hacia finales de la Colonia. Aunque el tinte y su exportación se habían llevado a cabo desde el siglo XVI en el Reino de Guatemala, no fue sino hasta la segunda mitad del siglo XVIII, que se convirtió en el producto motor de la economía centroamericana (Erquicia, 2019). El mismo autor señaló que la producción, comercialización y exportación del tinte añil, fue fundamental para el desarrollo económico, social y político de la región y en especial para la república de El Salvador.

Se le asigna la palabra añil al extracto del colorante azul índigo que se puede obtener de diferentes variedades de plantas, pero comúnmente se le ha asignado este nombre al grupo de fabáceas que se utilizan en la agricultura, siendo una de las que predominan en los cultivos salvadoreños la especie *Indigofera suffruticosa* (Stevens *et al.*, 2009).

En El Salvador, existe cuantioso germoplasma o semilla de *I. suffruticosa*, se guarda de cada cosecha o se intercambian entre agricultores con objetivos de mantener o mejorar la calidad y concentración de indigotina; pero actualmente algunos agricultores están incorporando semillas silvestres a sus prácticas agrícolas, lo que podría tener implicaciones a nivel genético en esta especie.

Por otro lado, Ahuja y Jain (2015) especifican que, a nivel de paisaje agrícola, los sistemas de monocultivo y la simplificación de los agroecosistemas representan una de las amenazas que lleva a la erosión genética. Por tal razón y dado que no existe información sobre el estado genético de esta especie en el país, que permita un mejor aprovechamiento de este recurso, el presente proyecto de investigación se planteó como objetivo fundamental, analizar la diversidad genética en cultivos de *I. suffruticosa* en El Salvador.

Muestreo y extracción de ADN

Las recolectas de muestras de *I. suffruticosa* se hicieron en los cultivos de Chalchuapa (Casa Blanca), Departamento de Santa Ana; Jardín Botánico La Laguna, Departamento de La Libertad; Hacienda Los Nacimientos, Departamento de Cuscatlán; Cantón San Francisco y Cooperativa Pinares de Berlín Departamento de Usulután y una muestra control de la especie *I. guatemalensis*, fue colectada en el Departamento de San Miguel.

Todas las colectas se realizaron en el año 2021. Se seleccionó un total de 49 muestras de tejido foliar. Para la extracción de ADN se aplicó el protocolo de extracción CETAB con ligeras modificaciones. La calidad de las muestras se verificó a electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C (Borges *et al.*, 2012).

PCR, secuenciación y análisis genéticos

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se llevó a cabo en un termociclador MultiGene™ Mini y se utilizó el cebador estándar región ribonuclear ITS2, secuencia (5'-3'): FACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTCG/RTAGAATTCCTCGCTCGCCGTTAC (Fazekas *et al.*, 2012).

Las condiciones para la PCR fueron: iniciación 95 °C durante 3 min; desnaturalización 94 °C durante 0.3 min, alineamiento 59 °C durante 0.3 min, elongación 72 °C durante 0.45 min; extensión 72 °C durante 10 min, para un total de 35 ciclos y una etapa de extensión final 4 °C. Los productos PCR se evaluaron en electroforesis en gel de agarosa al 2% (p/v) a 150 voltios por 15 min. El tamaño de los fragmentos amplificados se determinó con la ayuda de un marcador de ADN comercial de 100 bp DNA Ladder. El producto obtenido fue enviado a la empresa MacroGen Inc. (Corea) para su secuenciación.

Los electroferogramas resultantes de la secuenciación fueron analizados y editados con el software SnapGene® 5.3.1, de donde se obtuvo un archivo fasto por secuencia. La clasificación taxonómica de cada individuo se realizó por comparación de secuencias reportadas en GenBank. El alineamiento de secuencias se realizó en Mega. Para el cálculo de índices de diversidad genética

se utilizó DnaSP v6.12.03. El análisis haplotípico se realizó en PopART 1.7, y el análisis de varianza molecular (Ampova) se realizó mediante el programa Arlequin 3.5.

Respecto de los índices de diversidad genética, la cantidad de haplotipos (Hn) encontrados en las poblaciones de *I. suffruticosa* fue de dos. La diversidad haplotípica global (Hd) fue de 0.45883. El número medio de diferencias de nucleótidos (K) ha sido de 1.3765 a nivel de poblaciones individuales. La diversidad nucleotídica total (π) está representada por un valor de 0.004, donde el Cantón San Francisco resalta con una diversidad nucleotídica de 0.005; por lo tanto, es la población que mostró mayor polimorfismo entre sus individuos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Índices de diversidad genética por localidad de *I. suffruticosa*.

Poblaciones	N	Hn	Hd	K	π
Casa blanca	9	1	0	0	0
Cooperativa	11	1	0	0	0
Pinares de Berlín					
Cantón San Francisco	11	2	0.56	1.64	0.005
Hacienda los	10	1	0	0	0
Nacimientos Aguilares					
Jardín botánico	6	1	0	0	0
Total	47	2	0.46	1.38	0.004

Tamaño de la muestra (n); número de haplotipos (Hn); diversidad haplotípica (Hd); número promedio de las diferencias nucleotídicas por haplotipo (K) y diversidad nucleotídica (π).

Estos resultados reflejaron un flujo genético, asociado a valores muy bajos de diversidad haplotípica (Hd= 0.46) y nucleotídica (π = 0.004) y por consiguiente, una variabilidad genética baja, presumiblemente vinculada a procesos endogámicos y de autopolinización típicos de sistemas de monocultivos (Ruíz *et al.*, 2018), lo que sin lugar a dudas debe considerarse como erosivo del acervo genético de esta especie en condición de cultivo, lo que conduce a la pérdida de la resiliencia frente a plagas y enfermedades (Vera, 2017).

En la estimación del índice de fijación por pares de población (F_{ST}) y sus valores de significancia p , (Cuadro 2), los pares de poblaciones que tienen un valor F_{ST} de 1 son: CPB/CB, HN-A/CPB y JB/CPB; por lo tanto, su diferenciación es muy alta, los valores de F_{ST} de 0.5 para CSF/CPB, 0.4 para CSF/CB y HN-A/CSF respectivamente, 0.35 para JB/CSF se corresponden con una diferenciación genética moderada. Los pares de poblaciones HN-A/CB, JB/CB y JB/HN-A, reflejan una estimación del F_{ST} de 0 cuya diferenciación genética resulta nula.

Cuadro 2. Índice de fijación F_{ST} . Sobre la diagonal valores de p y bajo la diagonal valores F_{ST} .

Poblaciones	cb	CPB	CSF	HN-a	jb
Casa Blanca	-	0 [*]	0.0105 [*]	0.0994	0.0994
Cooperativa	1	-	0.0023 [*]	0 [*]	0 [*]
Pinares de Berlín					
Cantón San Francisco	0.4	0.52	-	0.0062 [*]	0.0457
Hacienda los	0	1	0.42	-	0.099
Nacimientos Aguilares					
Jardín Botánico	0	1	0.35	0	-

CB= Casa Blanca; CPB= Cooperativa Pinares de Berlín; CSF= Cantón San Francisco; HN-A= Hacienda Los Nacimientos Aguilares; JB= Jardín Botánico; * = cuando el valor de $p < 0.05$.

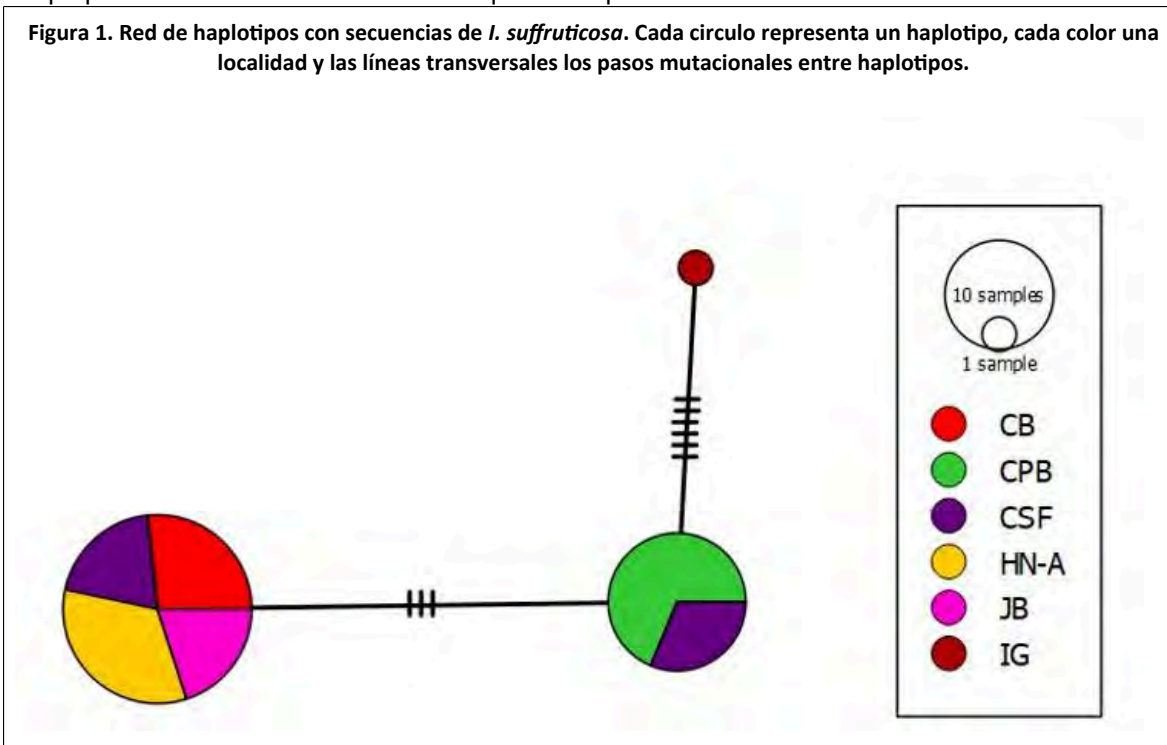
Estos resultados permitirán anticipar una relación directamente proporcional entre la distancia geográfica y la distancia genética. Coherente con lo anterior, en el caso de Hacienda los

Nacimientos y Casa Blanca se ha encontrado un $F_{ST} = 0$, debido a que geográficamente se encuentran a pocos kilómetros de distancia. Contrario a lo anterior, el Cantón San Francisco y Cooperativa Pinares de Berlín, mostraron moderada diferenciación genética $F_{ST} = 0.5$, aunque dichos cultivos se encuentran en una misma zona geográfica, lo que puede ser explicado por un flujo génico reducido entre ambas poblaciones y además, ser de grupos haplotípicos diferentes.

Al comparar la diversidad genética por localidad, en el caso del Cantón San Francisco que presenta valores de diversidad más altos ($H_d = 0.56$, $\pi = 0.005$) frente a las demás localidades y la presencia de dos haplotipos en sus muestras, revela la evidencia de introducción de germoplasma silvestre al cultivo de añil en estas localidades (como atestiguan los agricultores de dicho sitio).

Respecto del índice de fijación por pares de población (F_{ST}), se localizaron claramente diferenciación génica muy alta principalmente entre la localidad CPB y el resto de las localidades ($F_{ST} \geq 0.5$), lo que nuevamente podría ser explicado por la introducción de germoplasma silvestre en esa región del país. En la Figura 1 se apreció la red de haplotipos, donde cada círculo representa un haplotipo y su tamaño es proporcional al número de secuencias que lo comparten.

Figura 1. Red de haplotipos con secuencias de *I. suffruticosa*. Cada círculo representa un haplotipo, cada color una localidad y las líneas transversales los pasos mutacionales entre haplotipos.



El análisis mostró que el haplotipo uno es compartido por cuatro poblaciones (colores: morado CSF, rojo CB, rosado JB y amarillo HN-A) que reúne 31 secuencias. Mientras que el haplotipo dos posee 16 secuencias procedentes de las poblaciones de CPB (verde) y CSF (morado). El haplotipo tres representa la muestra control de la especie *I. guatemalensis* (color ocre).

La topología de la red muestra que el haplotipo 1 es el más distribuido, con presencia en casi todas las regiones muestreadas, por lo que se deduce su presencia en el territorio salvadoreño por más tiempo que el haplotipo 2 (Leigh y Bryant, 2015). Por su parte, la prueba de Amova (Cuadro 3), reveló que la mayoría de la variación genética observada reside en las diferencias entre las poblaciones (77.15%) y menos diferencias dentro de las poblaciones (22.85%). Estos resultados podrían deberse a la autopolinización, pues según (Hariri *et al.*, 2017), las especies autopolinizantes comúnmente exhiben una menor variación genética dentro de su población que entre las poblaciones.



Cuadro 3. Análisis de varianza molecular (Amova) de 47 secuencias de *I. suffruticosa* de cinco sitios de cultivo.

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

Conclusiones

Los análisis realizados sobre el marcador ITS2 de las diferentes poblaciones de cultivos de *I. suffruticosa*, mostraron una baja diversidad genética, la presencia de muy pocos haplotipos y una estructura génica basada en diferencias mayoritariamente entre poblaciones. Esto indica una notable disminución de la diversidad genética en el germoplasma usado para el cultivo del añil en El Salvador, lo que puede ser explicado por la presión de selección artificial propia de monocultivos y a un sistema autopolinizante.

Bibliografía

- Ahuja, M. R.; Jain, S. M. 2015. Diversity and erosion in plants. Indicators and prevention. 1st Ed. Botany Department, M. L. Sukhadia University, Udaipur, Rajasthan, India: Kishan Gopal Ramawat. 7(1): 2-3.
- Borges, D. B.; Amorim, M. B.; Waldschmidt, A. M.; Mariano-Neto, E.; Vivas, C. V. and Pereira, D. G. 2012. Optimization of DNA extraction from fresh leaf tissues of *Melanoxylon brauna* (Fabaceae). Genet. Mol. Res. 11(2):1586-91. Doi: 10.4238/2012.May.22.8. PMID: 22653632.
- Erquicia-Cruz, J. H. 2019. Añil, demografía y poder en San Vicente y San Miguel de la provincia de San Salvador del Reino de Guatemala (1750-1810) Universidad Pablo de Olavide. 3-6 pp. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=264024>.
- Fazekas, A. J.; Kuzmina, M. L.; Newmaster, S. G. and Hollingsworth, P. M. 2012. DNA Barcoding methods for land plants. In: Kress, W. J. y Erickson, D. L. Ed. DNA Barcodes. Totowa, NJ: Humana Press. 858:223-252.
- Hariri, M. R.; Bati-Chikmawati, T. and Hartana, A. 2017. Genetic diversity of *Indigofera tinctoria* L. in java and Madura islands as natural batik dye based on inter simple sequence repeat markers. Journal of mathematical and fundamental sciences. 49(2):105-115. Doi: <https://doi.org/10.5614/j.math.fund.sci.2017.49.2.1>.
- Leigh, J. W. and Bryant, D. 2015. PopART: full-feature software for haplotype network construction. Methods Ecol Evol. 6(9):1110-1116.
- Ruíz, V. C. R.; Solano, J. P. L.; Castellanos, J. S. y Olán, M. O. 2018. Variabilidad genética en algunas especies cultivadas y silvestres de amaranto. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 9(2):405-416.
- Stevens, W. D.; Montiel, O. M.; Pool, A.; Gómez, L. D.; Arbaláez, A. L. y Hollowell, V. C. 2009. Flora de Nicaragua. ANGIOSPERMAS (Fabaceae-Oxalidaceae). Missouri Botanical Garden Press. 85(2): 1016. <https://archive.org/details/mobot31753002849922/mode/1up?view=theater>.
- Vera, D. F. 2017. Biodiversidad intraespecífica varietal para mejorar ambientes degradados por monocultivos en musáceas, como medida de control de plagas y enfermedades. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 12-14 pp. <http://hdl.handle.net/10803/457711>.



Estudio de la diversidad genética en cultivos de *Indigofera suffruticosa* en El Salvador

Journal Information
Journal ID (publisher-id): remexca
Title: Revista mexicana de ciencias agrícolas
Abbreviated Title: Rev. Mex. Cienc. Agríc
ISSN (print): 2007-0934
Publisher: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Article/Issue Information
Date received: 01 November 2024
Date accepted: 01 December 2024
Publication date: 12 January 2025
Publication date: Nov-Dec 2024
Volume: 15
Issue: 8
Electronic Location Identifier: e3557
DOI: 10.29312/remexca.v15i8.3557

Categories

Subject: Nota de investigación

Palabras clave:

Palabras clave:

Indigofera suffruticosa
diversidad haplotípica
región ribonuclear ITS2

Counts

Figures: 1

Tables: 3

Equations: 0

References: 9

Pages: 0