

**"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MATERIALES
SELECCIONADOS DE CARDAMOMO -*Elettaria
cardamomum* L. (Matón)- UTILIZANDO
MARCADORES AFLP."**

ANA CRISTINA TAMAYO DOMÍNGUEZ

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN BIOTECNOLOGIA
SECCIONAL MEDELLÍN
2003**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MATERIALES
SELECCIONADOS DE CARDAMOMO -*Elettaria cardamomum* L.
(Matón)- UTILIZANDO MARCADORES AFLP.”**

ANA CRISTINA TAMAYO DOMÍNGUEZ

**Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en Biotecnología**

**Directora
LUCIA AFANADOR KAFURI M.Sc.**

**Asesor
CARLOS REYES S. PhD.
Asesor
RODRIGO HOYOS S. PhD.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIONAL MEDELLÍN
POSGRADO EN BIOTECNOLOGIA
2003**

**"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MATERIALES
SELECCIONADOS DE CARDAMOMO -*Elettaria cardamomum* L.
(Matón)- UTILIZANDO MARCADORES AFLP."**

**LUCIA AFANADOR KAFURI
DIRECTORA**

JURADO

JURADO

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIONAL MEDELLÍN
POSGRADO EN BIOTECNOLOGIA
2003**

Dedicatoria

A mis padres Ramón y Teresita, a quienes, gracias a su esfuerzo y dedicación durante tantos años, debo la mayor parte de mi desarrollo profesional y personal;

A Luis Mauricio mi esposo, por su apoyo y su amor inspirador;

A Alberto mi hermano y segundo padre, por ayudarme en cada momento;

A mi hermana y hermanos y sus familias y

A los que siempre me han apoyado.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas e instituciones que de una u otra forma contribuyeron para el buen desarrollo del presente trabajo, con aportes materiales e intelectuales; poniendo a consideración que este trabajo es fruto de un proceso que he iniciado en campo desde 1993 y del cual se obtienen sus valiosos resultados a la fecha y donde muchos merecen estar en el primer lugar de estos agradecimientos.

A la Doctora Lucia Afanador por su valiosa colaboración, apoyo y asesoría y su actitud diligente en todos los momentos del trabajo.

A los Doctores Carlos Astorga y Wilberth Phillips, por sus valiosos consejos y gran colaboración.

A Olman Quirós, excelente compañero, con quien se trabaja y se ríe.

A mis ex compañeros de trabajo, Guillermo León Arango y Darío Usuga con quienes desarrollamos el programa de mejoramiento genético del cultivo y avanzamos en su progreso en el Municipio de Jericó durante tantos años en un excelente ambiente de trabajo, amistad y compañerismo, gracias por su ayuda siempre incondicional.

Al Dr. Jaime Cárdenas por su confianza y apoyo; igualmente a los Propietarios y ex compañeros de trabajo de la empresa Cultivares S.A., sin los cuales el proceso de tantos años de trabajo con este cultivo no hubiera sido posible.

A la Doctora Maria Elena Márquez, por su apoyo y comprensión.

Al Dr. Carlos Reyes por su confianza y apoyo.

A Joaquín Calderón, compañero de trabajo en EARTH por su ayuda y entusiasmo.

A los jefes inmediatos de la Universidad EARTH, por su apoyo invaluable para la culminación del trabajo.

A los Asesores y Profesores de la Universidad Nacional de Colombia Seccional Medellín, por sus valiosas enseñanzas.

A las Doctoras Nelly Vásquez y Maria Elena Aguilar y al equipo de trabajo del laboratorio de Biología Molecular en CATIE por su ayuda.

A Ligia Luz Corrales por su apoyo y colaboración.

Agradezco muy especialmente a mi familia y amigos y a todas las personas en Jericó, Medellín, CATIE y Universidad EARTH que de alguna forma directa o indirectamente contribuyeron en este proceso de desarrollo y crecimiento personal.

CONTENIDO	Pág.
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ANEXOS	XII
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. CARDAMOMO - <i>Elettaria cardamomum</i> L. (Matón)-	5
2.1.1. Generalidades de la especie	5
2.1.2. Aspectos agronómicos del cardamomo	6
2.2. MARCADORES MOLECULARES	11
2.2.1. Isoenzimas	12
2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR-	12
2.2.3. Marcadores RFLP	13
2.2.4. Marcadores RAPD	13
2.2.5. Marcadores AFLP	14
3. METODOLOGÍA PROPUESTA	17

3.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	17
3.2. MATERIAL VEGETAL	17
3.3. PARÁMETROS DE SELECCIÓN DE MATERIALES	20
3.4. METODOLOGÍA	23
3.4.1. Extracción de ADN	23
3.4.2. Cuantificación de ADN	24
3.4.3. Análisis con marcadores genéticos AFLP	24
3.4.4. Análisis electroforético	26
3.4.5. Análisis de los datos	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN	28
4.2. ANÁLISIS CON MARCADORES GENÉTICOS AFLP	29
4.2.1. Digestión / ligación y preamplificación del ADN	29
4.2.2. Amplificación del ADN	30
4.3. ANÁLISIS DE GRUPOS GENÉTICOS	35
4.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS MATERIALES	37
4.5. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS MATERIALES	38
4.6. RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES	42
5. CONCLUSIONES	44
6. RECOMENDACIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXOS	58

LISTA DE TABLAS

Pág.

TABLA 1. Parámetros tenidos en cuenta para la selección de los materiales de cardamomo utilizados en el estudio. CM 1 al CM 14 materiales colombianos, CR 15 material procedente de Costa Rica.	18
TABLA 2. Lista de las combinaciones de primers EcoRI/ MseI usadas en la evaluación de polimorfismo presente en cardamomo.	31
TABLA 3. Número de fragmentos AFLP polimórficos y porcentaje de polimorfismo obtenido en cada combinación de primer EcoRI/ MseI para todos los genotipos de cardamomo evaluados excepto la accesión silvestre CM 14.	33
TABLA 4. Características morfológicas y agronómicas de las accesiones mejoradas de cardamomo agrupadas por su similaridad genética por marcadores AFLP. *El valor promedio no incluye los valores de la accesión CM 8.	40

LISTA DE FIGURAS

Pág.

- FIGURA 1.** Características morfológicas de materiales de cardamomo Tipo mejorados, representadas en los genotipos CM 1, CM 3, CM 8 y CM 9. 19
- FIGURA 2.** Características morfológicas de materiales de cardamomo Tipo intermedios, representados en los genotipos CM 10 y CM 11. 19
- FIGURA 3.** Características morfológicas de materiales de cardamomo Tipo comunes, representadas en los genotipos CM 12 y CM 13. 20
- FIGURA 4.** Características morfológicas de material de cardamomo Tipo silvestre, representado en el genotipo CM 14. 20
- FIGURA 5.** Grano de cardamomo con la característica de grano abierto y grano manchado respectivamente. 22
- FIGURA 6.** Características morfológicas para la clasificación del grano de cardamomo de acuerdo al tamaño: A: Grano Tipo Pequeño; B: Grano Tipo Mediano y C: Grano Tipo Grande. 22
- FIGURA 7.** Características morfológicas para la clasificación del grano de cardamomo de acuerdo al color: A: Grano verde claro, B: Grano verde y C: Grano verde intenso. 23

FIGURA 8. ADN total de 15 accesiones de *Elettaria cardamomun* en un gel de agarosa al 0.8 %. De izquierda a derecha el carril 1 y el carril 20 corresponden al patrón de referencia a 100 ng/ μ l y del carril 2 al 19 corresponden a las muestras CM1 a CR15 y repeticiones de CM1 a CM3 29

FIGURA 9. Electroforesis en un gel de agarosa de la digestión - ligación del ADN de las 15 accesiones de cardamomo. De izquierda a derecha CM1 a CR15, numerados de 1 a 15 respectivamente. 30

FIGURA 10. Perfil electroforético de marcadores AFLP en tres accesiones de cardamomo utilizando 16 combinaciones de primers EcoRI/MseI. De izquierda a derecha A: Genotipo CM7, B: Genotipo CM11, C: Genotipo CM13. 32

FIGURA 11. Perfil electroforético de marcadores AFLP en 15 genotipos de cardamomo utilizando tres combinaciones de primers EcoRI/ MseI. De izquierda a derecha A: Combinación EACC/MCTC, B: Combinación EACC/MCAC, C: Combinación EACC/MCAG. 34

FIGURA 12. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Jaccard entre 15 genotipos de cardamomo. Coeficiente de correlación cofenética = 0.962 35

LISTA DE ANEXOS

Pág.

ANEXO 1. Parámetros de evaluación de los materiales seleccionados dentro del programa de mejoramiento genético de la empresa Cultivares S.A. en el municipio de Jericó – departamento de Antioquia – Colombia.	59
ANEXO 2. Parámetros de evaluación de los 15 materiales seleccionados para caracterización molecular mediante AFLP. CM 1 a CM 14 procedentes de Colombia y CR15 procedente de Costa Rica.	60
ANEXO 3: Protocolo de extracción de ADN y Preparación de reactivos para extracción de ADN.	63
ANEXO 4: Preparación del gel de agarosa para cuantificación de ADN.	65
ANEXO 5: Preparación de vidrios y reactivos para gel de poliacrilamida.	67
ANEXO 6: Procedimiento para revelado de gel de poliacrilamida.	71
ANEXO 7: Matriz binaria con presencia o ausencia de bandas obtenida de los patrones electroforéticos en cada gel, evaluando las 15 accesiones de cardamomo.	72
ANEXO 8: Matriz de similaridad usando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA para el análisis de agrupamiento para las 15 accesiones de cardamomo.	74

RESUMEN

En los últimos años, el cultivo de cardamomo -*Elettaria cardamomum* L. (Matón)- ha tomado gran importancia en Colombia, convirtiéndose en una alternativa laboral y económica en zonas rurales; en generador de divisas y potencial de diversificación agrícola en zonas cafeteras, donde las plantaciones de cardamomo se han acogido con gran entusiasmo, por las condiciones climáticas favorables y debido a la crisis en la caficultura nacional. En el municipio de Jericó, el cultivo de cardamomo se ha propagado a través de 17 años, por diferentes métodos vía sexual y asexual, lo cual ha conducido a una gran heterogeneidad morfológica. Los genotipos iniciales utilizados como base para el programa de mejoramiento genético de este cultivo, fueron tomados de otras zonas del departamento de Antioquia y de Costa Rica, y actualmente están representados en materiales mejorados y en materiales comunes, los cuales tienen características deseables e indeseables de acuerdo con los estándares de calidad a nivel internacional e incluso presentan características agronómicas de gran interés. El material vegetal del cultivo ha tenido proceso de selección recurrente y posteriormente selección clonal. En ese proceso, se han realizado introducciones de plantas de otras zonas, selección de materiales, hibridación, conservación de progenie y multiplicación *in vitro*.

Las investigaciones con estos genotipos colombianos toman mucha importancia debido a su alta productividad comparada con otros países y con las cifras promedias nacionales, los materiales mejorados tienen un promedio de producción entre ellos de 5.4 kilos secos/ planta/ año frente a los comunes que producen 1.2 kilos secos/ planta/ año. Con el propósito de evaluar la variabilidad genética entre los genotipos de cardamomo seleccionados se utilizaron marcadores moleculares tipo AFLP. Se analizaron un total de 15 accesiones compuestas por nueve de los materiales mejorados, tres comunes, dos intermedios, y uno silvestre, utilizando para ello 11 combinaciones de primers EcoRI-MseI. Se generaron y analizaron un total de 100 marcadores AFLP informativos. El análisis de agrupamiento se realizó mediante la construcción de matrices de datos utilizando el programa MVSP –Multi Variate Statistical Package- (Kovach, 1999), y el coeficiente de similitud de Jaccard para generar el dendrograma. El método UPGMA - Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means- (Bhat *et al*, 1995), fue utilizado para el análisis estadístico de los resultados. Las combinaciones EcoRI y MseI que más bandas polimórficas presentaron fueron EACC/MCTC y EACC/MCTA ambas con 12 fragmentos polimórficos. Los genotipos de cardamomo seleccionados en el municipio de Jericó muestran un agrupamiento entre ellos donde se incluyen 7 de los 9 materiales mejorados, con una marcada diferencia contra los materiales intermedios, comunes y el silvestre, separándose incluso del material de Costa Rica.

Palabras claves: Cardamomo, *Elettaria cardamomum*, AFLP, variabilidad genética.

ABSTRACT

In recent years, the planting of cardamom -*Elettaria cardamomum* L. (Matón)- has become very important in Colombia, developing into a viable form of work and an economic alternative in rural areas. It has begun generating income and potential agricultural diversification in coffee growing regions where cardamom plantations had originally been developed because of the excellent weather conditions and as a result of the national coffee production crisis. In the municipality of Jericó, the cardamom crop has been propagated over the past 17 years by both sexual and asexual methods, which, as a result, has produced a great morphological heterogeneity. The original agricultural genotypes utilized in this program of genetic improvement were acquired from other areas within the Department of Antioquia and from Costa Rica. These materials are currently represented in both the improved and common varieties, which have both desirable and undesirable characteristics dependant on international quality standards. They also present agricultural characteristics of great interest. The vegetable material of the crop has undergone a constant process of selection and a post-cloning selection. Throughout this process, introduction of plant samples from other zones, selection of materials, hybridization, conservation of progeny, and in- vitro multiplication have all taken place. Because of their high rate of productivity compared to those of other countries and also the national average, research with these particular Colombian cardamom genotypes is becoming very important. The improved varieties have an average production of about 5.4 kg dry/plant/year in contrast to the common varieties that produce 1.2 kg dry/plant/year. To evaluate the genetic variability among selected cardamom genotypes, molecular markers (type AFLP) were used. A total of 15 accessions comprised of nine improved varieties, three common ones, two intermediary ones, and one wild one were analyzed, utilizing 11 combinations EcoRI-MseI primers. 100 informative AFLP Markers were generated and analyzed. The grouping analysis was accomplished through the creation of data matrices using the MSVP program -Multi Variate Statistical Package- (Kovach, 1999), and using the Jaccard's similitude coefficient to generate a dendrogram. The UPGM -Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means- (Bhat *et al*, 1995) method was used for the statistical analysis of the results. The EcoRI and MseI combinations that presented more polymorphic bands were EACC/MCTA both with 12 each. The selected cardamom genotypes selected from the municipality of Jericó show a strong grouping tendency among them, in which 7 of the 9 improved varieties are included, which indicates a significant difference from the intermediary, common, and wild materials, and even from the Costa Rican material.

Key words: Cardamom, *Elettaria cardamomum*, AFLP, genetic variability.

1. INTRODUCCIÓN

El cardamomo -*Elettaria cardamomum* L. (Matón)- es una planta monocotiledónea originaria de la India y Sri Lanka, perteneciente a la familia Zingiberaceae. Con el nombre de cardamomo se encuentran dos especies, la *Amomun subulatum* Roxb. (también llamado cardamomo largo –The large cardamom-) (Sajina *et al*, 1997 y Dubey y Yadav, 2001) y *Elettaria cardamomum* L. (Matón) (también llamado pequeño cardamomo – Small cardamom-) (Patil *et al*, 1998 y Naidu, 1986). Dentro del género *Elettaria* spp. se han identificado dos especies botánicas. La de la India, *E. cardamomum* Matón var. Minúscula Burkill y el originario de Sri Lanka, *E. cardamomum* Matón var. Major Thwaites (Moya y Lemarie, 1993). Según Moya y Lemarie, 1993, el cardamomo de la India ha tenido hibridación natural dando variedades como la Malabar y Mysore que se distinguen por el vigor del cultivo, tamaño de la planta, cápsulas y hojas, tolerancia a la sequía, adaptación a bajas temperaturas. La variedad Mysore fue la primera introducida en América, en el norte de Guatemala a principios del siglo XX.

El cultivo de cardamomo se conoce desde el siglo IV a.C.; según Lüttmann, 1985, fue introducido a Centroamérica en 1914. Lemus 2003, reporta el ingreso del cultivo a Guatemala en 1917, llevado por el alemán Oscar Majus a la zona de Cobán. En Colombia se inició el cultivo como alternativa de diversificación en algunas zonas cafeteras del país. La empresa Cultivares S.A. importó desde Costa Rica parte del material vegetal que dió inicio a las siembras en el municipio de Jericó -Antioquia- (Tamayo, 1993-2001).

La empresa Cultivares S.A. trabaja con materiales de cardamomo seleccionados de poblaciones obtenidas por los cruces naturales de los clones introducidos, buscando mejorar características para una alta productividad y calidad de grano, evaluando parámetros deseables e indeseables y aspectos agronómicos (Tamayo, 1993-2001).

El cultivo se propaga de forma sexual y asexual. La propagación sexual es por semilla, la propagación asexual es por multiplicación *in vitro* o por rizomas, lo cual tiene ventajas en la similitud con el material de procedencia (Tamayo, 1993-2001).

Las plantas seleccionadas para el programa de mejoramiento genético en el municipio de Jericó, se obtuvieron mediante un proceso de selección de materiales que cumplieran características deseables para el mercado internacional en color y tamaño de grano. Las plantas obtenidas de esa generación se sometieron al mismo proceso de selección del anterior, para esto se tuvieron en cuenta parámetros de calidad y cantidad y aspectos agronómicos y fitosanitarios.

Para desarrollar el programa de mejoramiento del cultivo de cardamomo se han requerido estudios básicos tales como fisiología de la planta, requerimientos agronómicos, caracterización morfológica y establecimiento de poblaciones con la mezcla de los clones promisorios.

En los países donde el cardamomo es un cultivo de importancia económica, incluido Colombia, no existen reportes de estudios encaminados a evaluar la variación genética entre y dentro de las especies de *Elettaria*. En Colombia los únicos trabajos realizados con cardamomo han estado encaminados al mejoramiento y selección de materiales con características agronómicas deseables, pero no se ha incursionado en estudios de caracterización molecular de las colecciones existentes, ni tampoco en la búsqueda e incorporación en ellos de genes de resistencia a enfermedades.

Las técnicas de marcadores moleculares basados en ADN han presentado resultados muy satisfactorios para evaluación de diversidad genética en gran número de especies vegetales, entre estas pruebas se encuentran las técnicas AFLP las cuales permiten detectar gran polimorfismo y tienen buena reproducibilidad (Becerra y Paredes, 2000). La técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), o producción de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados se ha utilizado con diferentes propósitos como evaluar variedades de *Manihot esculenta* (Elias *et al*, 2000); en

Hordeum vulgare para determinar la posición de loci, obteniendo 819 loci marcadores (Pozzi *et al*, 2003); para evaluar diversidad genética en *Alstroemeria* spp. (Tae-Ho *et al*, 2000); en caña de azúcar para identificación de genomas (Kraft *et al*, 2000); en especies y variedades de Cítricos como técnica para asistir los programas de mejoramiento genético mediante caracterización del genoma de la especie *Citrus* spp. (Mendoza *et al*, 2001); en café para evaluar 11 accesiones de *Coffea arabica* L. en Costa Rica (Anthony *et al*, 2002); en Ecuador, se ha usado en Caricaceae para evaluar su relación con especies nativas incluyendo 95 accesiones de tres géneros diferentes, permitiendo hacer agrupamientos y evaluar la clasificación taxonómica de las accesiones (Droogenbroeck *et al*, 2002); entre muchos casos de gran interés económico y científico.

La posibilidad de evaluar molecularmente la variabilidad genética entre los materiales de cardamomo seleccionados por la empresa Cultivares S.A, constituye una etapa importante en el avance de las investigaciones futuras tendientes al mejoramiento genético de la especie.

En el presente trabajo se han incluido para la evaluación, genotipos con diferencias en productividad y calidad, entre promedias y sobresalientes, y un material silvestre con características de color y tamaño de fruto por fuera de los estándares comerciales.

El objetivo general de la presente investigación fue evaluar las posibles diferencias moleculares existentes entre materiales de cardamomo preseleccionados morfológicamente utilizando marcadores AFLP. Los objetivos específicos consistieron en acondicionar las metodologías de extracción de ADN y de amplificación por medio de la técnica AFLP para cardamomo y evaluar las posibles diferencias moleculares entre 9 materiales promisorios de cardamomo, 2 intermedios, 3 comunes y 1 silvestre utilizando la técnica AFLP.

Este trabajo se planteó como avance del programa de mejoramiento para el cultivo de cardamomo en Colombia y como referencia para otros productores internacionales.

HIPÓTESIS

Las hipótesis planteadas para la presente investigación fueron:

- Los materiales de cardamomo de Jericó, aunque todos han sido obtenidos por un proceso de hibridación natural entre si, presentan variabilidad genética.
- Aunque la base genética de los genotipos de cardamomo procedentes de Jericó es estrecha, el poder discriminatorio de los marcadores AFLP permite detectar variaciones pequeñas en el material genético de estos y establecer diferencias entre ellos.
- Los genotipos de Jericó aún conservan cierta relación con el cardamomo procedente de Costa Rica.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. CARDAMOMO - *Elettaria cardamomum* L. (Matón)-.

Elettaria cardamomum L. (Matón), más conocida como cardamomo, es una especia con gran potencial comercial debido al interés de muchos consumidores de todos los continentes; no se ha popularizado su cultivo, sin embargo podría constituirse en una gran alternativa de producción y comercialización para algunas zonas de Centro y Latinoamérica, donde se encuentran zonas de vida ideales para su producción.

2.1.1. Generalidades de la especie

El cardamomo es una planta monocotiledónea originaria de la India y Sri Lanka, perteneciente a la familia Zingiberaceae. Con el nombre de cardamomo se encuentran dos especies, la *Amomum subulatum* Roxb. (también llamado cardamomo largo –The large cardamom-) (Sajina *et al*, 1997 y Dubey y Yadav, 2001) y *Elettaria cardamomum* L. (Matón) (también llamado pequeño cardamomo – Small cardamom-) (Patil *et al*, 1998 y Naidu, 1986). Dentro del género *Elettaria* spp. se han identificado dos especies botánicas. La de la India, *E. cardamomum* Matón var. Minúscula Burkill y el originario de Sri Lanka, *E. cardamomum* Matón var. Major Thwaites. (Moya y Lemarie, 1993). Según Moya y Lemarie, 1993, el cardamomo de la India ha tenido hibridación natural dando variedades como la Malabar y Mysore que se distinguen por el vigor del cultivo, tamaño de la planta, cápsulas y hojas, tolerancia a la sequía, adaptación a bajas temperaturas. La variedad Mysore fue la primera introducida en América, en el norte de Guatemala a principios del siglo XX. Investigaciones recientes en la India, presentan líneas elite de

cardamomo que superan a la Malabar en características de importancia económica. (Korikanthimath y Mulge, 1998); en Karnataka, India, 12 clones de cardamomo fueron probados con superioridad en producción, medida en cápsulas y panículas comparadas con los materiales locales (Korikanthimath *et al*, 1997).

Las plantas de cardamomo son herbáceas, perennes, con alturas entre 2.5 a 5.0 metros, poseen rizoma tuberoso que forma macollas en número variable. Las hojas son lanceoladas de color verde oscuro con nervadura central dispuestas en forma alternada. Del rizoma nacen los tallos florales con tendencia a inclinarse horizontalmente, producen flores bisexuales dispuestas en panículas, el fruto es una cápsula elipsoidal o esférica, dehiscente, oblonga, trilocular. Cada cápsula contiene las semillas de color café oscuro ricas en almidón que contienen aceites y resinas. (Moya y Lemarie, 1993).

2.1.2. Aspectos agronómicos del cardamomo

El cultivo de cardamomo se conoce desde el siglo IV a.C.; según Lüttmann, 1985, fue introducido a Centroamérica en 1914. Lemus 2003, reporta el ingreso del cultivo a Guatemala en 1917, llevado por el alemán Oscar Majus a la zona de Cobán, Barret, 1995, lo reporta como cultivo no tradicional también para Guatemala.

En Colombia se inició el cultivo como alternativa de diversificación en algunas zonas cafeteras del país. La empresa Cultivares S.A. importó desde Costa Rica parte del material vegetal que dió inicio a las siembras en el municipio de Jericó -Antioquia- (Tamayo, 1993-2001).

Las variedades mas conocidas son la variedad Malabar y Ceilán. La variedad Malabar es originaria de la costa sur occidental de la India, sus tallos son largos, sus hojas delgadas, los tallos florales son cortos, el fruto pequeño y redondo. La variedad Ceilán es originaria de la isla del mismo nombre, sus tallos son cortos, gruesos y presentan tono rosado en la base, las hojas son grandes y anchas, el tallo floral es largo y el fruto es grande y alargado, (Lüttmann, 1985). En el municipio de Jericó, se encuentran

plantas con características similares entre ellas, presentando tallos largos, tallos florales largos y frutos triangulares y oblongos (Tamayo, 1993-2001).

La empresa Cultivares S.A. trabaja con materiales de cardamomo seleccionados de poblaciones obtenidas por los cruces naturales de los clones introducidos, buscando mejorar características para una alta productividad, calidad de grano, evaluando parámetros deseables e indeseables y aspectos agronómicos (Tamayo, 1993-2001).

El cultivo se propaga de forma sexual y asexual. La propagación sexual es por semilla, la propagación asexual es por multiplicación *in vitro* o por rizomas, lo cual tiene ventajas en la similitud con el material de procedencia (Tamayo, 1993-2001).

La flor del cardamomo requiere la presencia de polinizadores externos (Lang, 1983), mientras mayor sea el tiempo de exposición de las flores a los polinizadores mayor será el porcentaje de fructificación. La polinización es uno de los factores que más influye en la productividad del cultivo, según Siddappaji *et al*, 1985, el 98% de la polinización es debida a la abeja melífera. Pattanshetti *et al*, 1973 reporta el incremento en la producción del cardamomo mayor de 50 % en presencia de abeja melífera, del 37.2 % (Chandran *et al*, 1983) y del 44.5% en presencia de abejas (Siddappaji *et al*, 1985); Chaudhary y Kumar, 2000 reportan que el número de cápsulas por panícula, el número de semillas y el número de semilla por cápsula es más alto con polinización abierta que sin polinización por insectos; Mohan, 1986 reporta un estudio donde se atribuyó el 92 % de la polinización por abeja melífera, del 5 % por hormigas y del 3 % por moscas.

En cuanto a plagas de importancia económica para el cultivo en Antioquia - Colombia el más limitante es el picudo del cardamomo (*Cholus* spp.) y algunos defoliadores de sombrío; en cuanto a enfermedades la más limitante es la pudrición basal causada por una asociación de *Fusarium* spp. y *Pithyum* spp. (Tamayo, 1993-2001, datos no publicados); en India reportan plagas y enfermedades de importancia económica de diversa índole, algunas de estas son:

- Virus del Mosaico del Cardamomo - CarMV - o enfermedad de "Katte" (Naidu, 1986) (Venugopal *et al*, 2000) y su vector *Pentalonia nigronervosa* – Homoptera - Aphididae (Rajan, 1981) (Mathew *et al*, 1999).
- Enfermedad viral "Vein-clearing" -CarVCV- en India es también conocida como "Kokke-kandu" (Anand *et al*, 1998) (Venugopal *et al*, 2000).
- Virus de la Necrosis del Cardamomo -CarNV- (Venugopal *et al*, 2000).
- *Dichocrocis puntiferalis* -Lepidoptera- Pyralidae (Naganathan *et al*, 1983).
- *Conoghetes puntiferalis* -Lepidoptera- Pyralidae (Thyagaraj y Chakravarthy, 1999).
- *Attacus atlas* Linn. -Lepidoptera-Saturnidae-, defoliador de cardamomo (Jasvir *et al*, 1997).
- *Eupterote canariaca* y *E. cardamomi* –Lepidoptera- Eupterotidae (Joseph *et al*, 1983).
- *Ragwelellus horvathi* –Hemiptera- Miridae (Smith, 1977).
- *Kanakarajiella cardamomi* (David & Subramaniam) –Homoptera– Aleyrodidae (Selvakumaran *et al*, 1998).
- *Sciothrips cardamomi* (Thysanoptera: Thripidae) (Pillai y Abraham, 1978).
- *Pythium vexans*, *P. aphanidermatum* (Alagianagalingam y Kandaswamy, 1981).
- *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae* (Alagianagalingam y Kandaswamy, 1981).
- *Phyllosticta elettariae* (Naidu, 1981).
- *Fusarium moniliforme* (Wilson, Sasi y Mathew, 1979).
- *Rhizoctonia solani* (Wilson, Sasi y Rajagopalan, 1979).
- *Colletotrichum gloeosporioides* (Govindaraju *et al*, 1998).
- Nemátodos como *Meloidogyne incognita*. (Muniappan, 1993).
- Roedores como: *Bandicota bengalensis*, *Mus booduga*, *Rattus rattus* y *Rattus meltada* (Chakravarthy *et al*, 1998).

Una vez cosechado, el cardamomo se clasifica por tamaño y color, con preferencia granos verdes de gran tamaño, seguidos por granos pálidos y por último granos con defectos como amarillo o abierto, la semilla suelta se considera la calidad final para comercializar (Tamayo, 1993-2001). Del fruto seco se extrae aceite esencial, los Árabes usan el cardamomo mezclado con café, para preparar una bebida llamada "Gahwa"; se utiliza igualmente en vainas enteras o semillas como condimento para

pastas, galletas, tortas, arroz, carnes, sopas, entre otros. En la industria se utiliza en alimentos envasados como conservador suave y condimento; en la aromatización de perfumes, cosméticos, licores, bebidas y cigarrillos y en la industria farmacéutica como olorizante de drogas y en fabricación de medicamentos estimulantes de las funciones gastrointestinales (ICTA, 1990), también se resalta su importancia como antioxidante y antimicrobial por lo que su uso se implementa para la preservación de alimentos (Adel *et al*, 2002), (Badei *et al*, 2002), (Kubo *et al*, 1991).

Al cardamomo se le atribuyen propiedades medicinales como antiséptico, antiespasmódico, afrodisíaco, carminativo, cefálico, digestivo, diurético, sialóguico, estimulante, estomático y tónico nervioso. (Aromatherapy & Essential oils, 2000). Un estudio donde se evaluó el contenido de fluoruro en especies y condimentos en India registró el más alto contenido de fluoruro en el cardamomo, con un nivel de 12.4 ppm, contribuyendo a disminuir los problemas de deficiencias de flúor en la población. (Sharma y Mehta, 1995).

Los programas de mejoramiento por biotecnología a partir de materiales mejorados incluyen programas de multiplicación *in vitro* de clones obtenidos de rizomas (Korikanthimath, 1997), (Babu *et al*, 1999), a partir de panículas (Kumar *et al*, 1985), cultivo de microcallos y cultivo de células en suspensión (Geetha *et al*, 2000); también se han desarrollado programas de crioconservación de germoplasma en nitrógeno líquido usando semillas, obteniendo un 80 % de germinación después de crioconservadas (Chaudhury y Chandel, 1995).

Los principales países productores de cardamomo son Guatemala, India, Sri Lanka, Malasia, y el país de mayor exportación es Guatemala con cerca del 50% de 24.760 toneladas producidas anualmente en el mundo. Los principales mercados son los países Árabes con un consumo anual de 17.000 toneladas y un incremento de la demanda de 240 toneladas anuales (Zapata, 2000).

En la India, para 1995 (Korikanthimath, 1995) la producción promedia nacional fue de 58 kilos secos/ hectárea/ año; en 1999, Nair G.K. reporta 236 kilos secos/ hectárea/ año

y en poblaciones mas productivas y en estudio una producción promedia anual de 735 kilos secos/ hectárea/ año, encontrando clones seleccionados, algunos que superan los 1000 kilos secos/ hectárea/ año (Korikanthimath *et al*, 2000), (Nair G.K., 1999) y otros con 1473 kilos secos/ hectárea/ año cuyas plantas están sembradas a 1.8 metros x 1.2 metros (Korikanthimath *et al*, 2002).

En el municipio de Jericó – Colombia - se tiene una productividad promedia de 1.2 kilos secos/ planta/ año, para un total de 1538 kilos secos/ hectárea/ año, las plantas seleccionadas superan los 5.5 kilos secos/ planta/ año, equivalente a 7050 kilos secos/ hectárea/ año con distancias de siembra de 3 metros x 3 metros (Tamayo y Usuga, 1993-2001).

Las plantas seleccionadas para el programa de mejoramiento genético en el municipio de Jericó, han sido obtenidas mediante un proceso de selección de materiales que cumplieran características deseables para el mercado internacional en color y tamaño de grano. Las plantas obtenidas de esa generación fueron sometidas al mismo proceso de selección del anterior, para esto se tuvieron en cuenta parámetros de calidad y cantidad y aspectos agronómicos y fitosanitarios. En el establecimiento de este proceso de selección recurrente y posteriormente selección clonal, buscando el mejoramiento de las plantaciones se requirió esperar el tiempo de desarrollo vegetativo, seleccionar el material en cuanto a calidad, productividad y aspectos agronómicos, entre otros, realizar siembras en nuevos lotes, esperar nueva emisión de espigas y fruto e iniciar de nuevo el proceso; esta metodología ha tomado largos años de evaluación y seguimiento y ha sido rigurosa pues podría conllevar a seleccionar plantas con grano fenotípicamente mejor donde los factores ambientales han influido sobre características genéticas, sacando conclusiones erráticas.

En cuanto a porcentajes de calidad superior e inferior determinadas de acuerdo a color y tamaño de grano, los cuales normalmente se encuentran en 60% y 40 % respectivamente, en las plantas seleccionadas del municipio de Jericó, se observan muchos materiales por encima de ese promedio en calidad superior, algunos incluso mayores al 90 % (Anexo 1). Esto indica que esas selecciones permitirían tener

poblaciones con superioridad en calidad y cantidad de grano, lo cual hace la inversión en este cultivo mucho más rentable para los productores y para el país, quienes teniendo esta variedad tendrían ventaja competitiva en el mercado internacional.

Para desarrollar el programa de mejoramiento del cultivo de cardamomo se han requerido estudios básicos tales como fisiología de la planta, requerimientos agronómicos, caracterización morfológica, establecimiento de poblaciones con la mezcla de los clones promisorios, y recientemente la caracterización molecular de los materiales seleccionados, y en un futuro inmediato la búsqueda e incorporación de resistencia a enfermedades.

2.2. MARCADORES MOLECULARES.

En los últimos tiempos, con los descubrimientos de la estructura del ADN y con el desarrollo de nuevas técnicas de identificación genética, se ha hecho posible estudios de variabilidad genética basados en ADN, los acontecimientos históricos más reconocidos tomados de Cummings y Klug, 1999, son:

En 1866 Gregor Mendel expone sus estudios sobre hibridación en plantas de *Pisum sativum*, del que obtuvo credibilidad cerca de 30 años después cuando varios científicos redescubren y publican su trabajo.

En 1953 James Watson y Francis Crick anuncian el modelo en doble hélice de la molécula de ADN, impulsando los estudios en biotecnología.

En 1974 se inician los trabajos con marcadores RFLP. (Phillips *et al*, 1995)

En 1994 se pone en venta el primer alimento modificado genéticamente producido mediante el uso de biotecnología.

Entre 1990 y 1995 se inician trabajos con marcadores RAPD y AFLP.

2.2.1. Isoenzimas

Una isoenzima, es una de dos o más formas moleculares de una enzima que existe en el mismo organismo y cataliza la misma reacción. (Conn *et al*, 1998). Estas formas moleculares se encuentran en una especie como resultado de la presencia de más de un gen codificando para cada una de las enzimas. (Moss, 1982, citado por Ferreira y Grattapaglia, 1998).

En el mejoramiento genético de plantas, las isoenzimas han sido utilizadas para la identificación de variedades, selección indirecta de caracteres agronómicos y evaluación de germoplasma. Con la evaluación de la movilidad electroforética de una prueba isoenzimática se puede determinar si las diferencias se encuentran a nivel de secuencias de ADN que están codificando para tales enzimas, así, si los patrones de bandas para los individuos difieren se asume que estas diferencias poseen base genética y serán heredables. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa - PCR-

La técnica de la PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza con ayuda de un equipo conocido como Termociclador, el cual regula la temperatura de las muestras a un tiempo dado durante varios ciclos, esto permite someter las muestras de ADN a un proceso similar al que ocurre en la duplicación de ADN a nivel celular. La PCR ha sido una técnica muy usada en los últimos tiempos, con grandes aplicaciones en diagnóstico y evaluación de diferentes tipos de materiales, tanto en especies vegetales, animales y en medicina; y ha sido la base de otras técnicas de marcadores moleculares basadas en PCR, como RFLP, RAPD y AFLP. (Powell *et al*, 1996; Meksem *et al*, 1995).

El ciclo de una PCR consiste en tres fases: desnaturalización, hibridación y extensión. Todas estas fases ocurren dentro del tubo una vez las muestras han sido colocadas en el termociclador, con adición de los materiales necesarios para realizar el proceso, tales como dNTP's, Taq polimerasa, MgCl₂, primers y la muestra de ADN. (Hillis *et al*, 1996).

2.2.3. Marcadores RFLP.

Los marcadores RFLP "Restriction Fragment Length Polymorphism", se generan por la presencia o ausencia de un sitio o alelo, en algunos individuos de una población. (Griffiths *et al*, 1999).

La técnica esta basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce grandes cantidades de fragmentos para una molécula dada, los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad en una membrana de nylon – Southern Blot- esta membrana es hibridada con una sonda, el producto es visualizado en autoradiografía de rayos X según el peso molecular de la banda. (Becerra y Paredes, 2000).

Los RFLP son importantes porque pueden usarse para medir la diversidad genética entre poblaciones diferentes o especies relacionadas y también sirven para fines diagnósticos. (Griffiths *et al*, 1999.)

2.2.4. Marcadores RAPD.

La técnica RAPD´s -Random Amplified Polymorphic DNA - ADN polimórfico amplificado al azar- evalúa polimorfismo basado en la amplificación de segmentos de ADN al azar utilizando varios "primers" de secuencia arbitraria. Los polimorfismos, detectados como segmentos de ADN son heredados de forma Mendeliana en el 90 % de los casos, y pueden ser utilizados para construir mapas genéticos en muchas especies. Debido a la gran cantidad de ADN producido, este fragmento amplificado puede ser visualizado directamente en forma de una banda en el gel de electroforesis. La electroforesis se realiza, generalmente, en gel de agarosa y la visualización de los fragmentos se realiza por coloración específica con Bromuro de Etidio y en presencia de luz ultravioleta. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El polimorfismo genético detectado por los marcadores RAPD´s tiene naturaleza binaria, lo que significa que el segmento amplificado esta presente o ausente (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Narváez *et al*, 2000 resumen las ventajas de esta técnica en la simplicidad y bajo costo, aunque argumentan como gran limitante la sensibilidad de las condiciones de amplificación que influirían desfavorablemente en la reproducibilidad del método.

Desde su descripción, el uso de marcadores RAPD´s en el análisis genético y en el mejoramiento de plantas ha tenido una difusión extremadamente rápida, las aplicaciones incluyen, obtención de "fingerprints" genómicos de individuos, variedades y poblaciones; análisis de estructura y diversidad genética en poblaciones naturales, poblaciones de mejoramiento y bancos de germoplasma; establecimiento de relaciones filogenéticas entre diferentes especies; construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores RAPD se han usado en bancos de germoplasma de manzano para encontrar variabilidad genética (Itoiz *et al*, 1997); en estudios en Cedro (*Cedrela odorata*) para determinar variación genética entre poblaciones, encontrando un alto grado de variación intraespecífica (Gillies *et al*, 1997).

2.2.5. Marcadores AFLP

La técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), o producción de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados, ha sido desarrollada a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa combinada con los principios de la técnica RFLP, donde una muestra de fragmentos producidos por la restricción del ADN en estudio son amplificados selectivamente. Los AFLP usan cebadores o "primers" oligonucleótidos complementarios a las secuencias que han sido ligadas a cada extremo del ADN digerido. (Becerra y Paredes, 2000). El polimorfismo es detectado por la

presencia o ausencia de fragmentos e interpretado por medio de programas estadísticos para encontrar diversidad genética. (Vos *et al*, 1995).

La técnica consiste en la adecuación de las muestras de ADN, verificando su cantidad y calidad para asegurar igualdad en los materiales, posteriormente son sometidos a la acción de enzimas de restricción EcoRI y MseI que hacen cortes en sitios específicos, estos materiales son sometidos al proceso de ligación con la presencia de adaptadores y después de realizar la dilución en las cantidades adecuadas, se realiza preamplificación y amplificación con una combinación específica de cebadores, para finalmente observar las muestras amplificadas en un gel de poliacrilamida que permite mayor resolución. (Astorga y Quirós, 2003), (Karp *et al*, 1997).

Vos *et al*, 1995 reporta los AFLP como una técnica novedosa con una muy alta capacidad de obtener patrones de ADN de cualquier origen y complejidad.

En cultivos se ha usado la técnica para evaluar variedades de *Manihot esculenta* (Elias *et al*, 2000); en *Hordeum vulgare* para determinar la posición de loci, obteniendo 819 loci marcadores (Pozzi *et al*, 2003); para evaluar diversidad genética en *Alstroemeria* spp. (Tae-Ho *et al*, 2000); en caña de azúcar para identificación de genomas (Kraft *et al*, 2000); en especies y variedades de Cítricos como técnica para asistir los programas de mejoramiento genético mediante caracterización del genoma de la especie *Citrus* spp. (Mendoza *et al*, 2001); en café para evaluar 11 accesiones de *Coffea arabica* L. en Costa Rica (Anthony *et al*, 2002); en Ecuador, la técnica se ha usado en Caricaceae para evaluar su relación con especies nativas incluyendo 95 accesiones de tres géneros diferentes, permitiendo hacer agrupamientos y evaluar la clasificación taxonómica de las accesiones (Droogenbroeck *et al*, 2002); entre muchos otros casos de gran interés económico y científico.

Con estos y muchos otros reportes, la técnica se ha convertido en una herramienta de la biología molecular para obtener polimorfismo a partir de aislamientos de ADN incluso cuando la base genética de los materiales es estrecha.

2.2.5.1. Ventajas de los marcadores AFLP

Entre las ventajas encontradas con esta técnica, se encuentra la posibilidad de detectar una variación considerable del genoma, reflejada en un gran número de productos amplificados en una sola combinación de cebadores, la eficiencia en detectar polimorfismo puede ser varias veces mayor que la obtenida con RAPD. Esta metodología ha sido ampliamente usada en especies para medir diversidad genética, tales como: lechuga (*Lactuca sativa*) (Hill *et al.* 1996 citado por Becerra y Paredes 2000), lenteja (*Lens culinaris*) (Sharma *et al.* 1996 citado por Becerra y Paredes 2000), Vid (*Vitis vinifera*) (Narváez *et al.*, 2000), Yuca (*Manihot* spp.) (Roa *et al.*, 1997), Zanahoria (*Daucus carota*) Shim y Jorgensen, 2000, entre otras. Una de las mayores ventajas reportada por Becerra y Paredes 2000, es que en una sola reacción se puede identificar alrededor de 50 loci en un tiempo corto.

Roa *et al.*, 1997, realizó estudios en varios materiales de *Manihot* spp. y los ancestros de la especie con el objetivo de definir sus orígenes, encontró que la técnica AFLP provee un gran número de marcadores genéticos mucho más incluso que RFLP o RAPD, permitiéndole obtener conclusiones adecuadas para su estudio.

2.2.5.2. Desventajas de los marcadores AFLP

Son pocas las desventajas asociadas con la técnica desde el punto de vista de estudios de variabilidad genética, la mayoría reporta altos costos y dificultad en la adquisición de algunos reactivos.

Becerra y Paredes, 2000 reporta como desventaja para la interpretación de los datos el tiempo necesario para el análisis cuando se realiza en forma no automatizada, o sea visual.

3. METODOLOGÍA PROPUESTA

3.1. LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

La investigación se desarrolló en su fase inicial en el Laboratorio de Estudios Moleculares en la Universidad Nacional seccional Medellín -Colombia- y en su fase final en los laboratorios de la Universidad EARTH -Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda- y del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza -CATIE-, ambos en Costa Rica.

La colecta del material vegetal se realizó en las fincas de propiedad de la empresa Cultivares S.A. en el municipio de Jericó, ubicado en el suroeste del departamento de Antioquia, Colombia, a una altura de 1.200 a 1.800 metros sobre el nivel del mar, con una precipitación anual promedio de 2.000 milímetros y temperaturas entre 18°C - 24 °C. (Tamayo, 1993-2001, datos tomados en campo); y en una zona de vegetación mezclada de bosques y potreros en plantaciones abandonadas de Turrialba, Cantón de Cartago, Costa Rica, ubicada a 646 metros sobre el nivel del mar, precipitación anual promedio de 2635 milímetros y temperatura promedio de 23 °C año (CATIE, 2003).

3.2. MATERIAL VEGETAL

Se trabajó con 15 accesiones de *Elettaria cardamomum* L. (Matón)- procedentes de Colombia y Costa Rica. Las 15 accesiones estuvieron compuestas por 9 materiales

promisorios llamados mejorados procedentes de Colombia; tres (3) materiales comunes, dos de Colombia y uno de Costa Rica, llamados comunes; dos (2) materiales intermedios entre comunes y mejorados, llamados intermedios, procedentes de Colombia y un (1) material silvestre, también procedente de Colombia. En la Tabla 1 se presenta una breve descripción de cada una de las accesiones.

TABLA 1. Parámetros tenidos en cuenta para la selección de los materiales de cardamomo utilizados en el estudio. CM 1 al CM 14 materiales colombianos, CR 15 material procedente de Costa Rica.

Código	Categoría	Kg. Secos /pl./año	% calidad superior	% calidad inferior	Procedencia
CM 1	MEJORADO	5.6	71.52	28.45	Colombia
CM 2	MEJORADO	6.1	81.78	18.2	Colombia
CM 3	MEJORADO	4.3	95.79	4.2	Colombia
CM 4	MEJORADO	8.1	82.31	17.67	Colombia
CM 5	MEJORADO	6.1	72.39	27.59	Colombia
CM 6	MEJORADO	6.9	91.46	8.5	Colombia
CM 7	MEJORADO	5.0	85.46	14.51	Colombia
CM 8	MEJORADO	> 4	-	-	Colombia
CM 9	MEJORADO	> 4	-	-	Colombia
CM 10	INTERMEDIO	> 1,2 < 4	60.5	39.5	Colombia
CM 11	INTERMEDIO	> 1,2 < 4	60.5	39.5	Colombia
CM 12	COMUN 1	1.2	60.5	39.5	Colombia
CM 13	COMUN 2	1.2	60.5	39.5	Colombia
CM 14	SILVESTRE	-	-	-	Colombia
CR 15	COMUN 3	-	-	-	Costa Rica

Los materiales colombianos fueron colectados de las plantaciones del municipio de Jericó, todos obtenidos en el proceso de selección adelantado en el programa de mejoramiento de la empresa Cultivares S.A., con base en características agronómicas y morfológicas como producción, color, tipo y calidad del grano.

El material de Costa Rica se tomó como muestra única encontrada en las plantaciones que fueron eliminadas en ese país.

El anexo 2 presenta la información detallada de estos materiales y los parámetros de selección que se tuvieron en cuenta, y las Figuras 1 a la 4 ilustran características morfológicas y de calidad de grano de algunas de las accesiones.

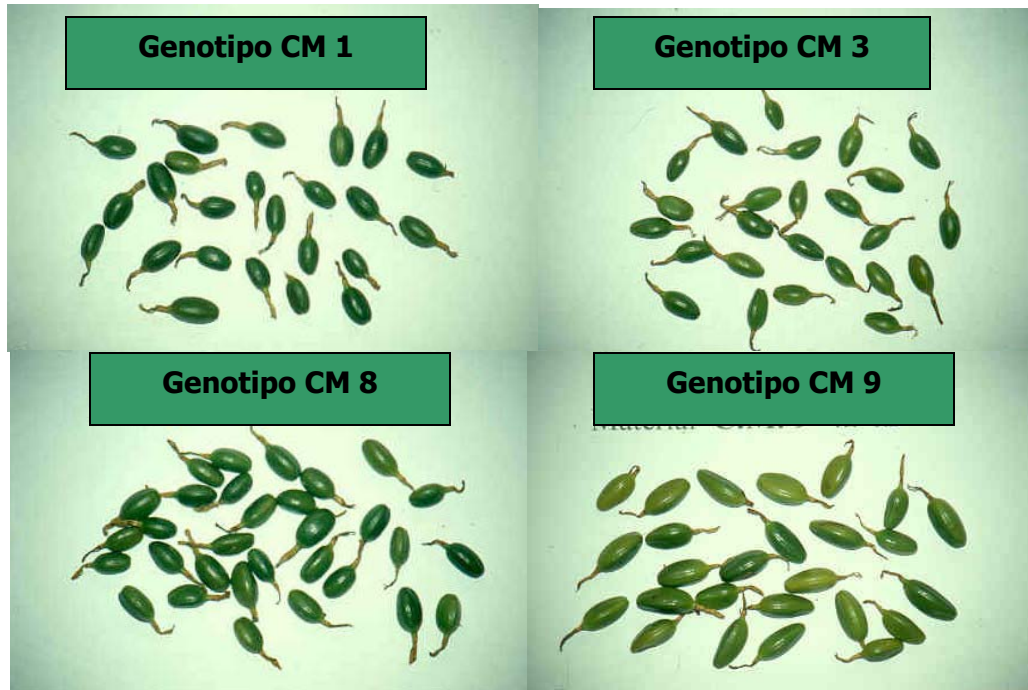


FIGURA 1. Características morfológicas de materiales de cardamomo Tipo mejorados, representadas en los genotipos CM 1, CM 3, CM 8 y CM 9.

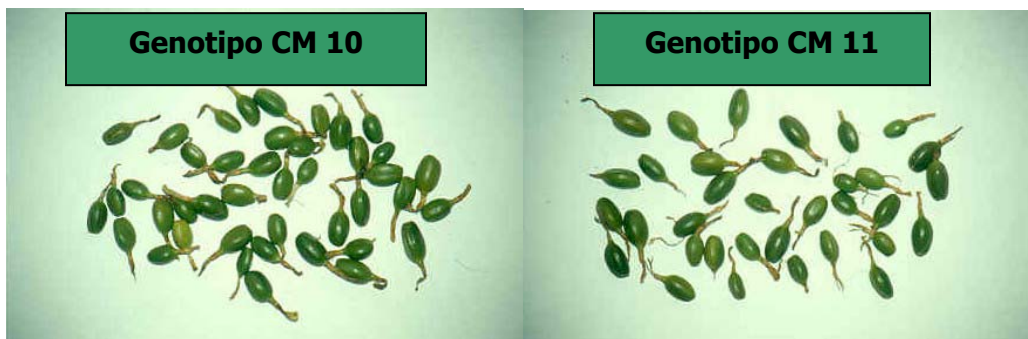


FIGURA 2. Características morfológicas de materiales de cardamomo Tipo intermedios, representados en los genotipos CM 10 y CM 11.



FIGURA 3. Características morfológicas de materiales de cardamomo Tipo comunes, representadas en los genotipos CM 12 y CM 13.



FIGURA 4. Características morfológicas de material de cardamomo Tipo silvestre, representado en el genotipo CM 14.

3.3. PARAMETROS DE SELECCIÓN DE MATERIALES.

Los materiales del programa de mejoramiento genético desarrollado por la empresa Cultivares S.A. en el municipio de Jericó (Anexo 1), fueron sometidos a un análisis, realizando observaciones y evaluaciones continuas, determinando características agronómicas y fitosanitarias deseables e indeseables y parámetros de calidad, de este material inicial se seleccionaron siete accesiones que presentaban excelentes características, los cuales corresponden a los materiales CM 1 a CM 7, posteriormente se incluyeron CM 8 y CM 9 que presentaron características importantes para el programa de mejoramiento genético; el material CM 9 fue procedente de un programa de multiplicación in-vitro desarrollado por un laboratorio comercial en Costa Rica a solicitud de la empresa Cultivares S.A. a partir de plantas procedentes de Jericó de propiedad de

la misma empresa; estos dos últimos, aunque no tuvieron el proceso de seguimiento igual que los siete materiales anteriores mostraron diferencias importantes en su fenotipo que los hicieron elegibles para el estudio. En la figura 1 se observa una muestra tipo de materiales Mejorados, representada por los genotipos CM 1, CM 3, CM 8 y CM 9.

Los materiales CM 10 y CM 11 son aceptables dentro del proceso de producción y mostraban un aumento de calidad según lo que se observa en los parámetros de selección, estos son los llamados Intermedios. En la figura 2 se muestran los genotipos Intermedios CM 10 y CM 11.

Los materiales CM 12 y CM 13 son Comunes, presentan registros de producción cerca del promedio de toda la plantación, no han sobresalido por ninguno de los aspectos evaluados, se cree que están más relacionados con las líneas parentales y han permanecido con iguales promedios aun cuando han presentado cambios asociados a diferentes condiciones ambientales; y por último, el material de Costa Rica -CR 15-, que se incluye entre los comunes buscando la correlación con los demás materiales, de este último no se tienen registros de producción ni calidad debido a que las plantas aun no han iniciado su etapa reproductiva (Anexo 2). En la figura 3 se muestran las características morfológicas típicas de los genotipos comunes, representados en las accesiones CM 12 y CM 13.

El material CM 14 es el llamado "cardamomo silvestre", conocido así por poseer plantas de gran similitud fenotípica con las demás plantas de cardamomo, aunque la coloración de grano es roja, y el aroma y sabor son diferentes de las especies comerciales; el genotipo CM 14 se incluyó en el estudio con el objetivo de determinar su relación genética con los demás materiales (Figura 4).

Los materiales con alto porcentaje de grano abierto y grano manchado fueron descartados de los mejorados, por disminuir los estándares de calidad (Figura 5).



FIGURA 5. Grano de cardamomo con la característica de grano abierto y grano manchado respectivamente.

Las características morfológicas para la clasificación de cardamomo de acuerdo al tamaño y color de grano que fueron base para la selección de genotipos se muestran en la figura 6 y figura 7 respectivamente.



FIGURA 6. Características morfológicas para la clasificación del grano de cardamomo de acuerdo al tamaño: A: Grano Tipo Pequeño; B: Grano Tipo Mediano y C: Grano Tipo Grande.



FIGURA 7. Características morfológicas para la clasificación del grano de cardamomo de acuerdo al color: A: Grano verde claro, B: Grano verde y C: Grano verde intenso.

3.4. METODOLOGIA

3.4.1. Extracción de ADN

Se tomaron muestras de hoja tierna de plantas que estaban bajo condiciones de campo e inmediatamente se llevaron a nevera de -20°C , una porción de hojas de cada material se liofilizó (Labconco Freezon 12) durante 24 horas y posteriormente se maceró con mortero y pistilo hasta la obtención de un polvo fino. El tejido pulverizado se empacó en tubos Falcon de 50 ml y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología propuesta por Harris, 1996 modificada por Phillips *et al*, 1998, basada en el uso de CTAB (Anexo 3). Posteriormente el ADN extraído se observó en un gel al 0.8% de agarosa (Marca Sigma Grado Biología Molecular) en buffer TBE 1X con Bromuro de Etidio ($0.01\ \mu\text{g/ml}$). Para observar el ADN se tomaron $2\ \mu\text{l}$ de este, $2\ \mu\text{l}$ de Azul de bromofenol y $17\ \mu\text{l}$ de buffer TE 10X a pH 8.0 y se corrió a 137 Voltios, 35 miliamperios durante 40 minutos.

3.4.2. Cuantificación de ADN

Para la visualización y cuantificación de las muestras se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X con Bromuro de Etidio (Anexo 4) y se corrió a 35 miliamperios, los geles se observaron en transiluminador de luz ultravioleta. Se realizó la cuantificación de las muestras por comparación contra un estándar de referencia.

3.4.3. Análisis con marcadores genéticos AFLP

La metodología propuesta por Astorga y Quirós, 2003 fue usada para la digestión, ligación, preamplificación y amplificación de las 15 accesiones.

3.4.3.1. Digestión de ADN genómico

Para la digestión del ADN genómico se siguió la metodología de Astorga y Quirós, 2003, aplicada de forma rutinaria en el laboratorio de Biología Molecular del CATIE, consistente en la digestión de 250 ng/ μ l de ADN genómico por reacción, con 1.25 u/ μ l de EcoRI y 1.25 u/ μ l de MseI (Invitrogene), correspondiente a 2 μ l y 5 μ l de buffer 5X (Invitrogene), ajustando con 13 μ l de agua de AFLP (marca Sigma) para un volumen final de 25 μ l. La mezcla fue luego incubada en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 a una temperatura de 37 °C por 2 horas, 15 minutos a 70 °C y 5 minutos a 4°C.

3.4.3.2. Ligación de adaptadores y pre-amplificación

Las condiciones de la reacción para la ligación consistieron en 24 μ l de la solución de adaptadores, 1 μ l de T4 DNA ligasa (Invitrogene) y 25 μ l del ADN digerido, para un

volumen total de 50 µl. La mezcla resultante fue incubada por 3 horas a 37°C, seguida de 10 minutos a 60°C y 5 minutos a 4°C. Estas muestras se montaron en un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 1X para verificar la digestión /ligación colocando en cada pozo 5 µl de azul de bromofenol al 50% y 10 µl de muestra, se migró a 135 voltios durante 30 minutos.

De la mezcla de ligamiento se realizó una dilución 1:10 con agua para AFLP (marca Sigma).

Las condiciones de preamplificación consistieron en 40 µl de la mezcla de iniciadores de preamplificación de Invitrogene, 4.8 µl de buffer 10 X para PCR - AFLP de Invitrogene, 0.2 µl de Taq ADN polimerasa de Promega y 5 µl de una dilución 1:10 de ADN. La dilución resultante fue llevada a un termociclador previamente programado para 20 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto.

De la preamplificación se prepararon diluciones 1:30 con agua para AFLP (Sigma) y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.4.3.3. Amplificación selectiva

Las condiciones de amplificación selectiva consistieron en 5 µl de una dilución 1:30 de ADN de preamplificación más 15 µl de la mezcla de amplificación conformada así: 2 µl de buffer 10X para PCR, 0.4 µl de dNTPs 5mM, 1 µl de MgCl₂ 25 mM, 9 µl de primer-MseI, 0.5 µl de primer-EcoRI, todos de Invitrogen, 0.2 µl de Taq DNA polimerasa de Promega, y 2 µl de agua para AFLP de Sigma.

La mezcla final se incubó en el termociclador previamente programado para un ciclo a 94°C por 1 minuto; nueve ciclos a 65°C por 30 segundos y 72 °C 60 segundos con un gradiente de - 0.7°C por ciclo; 33 ciclos a 95 °C 30 segundos, 56°C 30 segundos y 72°C por 1 minuto con un gradiente de - 0.7°C por ciclo; un ciclo a 72°C por 10 minutos y un ciclo final a 4°C por 5 minutos.

3.4.4. Análisis electroforético

Después de la amplificación se agregó 20 µl de azul de AFLP (Anexo 5) a cada muestra para almacenarlas a - 20 °C hasta el momento de la electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (Anexo 5).

La preparación de las muestras, montaje de geles y revelado se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Anthony *et al*, 2002, con reactivos de Promega, con algunas modificaciones hechas por investigadores del laboratorio de biología molecular de CATIE, 2003. Los procedimientos de preparación de vidrios y reactivos para el gel de poliacrilamida y los procedimientos para revelado del gel son presentados en detalle en los anexos 5 y 6 respectivamente.

Las muestras para el análisis electroforético fueron sometidas en el termociclador a un proceso previo de desnaturalización por 3 minutos a 94°C, seguido de 5 a 20 minutos a 72°C. Una vez armado y polimerizado el gel este fue pre-corrido hasta que el gel alcanzó una temperatura de 70 °C. Apenas alcanzó la temperatura óptima, se colocó en cada pozo 6 µl del producto desnaturado y se dejó correr por dos horas a 50 watt. Luego de este tiempo se colocó el gel a teñir con plata según el protocolo de Anthony *et al*, 2002 con reactivos de Promega.

La lectura e interpretación del patrón de bandas se hizo con la ayuda de una caja de luz blanca, determinando la presencia o ausencia de fragmentos AFLP para la construcción de una matriz binaria necesaria para el análisis estadístico de los datos.

3.4.5. Análisis de los datos

Los patrones electroforéticos obtenidos en cada gel fueron evaluados utilizando un sistema binario de análisis en el que se registra presencia y ausencia de bandas como 1

y 0 respectivamente. Los datos fueron exportados a una hoja de Excel y formateados para el análisis de agrupamiento de acuerdo al programa -MVSP- Multi Variate Statistical Package (Kovach, 1999). Los datos de las 15 accesiones fueron utilizadas para determinar el coeficiente de similaridad de Jaccard. El análisis de agrupamiento se realizó a partir de la matriz de similaridad utilizando el método de UPGMA -Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means- (Bhat *et al*, 1995).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACION DE ADN

El protocolo de extracción de ADN CTAB - Minipreparaciones sugerido por Harris, 1996 modificado por Phillips *et al*, 1998, arrojó buenos resultados por producir muestras de calidad para ser digerible y amplificable.

La cuantificación del ADN extraído para las 15 accesiones (entre 95 ng/μl y 100 ng/μl) mostró niveles suficientes de muestra para el proceso de digestión y amplificación requeridos en los AFLPs.

La figura 8 muestra una electroforesis del ADN total de las 15 accesiones, incluyendo repeticiones para algunas de ellas. En esta figura los carriles 1 y 20 corresponden a la muestra testigo de café estandarizada a 100 ng/μl como patrón de referencia y los carriles del 2 al 19 corresponden a las accesiones CM 1 a CR 15 y las siguientes a las repeticiones de los materiales del CM 1 al CM 3.

Las muestras de ADN se conservaron a – 20°C hasta su uso.

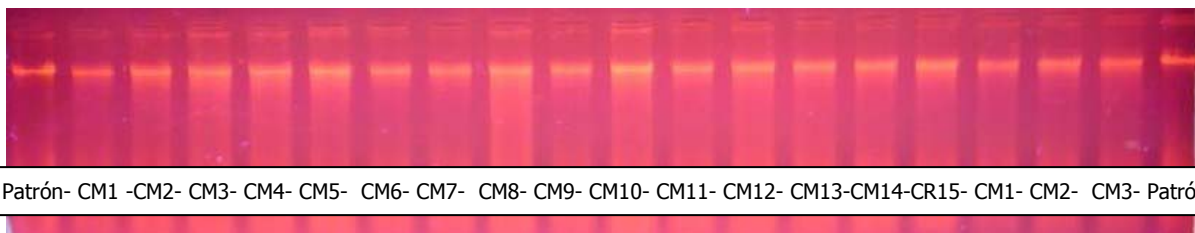


FIGURA 8. ADN total de 15 accesiones de *Elettaria cardamomun* en un gel de agarosa al 0.8 %. De izquierda a derecha el carril 1 y el carril 20 corresponden al patrón de referencia a 100 ng/ μ l y del carril 2 al 19 corresponden a las muestras CM 1 a CR15 y repeticiones de CM 1 a CM 3.

4.2. ANÁLISIS CON MARCADORES GENÉTICOS AFLP

4.2.1. Digestión / ligación y preamplificación del ADN

La digestión, ligación y preamplificación de las 15 accesiones se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Astorga y Quirós, 2003; para verificar los resultados de los procesos digestión - ligación de las 15 muestras se montó un gel de agarosa al 0.8 % en las mismas condiciones que se usó para la cuantificación de ADN y se presenta en la figura 9.

Una vez verificada la presencia de productos digeridos y ligados se realizó la preamplificación.

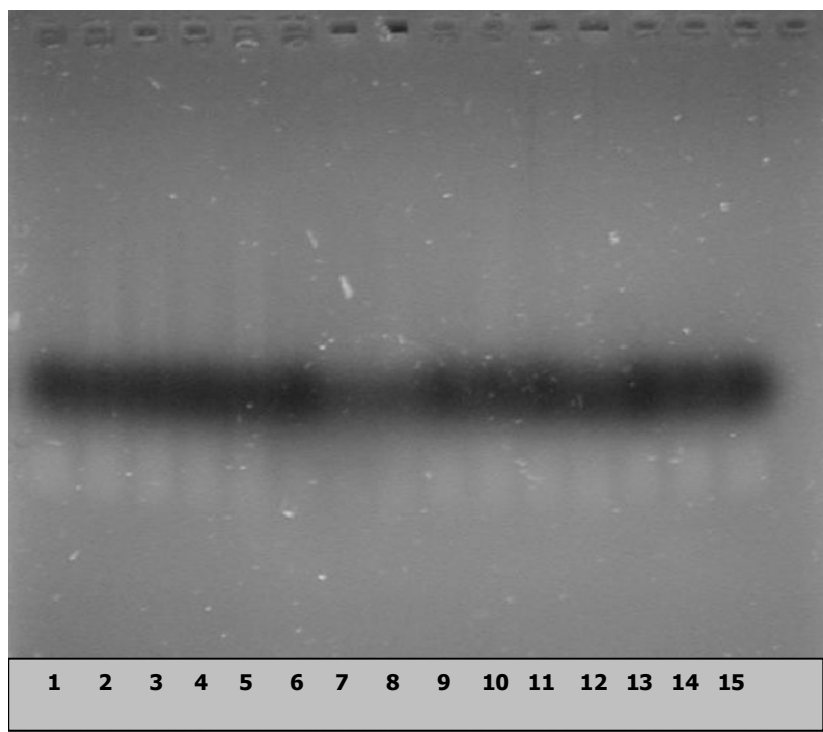


FIGURA 9. Electroforesis en un gel de agarosa de la digestión - ligación del ADN de las 15 accesiones de cardamomo. De izquierda a derecha CM 1 a CR 15, numerados de 1 a 15 respectivamente.

4.2.2. Amplificación del ADN

La amplificación de las 15 accesiones se realizó según la metodología propuesta por Astorga y Quirós, 2003.

Las combinaciones de primers EcoRI/ MseI usadas en la evaluación de polimorfismo se muestran en la Tabla 2. En la Figura 10 se presentan los resultados de la evaluación preliminar de polimorfismo con 16 combinaciones de primers EcoRI/ MseI en las accesiones CM 7, CM 11 y CM 13. En la Figura 11 se presentan los resultados de la evaluación de las 15 accesiones con tres combinaciones de primers EcoRI/ MseI. La matriz binaria construida a partir de los datos de presencia y ausencia de bandas tomadas de los geles es presentada en el Anexo 7.

TABLA 2. Lista de las combinaciones de primers EcoRI/ MseI usadas en la evaluación de polimorfismo presente en cardamomo.

COMBINACION ECO RI / MSE I	GENOTIPOS EVALUADOS
EAAC/MCAA	CM 1 a CR 15
EACA/MCAC	CM 1 a CR 15
EACC/MCTT	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCTC	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCAC	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCAT	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCTA	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCAG	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCAA	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCTG	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCTT	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCTC	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCAC	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCAT	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCTA	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCAG	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCAA	CM 7, CM 11 y CM 13
EAAG/MCTG	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCTC	CM 1 a CR 15
EACC/MCAC	CM 1 a CR 15
EACC/MCAG	CM 1 a CR 15
EAAC/MCAA	CM 7, CM 11 y CM 13
EACA/MCAC	CM 7, CM 11 y CM 13
EACG/MCAT	CM 7, CM 11 y CM 13
EACC/MCTG	CM 1 a CR 15
EAAG/MCTC	CM 1 a CR 15
EAAG/MCAC	CM 1 a CR 15
EACT/MCTA	CM 7, CM 11 y CM 13
EAGC/MCAG	CM 7, CM 11 y CM 13
EAGG/MCAT	CM 7, CM 11 y CM 13
EACA/MCAC	CM 1 a CR 15
EACC/MCTA	CM 1 a CR 15
EAAG/MCAT	CM 1 a CR 15

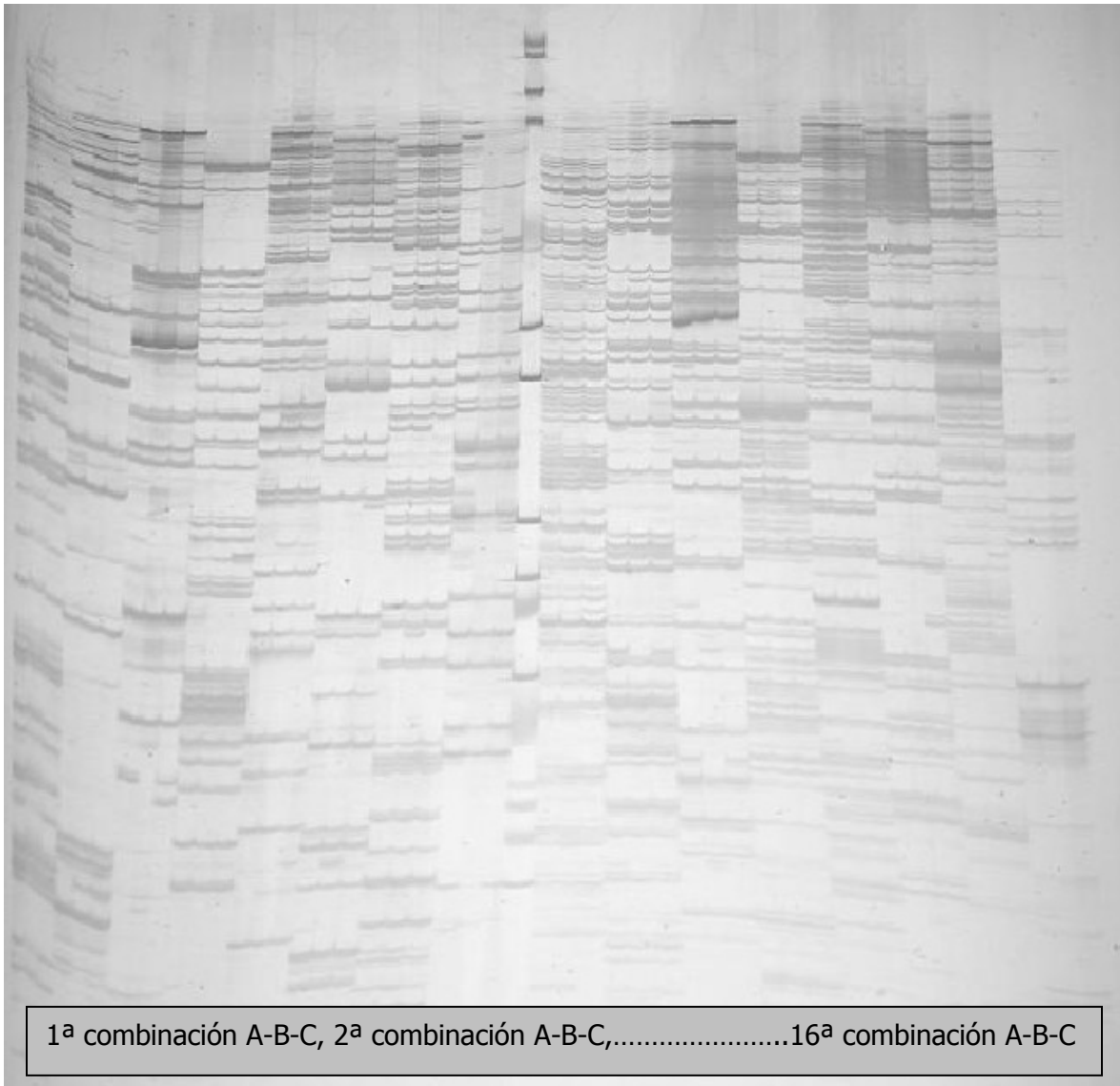


FIGURA 10. Perfil electroforético de marcadores AFLP en tres accesiones de cardamomo utilizando 16 combinaciones de primers EcoRI/ MseI. De izquierda a derecha A: Genotipo CM 7, B: Genotipo CM 11, C: Genotipo CM 13.

En la Tabla 3 se presenta el número de fragmentos AFLP polimórficos y el porcentaje de polimorfismo obtenido con cada una de las combinaciones de primer EcoRI/ MseI para los genotipos de cardamomo analizados excluyendo algunos de los fragmentos obtenidos del material CM 14. En los análisis donde se incluyó el genotipo CM 14, este se caracterizó por presentar muchos fragmentos polimórficos únicos diferentes al resto de genotipos, de los cuales se seleccionaron 18, estos fragmentos únicos indican la gran diferencia genética del CM 14 con respecto a los demás.

TABLA 3. Número de fragmentos AFLP polimórficos y porcentaje de polimorfismo obtenido en cada combinación de primer EcoRI/ MseI para todos los genotipos de cardamomo evaluados excepto la accesión silvestre CM 14.

Combinación de primer EcoRI/MseI	Numero de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo
EAAC/MCAA	5	6.10 %
EACA/MCAC	7	8.54 %
EACC/MCTC	12	14.63 %
EACC/MCAC	5	6.09 %
EACC/MCAG	10	12.19 %
EAAG/MCTC	7	8.54 %
EAAG/MCAC	8	9.76 %
EACA/MCAC	6	7.32 %
EACC/MCTA	12	14.63 %
EAAG/MCAT	3	3.66 %
EAAC/MCTG	7	8.54 %
TOTAL	82	100 %
Promedio	7.45	

Se realizó una evaluación preliminar del polimorfismo utilizando los genotipos CM 7, CM 11 y CM 13, y un total de 22 combinaciones de primers EcoRI/MseI. Posteriormente se prepararon las combinaciones presentadas en la tabla 3 con las 15 accesiones. El número total de marcadores AFLP polimórficos generados sin incluir los datos del genotipo silvestre CM 14, fue de 82 en todas las combinaciones, con un rango de 3 a 12 marcadores polimórficos por combinación y un promedio de 7.45, que según resultados obtenidos en otras especies se considera bajo (Tohme *et al*, 1996).

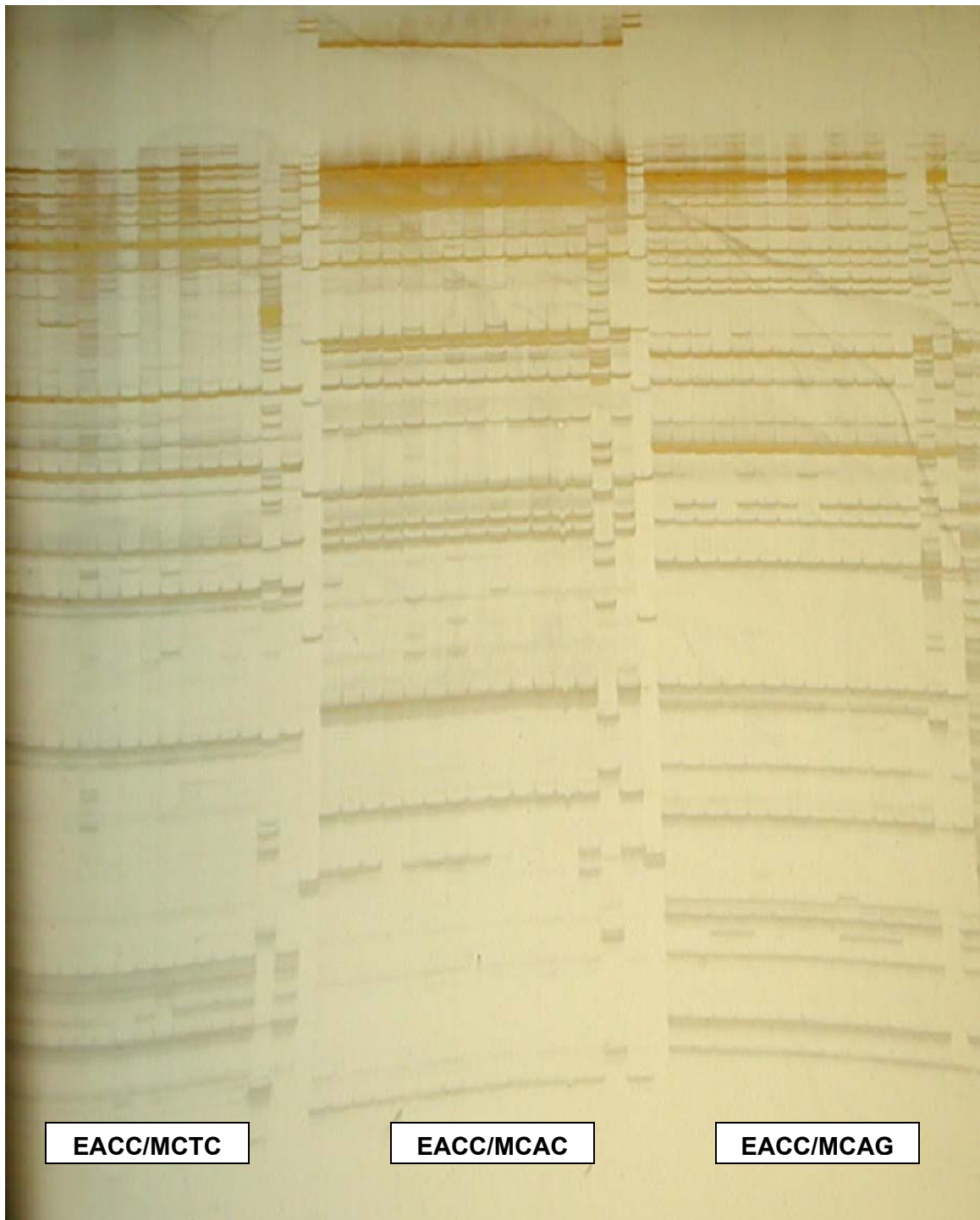


FIGURA 11. Perfil electroforético de marcadores AFLP en 15 genotipos de cardamomo utilizando tres combinaciones de primers EcoRI/ MseI. De izquierda a derecha A: Combinación EACC/ MCTC, B: Combinación EACC/ MCAC, C: Combinación EACC/MCAG.

Las combinaciones EcoRI/ MseI que presentaron más marcadores AFLP polimórficos fueron EACC/ MCTC y EACC/ MCTA ambas con 12 fragmentos polimórficos.

4.3. ANALISIS DE GRUPOS GENÉTICOS

La matriz de similaridad y el coeficiente de Jaccard fueron obtenidos por el método UPGMA -Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means- (Bhat *et al*, 1995) y analizados con el programa MVSP –Multi Variate Statistical Package- (Kovach, 1999). Los resultados de este análisis se presentan en el Anexo 8.

Para establecer la relación genética entre las accesiones se realizó un análisis de agrupamiento, el dendrograma resultante se presenta en Figura 12.

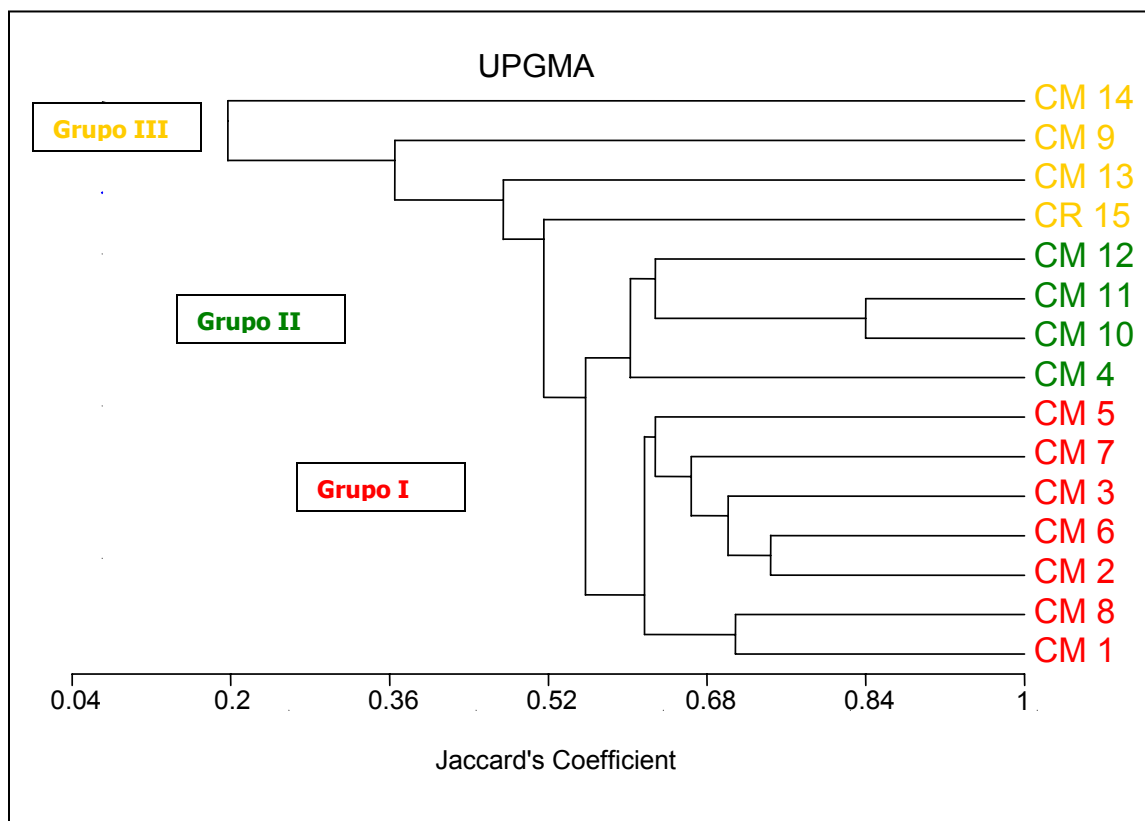


FIGURA 12. Dendrograma basado en el coeficiente de similaridad de Jaccard entre 15 genotipos de cardamomo. Coeficiente de correlación cofenética = 0.962

El dendrograma obtenido muestra la conformación de pequeños grupos. El grupo I incluye los genotipos CM 5, CM 7, CM 3, CM 6, CM 2, CM 8 y CM 1, los cuales corresponden a los llamados materiales mejorados promisorios desarrollados en el programa de mejoramiento de la empresa Cultivares S.A. en el municipio de Jericó, y del que se excluyen los genotipos CM 4 y CM 9 caracterizados también como promisorios de acuerdo a su morfología y comportamiento agronómico. El grupo II esta conformado por el material CM 4 y los materiales CM 10, CM 11 y CM 12, caracterizados morfológica y agronómicamente como intermedios y común. La presencia del material CM 4 en el Grupo II puede ser explicada como el resultado de la presencia en él, de características visuales de unidad productiva mejorada en campo resultado de heterosis en la especie, y poco estables en las generaciones futuras.

El material CM 9 junto a los comunes CM 13 y CR 15 y al silvestre CM 14 conforma cada uno grupos diferentes poco relacionados con los materiales mejorados. Cabe resaltar que esta accesión fue obtenida por un proceso de multiplicación *in vitro* realizado por una compañía costarricense para la empresa Cultivares S.A., a partir de meristemos que provenían de las plantaciones de cardamomo del municipio de Jericó, sin embargo presenta gran diferencia fenotípica y variabilidad genética de los materiales mejorados.

El material silvestre CM 14 no se agrupa con ninguno de los materiales de cardamomo mejorados, presentando una variación genética bastante marcada lo que podría llevar a pensar en la existencia de otra especie.

El material de Costa Rica - CR 15 -, tal como se muestra en el dendrograma, se encuentra emparentado con los genotipos de Colombia y más cercano al CM 13 que es el Común 2.

4.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS MATERIALES

La información tomada en campo de los materiales presentada en el Anexo 2, muestra diferencias en productividad y calidad entre ellos.

Los materiales CM 12 y CM 13 corresponden a los genotipos comunes en la plantación de Colombia, cuentan con un promedio de producción de 1.2 kilos secos/ planta/ año, el porcentaje de grano abierto es de 12 % y el porcentaje de grano manchado es del 3 %; una vez secado el grano y clasificado en calidades presenta un 60.5 % de calidad superior que son consideradas las mejores calidades, caracterizadas por grano verde intenso o verde y con diferentes tamaños, excluyendo el grano abierto, grano manchado y la semilla suelta, cualquier otro defecto externo aumentaría el porcentaje de calidad inferior; de esta manera, CM 12 y CM 13 corresponden a materiales con alto porcentaje de calidad inferior, alto porcentaje de grano abierto y de grano manchado y poca producción, su tipo de grano es redondo lo que hace lógico que se ubique en mayor porcentaje en las calidades inferiores; por todo esto, las pérdidas en calidad son notables para los productores donde se trabaje con plantaciones de grano común y no se hayan realizado programas de mejoramiento genético.

Los materiales CM 10 y CM 11 tienen una producción entre 1.2 y 4 kilos secos/ planta/ año, los datos de porcentaje de grano abierto y porcentaje de grano manchado no han sido incluidos, estos materiales han aumentado las cifras de producción promedio de la plantación, presentan porcentajes de calidad superior y calidad inferior similares a los genotipos comunes, sin embargo al tener mayor cantidad de kilos por unidad productiva significaría para el productor unidades productivas más importantes desde el punto de vista económico que las comunes.

Las accesiones CM 1, CM 2, CM 3, CM 4, CM 5, CM 6 y CM 7 son sobresalientes desde todos los parámetros, nótese que son plantas que poseen altísimos volúmenes de producción, expresado en kilos secos/ planta/ año, con un porcentaje de grano abierto inferior al promedio y porcentaje de grano manchado también inferior al promedio excepto el material CM 2 que supera el promedio de grano manchado; el tipo de grano

es largo, con lo que aumenta el porcentaje de calidad superior, incluso la accesión CM 3 posee un 10.51 % de calidad Extra - la mejor calidad -, que no la tiene ninguno de los genotipos restantes, con esas características, aún cuando esta planta es la de menor cantidad de kilos secos/ planta/ año entre los materiales mejorados, con su porcentaje de calidad superior tan alto, es una unidad productiva que mejoraría notablemente los ingresos del productor.

Es importante resaltar que se tuvieron en cuenta aspectos morfológicos relacionados con producción, sería importante para investigaciones futuras incluir otras características tales como área foliar, altura de plantas, entre otras.

4.5. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS MATERIALES

En el análisis molecular el genotipo CM 14 es el que se muestra más distante de los demás, podría decirse que no tiene relación con los otros materiales evaluados, pareciera ser una variedad diferente.

El material CM 9 presenta una distancia genética alta con los otros genotipos de su grupo, esto hace creer que sufrió un proceso de mejoramiento diferente a los demás. Cabe resaltar, que este material fue tomado de las plantaciones de Colombia, y la propagación fue realizada por medio de una compañía costarricense con la cual la empresa Cultivares S.A. tenía acuerdo comercial para la propagación *in vitro* de los materiales mejorados provenientes de Jericó, pero a pesar de ello, el CM 9 no muestra ninguna relación con los mejorados de donde se dice que fue su origen. Esto lleva a pensar que es un genotipo diferente del original suministrado para su multiplicación *in vitro*, que pudo haber sufrido mutación o mezcla durante la multiplicación *in vitro* o del cual se desconoce su procedencia, y tal como puede observarse en la figura 1, presenta características morfológicas diferentes en el tamaño del grano con respecto a los demás. Igualmente en él se han registrado índices de producción muy significativos. Este material podría aprovecharse para aumentar la variabilidad genética de la especie en Colombia, teniendo en cuenta sus características productivas. Sin embargo, es necesario realizar otras pruebas a nivel genético que lleven a esclarecer el origen de sus

características fenotípicas y hacer más útil su aprovechamiento en el programa de mejoramiento genético de cardamomo.

Los materiales CM 13 y CR 15, ambos con categoría de materiales comunes, aún cuando uno es procedente de Colombia y el otro procedente de Costa Rica, presentan mas cercanía genética, esto hace concluir que efectivamente estuvieron emparentados en el pasado y que aún muestran alguna similitud, es probable que efectivamente el material de Costa Rica formara parte del proceso inicial de hibridación natural de los genotipos de Colombia aunque no se puede asegurar.

Los materiales CM 12, CM 11, CM 10 y CM 4 forman un conglomerado que aunque por parte de los materiales CM 10, CM 11 y CM 12 parece consecuente, debido a que corresponden a los materiales intermedios y un común, y deja de serlo con el material CM 4, que corresponde a uno de los mejorados, cuya presencia en este grupo podría obedecer a una expresión de vigor híbrido de su genotipo, aspecto que al analizarse llevaría a pensar que la presencia de CM 4 dentro del grupo de genotipos mejorados podría generar confusión en el programa de mejoramiento genético, o desde otro punto de vista, podría contribuir a aumentar la variabilidad genética existente constituyéndose en un aspecto importante para evaluar en campo dentro del programa de mejoramiento.

Los materiales CM 1, CM 2, CM 3, CM 5, CM 6, CM 7 y CM 8 se agrupan con el mayor coeficiente de similitud entre ellos, tal como lo muestra el coeficiente de Jaccard (Anexo 8) y esto permite concluir que los genotipos analizados en el estudio efectivamente corresponden a materiales mejorados en el municipio de Jericó que presentan variabilidad genética con los demás, y que entre ellos, tal como se ha realizado el proceso de selección clonal, formaron una línea genética mejorada muy importante para los productores, dados sus niveles altos de producción y de calidad. En la Tabla 4 se presentan las características morfológicas y agronómicas de estos materiales teniendo en cuenta el agrupamiento mostrado en el dendrograma, indicándose el promedio en producción, en porcentajes de grano manchado, abierto y calidad superior e inferior. Estas accesiones constituyen el grupo mas importante a ser considerado por la empresa

Cultivares S.A. y los productores como material base de sus plantaciones y como candidatos para entrar en un programa futuro de mejoramiento. El que estos materiales puedan continuar en un programa de hibridación artificial permitiría llevar a homocigosis sus características deseables y avanzar varias generaciones hasta obtener una línea superior y estable vía propagación sexual por auto polinización o alternativamente se pueden iniciar programas operativos de propagación vía asexual como multiplicación *in vitro* o deshije en campo.

TABLA 4. Características morfológicas y agronómicas de las accesiones mejoradas de cardamomo agrupadas por su similaridad genética por marcadores AFLP. *El valor promedio no incluye los valores de la accesión CM8.

Código	Kg. Secos / año	% gr. abierto	% gr. manchado	Tipo grano	Cal. superior	Cal. inferior
CM 1	5.6	7.44	2.48	Largo	71.52	28.45
CM 2	6.1	6.23	3.11	Largo	81.78	18.2
CM 3	4.3	6.3	1.96	Largo	95.79	4.2
CM 5	6.1	5.69	1.97	Largo	72.39	27.59
CM 6	6.9	5.05	1.88	Largo	91.46	8.5
CM 7	5.0	6.93	2.82	Largo	85.46	14.51
CM 8	Mayor 4.0	-	-	-	-	-
Promedio*	5.66	6.27	2.37	Largo	83.07	16.91

Analizando la matriz de similaridad presentada en el anexo 8, se observa el grado de diversidad entre los materiales, que va desde 0.157 para el genotipo CM 14 con relación al CM 13 y hasta 0.236 respecto a otros genotipos. Estos resultados indican la gran diferencia existente entre los genotipos CM 14 y CM 13, conservándose el mismo comportamiento con respecto al resto de genotipos.

En un análisis donde se excluye el genotipo silvestre, el material CR 15, procedente de Costa Rica, muestra rangos de similaridad con respecto a los otros genotipos que van desde 0.385 hasta 0.605, esto nos indica que muy posiblemente las líneas colombianas aún conservan algunas de las características de los genotipos parentales de cardamomo procedentes de Costa Rica y que dieron origen a los materiales hoy existentes en las plantaciones de Jericó.

Los materiales CM 10 y CM 11 muestran valores de similaridad bastante parecidos, incluso comparados independientemente con el material CM 9, los datos son cercanos, variando en 0.375 y 0.433, y contra los demás materiales valores de similaridad desde 0.508 hasta 0.635, excluyendo los datos del CM 14, lo que coincide con su posición tan cercana en el grupo II del dendrograma.

El material CM 12 presenta los valores mas altos de similaridad con los materiales CM 2 y CM 4, aunque como se muestra en el dendrograma la agrupación del material CM 12 corresponde con el material CM 4 y no con el CM 2, el cual se ubica en el grupo de los materiales mejorados.

Es importante tener en cuenta que ninguno de los materiales muestra un índice de similaridad por encima del 0.744, encontrándose este valor únicamente entre los materiales CM 8 y CM 1, coincidiendo con su ubicación en el dendrograma.

Los materiales mejorados conforman el Grupo I en el dendrograma, y presentan valores de similaridad que oscilan entre 0.537 hasta 0.744, que aunque son los mas altos con relación al resto de genotipos, pueden considerarse bajos en cuanto a la relación entre ellos dentro del grupo.

Los valores mas bajos de similaridad excluyendo el material CM 14 están cercanos a 0.322 y corresponden al genotipo CM 9.

Los valores de similaridad, y los grupos representados en el dendrograma nos indican una mayor disimilaridad en el genotipo CM 14 con respecto a los otros, seguido por los

genotipos CM 9 y CM 13, mientras que el genotipo CR 15 presenta mayor similaridad con los genotipos CM 12, CM 11, CM 10 y CM 4 que conforman el grupo II.

Los materiales del grupo I son muy consistentes en la información de distancia genética.

4.6. RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y MOLECULARES

Al comparar las características morfológicas evaluadas para cada accesión con los resultados de variabilidad genética obtenidos por medio de los marcadores AFLP nos lleva a resultados que permiten afirmar la hipótesis planteada en este estudio, ya que el 78% de las accesiones mejoradas difieren genéticamente de las accesiones comunes como era esperado y solo el 11 % forma parte de estas, relación observada en los grupos I y II del dendrograma (figura 12).

Ese 11 %, constituido por el material CM 4 es un porcentaje muy bajo para los análisis de campo, teniendo en cuenta que dichas evaluaciones fueron basadas únicamente en su fenotipo, esto da confianza del procedimiento que se llevó a cabo en el programa de mejoramiento genético de cardamomo por parte de la empresa Cultivares S.A. en Colombia, también es importante hacerle seguimiento continuo a los materiales en campo y reforzar los estudios con pruebas biotecnológicas como los marcadores moleculares AFLP para tener certeza de los genotipos que se están incluyendo dentro de este programa ya que este 11 % podría ser semilla indeseable.

Desde otro punto de vista, la inclusión de bajos porcentajes de semilla no mejorada dentro de un programa de mejoramiento genético, podría contribuir a aumentar la variabilidad genética necesaria para la búsqueda de materiales con resistencia a enfermedades de importancia económica para el cultivo, tales como grano manchado y pudrición basal, o a la mejora de características indeseables como el grano abierto y otras de interés agronómico para los productores.

Los genotipos que se están manejando en el programa de mejoramiento genético de cardamomo en Colombia conformados por la mezcla de 9 materiales mejorados representan una alternativa muy importante para los productores, donde tienen en su mayoría altos porcentajes de calidad y cantidad de grano, lo cual demuestra que el programa de mejoramiento de cardamomo estuvo muy bien fundamentado, posee líneas productivas con gran potencial, las cuales presentan variabilidad genética.

5. CONCLUSIONES

- 5.1. De los métodos evaluados para la extracción de ADN de cardamomo, el protocolo de extracción de ADN CTAB-Minipreparaciones sugerido por Harris, 1996 modificado por Phillips *et al*, 1998 fue el que presentó mejores resultados en cuanto a calidad, cantidad, facilidad de digestión y amplificación para la especie en estudio.
- 5.2. De las metodologías evaluadas para amplificación, la metodología propuesta por Astorga y Quirós, 2003 para AFLP fue aplicada a la especie *Elettaria cardamomun* L. (Matón) arrojando resultados satisfactorios para la detección de polimorfismo y evaluación de la variabilidad genética de materiales seleccionados de esta especie en Colombia, donde las combinaciones de primers EcoRI/ MseI que permitieron detectar mayor polimorfismo fueron EACC/MCTC y EACC/MCTA ambas con 12 fragmentos polimórficos.
- 5.3. Los materiales seleccionados de cardamomo de Jericó -Colombia- presentan variabilidad genética a pesar de que fueron obtenidos por un proceso de hibridación natural entre materiales pertenecientes a acervos genéticos muy relacionados.
- 5.4. Aunque la base genética de los materiales de cardamomo procedentes de Jericó es estrecha, el poder discriminatorio de los marcadores AFLP permitió detectar variaciones en el material genético de estos y establecer diferencias entre ellos.

- 5.5. El material CM 14 procedente de Jericó es el más distante genética y morfológicamente de todos los materiales evaluados, lo cual podría indicar la existencia de otra especie o la pertenencia de dicho genotipo a un género diferente, consideraciones que deben ser comprobadas en estudios posteriores.
- 5.6. El material CM 9 presenta mayor distancia genética con respecto a los demás materiales del grupo de los mejorados, esto hace creer que sufrió un proceso de mejoramiento diferente a los demás, tuvo un cambio en su proceso de multiplicación *in vitro*, o reingresó a las plantaciones de Jericó con una identificación equivocada.
- 5.7. Los materiales CM 13 y CR 15, ambos con categoría de materiales comunes, aún cuando uno es procedente de Colombia y el otro procedente de Costa Rica, presentan mas cercanía genética, esto hace concluir que son materiales que efectivamente estuvieron emparentados en el pasado y que aún muestran alguna similitud, es probable que efectivamente el material de Costa Rica formara parte del proceso inicial de hibridación natural de los materiales de Colombia aunque esto no se puede asegurar.
- 5.8. Los materiales CM 10, CM 11, CM 12 y CM 4 forman un conglomerado que aunque por parte de los materiales CM 10, CM 11 y CM 12 parece consecuente, debido a que corresponden a los materiales intermedios y un común, no lo es por el CM 4, que corresponde a uno de los mejorados. La ubicación de CM 4 en otro grupo puede ser una expresión de vigor híbrido de su genotipo, lo que hace riesgosa su permanencia como un material mejorado dentro del programa de mejoramiento genético de cardamomo, pero a su vez podría contribuir a aumentar la variabilidad genética, aspecto importante a evaluar en campo.
- 5.9. Los materiales CM 1, CM 2, CM 3, CM 5, CM 6, CM 7 y CM 8 se agrupan con el mayor coeficiente de similitud entre ellos, como lo muestra el coeficiente de Jaccard, son el grupo de genotipos con mayor grado de similitud de los 15

- materiales evaluados. Esto permite concluir que los materiales seleccionados en el estudio de mejoramiento genético de Jericó efectivamente corresponden a genotipos mejorados que poseen variabilidad genética con los demás materiales, y que entre ellos, tal como se ha realizado el proceso de selección clonal formarían una línea genética mejorada muy importante para los productores.
- 5.10. Los materiales de cardamomo seleccionados en el municipio de Jericó muestran un agrupamiento entre ellos donde se incluyen 7 de los 9 genotipos promisorios, con una marcada diferencia contra los materiales comunes y el silvestre, separándose incluso del genotipo de Costa Rica.
 - 5.11. Al comparar las características morfológicas evaluadas para cada accesión con los resultados de variabilidad genética obtenidos por medio de los marcadores AFLP nos lleva a resultados que permiten afirmar la hipótesis planteada en este estudio, ya que el 78% de las accesiones mejoradas difieren genéticamente de las accesiones comunes como era esperado.
 - 5.12. Solo el 11 % de materiales mejorados no forma parte de los mismos y se agrupa con los comunes, lo cual da confianza del procedimiento que se llevó a cabo en el programa de mejoramiento genético de cardamomo en Colombia para realizar este estudio, debido a que fueron seleccionados únicamente por su fenotipo; también genera confusión ya que este 11 % podría ser semilla indeseable, que desde otro punto de vista podría contribuir a aumentar la variabilidad genética necesaria para la búsqueda de materiales de interés agronómico.
 - 5.13. El menor índice de similaridad obtenido por el coeficiente de Jaccard se presenta con relación al material CM 14, excluyendo éste, el menor índice es de 0.375.
 - 5.14. Los materiales mejorados que se agruparon en el dendrograma en el grupo I, tienen valores de similaridad que oscilan entre 0.537 hasta 0.744, que aunque son los mas altos en la matriz pueden considerarse bajos en cuanto al índice. Ninguno de los materiales muestra un índice de similaridad por encima del 0.744,

- encontrándose este valor únicamente entre los materiales CM 8 y CM 1, coincidiendo con su ubicación en el dendrograma.
- 5.15. Los valores de similitud, y los grupos representados en el dendrograma nos indican una mayor disimilitud en el genotipo CM 14 con respecto a los otros, seguido por los genotipos CM 9 y CM 13, mientras que el genotipo CR 15 presenta mayor similitud con los genotipos CM 12, CM 11, CM 10 y CM 4 que conforman el grupo II.
 - 5.16. Los materiales seleccionados en el programa de mejoramiento genético de cardamomo en Colombia, conformados por la mezcla de 9 materiales mejorados, representan una alternativa muy importante para los productores, por tener en su mayoría índices altos de calidad y cantidad de grano. Esto demuestra que el programa de mejoramiento de cardamomo estuvo muy bien fundamentado, posee líneas productivas con gran potencial y variabilidad genética.
 - 5.17. Las diferencias encontradas entre los materiales evaluados abren el camino a investigaciones futuras tendientes a desarrollar variedades regionales o una variedad nacional de cardamomo formada con la mezcla de las líneas mejoradas.
 - 5.18. El empleo de marcadores moleculares como los AFLPs se convierte en una herramienta útil para el mejoramiento asistido por marcadores, proporcionando un ahorro importante de tiempo y dinero para las empresas y agricultores dedicados a esta y otras especies, permitiendo encontrar diferencias de carácter genético con mayor exactitud que si solo se evaluara el fenotipo.
 - 5.19. Este trabajo permite avanzar en el programa de mejoramiento para el cultivo de cardamomo en Colombia y sirve como parámetro de referencia en otros países donde el cultivo tiene gran interés.

6. RECOMENDACIONES

- 6.1. El material CM 9 podría utilizarse para aumentar la variabilidad genética de la especie *Elettaria cardamomun* debido a sus características productivas, sin embargo sería importante realizar otras pruebas a nivel genético que permitan esclarecer el origen de sus características fenotípicas evaluadas y así darle un mejor aprovechamiento en el programa de mejoramiento.
- 6.2. Los materiales promisorios representan el tipo de material que los productores deben utilizar como material base para sus siembras. Un futuro programa de hibridación artificial debería encaminarse a la obtención de homocigosis en las características deseables y la generación vía propagación sexual por auto polinización de materiales superiores.
- 6.3. Es importante continuar con las etapas planteadas en el programa de mejoramiento genético de la especie en Colombia, incluyendo los materiales seleccionados, considerando que el 78% de ellos se encuentran dentro del grupo de los mejorados mostrando variabilidad genética con los demás materiales.
- 6.4. Se sugiere realizar estudios posteriores donde se involucren repeticiones de los materiales que permitan hacer análisis estadísticos que arrojen mayor información.
- 6.5. Para una etapa posterior, se sugiere realizar la caracterización morfológica y molecular de los materiales incluyendo las introducciones de otros países, dando

mayor relevancia al estudio y permitiendo analizar la posible evolución de la especie.

- 6.6. Se sugiere incluir estudios de la tolerancia a enfermedades en estos genotipos como un paso para el mejoramiento genético de los materiales promisorios.
- 6.7. Se sugiere que los materiales estudiados y todos los que se encuentran dentro del programa de mejoramiento genético, tanto comunes como intermedios y mejorados, sean conservados en un banco de germoplasma para garantizar investigaciones futuras y la variabilidad genética de la especie.

BIBLIOGRAFIA

- ADEL** ZMB; SIHAM MMF; AHMED TME; BARAKAT SMM. 2002. Application of some spices in flavoring and preservation of cookies: 2-antimicrobial and sensory properties of cardamom, cinnamon and clove. *Deutsche-Lebensmittel-Rundschau*. 2002, 98: 7, 261-265.
- ALAGIANAGALINGAM**, M.N.; KANDASWAMY, T.K. 1981. Control of capsule rot and rhizome rot of cardamom (*Elettaria cardamomum* Salisb) *Madras Agricultural Journal* (India). V. 68(8) p. 554-557.
- ANAND** T; GOVINDARAJU C; SUDHARSHAN MR; SREENIVASULU P. 1998. Epidemiology of vein-clearing disease of small cardamom. *Indian Journal of Virology*. 1998, 14: 2, 105-109.
- ANTHONY** F., QUIROS O., TOPART P., BERTRAN B., LASHERMES P. 2002. Detection by simple secuency repeat market of introgression from *Coffea canephora* in *Coffea arabiga* cultivar. *Plant breeding* 121, 1-3 (2002).
- AROMATHERAPY** & Essential oils. Information about the essential oils. Disponible en www.naturaloil.com. Mayo 2000, Revisado agosto 2003.
- ASTORGA** C., O. QUIROS. 2003. Protocolos de amplificación de ADN para las técnicas de RAPD, SSR y AFLP para el estudio genético de la diversidad de las plantas cultivadas. Unidad de recursos fitogenéticos y biotecnología. CATIE. Costa Rica.
- BADEI** AZM; EL AKEL ATM; FAHEID SMM; MAHMOUD BSM. 2002. Application of some spices in flavoring and preservation of cookies: 1-antioxidant properties of cardamom, cinnamon and clove. *Deutsche-Lebensmittel-Rundschau*. 98: 5, 176-183.
- BABU**, K.N., GEETHA, S.P. MINOO, D.; RAVINDRAN P.N. and PETER, K.V. 1999. *In vitro* conservation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Matón) germoplasma. *Plant Genetic Resources Newsletter*. Nº 119: 41-45.
- BARRETT**, B. 1995. Commentary: plants, pesticides and production in Guatemala. Nutrition, health and nontraditional agriculture. *Ecology of Food and Nutrition* (USA). V. 33(4) p. 293-309.

- BECERRA**, V. y PAREDES M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética; Agricultura Técnica Chile. 60 (3):270-281. Sep 2000.
- BHAT** K.V., LAKHANPAUL S., CHANDEL K.P.S., and Jarret R.L. 1995. Molecular markers for characterization and identification of genetic resources of perennial crops. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. IPGRI. Pg. 107- 127.
- CATIE**, 2003. Manual de presentación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza – CATIE-. Costa Rica. Pg. 26
- CHANDRAN** K. *et al*, 1983. Studies on the role of honeybees in the pollination of cardamom. Proc. 2nd International Conference on Apiculture in Tropical Climates. New Delly.
- CHAKRAVARTHY** AK; SRIHARI K; THYAGARAJ NE; NAGARAJU S; REDDY PP (ED.); KUMAR NKK (ED.); VERGHESE A. 1998. Rodent pest management in cardamom with cultural practices. Advances in IPM for horticultural crops. Proceedings of the First National Symposium on Pest Management in Horticultural Crops: environmental implications and thrusts, Bangalore, India, 15-17 October 1997. pg. 188-194.
- CHAUDHARY**, O.P.; KUMAR, R. 2000. Studies on honeybee foraging and pollination in cardamom (*Elettaria cardamomum* Matón). Journal of Spices and Aromatic Crops (India). V. 9(1) p. 37-42.
- CHAUDHURY**, R.; CHANDEL, K.P.S. 1995. Studies on germination and cryopreservation of cardamom (*Elettaria cardamomum* Matón) seeds. Seed Science and Technology (Switzerland). V. 23(1) p. 235-240.
- CONN**, E.; STUMPF, P; BRUENNING, G y DOI, R. 1998. Bioquímica fundamental. Universidad de California Davis. Limusa Noriega editores. México. Pg 178.
- CUMMINGS**, M. y W. KLUG. 1999. Conceptos de genética. 5ª edición, Prentice Hall. 814 pgs.
- DROOGENBROECK** B VAN; BREYNE P; GOETGHEBEUR P; ROMEIJN PEETERS E; KYNDT T; GHEYSEN G; VAN DROOGENBROECK B. 2002. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador. Theoretical and Applied Genetics. 105: 2-3, 289-297.
- DUBEY** AK; YADAV DS. 2001. Comparative performance of different varieties of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.) under mid altitude of Arunachal Pradesh. Journal of Spices and Aromatic Crops. 10: 2, 119-122.

- ELIAS** M., PANAUD O. and ROBERT T. 2000. Assessment of genetic variability in a traditional Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity*. V. 85. Nº 3 pg. 219-230.
- FERREIRA**, M.E. y GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA, Brasil.
- GEETHA**, S.P.; BABU, K.N.; REMA, J.; RAVINDRAN, P.N.; PETER, K.V. 2000. Isolation of protoplasts from cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *Journal of Spices and Aromatic Crops* (India). V. 9(1) p. 23-30.
- GILLIES**, A.C.; CORNELIUS, J.P.; NEWTON, A.C.; NAVARRO, C.; HERNANDEZ, M. y WILSON, J. . 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Plant Ecology*: 6, 1133-1145.
- GOVINDARAJU** C; THOMAS J; SUDARSHAN MR; MATHEW NM (ED.); KURUVILLA JACOB C (ED.); LICY J (ED.); JOSEPH T (ED.); MEENATTOOR JR (ED.); THOMAS KK. 1998. "Chenthal" disease of cardamom caused by *Colletotrichum gloeosporioides* Penz and its management. *Developments in plantation crops research. Proceedings of the 12th Symposium on Plantation Crops, PLACROSYM XII, Kottayam, India, 27-29 November 1996., 255-259.* Allied Publishers Ltd; New Delhi; India.
- GRIFFITHS**, A, GELBART, W, MILLAR, J, LEWONTIN, R, 1999. *Genética Moderna*. Editorial Mc Graw-Hill. Pg. 342-346.
- HARRIS**, S.A. 1996. *Molecular analysis of forest tree biodiversity: a selection of practical protocols*. Oxford, England. 47 p. Modificado por W. Phillips. Enero 23 de 1998.
- HILL**, M. ; WITSENBOER, H. ; ZABEAU, M.; VOS, P. ; KESSELI. R. AND MICHELMORE, R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genetic*. 93.: 1202-1210.
- HILLIS**, D, MORITZ, C, MABLE, B, 1996. *Molecular Systematics*. Second Edition. Sinauer Associates, USA. Pg 205-247.
- ICTA**. 1990. *Spice plants*. Mac Millan Education ltd. The Tropical Agriculturalist. London.
- ITOIZ**. R. *et al*, 1997. Aplicación de los RAPD a la identificación de manzano en bancos de germoplasma. Dpto. Producción Agraria. Univ. Pública de Navarra. Campus Arrosadía s/n. 31006 Pamplona. Navarra.
- INVITROGENE** de Life Technologies. 2003. *Protocolos de AFLP* Cat 10544-013i y Cat 10483-014. Disponible en: www.invitrogene.com

- JASVIR SINGH**; SELVAN MT; VARADARASAN S; SINGH J. 1997. Biology of cardamom defoliator, *Attacus atlas* Linn. (Saturniidae). Journal of Insect Science. 10: 2, 189-190.
- JOSEPH**, K.J.; NARENDRAN, T.C.; HAQ, M.A. 1983. Outbreak of hairy caterpillars (*Eupterote* spp.) as serious pests of cardamom in the Mackimalai area of South India and recommendations for their integrated management. Tropical Pest Management (UK). V. 29(2) p. 166-172.
- KARP**, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.V.; AYAD, W.G. and T. HODGKIN. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin N° 2.
- KOVACH**, WL. 1999. MVSP – A Multi Variate Statistical Package for Windows, vers. 3.1 Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K. p 44-49.
- KORIKANTHIMATH**, V.S. 1995. Economics of sustained production of cardamom (*Elettaria cardamomum* M.) Journal of Spices and Aromatic Crops (India). V. 4(2) p. 119-128.
- KORIKANTHIMATH**, V.S. 1997. Rapid clonal multiplication of cardamom (*Elettaria cardamomum*): technique and economics Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences (India). V. 19(4) p. 994-999.
- KORIKANTHIMATH**, V.S.; MULGE, R.; HOSMANI, M.M. 1997. Preliminary evaluation of elite clones of cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) for yield and yield parameters in clonal nursery. Journal of Spices and Aromatic Crops (India). V. 6(1) p. 37-41.
- KORIKANTHIMATH**, V.S.; MULGE, R. 1998. Assessment of elite cardamom lines for dry matter distribution and harvest index. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences (India). V. 20(1) p. 28-31.
- KORIKANTHIMATH**, V.S.; RAO, G.; HIREMATH, G.M. 2000. Performance of cardamom (*Elettaria cardamomum* Matón) under low elevation and assured irrigation conditions. Journal of Plantation Crops (India). V. 28(3) p. 201-207.
- KORIKANTHIMATH**, V.S.; RAO, G.; HIREMATH, G.M. 2002. Cultivation of cardamom (*Elettaria cardamomum*) in valley bottoms under evergreen forest shade. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences (India). V. 24(1) p. 53-59.
- KRAFT** T; HANSEN M; NILSSON NO. 2000. Linkage disequilibrium and fingerprinting in sugar beet. Theoretical and Applied Genetics. 101: 3, 323-326.
- KUBO**, I.; HIMEJIMA, M.; MUROI, H. 1991. Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed Journal of Agricultural and Food Chemistry (USA). V. 39(11) p. 1984-1986.

- KUMAR**, K.B.; KUMAR, P.P.; BALACHANDRAN, S.M.; IYER, R.D. 1985. Development of clonal plantlets from immature panicles of cardamom. *Journal of Plantation Crops (India)*. V. 13(1) p. 31-34.
- LANG**, F., 1983. La flor, polinización y polinizadores del cardamomo en Cobán, Alta Verapaz. En: *Tikalía. Rev. de la Facultad de Agronomía. Guatemala*. Vol. 2 No. 2.
- LEMUS**, O. 2003. Verde Verde...Verapaz, Año 2 N° 2 Abril 2003. Guatemala. Pag. 5-8.
- LÜTTMANN** N.T. 1985. El cardamomo y su cultivo. Artemis y Edinter. Talleres de litografías modernas. Guatemala. 83 pgs.
- MATHEW** MJ; VENUGOPAL MN; SAJU KA. 1999. First record of some entomogenous fungi on cardamom aphid, *Pentalonia nigronervosa* f. *caladii* van der Goot (Homoptera: Aphididae). *Insect Environment*. 4: 4, 147-148.
- MENDOZA** RODRÍGUEZ MF; CERVERA GOY MT; CABEZAS MARTINEZ JA; LUIS –CENIS J; MARTINEZ ZAPATER JM. 2001. Application of AFLP and SAMPL markers to genetic identification of *Citrus* species and varieties. - Utilización de marcadores AFLP y SAMPL en la identificación genética de especies y variedades de cítricos. *Biotecnología-Vegetal*. 1: 1, 11-16.
- MEKSEM** K., LEISTER D., PELEMAN J., ZABEAU M., SALAMINI F. 1995. A high-resolution map of the vicinity of the R1 locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen Genet*. 249: 74-81.
- MOHAN**, M.S. 1986. Bee-hive management for pollination. *Planters' Chronicle (India)*.v. 81(2) p. 60-61.
- MOSS**, D. W. 1982. Isoenzymes. Capman & Hall, London & New Cork. Citado por: Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA, Brasil.
- MOYA**, L. y LEMARIE, L. 1993. Estudio del aceite esencial de cardamomo. *Politécnica. Escuela Politécnica Nacional de Ecuador*. Volumen 18 No. 2. pg. 110-122.
- MUNIAPPAN**, R. 1993. Pests and diseases of *Erythrina*: a review. *Journal of Coffee Research (India)*. V. 23(1) p. 1-13.
- NAGANATHAN**, T.G.; REGUPATHY, A.; KUMARESAN, D. 1983. Efficacy of certain insecticides in controlling the cardamom stem borer *Dichocrocis punctiferalis* Pesticides (India). V. 17(6) p. 22-23.
- NAIDU**, R. 1981. Morphology, parasitism and epidemiology of *Phyllosticta elettariae* Chowdhury causing nursery leaf spot disease of cardamom *Journal-of-Plantation-Crops (India)*. V. 9(1) p. 23-27.

- NAIDU**, R. 1986. "Katte" disease of small cardamom and its management. Technical Bulletin Central Plantation Crops Research Institute (India). 1986, N°. 11, 6 p.
- NAIR**. G. K. 1999. The Bussiness Line. ICRI spots high-yielding large cardamom clones.
- NARVAEZ**., R.C.; VALENZUELA, J.; MUÑOZ, C. y HINRICHSEN P. 2000. Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de Vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. Agricultura técnica (Chile) 60 (4): 320-340. Octubre diciembre.
- PATTANSHETTI** and A.B.N. P ASAD. 1973. Con Res. 256 citado por Chandran K. *et al.* Studies on the role of honeybees in the pollination of cardamom. Proc. Second International Conference on Apiculture in Tropical Climates. New Delly. 1980.
- PATIL** DV; KURUVILLA KM; MADHUSOODANAN KJ; MATHEW NM (ED.); KURUVILLA JACOB C (ED.); LICY J (ED.); JOSEPH T (ED.); MEENATTOOR JR (ED.); THOMAS KK. 1998. Correlation studies in small cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). Developments in plantation crops research. Proceedings of the 12th Symposium on Plantation Crops, PLACROSYM XII, Kottayam, India, 27-29 November 1996. 1998, 16-19. Allied Publishers Ltd; New Delhi; India.
- PHILLIPS** - MORA, W.; RODRÍGUEZ H.; FRITZ, PJ. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. Unidad de biotecnología CATIE. Costa Rica. 183 pg.
- PILLAI**,-G.B.; ABRAHAM,-V.A. 1978. Field evaluation of some insecticides in control of cardamom thrips *Sciothrips cardamomi* Ramakrishna (Thysanoptera: Thripidae) Pesticides (India). V. 12(1) p. 32-33.
- POWELL** W., MORGANTE M., ANDRE CH., HANAFEY M., VOGEL J., TINGEY S. and RAFLASKY A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular breeding 2: 225-238.
- POZZI** C., PIETRO D HALAS G, ROIG C and SALAMINI F. 2003. Integration of a barley (*Hordeum vulgare*) molecular linkage map with the position of genetic loci hosting 29 developmental mutants. Heredity. V. 90, N° 5 pg. 390-396.
- PROMEGA**, 2000. Silver Sequence™ DNA. Sequencing system. Technical Manual # 023 24 pp. Disponible en [http:// www.promega.com](http://www.promega.com)
- RAJAN**, P. 1981. Biology of *Pentalonia nigronervosa* f. *caladii* van der Goot, vector of "katte" disease of cardamom. Journal of Plantation Crops (India). V. 9(1) p. 34-41.
- ROA**. A.C., MAYA, M.M.; DUQUE, M.C.; TOHME, J.; ALLEM, A.C. and BONIERBALE, M.W. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. Theor Appl Genet (1997) 95: 741-750

- SAJINA**, A.; MINI, P.M.; JOHN, C.Z.; BABU, K.N.; RAVINDRAN, P.N.; PETER, K.V. 1997. Micropropagation of large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.). *Journal of Spices and Aromatic Crops (India)*. V. 6(2) p. 145-148.
- SELVAKUMARAN** S; DAVID BV; KUMARESAN D. 1998. Biology of the whitefly, *Kanakarajiella cardamomi* (David & Subramaniam) (Aleyrodidae: Homoptera) on cardamom. *Pest Management in Horticultural Ecosystems*. 4: 2, 89-92.
- SHARMA**, P.; MEHTA, U. 1995. Fluoride content of some common Indian food items. 2. Spices, salts and beverages. *Journal of Horticultural Sciences (India)*. V. 24(3-4), special issue, p. 311-314.
- SHARMA**, S.K.; KNOX, M. R. AND ELLIS, T. H. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 93: 751-758.
- SHIM** SI; JORGENSEN RB. 2000. Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 2000, 101: 1-2, 227-233.
- SIDDAPPAJI** *et al.* 1985. Role of honeybees in the pollination of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton. *Indian Bee Journal*, 47; 12-13.
- SMITH**,-E.S.C. 1977. The cardamom mirid (*Ragwelellus horvathi*) Poppius (Heteroptera: Miridae) in Papua New Guinea. *Papua New Guinea Agricultural Journal (Papua New Guinea)*. V. 28(2-4) p. 97-101.
- TAMAYO** y USUGA, 1993-2001. Trabajo de selección de plantas para programa de multiplicación *in vitro*, datos sin publicar. Jericó - Antioquia - Colombia.
- TAMAYO**, C . 1993-2001. Observaciones según experiencia de campo con el cultivo de cardamomo, datos sin publicar. Jericó- Antioquia - Colombia.
- TAE-HO** H., DE JEU M., VAN ECK H and JACOBSEN E. 2000. Genetic diversity of Chilean and Brazilian *Alstroemeria* species assessed by AFLP analysis. *Heredity*. V. 84. N° 5. pg. 564-569.
- THYAGARAJ** NE; CHAKRAVARTHY AK. 1999. Effect of different levels of NPK on shoot and fruit borer, *Conogethes punctiferalis* Guenee (Pylalidae: Lepidoptera) infestation on small cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton). *Insect Environment*. 4: 4, 139-140.
- TOHME** J., GONZALEZ O., BEEBE S. AND DUQUE M. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci.* 36. 1375-1384.
- VENUGOPAL**, MN; MATHEW MJ; DASGUPTA MK. 2000. Integrated management of viral diseases of cardamom. *Diseases of plantation crops, spices, betelvine and mulberry*. 106-110; 35 ref. (Institute of Agriculture), India.

VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., VANN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. AND ZABEAU M. 1995. AFLP, a new technique for DAN fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, Vol. 23, No.21 4407-4414. Oxford University Press.

WILSON, K.I.; SASI, P.S.; MATHEW, J. 1979. Fusarium capsule disease of cardamom. *Current Science (India)*. V. 48(22) p. 1005.

WILSON, K.I.; SASI, P.S.; RAJAGOPALAN, B. 1979. Damping off of cardamom caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Current Science (India)*. V. 48(8) p. 364.

ZAPATA, J. L. 2000. C.I. Apex Ltda. Información recopilada de Banco de Guatemala. Registros de producción 1985 – 1997; Estimativos de Sri Lanka. Testimonio de clientes; Estadísticas Incremento Poblacional de la ONU. 1998.

ANEXOS

Muestra	Kg cer año	Kg sec año	% gr abto	% gr manch	tipo gr	L X A	E	1	2	3D	3E	4B	5	8	Cal sup	Cal inf
1	19986	5.6	7.44	2.48	LARGO	1.83 X 0.61	0	13.33	34.05	24.14	14.41	5.22	7.92	0.9	71.52	28.45
2	19155	5.3	8.53	3.7	LARGO	1.74 X 0.55	0	4.27	18.8	34.18	28.41	7.05	6.19	0.64	57.25	42.29
3	18010	5.0	6.93	2.82	LARGO	1.84 X 0.57	0	22.46	36.16	26.84	12.05	0	2.46	0	85.46	14.51
4	17210	4.8	10.29	1.77	LARGO	1.82 X 0.53	0	12.94	31.27	41.18	9.69	1.98	2.86	0	85.39	14.53
5	15425	4.3	6.3	1.96	LARGO	1.96 X 0.59	10.51	41.74	30.03	13.51	1.8	0	0.9	1.5	95.79	4.2
6	17449	4.9	9.59	0.44	LARGO	1.82 X 0.56	0.85	14.89	25.53	22.55	28.93	0.42	3.4	3.4	63.82	36.15
7	15906	4.4	7.73	0.72	LARGO	1.99 X 0.60	9.25	29.3	28.02	16.19	12.33	0	3.08	1.79	82.76	17.2
8	15451	4.3	9.86	2.8	LARGO	1.79 X 0.59	0	9.82	41.52	28.99	12.03	0	7.61	0	80.33	19.64
9	12575	3.5	12.3	3.49	LARGO	1.89 X 0.60	2.12	27.05	33.13	25.53	6.38	0	3.95	1.82	87.83	12.15
10	12395	3.4	3.08	2.81	LARGO	1.7 X 0.55	0	21.75	35.95	26.58	10.87	0.9	3.92	0	84.28	15.69
11	22095	6.1	6.23	3.11	LARGO	1.78 X 0.57	0	10.64	51.26	19.88	10.64	0	3.08	4.48	81.78	18.2
12	19730	5.5	10	0.94	LARGO	1.83 X 0.60	0	5.6	49.22	29.9	7.47	0	3.42	4.36	84.72	15.25
13	18565	5.2	9.72	2.03	LARGO	1.89 X 0.58	7.08	27.16	36.61	14.17	4.72	0.78	7.48	1.96	85.02	14.94
14	19606	5.5	10.77	1.75	LARGO	1.76 X 0.58	0	4.24	34.74	26.86	27.47	4.44	2.22	0	65.84	34.13
15	20010	5.6	10.41	4.54	LARGO	1.89 X 0.56	0	10.02	54.54	20.97	5.59	2.56	6.29	0	85.53	14.44
16	18045	5.0	14.2	1.44	LARGO	1.68 X 0.54	0	0	22.55	44.44	27.94	0.33	3.03	1.68	66.99	32.98
17	19725	5.5	12.34	1.79	LARGO	1.82 X 0.59	0	25.39	45.28	14.13	10.2	0	4.97	0	84.8	15.17
18	16340	4.5	11.85	2.78	LARGO	1.79 X 0.57	0	20.31	31.11	27.61	15.55	0.63	4.12	1.63	79.03	21.93
19	18343	5.1	9.13	0.95	LARGO	1.99 X 0.59	0	13.36	25.83	35.41	12.02	1.11	12.24	0	74.6	25.37
20	18310	5.1	7.44	2.48	LARGO	1.83 X 0.55	0	15.89	27.94	27.67	20.27	0	8.21	0	71.5	28.48
21	37655	10.5	11.68	2.37	LARGO	1.86 X 0.61	0	11.79	28.08	26.68	15.16	0	16.01	2.24	66.55	33.41
22	31185	8.7	9.35	0.45	LARGO	1.70 X 0.55	0	12.94	25.63	36.29	20.3	0.76	2.03	2.03	74.86	25.12
23	29742	8.3	9.34	2.94	LARGO	1.71 X 0.58	0	1.47	13.26	42.5	34.15	4.42	4.17	0	57.23	42.74
24	25374	7.1	10.26	1.67	LARGO	1.77 X 0.58	0	35.63	30.74	20.97	9.19	2.58	0.28	0.57	87.34	12.62
25	24915	6.9	5.05	1.88	LARGO	1.81 X 0.55	0	13.69	44.18	33.59	6.45	0.25	180	0	91.46	186.7
26	22070	6.1	5.69	1.97	LARGO	1.76 X 0.57	0	26.94	21.75	23.7	21.75	0.97	4.87	0	72.39	27.59
27	21385	5.9	11.79	1.74	LARGO	1.79 X 0.56	0	8.12	18.75	44.79	19.58	4.58	3.12	1.04	71.66	28.32
28	29165	8.1	8.44	2.22	LARGO	1.94 X 0.51	0	12.77	30.84	38.7	9.43	1.57	6.09	0.58	82.31	17.67
29	20790	5.8	14.34	3.06	LARGO	1.84 X 0.55	0	5.49	30.2	37.29	15.33	2.05	8.23	1.37	72.98	26.98
30	20226	5.6	13.61	0.62	LARGO	1.85 X 0.62	0	2.19	25.36	40	27.8	0	3.65	0.97	67.55	32.42
31	12255	3.4	6.19	1.99	LARGO	1.84 X 0.56	0	8.84	30.08	30.88	22.71	1.17	6.48	0.29	69.8	30.65
32	10517	2.9	8.39	2.05	LARGO	1.73 X 0.55	1.5	22.25	38.75	18.75	11.5	0	6	1.25	81.25	18.75
33	8557	2.4	8.92	1.29	LARGO	1.82 X 0.59	0	14.59	44.4	25.46	8.69	0	6.21	0.62	84.45	15.52
Promedio		5.5	9.3	2.1			0.9	15.4	32.6	28.5	15.2	1.3	10.4	1.1	77.4	28.0

ANEXO 1. Parámetros de evaluación de los materiales seleccionados dentro del programa de mejoramiento genético de la empresa Cultivares S.A. en el municipio de Jericó – departamento de Antioquia – Colombia.

Código	Muestra	Kg cer año	Kg sec año	% gr abto	% gr manch	tipo gr	L X A	E	1	2	3D	3E	4B	5	8	Cal sup	Cal inf
CM 1	1	19986	5.6	7.44	2.48	LARGO	1.83 X 0.61	0	13.33	34.05	24.14	14.41	5.22	7.92	0.9	71.52	28.45
CM 2	11	22095	6.1	6.23	3.11	LARGO	1.78 X 0.57	0	10.64	51.26	19.88	10.64	0	3.08	4.48	81.78	18.2
CM 3	5	15425	4.3	6.3	1.96	LARGO	1.96 X 0.59	10.51	41.74	30.03	13.51	1.8	0	0.9	1.5	95.79	4.2
CM 4	28	29165	8.1	8.44	2.22	LARGO	1.94 X 0.51	0	12.77	30.84	38.7	9.43	1.57	6.09	0.58	82.31	17.67
CM 5	26	22070	6.1	5.69	1.97	LARGO	1.76 X 0.57	0	26.94	21.75	23.7	21.75	0.97	4.87	0	72.39	27.59
CM 6	25	24915	6.9	5.05	1.88	LARGO	1.81 X 0.55	0	13.69	44.18	33.59	6.45	0.25	1.8	0	91.46	8.5
CM 7	3	18010	5.0	6.93	2.82	LARGO	1.84 X 0.57	0	22.46	36.16	26.84	12.05	0	2.46	0	85.46	14.51
CM 8	CM 8	> 14300	> 4														
CM 9	CM 9	> 14300	> 4														
PROMEDIO			6.0	6.6	2.3				1.5	20.2	35.5	10.9	1.1	3.9	1.1	83.0	17.0
CM 10	Intermedio 1	4500 a 14300	> 1,2 < 4			INTERM										60.5	39.5
CM 11	Intermedio 2	4500 a 14300	> 1,2 < 4			INTERM										60.5	39.5
CM 12	Común 1	4317	1.2	12	3	REDON										60.5	39.5
CM 13	Común 2	4317	1.2	12	3	REDON										60.5	39.5
CM 14	Silvestre																
CR 15	Común 3																

ANEXO 2. Parámetros de evaluación de los 15 materiales seleccionados para caracterización molecular mediante AFLP.
CM 1 a CM 14 procedentes de Colombia y CR15 procedente de Costa. Rica.

Con el objetivo de entender mejor los parámetros de selección de los materiales en campo presentados en el cuadro anterior, se describen a continuación:

- Código: Las plantas han sido llamadas CM 1 - CM 14 los genotipos de Colombia y CR15 al de Costa Rica. La ubicación de los materiales de Colombia es en diferentes lotes de las fincas de propiedad de la empresa proveedora de los materiales en el municipio de Jericó – departamento de Antioquia (Figuras 1-4).
- Muestra: El número de muestra corresponde a la selección inicial que ha manejado la empresa productora (Anexo 1).
- Kilos cereza año: Es la producción de cardamomo en peso fresco, plantas cosechadas cada 60-90 días y obtenida en promedio por año.
- Kilos secos Año: Es la producción de cardamomo una vez ha sido secado, esto genera una conversión diferente para cada material.
- Porcentaje de grano abierto: Plantas con alta dehiscencia presentan un alto porcentaje de grano abierto, lo cual genera pérdida de aroma y de semilla que se sale de la cápsula, los mejores materiales deben tener bajos porcentajes de grano abierto (Figura 5).
- Porcentaje de grano manchado: Es el efecto que deja en el grano la presencia de *Colletotrichum* sp., las cápsulas afectadas pierden valor comercial por su daño exterior, algunos materiales presentan mas tolerancia al daño. Figura 5.
- Tipo grano: El grano puede ser Tipo Pequeño –redondo-, Tipo Mediano –elíptico- y Tipo Grande –alargado-, el tipo de grano ubica las cápsulas en diferentes calidades, considerándose mejor calidad mientras más grande sea, esto esta dado por la relación largo ancho, a mayor relación, mayor numero de semillas internas puede tener el grano (Figura 6).
- Color del grano: La coloración de los materiales comerciales varia en tonalidades de verde, desde verde claro, verde y verde intenso, que se conserva con un adecuado sistema de secado; y el material silvestre tiene una coloración rojiza que se vuelve café una vez seco (Figuras 4 y 7).
- Largo por ancho: La medida de largo por ancho nos permite obtener una medida del volumen de la cápsula, es importante una buena proporción de largo por ancho que permite tener un mayor número de semilla interna y un mayor peso de cápsula.
- Calidades: Las calidades tienen una variación gradual de tamaño y color, la denominación es particular de la empresa productora, sin embargo, se conserva la preferencia de grano color verde intenso y de gran tamaño, disminuyendo la calidad a medida que baja el tono del color y la medida.

- Porcentaje de calidad superior: Las calidades superiores poseen grano color verde intenso y cambios graduales de tamaño que incluye granos grandes y medianos.
- Porcentaje de calidad inferior: Las calidades inferiores poseen grano pálido o grano con defectos y con cambio gradual de tamaño que incluye granos medianos y pequeños.

Las plantas con características indeseables como presencia de enfermedad, dificultad para recolección, altos porcentajes de grano abierto y grano manchado fueron descartadas, incluyendo solo los materiales aceptables y superiores. Aun los registros de producción de los materiales que están por debajo del promedio son muy superiores a los datos registrados de producción promedio a nivel internacional. Para mejorar el material a evaluar y esperando tener mayor avance genético, se seleccionaron genotipos con características deseables que se encuentran por encima del promedio. Los que tienen características indeseables por debajo del promedio se descartan, con esto, se disminuye el número de evaluaciones, quedando un número de 7 genotipos mejorados seleccionados, de CM 1 a CM 7.

ANEXO 3: Protocolo de extracción de ADN y Preparación de reactivos para extracción de ADN.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Método de extracción CTAB-Minipreparaciones desarrollado por Harris, 1996 y modificado por Phillips *et al*, 1998.

1. Pesar 0.2 g de tejido de hoja liofilizado, colocar en un mortero y macerar con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Colocar el polvo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y agregar 100 μ l de buffer 2X CTAB.
3. Adicionar 900 μ l del buffer 2X CTAB y luego 2 μ l de mercaptoetanol en cámara de gases y agitar en vortex hasta uniformizar.
4. Incubar en baño maría a 65° C por 30 minutos, luego dejar enfriar los tubos por 4 minutos.
5. Adicionar 400 μ l de una solución 24:1 de cloroformo - alcohol isoamílico en cámara de gases y mezclar con vortex. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y repetir el paso 5.
7. Agregar 500 μ l de isopropanol a -20° C y mezclar ligeramente para homogenizar.
8. Dejar reposar por 60 minutos en el congelador para precipitar el ADN.
9. Centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos, eliminar el alcohol.
10. Adicionar 1000 μ l de buffer de lavado (76% etanol y 10 mM de acetato de amonio) y dejar reposar por 20 minutos a temperatura ambiente.
11. Eliminar el buffer de lavado invirtiendo el tubo y dejar secar.
12. Agregar 100 μ l de TE 0.5 M, pH 7.4 y resuspender el ADN.
13. Agregar 50 μ l de etanol absoluto y dejar precipitar el ADN toda la noche a -20° C.
14. Centrifugar a 10.000 rpm durante 3 minutos, eliminar la fase acuosa y dejar secar los tubos.

15. Agregar a cada tubo una solución 300 μ l de RNAsa a 10 μ g/ml. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
16. Precipitar nuevamente el ADN con etanol, dejando los tubos toda la noche a -20° C.
17. Centrifugar a 10.000 rpm por 3 minutos, eliminar la fase acuosa y dejar secar los tubos.
18. Agregar 100 μ l de buffer TE 0.5 M y resuspender agitando suavemente.

PREPARACION DE REACTIVOS

- Buffer de extracción CTAB 2X

Tris-HCL pH 8,0	100 mM.
EDTA	20 mM.
NaCl	1,4 M.
CTAB	2% (P/V)
PVP	1%

- Cloroformo: Alcohol isoamílico.

Mezclar 240 ml de cloroformo:10 ml de alcohol isoamílico para que queden en proporción 24: 1

- Buffer TE 10X

Tris base	108 gr
Ácido bórico	55 gr.
EDTA 0.5 M	40 ml.
Aforar con agua destilada	a 1000 ml.

ANEXO 4: Preparación del gel de agarosa para cuantificación de ADN.

- Buffer TE.

Reactivo	Cantidad	Conc Final
EDTA 0.5 M	0.2 ml	1 mM
TRIS-HCL 1 M	1.0 ml	10 mM
Agua pura	Aforar a 100 ml	
Volumen final	100 ml	

- Solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml).

Adicionar 1 gramo de bromuro de etidio (BrEt) en 100 ml de agua destilada y agitar hasta disolverlo. Almacenarlo en una botella oscura y a temperatura ambiente. (El BrEt es cancerígeno, debe manipularse con mucha precaución).

- Preparación de gel de agarosa 0.8% para cuantificación de ADN y para el control de digestión / ligación.

Para preparar un gel de 100 ml.

Reactivo	Cantidad
Buffer TBE 10X	10.0 cc
Agua destilada	99.0 cc
Agarosa	0.8 gr.

Se mezcla en erlenmeyer y se coloca esta solución en el microondas por 2 minutos.

- Preparación de muestra de ADN para cuantificación en gel de agarosa.

Para cada muestra de ADN se coloca en tubos eppendorf lo siguiente:

2 μ l de ADN
17 μ l de TE 1/10.
2 μ l de azul de bromofenol.

- Antes de la preparación del Gel de agarosa se debe realizar los siguientes pasos:
 - Preparar la cámara de electroforesis verificando que no tenga fugas.
 - Agregar 40 μl de Bromuro de Etidio a una concentración de 0.0000001 % (0.01 $\mu\text{g/ml}$).
 - Agregar el contenido del erlenmeyer en forma circular sobre la bandeja que tiene el Bromuro de Etidio para distribuirlo uniformemente.
 - Colocar los peines.
 - Esperar que gelidifique (Aproximadamente 20 minutos).
 - Retirar los peines y colocar el gel en la cámara con buffer TBE 1X.
 - Colocar la solución conteniendo el ADN en cada pozo del gel.
 - Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder aproximadamente 30 - 40 minutos, a 137 w y 35 miliamperios.
 - Visualizar el resultado de la migración con una lámpara de luz ultravioleta.

ANEXO 5: Preparación de vidrios y reactivos para gel de poliacrilamida.

- Solución de Acrylamide/ bis-Acrylamide 6%.

Producto	Cantidad para 1 gel
Urea	40 gr.
Acrylamide / bis- Acrylamide (40%) 19/1	12 ml.
TBE 10X	8 ml.
H2O desionizada y destilada.	28 ml.
Volumen Total	80 ml

La acrilamida se mantiene en envase ámbar y a temperatura ambiente para evitar la formación de cristales.

- Solución Atractiva.

1 ml de Etanol al 95 %.

3 μ l de Bind Silane (METHACRYLOXIPROPYLTRI-METHOXYSILANE).

5 μ l de Ácido Acético Glacial.

Se mezcla para homogenizar.

- Solución de Persulfato de Amonio al 10% (10 mg / 1 ml).

Utilizar una botella limpia de 80 ml.

Agregar 80 ml de solución Acrylamide/ bis-Acrylamide al 6%.

Colocar 300 μ l de Persulfato al 10 %.

Agregar 30 μ l de TEMED.

- Tiosulfato de sodio 1.5%.

Pesar 1,5 gramos de Tiosulfato de sodio

Aforar a 100 ml con agua destilada.

- Carbonato de Sodio.

Pesar 60 gramos y aforar en 2 litros de agua desionizada y destilada.

- Solución de Nitrato de Plata (AgNO_3) al 1 %.

Pesar 1 gramo de Nitrato de Plata.

Agregar 1.5 ml de Formaldehído.

Aforar hasta un volumen de 1 L de agua desionizada y destilada.

- Tris - borate (TBE).

10x: 108 gramos Tris base.

55 gramos acido bórico.

40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0

Aforar con agua destilada hasta 1 L.

- Azul de bromofenol para AFLP.

Formamida 98 % 49 ml.

EDTA 10 mM 186 mg.

Azul de bromofenol 150 mg.

Xylene cyanol 10 mg.

Aforar con agua destilada hasta 50 ml.

▪ **LIMPIEZA DE VIDRIOS.**

Los vidrios se deben mantener identificados con etiquetas para trabajar siempre de la misma cara.

Dejar los vidrios durante 1 hora en NaOH 1M.

Limpiar los vidrios (grande y pequeño) con agua y jabón y remojarlos con agua desionizada y destilada.

Limpiarlos con 2 ml de Cloroformo para eliminar residuos de grasas.

Limpiar los dos vidrios con Etanol absoluto.

Agregar 2 ml de la solución SIGMACOTE al vidrio grande, y distribuirlo uniformemente, dejar secar 4 a 5 minutos y luego limpiar el vidrio con Etanol absoluto, para eliminar el exceso del producto.

Agregar y distribuir la solución atractiva sobre el vidrio pequeño con papel toalla.

Eliminar el exceso de atractivo, agregando 2 ml de Etanol y limpiarlo con papel toalla, verticalmente y horizontalmente.

Limpiar las guías del gel con Etanol Absoluto y colocarlas sobre los extremos del vidrio grande.

Colocar el vidrio corto sobre el vidrio largo y sobre los separadores sosteniéndolos con prensas.

Colocar cinta adhesiva, en la parte basal de los vidrios y luego colocar el empaque de hule, prensando muy bien los dos vidrios.

Preparar la solución de acrilamida, agitar suavemente y depositarla inclinando los vidrios rápidamente.

Colocar el peine en el centro del gel, aproximadamente hasta la mitad de los pozos.

Dejar secar por lo menos una hora.

▪ **PREPARACIÓN DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS.**

Colocar los vidrios en una bandeja, se lavan con agua caliente para sacar el exceso de urea, limpiando los bordes y extremos.

Se desprende el empaque de hule y se lava.

Se seca cuidadosamente el vidrio por ambos lados.

Colocar los vidrios en la cámara, revisando previamente que la guía de hule tenga un poco de Silicona y se ajuste al vidrio.

Se debe cerrar la llave que sirve para drenar la cámara.

Agregar Buffer TBE 1X (preparado con el buffer 10X), aproximadamente 500 ml para cada contenedor. Revisar que no tenga fugas.

Extraer el peine, y encender la fuente de poder, con el siguiente ajuste previo.

Volts al máximo	3000 Volts.
mA al máximo	300 mA.

Debe colocarse a 70 watts para el calentamiento previo y a 50 watts para la migración.

Verificar que no presente de burbujas y mantenerse el calentamiento 15 a 20 minutos.

Durante este lapso utilizando una jeringa se toma parte del buffer y se extrae la urea remanente dentro del pozo dos o tres veces.

- Desnaturalización de las muestras en Termociclador GENE AMP PCR System 9700
Este paso se realiza inmediatamente antes de colocar las muestras en el gel de Acrilamida.

94⁰ C por tres minutos.
72⁰ C de 5 a no mas de 20 minutos.

Lavar nuevamente para eliminar el exceso de urea.

Colocar el peine.

Ajustar la potencia a 50 watts.

Retirar las muestras del Termociclador cuando están a 72⁰ C.

Apagar la fuente de poder para colocar las muestras.

En los extremos del gel poner colorante AFLP.

Colocar 6 µl de muestra en cada pozo y encender la fuente a 50 watts.

ANEXO 6: Procedimiento para revelado de gel de poliacrilamida.

El carbonato de Sodio se prepara con anterioridad para que este frío para el proceso de revelado.

Apagar la fuente hasta que el azul de bromofenol salga completamente del gel (2:00 horas aproximadamente).

Drenar la cámara, retirar el peine, sacar los vidrios y retirarle los espaciadores y separar los vidrios.

- Fijación con ácido acético al 10%.

Se coloca el vidrio pequeño dentro de una bandeja en la cual se adiciona un litro de ácido acético al 10 %, y se agita durante 20 minutos a 80 rpm.

Preparar tres bandejas con un litro de agua desionizada y destilada cada una.

Terminada la fijación se coloca el gel por 2 a 3 minutos en cada una de las bandejas removiendo constantemente -Para eliminar excesos de ácido acético-.

El ácido acético usado en la fijación se recoge en un recipiente para luego utilizarlo en fijación del gel después de la tinción con Plata.

Colocar el gel en una bandeja y agregar la solución de Nitrato de Plata al 1 %, agitar a 80 r.p.m. por una hora.

Lavar el gel en agua desionizada y destilada rápidamente por 3 segundos.

Agregarle a los dos litros de Carbonato de Sodio 400 μ l de Tiosulfato de sodio que se encuentra a 1.5% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3, 5\text{H}_2\text{O}$), y 3 ml de Formaldehído al 37 %. Esta mezcla se realiza justo antes de utilizar el Carbonato de Sodio.

Colocar el gel en las bandejas con el carbonato y agitar suavemente hasta que empieza a notarse las bandas, luego se transfiere a la segunda bandeja para terminar la coloración.

Cuando se visualizan las bandas se agrega el ácido acético al 10 % para fijar la coloración obtenida en el gel.

Realizar dos lavados en agua desionizada y destilada para concluir el proceso de revelado.

ANEXO 8: Matriz de similaridad usando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA para el análisis de agrupamiento para las 15 accesiones de cardamomo.

CLUSTER ANALYSIS		Analysing 100 variables x 15 cases														
UPGMA		Imported data														
Jaccard's Coefficient Similarity matrix		CM 1	CM 2	CM 3	CM 4	CM 5	CM 6	CM 7	CM 8	CM 9	CM 10	CM 11	CM 12	CM 13	CM 14	CM 15
CM 1	1.000															
CM 2	0.580	1.000														
CM 3	0.593	0.694	1.000													
CM 4	0.481	0.510	0.653	1.000												
CM 5	0.523	0.600	0.635	0.446	1.000											
CM 6	0.592	0.744	0.708	0.521	0.638	1.000										
CM 7	0.537	0.633	0.642	0.444	0.639	0.717	1.000									
CM 8	0.708	0.681	0.686	0.638	0.623	0.696	0.660	1.000								
CM 9	0.323	0.339	0.387	0.351	0.414	0.322	0.361	0.390	1.000							
CM 10	0.517	0.635	0.643	0.566	0.591	0.527	0.508	0.630	0.375	1.000						
CM 11	0.536	0.627	0.607	0.620	0.561	0.577	0.554	0.623	0.433	0.840	1.000					
CM 12	0.472	0.630	0.547	0.622	0.508	0.609	0.491	0.529	0.368	0.615	0.640	1.000				
CM 13	0.472	0.471	0.439	0.431	0.462	0.480	0.463	0.500	0.300	0.500	0.491	0.542	1.000			
CM 14	0.164	0.188	0.236	0.212	0.229	0.191	0.194	0.232	0.214	0.213	0.203	0.191	0.157	1.000		
CR 15	0.469	0.605	0.551	0.457	0.459	0.545	0.521	0.565	0.385	0.500	0.551	0.447	0.447	0.136	1.000	
	CM 1	CM 2	CM 3	CM 4	CM 5	CM 6	CM 7	CM 8	CM 9	CM 10	CM 11	CM 12	CM 13	CM 14	CM 15	

ANEXO 8 : Matriz de similaridad para las 15 accesiones, usando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA.

Group 1	Group 2	Simil.	in group
CM 10	CM 11	0.840	2
CM 2	CM 6	0.744	2
CM 1	CM 8	0.708	2
Node 2	CM 3	0.701	3
Node 4	CM 7	0.664	4
Node 5	CM 5	0.628	5
Node 1	CM 12	0.628	3
Node 3	Node 6	0.617	7
CM 4	Node 7	0.603	4
Node 8	Node 9	0.558	11
Node 10	CR 15	0.515	12
Node 11	CM 13	0.475	13
Node 12	CM 9	0.365	14
Node 13	CM 14	0.197	15

