

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Caracterización molecular por marcadores de cloroplasto en  
especies de *Annona* (Annonaceae) en Guatemala

Trabajo de graduación presentado

por Luis Javier Ajú Torres

para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala

2012



Caracterización molecular por marcadores de cloroplasto en  
especies de *Annona* (Annonaceae) en Guatemala

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades


Caracterización molecular por marcadores de cloroplasto en  
especies de *Annona* (Annonaceae) en Guatemala

Trabajo de investigación presentado  
por Luis Javier Ajú Torres  
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala

2012

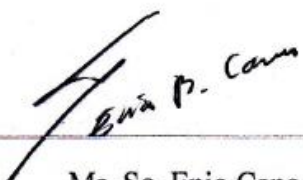
Vo. Bo. :

(f)   
\_\_\_\_\_  
Licda. Elena Dardón Fresse

Tribunal Examinador:

(f)   
\_\_\_\_\_  
Licda. Elena Dardón Fresse

(f)   
\_\_\_\_\_  
Licda. Margarita Palmieri Santisteban

(f)   
\_\_\_\_\_  
Ms. Sc. Enio Cano

Fecha de aprobación: Guatemala 18 de junio del 2012.

## **PREFACIO**

La Biología es una de las ciencias más fascinantes y el estudio de la vida, desde su misterioso origen y evolución, ha dado grandes sorpresas y respuestas al ser humano. Nací en los trópicos y qué mejor lugar que este para ser biólogo: la vida es abundante y se presenta en diversas formas, tamaños y colores. Mi interés por las ciencias naturales nació desde mi infancia y mi pasión por la lectura se concentraba en libros de animales, dinosaurios y plantas. Puedo decir que desde muy pequeño supe mi vocación y escogí la carrera de Biología porque la vida en la Tierra capturó mi fascinación. Durante mi carrera los cursos de evolución, biogeografía, paleontología y botánica fueron muy importantes para formar mis intereses en el campo científico que se reúnen en la sistemática. A finales del quinto año tuve la oportunidad de integrarme al proyecto “Diversidad Genética y Conservación de Recursos Genéticos en Frutales Autóctonos Latinoamericanos. Un estudio de caso en anonáceas”, en el laboratorio de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. El proyecto se convirtió en mi tesis de grado y pude encontrar la aplicación práctica de la sistemática a la problemática actual de Guatemala. Las anonáceas tienen una morfología primitiva respecto al resto de las plantas con flores, de cierta forma son como fósiles vivientes y su fruto comestible presenta una oportunidad económica para el país. Espero continuar mi carrera en el área de evolución y sistemática, sin olvidar encontrar siempre la aplicación a los problemas de mi país.

Quiero agradecer a varias personas y organizaciones que permitieron el desarrollo de esta investigación. A la comisión europea de cooperación internacional con países en desarrollo (INCODEV) y al Banco Bilbao Vizcaya Argentaria (BBVA) por proporcionar los fondos. A Margarita Palmieri por asesorar, dirigir mi formación académico y haberme permitido integrar al laboratorio de Protección Vegetal. A Heimo Rainer, Julio Granados y Wilfredo López por su gran apoyo durante la fase de campo. A Elena Dardón y Andrés Ávalos por su gran apoyo, ayuda, consejos y paciencia durante la fase de laboratorio. A

Elfriede Pöll y Enio Cano por sus observaciones, consejos y asesoría botánica y sistemática, respectivamente. A la Universidad del Valle de Guatemala, en especial al departamento de Biología, por ser mi casa de estudios y el lugar donde se desarrolló la investigación.

Quiero agradecer además a varias personas que me apoyaron durante los años de estudio. El agradecimiento más grande se lo debo a mi familia, en especial a mis padres por su apoyo y amor incondicional. A USAID RTI/Alianzas y a la Fundación Juan Bautista Gutiérrez por otorgarme la beca que permitió financiar mis estudios universitarios; especialmente a Isabel Gutiérrez de Bosch, Teresa Ligorria, Edgar Estrada, Tania de Sedán, Evelyn de Hernández y Kathy de Santay. A mis profesores que han sido parte fundamental en mi desarrollo como biólogo; en especial a Margaret Dix, Jack Schuster, Michael Dix y Daniel Ariano. A mis amigos biólogos; en especial a Arturo Monterroso, Erick López, Grecia Méndez, Hugo Villavicencio, Juan Manuel Pérez, Laura Palmieri, Luis Girón, Marietta Marroquín, Milena Oliva, Olga Zamora, Priscila Juárez, Sofía Rosales y Zabdi López.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
PREFACIO .....	vi
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xv
Capítulo	
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Antecedentes .....	2
B. Justificación.....	22
C. Objetivos.....	23
II. MÉTODOS.....	24
A. Procedimientos .....	24
III. RESULTADOS.....	30
A. Distribución e identificación botánica.....	30
B. Extracción de ácidos nucleicos.....	32
C. Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos.....	32
D. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	34
E. Inferencia filogenética .....	35
F. Riqueza de haplotipos .....	46
IV. DISCUSIÓN .....	50
A. Distribución y botánica de <i>Annona</i> en Guatemala .....	50
B. Fragmentos amplificados en <i>Annona</i> .....	51
C. Relaciones filogenéticas en <i>Annona</i> .....	51



D. Áreas de alta diversidad de <i>A. cherimola</i> en Guatemala .....	55
E. Conservación de los recursos genéticos de <i>Annona</i> de Guatemala .....	57
V. CONCLUSIONES .....	59
VI. RECOMENDACIONES.....	60
VII. LITERATURA CITADA.....	61
VIII. APÉNDICES.....	65
IX. GLOSARIO .....	105

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Annona</i> .....	2
<b>Cuadro 2.</b> Regiones del ADNcp y cebadores utilizados para su amplificación. ....	27
<b>Cuadro 3.</b> Receta para mezcla de reacción de 25 µl por cada par de cebadores. ....	27
<b>Cuadro 4.</b> Individuos con regiones amplificadas y secuenciadas.....	33
<b>Cuadro 5.</b> Intervalos de confianza del 95% de las medias de largos de fragmentos amplificados por especie y por marcador.....	35
<b>Cuadro 6.</b> Estadísticos de los árboles de las regiones <i>trnS-T</i> , <i>trnL-F</i> , <i>rpoC1</i> , <i>matK</i> y combinadas obtenidos del análisis de máxima parsimonia. ....	36
<b>Cuadro 7.</b> Modelos utilizados y valores de parámetros para los análisis de máxima verosimilitud y bayesiano aplicados individualmente y en combinación de las regiones <i>trnS-T</i> , <i>trnL-F</i> , intrón <i>rpoC1</i> y <i>matK</i> .....	37
<b>Cuadro 8.</b> Estadísticos de los árboles de la combinación de las regiones <i>trnL-F</i> y <i>rpoC1</i> obtenidos del análisis de máxima parsimonia.....	44
<b>Cuadro 9.</b> Haplotipos de <i>A. cherimola</i> encontrados en distintas localidades de Guatemala.....	47

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> <i>Annona cherimola</i> . .....	3
<b>Figura 2.</b> <i>Annona macrophyllata</i> . .....	4
<b>Figura 3.</b> <i>Annona glabra</i> . .....	5
<b>Figura 4.</b> <i>Annona muricata</i> . .....	6
<b>Figura 5.</b> <i>Annona purpurea</i> . .....	7
<b>Figura 6.</b> <i>Annona reticulata</i> . .....	8
<b>Figura 7.</b> <i>Annona squamosa</i> . .....	9
<b>Figura 8.</b> Mapa paleogeográfico de Gondwana durante el Cretácico tardío. ....	10
<b>Figura 9.</b> Riqueza alélica de <i>A. cherimola</i> en Ecuador, Perú y Bolivia. ....	19
<b>Figura 10.</b> Procedimiento general para la caracterización molecular. ....	25
<b>Figura 11.</b> Diagrama del proceso de extracción de ácidos nucleicos por el método CTAB de Murray y Thompson (1980). .....	26
<b>Figura 12.</b> Registro de herbario. ....	30
<b>Figura 13.</b> Distribución y colecta. ....	31
<b>Figura 14.</b> Diagrama circular de individuos colectados. ....	32
<b>Figura 15.</b> Consensos estrictos de los árboles más parsimoniosos producidos con análisis de máxima parsimonia individuales de las regiones <i>trnS-T</i> , <i>trnL-F</i> , <i>rpoC1</i> y <i>matK</i> . .....	38
<b>Figura 16.</b> Filogenias de <i>Annona</i> generadas con el método de máxima verosimilitud aplicado individualmente a las regiones <i>trnS-T</i> , <i>trnL-F</i> , <i>intrón rpoC1</i> y <i>matK</i> . .....	39

<b>Figura 17.</b> Árboles filogenéticos de <i>Annona</i> de la región <i>atpB-rbcL</i> . (A) Análisis de máxima parsimonia, (B) análisis de máxima verosimilitud y (C) análisis Bayesiano. ....	40
<b>Figura 18.</b> Consenso estricto de 68 árboles igualmente parsimoniosos producido con análisis MP utilizando datos combinados de las regiones <i>trnL-F</i> , intrón <i>rpoC1</i> y <i>matK</i> . ....	42
<b>Figura 19.</b> Filogenia de <i>Annona</i> con datos combinados de regiones <i>trnL-F</i> , intrón <i>rpoC1</i> y <i>matK</i> . ....	43
<b>Figura 20.</b> Consenso estricto de 190 árboles igualmente parsimoniosos producido con análisis MP utilizando datos combinados de las regiones <i>trnL-F</i> , intrón <i>rpoC1</i> y <i>matK</i> . ....	45
<b>Figura 21.</b> Filogenia de <i>A. cherimola</i> con datos combinados de la región <i>trnL-F</i> e intrón <i>rpoC1</i> . ....	46
<b>Figura 22.</b> Riqueza de haplotipos de <i>A. cherimola</i> . ....	48
<b>Figura 23.</b> Red de haplotipos .....	49

## RESUMEN

El género *Annona* contiene varias especies de árboles frutales nativos de los neotrópicos. El fruto de *A. cherimola* (anona, chirimoyo) es el más consumido, cuenta con producción a gran escala en Perú y España; cultivos a pequeña escala se encuentran en México, América Central, Ecuador y Bolivia. En Guatemala el cultivo de anonas generalmente es en huertos familiares entre 1500 y 2000 msnm. Los frutos de *A. macrophyllata* (papaya, anona blanca) y *A. muricata* (guanaba) también son comestibles, pero se les cultiva en tierras bajas. Las anonas son ricas en carbohidratos y al ser cultivos locales pueden ser una fuente importante de alimento e ingresos económicos. La región centroamericana ha sido propuesta como un centro de diversidad de las anonas, por lo que la conservación de sus recursos genéticos es importante para la seguridad alimentaria del país.

En el presente se realizó una caracterización molecular de especies de *Annona* en Guatemala para conocer las relaciones filogenéticas entre las especies, su riqueza genética y la distribución espacial de dicha riqueza en Guatemala. Esta caracterización consistió en la amplificación mediante PCR y posterior secuenciación de las regiones *trnS-T*, *trnL-F*, intrón *rpoCl*, *atpB-rbcL* y *matK* del ADN de cloroplasto (ADNcp) de individuos de 7 especies de *Annona* provenientes de Huehuetenango, Quetzaltenango, Chimaltenango, Sacatepéquez, Guatemala, Escuintla, Jalapa, El Progreso, Santa Rosa, Chiquimula, Jutiapa e Izabal. Los muestreos fueron realizados desde finales de 2010 a junio de 2011 y el análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Se realizó la inferencia filogenética con base en los modelos estadísticos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y estadística bayesiana. Se determinó la diversidad genética en base a los haplotipos presentes y se realizó el análisis espacial mediante el programa DIVA GIS 7.3.

Se determinó que *A. cherimola* es monofilético y su grupo hermano se compone de *A. squamosa* y *A. reticulata*. Se encontraron siete haplotipos de *A. cherimola*, encontrándose los valores más altos de riqueza genética en la región central de Huehuetenango. El estudio se vio limitado por la cantidad de individuos con amplificación y secuenciación exitosa; sin embargo las secuencias de las regiones *trnL-F* y *rpoCl* mostraron ser las más informativas. Se sugiere que la caracterización molecular se expanda a Alta Verapaz, donde se espera encontrar alta diversidad y especies propuestas como los parientes silvestres de *A. cherimola*.

## ABSTRACT

The genus *Annona* contains several species of fruit bearing trees native to the New World tropics. The edible fruits of *A. cherimola* (custard apple, chirimoyo) are preferred amongst other *Annona* species for human consumption; great scale cultivation occurs in Peru and Spain, small scale cultivation occurs in Mexico, Central America, Ecuador and Bolivia. There is cultivation of chirimoyo in Guatemala, mainly in the form of home gardens found between 1500 and 2000 m above sea level. The fruits of *A. macrophyllata* (ilama) and *A. muricata* (soursop) are also edible; they are cultivated in the country's lowlands. The fruits of anonas are rich in carbohydrates and being a local crop they have the potential to be an important food source and provide significant incomes to Guatemalan families. The Central American region has been proposed as a center of diversity of anonas, therefore the conservation of their genetic resources is very important for Guatemala's food safety.

In this study a molecular characterization of *Annona* species was done in order to determine the phylogenetic relationships among the species, their genetic richness and the spatial distribution in Guatemala of such richness. This characterization consisted in the amplification and sequencing of *trnS-T*, *trnL-F*, *rpoCl* intron, *atpB-rbcL* and *matK* of chloroplast DNA (cpDNA) regions from specimens of 7 *Annona* species collected in Huehuetenango, Quetzaltenango, Chimaltenango, Sacatepéquez, Guatemala, Escuintla, Jalapa, El Progreso, Chiquimula, Santa Rosa, Jutiapa and Izabal. The individuals were sampled from 2010 to 2011 and the analysis was done in the laboratory of Food Protection of the Universidad del Valle de Guatemala Research Institute. Phylogenetic relationships were inferred by maximum parsimony, máxima verosimilitud and Bayesian methods. Genetic diversity was determined based on the amount of haplotypes present and the spatial analysis was performed with the software DIVA GIS 7.3.

The results showed monophyly for *A. cherimola* with a sister group comprising *A. squamosa* and *A. reticulata*. A total of seven haplotypes of *A. cherimola* were found, with the region of Huehuetenango having the highest levels of genetic richness. The study was limited by the amount of individuals with successful amplification and sequencing; however the *trnL-F* and *rpoC1* sequences proved to be highly informative. The results suggest that the molecular characterization should be expanded to Alta Verapaz where high levels of diversity and *A. cherimola* wild relatives might be found.



# I. INTRODUCCIÓN

La conservación y uso sostenible de la diversidad biológica requieren de una serie de bases técnicas. La investigación permite establecer bases para la toma de decisiones; optimizando recursos, beneficios y esfuerzos. El proyecto CHERLA, patrocinado por la comisión europea de cooperación internacional con países en desarrollo (INCODEV, por sus siglas en inglés), ha permitido la investigación aplicada a la conservación. El proyecto CHERLA se creó para enfocarse en cultivos nativos de la región andina. Los cultivos nativos son prioridad de conservación porque forman parte importante de la seguridad alimentaria de los países. La investigación patrocinada por CHERLA se centró originalmente en la caracterización genotípica de *A. cherimola* y *A. senegalensis* mediante marcadores moleculares microsatélites (Escribano *et al.* 2004, Kwapata *et al.* 2007).

Los estudios más recientes de *A. cherimola* mediante microsatélites han encontrado que en el norte de Perú existe alta riqueza genética. El interés del proyecto CHERLA se ha extendido hacia la región centroamericana, la cual ha sido propuesta como un posible centro de diversidad de *Annona* (Van Zonneveld *et al.* 2012). La región centroamericana tiene una gran riqueza biológica nativa y las anonas centroamericanas parecen tener mayores variaciones a nivel genético que sus parientes andinas. El laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala se unió a CHERLA para realizar la caracterización molecular de especies de *Annona* presentes en Guatemala. Honduras y Costa Rica son los otros países centroamericanos en los que también se realizó la caracterización molecular.

Los frutos de anonas nativas han sido consumidos en el país desde cientos de años atrás y actualmente se ha reducido su consumo. Conocer la riqueza de los árboles frutales a nivel molecular permitirá establecer medidas para la conservación de variedades nativas, priorizando áreas y contribuyendo a la seguridad alimentaria del país. Este estudio pretende informar sobre la diversidad genética utilizando distintas regiones del ADNcp y determinar las áreas del país con alta riqueza genética en dichas regiones. Este tipo de estudio no se ha llevado a cabo en las anonas del país, por lo que puede ser la base de futuras investigaciones para fomentar la producción del este cultivo local. Además tampoco se han utilizado marcadores de ADNcp para caracterización genética en el país y este estudio pretende ser una referencia útil para

futuras investigaciones de este tipo. Finalmente, también se realizará una contribución a la sistemática del género mediante el análisis filogenético.

## A. Antecedentes

**1. Botánica de las anonas.** Las anonas son frutas de los trópicos y subtropicos, nativas de Centro y Sur América. Annonaceae contiene 112 géneros con 2,150 especies de árboles, arbustos y lianas con distribución tropical. Las hojas son usualmente alternas, simples enteras, pecioladas y sin estípulas. La inflorescencia puede ser solitaria o una cima. Las flores son actinomorfas, bisexuales (perfectas) y generalmente tienen 6 pétalos y 3 sépalos; los estambres son numerosos y las anteras son longitudinalmente dehiscentes. El fruto es un agregado de bayas o unidades secas e indehiscentes, o un sincarpo en el cual las bayas se fusionan a un eje receptacular carnoso. *Annona* spp. poseen importancia económica debido a sus frutos comestibles; otras especies son cultivadas como ornamentales, e.g., *Polyalthia*. Desde el punto de vista sistemático, las anonas son parte del clado Magnoliidae (*magnoliids*) dentro de Magnoliophyta o de las angiospermas (ver Cuadro 1). El clado Magnoliidae es basal dentro de Magnoliophyta y consiste de Laurales, Magnoliales, Canellales y Piperales (Stanley y Steyemark 1946, Bridg *op. cit.* 2001, Simpson 2006).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica de *Annona*.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta (angiospermas)
<b>Clase</b>	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
<b>Orden</b>	Magnoliales
<b>Familia</b>	Annonaceae
<b>Género</b>	<i>Annona</i>

Entre paréntesis se colocan los nombres comunes utilizados para ciertos *taxa*.

El género *Annona* se distingue entre las anonáceas por tener un fruto maduro con carpelos casi completamente fusionados, por lo que usualmente es grande y ovoide o globoso. *Rollinia* fue incluido dentro de *Annona*; y se solía separar las especies en uno u otro género porque el segundo tiene los pétalos externos no alados y los carpelos tienen un mayor grado de fusión. Existen cerca de 100 especies, todas

nativas de América. El nombre común, anona, deriva de anón, un nombre indígena de las Antillas Superiores (Stanley y Steyemark 1946).

**a. *Annona cherimola* Mill.** Entre los nombres comunes se encuentran anona; chirimoyo; pac (kaqchikel); pap (poquomchi, q'eqchi'); y tsumuy o tzumux (q'eqchi'). El chirimoyo es un arbusto o árbol pequeño, comúnmente de 5 a 9 metros. Las hojas son membranosas y comúnmente elípticas; de 8-15 cm de largo y 4-9 cm de ancho y con peciolo de 8-12 mm de largo. En el ápice las hojas son redondeadas a obtusas y raramente son acutas; son cuneadas a redondeadas en la base, seríceas en el haz y al crecer se vuelven glabras; en el envés son velutinosas-tomentosas. Las flores son opuestas a las hojas, se encuentran solitarias o binadas y tienen pedicelos tomentosos de 8-12 mm de largo. Los sépalos son triangulares, tomentosos y de 2-4 mm de largo. Los pétalos miden de 1.5 a 2-5 cm de largo, son lineares y obtusos; por dentro son verduzcos y por fuera son ferruginosos-tomentosos. El fruto es globoso u ovoide y generalmente es suave; la superficie posee protuberancias redondeadas y está marcada con areolas en forma de u (ver Figura 1). La pulpa del fruto es blanca y las semillas son negras (Stanley y Steyemark 1946).

**Figura 1.** *Annona cherimola*.



Izquierda: árbol. Derecha superior: flor. Derecha inferior: fruto. Disponible en: [<http://www.arbolesornamentales.es/Annonacherimola.htm>].

**b. *Annona macrophyllata* Donn.Smith.** *A. diversifolia* Safford es un sinónimo. Entre los nombres comunes se encuentran anona blanca (oriente) y papausa (San Marcos y Huehuetenango). La papausa es un árbol pequeño, con hojas membranosas, glabras, obovadas de 8-14 cm de largo y 4-6 cm de ancho; los peciolo miden 8-18 mm. El ápice de la hoja es redondeado o subacuto y la base es acuta o redondeada; el envés es glauco. La papausa posee otro tipo de hojas en forma de bráctea de 2-4 cm de largo; aparecen en las bases de las ramas con inflorescencias. Las flores son solitarias, los pedicelos son delgados, glabros, recurvados o pendulosos de 3-5 cm de largo. Los sépalos son redondeados-trianguares y miden 2-3 mm de largo. Los pétalos externos son lineares-oblongos, obtusos y escasamente pubescentes hacia afuera; miden 2-5 cm de largo. Los pétalos internos son rudimentarios. El fruto es ancho y ovoide, tomentoso, generalmente de 13-15cm de largo y 12-15 cm de ancho; se encuentra cubierto con protuberancias bajas y redondeadas (ver Figura 2). La pulpa es de color crema o coloreada de un rosa pálido (Stanley y Steyemark 1946, Hernández y León *op.cit.* 1992).

**Figura 2.** *Annona macrophyllata*.



Disponible en: [<http://www.increasemyvocabulary.com/definition/of/annonadiversifolia/>].

**c. *Annona glabra* L.** El anonillo (Izabal) es un arbusto o árbol pequeño, generalmente de 10 m de alto. Las hojas tienen peciolo cortos, son papiráceas y de color verde brillante; son ovadas-elípticas a oblongadas-elípticas de 7-14 cm de largo y 3-8 cm de ancho. Las hojas son glabras, tienen el ápice acuto corto y a veces obtuso: son redondeadas u obtusas en la base. Las flores son solitarias y cuelgan de

los peciolos; los pedícelos son glabros y miden 1.5-2 cm de largo. Los sépalos son redondeados, apiculados y glabros; miden 3-5 mm de largo. Los pétalos son glabros por fuera, los pétalos externos son ovados y miden 2.5-3 cm de largo. Los pétalos internos son más pequeños. Los frutos son globosos-ovoides, de 5-12 cm de largo, suaves, amarillentos en la madurez y la pulpa es de color crema (ver Figura 3) (Stanley y Steyemark 1946).

**Figura 3.** *Annona glabra*.



Disponible en: [<http://www.flickr.com/photos/haile/270288519/>].

**d. *Annona lutescens* Safford.** La anona amarilla es un árbol pequeño, con hojas en peciolos de 8-15 mm de largo. Las hojas son membranosas, ovadas a elípticas u obovadas, de 7-14 cm de largo y 3.5-7.5 cm de ancho; en el ápice son cortas-acuminadas u obtusas, redondeadas o subacutas en la base; son glabras al madurar, con unos cuantos tricomas persistentes en el envés a lo largo de las nervaciones. Las inflorescencias se encuentran opuestas a las hojas y contienen muchas flores, los pedícelos son seríceos y miden 12-18 mm de largo. Los sépalos son triangulares y de 2-3 mm de largo. Los pétalos son lineares-oblongos, obtusos y de 1.5-2 cm de largo; los pétalos internos son rudimentarios. El fruto es globoso-ovoide, suave, amarillo, de 8-9 cm de diámetro; posee areolas poco perceptibles. La validez de la especie es dudosa, se le considera una variante de *A. reticulata*, por lo que aún se necesita más investigación en las anonas de Alta Verapaz (Stanley y Steyemark 1946).



e. *Annona muricata* L. Se le conoce comúnmente como guanaba o guanábana, un nombre con origen en las Antillas. La guanaba es un árbol pequeño, de 8 metros de alto. Las hojas están en peciolo de 5 mm de largo; son papiráceas, lustrosas, obovadas a oblongas, de 8-15 cm de largo y 3-6 cm de ancho. El ápice es obtuso corto y acuto, la base es corta y acuta. Las hojas son glabras en el haz y seríceas en el envés, al madurar se vuelven glabras. Las flores son solitarias, terminales u opuestas a las hojas, los pedicelos son seríceos y miden 1.5-2 cm de largo. Los pétalos externos son redondeados-ovados, acutos contraídos en el ápice y cordados en la base; miden 2.5-3.5 cm de largo, son amarillentos y los pétalos internos son más pequeños. El fruto es ovoide u oblongo-ovoide, verde, cubierto con tubérculos curvos flexibles en forma de espinas; mide 15-20 cm de largo (ver Figura 4). Las semillas son negras, de 1.5 cm de largo (Stanley y Steyemark 1946).

**Figura 4.** *Annona muricata*.



Disponible en: [<http://www.superstock.com/stock-photos-images/1566-0207659>].

f. *Annona primigenia* Standl. y Steyerm. Es otra de las especies conocida como anonillo. Es un árbol de hasta 10 metros de alto. Las hojas se encuentran en peciolo delgado de 7-14 mm de largo; son membranosas y se oscurecen al secar. Las hojas son elípticas a lanceoladas-oblongadas u obovadas-oblongas de 8-14 cm de largo y 3-6 cm de ancho; acutas o subacuminadas en el ápice y redondeadas a subacutas en la base; son glabras en el haz y al madurar también lo son en el envés; tienen pequeños orificios en las axilas de las nervaciones. Las inflorescencias contienen varias flores, emergiendo desde la mitad de los internodos, los pedicelos son glabros, de 1.5 a 3 cm de largo. El fruto es subgloboso y casi glabro; mide 1.5-3 cm de diámetro; es suave o a veces areolado, en tonos café-rojizos y café-amarillentos.

Las semillas son café oscuro, de 8 mm de largo. El fruto es considerado comestible, pero provee poca pulpa. La especie es conocida por poseer los frutos más pequeños de todas las especies centroamericanas. Probablemente esta especie representa un ancestro silvestre de formas cultivadas de *A. reticulata* (Stanley y Steyemark 1946).

**g. *Annona purpurea* Mociño & Sessé ex Dunal.** Se le conoce como sencuyo, sincuyo, cabeza de muerto, sincuya, suncuyo y chincuya. La sincuya es un árbol de 10 metros de alto. Las hojas son grandes, decíduas, membranosas y se encuentran en peciolos de 3-5 mm de largo. Las hojas son anchamente obovadas a elíptico-obovadas, principalmente de 12-30 cm de largo y 6-14 cm de ancho; el ápice es corto acuminado y redondeado en la base. Las hojas son verdes y glabras en el haz, en el envés son pálidas. Las flores son extra-axilares, solitarias y subsésiles. Los sépalos son triangulares-ovados, acuminados, de 1-2 cm de largo. Los pétalos externos son valvados, gruesos y rígidos, ovados-lanceolados, de hasta 5 cm de largo y 2 cm de ancho. Los pétalos internos son imbricados, más delgados, elíptico-oblongados y redondeados en el ápice; miden 2.5 cm de largo y 1.5 cm de ancho. El fruto es subgloboso, de 10-12 cm de diámetro o mayor; está cubierto con un tomentum áspero, con numerosas y duras proyecciones piramidales; es anaranjado y con poco sabor (ver Figura 5). Las semillas son obovoides, castañas y de 3 cm de largo (Stanley y Steyemark 1946).

**Figura 5.** *Annona purpurea*



Foto por G. Mazza. Disponible en [<http://www.photomazza.com/?Annona-purpurea&lang=es>].

**h. *Annona reticulata* L.** Se le conoce como anona, anonillo, anona colorada, tzumuy (q'eqchi', pokomchí), pac (pokomchí), cahuex (quiché) y oopchi (Itzá). La anona colorada es un árbol pequeño, de hasta 12 metros de alto. Las hojas se encuentran en peciolos de 8-12 mm de largo; son membranosas, lanceoladas a oblongo-lanceoladas, principalmente de 10-20 cm de largo y 2-5 cm de ancho. El ápice es largo acuminado y la base es acuta a redondeada. Las hojas se oscurecen al secarse y al brotar son piloso-aplanadas en ambos lados, pero luego se vuelven glabras y ligeramente pálidas en el envés. Las inflorescencias emergen desde el medio de los entrenudos, raramente son opuestas a las hojas y contienen varias flores; los pedicelos son seríceos-grisáceos de 1.5-2.5 cm de largo. Los sépalos son redondeados-trianguulares, acuminados y de 2-3 mm de largo. Los pétalos son lineares-oblongos, obtusos, con cierta dilatación en la base, puberulentos en el exterior y de 1.5-2.5 cm de largo. El fruto es globoso-ovoide, de 8-12 cm de diámetro y algunas veces mayor; usualmente es rojizo oscuro o café rojizo; es suave, con areolas apenas visibles y con pulpa dulce (ver Figura 6) (Stanley y Steyemark 1946).

**Figura 6.** *Annona reticulata*.



Disponible en: [[http://www.tradewindsfruit.com/custard\\_apple.htm](http://www.tradewindsfruit.com/custard_apple.htm)].

**i. *Annona scleroderma* Safford.** Se le conoce como anona del monte y poxte (q'eqchi'). Es un árbol de hasta 25 metros, con un tronco de 30 cm de diámetro. Las hojas son glabras y están en peciolos de 1.5-2.5 cm de largo; las hojas son subcoriáceas, angostamente oblongas a oblongas-elípticas; miden 15-35 cm de largo y 5.5-9 cm de ancho. El ápice es acuminado y la base es corta cuneada o redondeada. Las flores son amarillas verdosas, extra axilares y comúnmente fasciculadas en las



ramas más viejas; los pedícelos son seríceos y miden 1.5 cm de largo. Los sépalos son conados, seríceos por fuera y de 6 mm de largo. Los pétalos son tres, están contraídos y son lineares por encima de la base ancha; son ferruginosos-seríceos por fuera. El fruto es globoso o globoso hundido, de 8-10 cm de diámetro, verde rojizo y notablemente areolado (Stanley y Steyemark 1946).

**j. *Annona squamosa* L.** Se conoce como anono, anona, saramuya y chirimoya (Petén). Es un arbusto o árbol pequeño, usualmente de 3-6 metros de alto. Las hojas se encuentran en peciolos de 6-12 mm de largo; son membranosas, elípticas o lanceoelípticas, de 5-11 cm de largo y 2-5 cm de ancho. Las hojas en el ápice son subacutas y cuneadas en la base; usualmente se oscurecen al secarse; son grisáceas y seríceas de jóvenes pero glabras al madurar; usualmente son glaucas en el envés. Las flores se encuentran opuestas a las hojas, son amarillas y se encuentran solitarias o en inflorescencias con pocas flores; los pedícelos son glabros o pubescentes, de 1-2 cm de largo. Los sépalos son lineares-oblongos, obtusos, glabros o tomentulosos por fuera y de 1.5-3 cm de largo. Los pétalos internos son rudimentarios. El fruto es globoso o cordado-ovoide, glabro, glauco y de 8-9 cm de diámetro. Los carpelos no están completamente fusionados y se proyectan como protuberancias redondeadas (ver Figura 7). La pulpa es blanca amarillenta, cremosa, muy dulce y de buen sabor (Stanley y Steyemark 1946).

**Figura 7.** *Annona squamosa*.



Foto por M. Karim. Disponible en: [[www.micro2macro.net](http://www.micro2macro.net)].

**2. Biogeografía de las anonas.** La historia evolutiva y la distribución actual de los organismos es muy importante para explicar los patrones de diversidad. Para explicar y entender la diversidad en las anonas se debe tener un conocimiento básico sobre su biogeografía.

**a. Biogeografía histórica.** Los patrones actuales de distribución de las especies pueden ser explicados al considerar las posiciones cambiantes de los continentes a partir del Cretácico. Los patrones de distribución de los organismos se ven afectados por los cambios tectónicos, cambios climáticos, rutas de migración y la capacidad de los organismos de utilizarlas. Los restos más antiguos de Annonaceae son semillas del Maastrichtiano (Cretácico tardío, 72-64.5 millones de años) de Nigeria y polen fósil de Colombia. Las anonáceas asiáticas muestran polen con morfología más derivada en comparación a las suramericanas y africanas. Actualmente no se puede determinar con precisión el origen de la familia; sin embargo, las líneas de evidencia apuntan a un origen en el oeste de Gondwana (antiguo continente formado por Sur América, África, Antártida, India y Australia; ver Figura 8) (Richardson *et al.* 2004).

**Figura 8.** Mapa paleogeográfico de Gondwana durante el Cretácico tardío (90-70 mda).

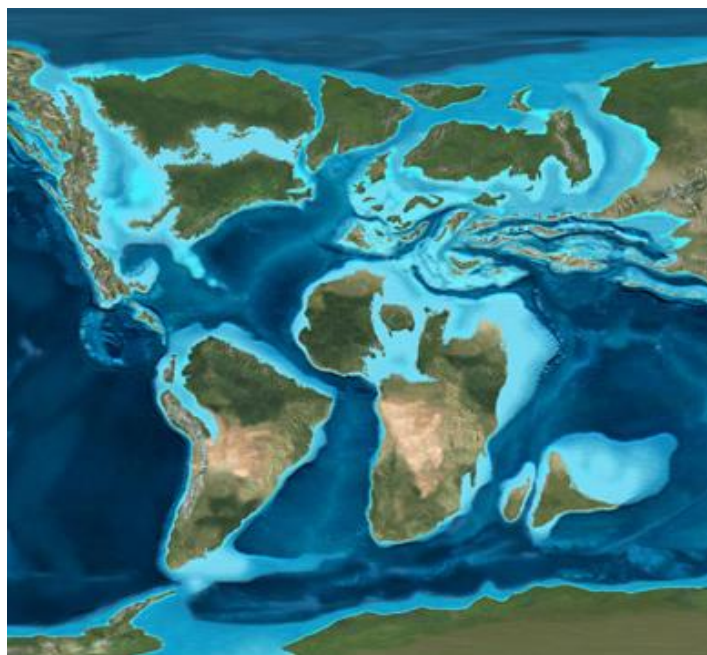


Imagen disponible en [\[http://jan.ucc.nau.edu/~rcb7/090Marect.jpg\]](http://jan.ucc.nau.edu/~rcb7/090Marect.jpg) Copyright Ron Blakey.

Las fechas establecidas por reloj molecular, ubican el origen de organismos basales de Annonaceae hace  $90.6 \pm 1.3$  millones de años (mda). La edad establecida sugiere un origen más antiguo de lo que sugiere el registro fósil. Los registros fósiles y análisis moleculares concuerdan en que los orígenes de las anonáceas se remontan a un tiempo posterior a la separación de Gondwana. La discontinuidad en la distribución actual no es entonces resultado de vicarianza. La migración es la teoría más adecuada; una posible ruta de migración entre África y Sur América por dispersión sobre agua a cortas distancias podría haber sido posible después del rompimiento de Gondwana (90-105 mda). Las anonáceas alcanzaron mayores latitudes cuando el clima en Laurasia se volvió tropical durante el Eoceno. El enfriamiento posterior al Eoceno, resultó en la distribución discontinua de los taxa actuales en las áreas tropicales de África, Asia y el Nuevo Mundo (Richardson *et al* 2004).

*Annona* apareció posiblemente a principios del Mioceno y al parecer es parafilético; estudios moleculares sugieren que *Rollinia* se agrupa dentro del clado de *Annona* (Richardson *et al* 2004). La especie más importante a nivel mundial entre las anonas es *A. cherimola*. Hasta recientemente se creía que la especie se había originado en los valles interandinos del sur de Ecuador y norte de Perú y que se extendió hacia el norte de Suramérica y Centroamérica en tiempos precolombinos; finalmente siendo introducida en el área Mediterránea por los exploradores españoles (Escribano *et al.* 2004).

**b. Distribución de *Annona* en Guatemala.** En Guatemala se reportan 11 especies de *Annona*; anona blanca (*A. macrophyllata*); anona colorada (*A. reticulata*); sincuya (*A. purpurea*); anona chirimoya (*A. cherimola*); guanaba (*A. muricata*), anonillo (*A. glabra*); anona de monte (*A. scleroderma*); anona amarilla (*A. lutescens*); anonillo (*A. primigenia*), saramuya (*A. squamosa*) y *A. volubilis*. Las especies de *Rollinia* en Guatemala son *R. jimenezii*, *R. mexicana*, *R. puberula*, *R. pulchinervia*, *R. rensoniana* y *R. sieberi* (Stanley y Steyemark 1946, Martínez y Martínez *op. cit.* 1999).

La distribución de las anonas en Guatemala ha sido estudiada para algunas especies. Las especies estudiadas han sido seleccionadas por su potencial de uso y grado de comercialización; se han incluido *A. cherimola*, *A. macrophyllata*

(*diversifolia*), *A. muricata*, *A. purpurea* y *A. reticulata*. El estudio de la distribución de estas especies sólo incluye Santa Rosa y Jutiapa, en donde se ha encontrado que los árboles de anonas se encuentran asociados a poblaciones humanas; especialmente en huertos familiares y en algunos casos se les encuentra de forma silvestre (Orellana y Martínez 2001).

**3. Aspectos económicos de las anonas.** En Guatemala no existen estadísticos certeros sobre la importancia económica de las anonas; en parte, la falta de información se debe a que este cultivo se sigue considerando de traspatio, y no se ha evaluado su verdadera importancia. El cultivo de anonas puede ampliar las opciones de producción agrícola del país, ya que Mesoamérica es considerada como un centro de diversificación de estos frutos tropicales.

**a. Valor alimenticio.** Las anonas son importantes como alimento y muchas especies se cultivan por sus frutos deliciosos. Las anonas son altamente nutritivas al ser ricas en carbohidratos, proteínas, calcio, fósforo, hierro, tiamina, niacina y riboflavina. Algunas especies además son ricas en magnesio, ácido ascórbico y caroteno (Hernández y León *op.cit.* 1992, Murillo 2001, Kwapata *et al.* 2007).

**b. Valor etnobotánico.** Las anonas son usadas ampliamente en comunidades de Guatemala. Su uso no se restringe al de alimentación, ya que también se usa como medicamento y pesticida. Las anonas son consumidas ampliamente en el interior del país, *A. cherimola* es la anona de tierras altas del país, su lugar es ocupado en las tierras bajas por *A. reticulata* y *A. macrophyllata*. Las frutas de *A. cherimola* son populares y son llevadas a los mercados de tierras bajas como Retalhuleu. *A. muricata* era abundante en los mercados de la capital, llevada desde tierras bajas; sin embargo, su presencia en los mercados ha disminuido al igual que otras anonas. *A. macrophyllata* es la anona preferida por las comunidades del país en las que se le conoce. *A. muricata* es utilizada ampliamente para elaborar helados y bebidas de varios tipos, incluso de bebidas carbonatadas (Stanley y Steyemark 1946).

El aprovechamiento medicinal de las anonas incluye el uso tradicional de las semillas molidas de *A. cherimola* mezcladas con manteca y aplicadas como una pasta al cuerpo para matar piojos y otros parásitos. Una decocción de las hojas de *A. muricata* se usa para aplicar al cabello y matar piojos. En Petén las hojas de *A. squamosa* son colocadas en el agua para bañar a los niños y refrescarlos cuando tienen

temperatura; en otras partes las hojas son frotadas en los pisos y colocadas en los gallineros para mantener lejos a los parásitos; además se cree que las semillas tienen propiedades insecticidas. Las anonas también tienen otro tipo de aprovechamiento, ya que se emplean las hojas y ramas de *A. reticulata* para tinción, generando un tinte azul a negro (Stanley y Steyemark 1946).

Los usos medicinales tradicionales de las anonas tienen respaldo por análisis de actividades citotóxicas y antiparasitarias llevados a cabo en Colombia, en donde *A. muricata* se utiliza como tratamiento para la malaria. Extractos de varias especies de anonáceas, entre ellas *A. muricata*, presentan actividad contra la leishmaniasis y otras enfermedades causadas por parásitos. El extracto del pericarpio presenta acetogeninas que podrían ser los metabolitos responsables de la actividad antiparasitaria. Las acetogeninas se han identificado en las hojas, raíces y semillas, y en una pequeña proporción en las porciones basales de los tallos (Osorio *et al.* 2007).

**c. Recursos genéticos de *Annona*.** Los recursos genéticos son el componente útil (real o potencial) de la biodiversidad. Las especies que forman parte de la riqueza de recursos genéticos de Guatemala muestran alta diversidad morfológica (fenotípica) y nutricional, por lo que generan opciones para la diversificación agrícola. La identificación y selección de materiales genéticos prometedores puede sentar las bases de alimentos locales alternativos y de programas de mejoramiento genético tradicional. En Guatemala se encuentran poblaciones de distintas especies de anonas emparentadas con las cultivadas, las cuales son importantes desde el punto de vista del mejoramiento. En Guatemala se cultiva *A. muricata* pero no se le encuentra de forma silvestre. Las especies cultivadas y encontradas en forma silvestre son *A. cherimola*, *A. macrophyllata*, *A. squamosa* y *A. purpurea*. Las especies que se encuentran solamente de forma silvestre son *A. glabra*, *A. reticulata*, *A. lutescens*, *A. primigenia*, *A. scleroderma* y *A. volubilis* (Azurdía 2008).

**4. Aspectos de diversidad genética.** Los estudios sobre diversidad genética utilizan técnicas de biología molecular, por lo que un entendimiento básico de los principios teóricos es necesario.

**a. Diversidad genética y ADN.** El estudio de la diversidad biológica utiliza distintas metodologías, y a nivel de organismo las variaciones morfológicas han sido ampliamente utilizadas para la estimación de diversidad. Los estudios de diversidad

son muy importantes en cultivares, ya que pueden ser la base de mejoramiento tradicional. En Guatemala, se han llevado a cabo estudios de caracterización agromorfológica en los frutos de anonas (García 2009). Los estudios morfológicos son importantes, y permiten conocer la variabilidad dentro de una población. La diversidad genética va más allá de los estudios de diversidad morfológica, permitiendo conocer la variabilidad dentro de una población y su relación o parentesco con otras poblaciones. Los estudios de diversidad genética utilizan los ácidos nucleicos presentes en todos los seres vivos. La secuencia de las bases nitrogenadas dentro de los ácidos nucleicos permite comparar a distintos individuos para establecer el grado de similitud o de diferencia existente entre ellos. La distribución de la variación genética en regiones específicas del genoma permite inferir sobre la filogenia de los organismos. El uso del ADN para inferir diversidad biológica y filogenias, ha sido ampliamente utilizado a diferentes niveles taxonómicos (Gielly y Taberlet 1994).

**b. Estructura del ADN.** El ADN es el material químico que contiene la información necesaria para producir a un organismo. El ADN está formado a partir de cadenas de nucleótidos, cada uno de ellos está formado de una de las cuatro bases nitrogenadas de purina o pirimidina; un azúcar ribosa o desoxirribosa; y un grupo fosfato. Las bases nitrogenadas A y G son purinas, mientras que C y T (o U en el ARN) son pirimidinas. La replicación duplica una hebra del ADN en base al principio de complementariedad (A con T y G con C). Una cadena de doble hebra se arregla de forma de doble hélice y se enrolla en proteínas llamadas histonas para generar cromosomas. El código genético finalmente se traduce en proteínas (McDonald *op. cit.* 2002).

**c. Herencia mendeliana.** El material diploide posee dos copias de cada tipo de cromosoma, a diferencia del material haploide que posee una copia. El número de cromosomas complementarios es muy variable entre los organismos; variando desde unos cuantos pares hasta varias decenas. Los genes son secuencias de ADN que codifican para un ARN y para múltiples proteínas. Los genes se ubican en un lugar específico (locus), dentro de un cromosoma (McDonald *op.cit.* 2002, Hamilton 2009).

**d. Marcadores moleculares.** La mayoría de las técnicas moleculares para analizar las variaciones de los organismos se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*) para amplificar

suficiente cantidad del ADN de interés. La técnica PCR requiere de ciertos componentes importantes para que se lleve a cabo. Los componentes importantes se mezclan en solución (*master mix*); en la que se agrega agua en estado ultra puro, una solución amortiguadora, deoxinucleótidos, los cebadores, la polimerasa, cloruro de magnesio y la hebra diana que va amplificarse. La PCR se lleva a cabo en tres distintas etapas que tienen una función clave. La primera etapa es la desnaturalización que permite separar la doble hebra. La segunda etapa consiste en la unión de los cebadores, que flanquea la región e interés de las hebras diana. Finalmente, la etapa de extensión de iniciadores tiene la función de síntesis por medio de la polimerasa, de un segmento específico de ADN complementario a la región flanqueada de la hebra plantilla (Becker *et al.* 2007).

Existen varias técnicas ampliamente utilizadas para analizar la variación de ADN, entre las que se encuentran los marcadores moleculares. Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen o región no codificadora cuya expresión permite un efecto observable (fenotípico) que puede detectarse fácilmente. Los marcadores de ADN son muy ventajosos ya que no son afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estadio del organismo, permiten una detección temprana, son universales, muy abundantes y es muy estable y específico para cada organismo. El estudio de ADN tiene ventajas importantes en comparación con otros métodos, ya que permite identificar genotipos, no sólo fenotipos. Los marcadores moleculares utilizan la secuencia de ADN para permitir identificar la variación existente entre grupos de organismos. Los marcadores pueden variar de grado de especificidad y marcadores más específicos se necesitan cuando el parentesco es mayor entre individuos a analizar. Ejemplos de marcadores son los microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés: *simple sequence repeats*) y la técnica RAPD's (por sus siglas en inglés: *randomly amplified polymorphic DNA*). Para el análisis de las bandas de RAPD's se utiliza un oligonucleótido arbitrario, de aproximadamente 10 bases, en la reacción de PCR en la cual éste se hibridiza lo suficientemente bien para servir como iniciador *forward* y *reverse* para amplificar 3 a 10 sitios de ADN nuclear simultáneamente. Los microsatélites son repeticiones de secuencias cortas de ADN de 2 a 6 pares de bases, que se repiten al azar a lo largo de todo el genoma. Los iniciadores para el PCR son secuencias de las regiones que flanquean al microsatélite, es posible amplificar la región inter microsatélite (ISSR's) en un Locus específico o amplificar cada

microsatélite presente (SSR's). Alelos en un locus específico se identificarán después de la amplificación por PCR, al comparar su migración electroforética relativa con un marcador de peso conocido. Los microsatélites fueron inicialmente descritos en humanos, y en poco tiempo fueron hallados en otros mamíferos. El potencial como marcadores útiles para los estudios en plantas fue rápidamente reconocido, resultando en su aislamiento y aplicación en muchas especies (Contreras 2003, Palmieri *et al.* 2008).

El polimorfismo en la longitud de fragmentos de ADN amplificados es otro marcador molecular desarrollado más recientemente. A estos marcadores moleculares se les conoce como AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) y se basan en la amplificación selectiva por PCR de fragmentos de restricción en el ADN genómico. La ventaja del uso de AFLP es que no se necesita un conocimiento previo de la secuencia de ADN, por lo que son importantes en el desarrollo de marcadores. La mayoría de los fragmentos de AFLP corresponden a posiciones únicas en el genoma, por lo que son útiles como marcadores en mapas genéticos. Otro tipo de tecnología de marcadores moleculares se basa en el polimorfismo del largo de fragmentos de restricción. Los RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) se basan en comparaciones del largo de los fragmentos que se generan al digerir la muestra con enzimas endonucleasas. Los RFLP tienen la ventaja de diferenciar entre los individuos heterocigóticos (Rahman *et al.* 1998).

**e. Marcadores de cloroplasto.** Los cloroplastos son los organelos donde se lleva a cabo la fotosíntesis en las plantas. Estos organelos se han denominado semiautónomos debido a la existencia de material genético propio del cloroplasto (Becker *et al.* 2007).

La Biología ha sido revolucionada a través de los análisis del ADN de los organelos celulares. Los genomas de los organelos no son recombinantes, se heredan de un solo padre y por lo tanto son haploides. En animales el uso del ADN mitocondrial (ADNmt) ha sido extensivo; principalmente por su pequeño tamaño, alto número de copias, orden de genes relativamente conservado, disponibilidad de marcadores y altas tasas de sustitución. En plantas el uso del ADNmt para estudios evolutivos ha sido limitado. El genoma mitocondrial vegetal es muy distinto al animal; se caracteriza por un gran tamaño, bajas tasas de sustitución de nucleótidos y



varios niveles de recombinación intramolecular. El genoma del cloroplasto comparte características con el genoma mitocondrial animal, por lo que se les ha llamado contrapartes naturales. El genoma del cloroplasto posee un orden de genes conservado, amplia disponibilidad de marcadores y en general la heteroplasma y recombinación están ausentes. Las características del genoma del cloroplasto lo convierten en una herramienta importante para estudios filogenéticos de plantas (Provan *et al.* 2001).

Las variaciones en la secuencia del ADN del cloroplasto (ADNcp) están siendo utilizadas para investigación de las relaciones entre angiospermas y otras plantas. Los marcadores de cloroplasto están diseñados tanto para regiones codificadoras y no codificadoras del genoma del cloroplasto y al combinar ambas regiones se pueden analizar las relaciones a nivel interespecífico e intraespecífico. El uso de los marcadores de ADNcp es útil para determinar la estructura genética de poblaciones de plantas. Los marcadores de cloroplasto permiten caracterizar la variación genética y además al analizar los patrones espaciales del ADNcp se puede evaluar el grado de flujo genético entre poblaciones. Los datos producidos al usar marcadores de cloroplasto proveen información que es de valiosa importancia para la conservación; mostrando localidades en las que existen genotipos raros o diversos (Taberlet *et al.* 1991, Petit *et al.* 1997, Saeki y Murakami 2009).

**f. Polimorfismos de un nucleótido y haplotipos.** Entre las variaciones o polimorfismos entre genomas de individuos, la variante más común es de un solo nucleótido (*single nucleotide polymorphism* SNP). Un SNP es la diferencia en una base presente en un sitio particular homólogo entre secuencias de ADN. Casi todos los sitios variables resultan de un evento histórico de mutación único ya que la tasa de mutación es muy baja (del orden de  $10^{-8}$  por sitio por generación. Al conjunto de SNP que son compartidos en un cromosoma o parte de él se les llama haplotipo (Anónimo 2003).

**g. Caracterización genética de *Annona*.** *A. cherimola* es uno de los frutos más importantes cultivados en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Los cultivares disponibles han sido caracterizados por la morfología y textura de la epidermis del fruto. La caracterización morfológica de los cultivares ha sido problemática por la variedad fenotípica entre frutos del mismo árbol; además, los

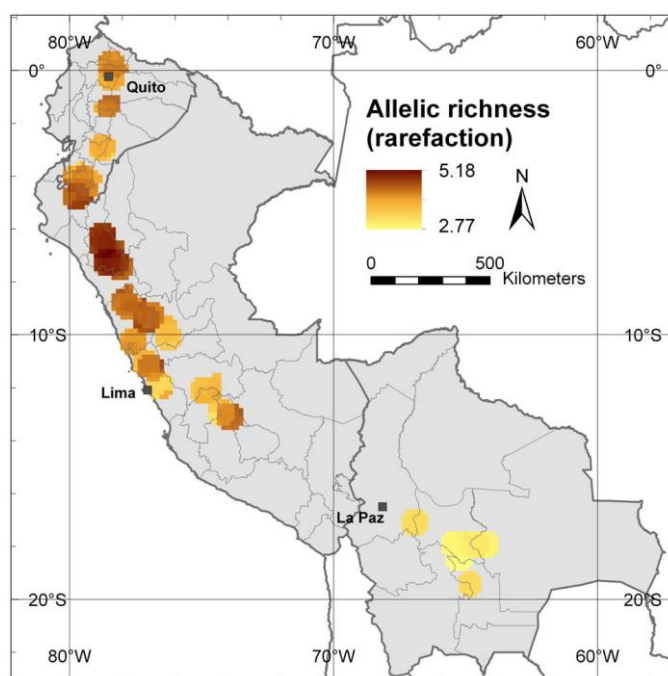
frutos herborizados por más de cinco años no muestran los detalles morfológicos originales. El interés por la caracterización genética de cultivares de anona inició con la aplicación de isoenzimas y marcadores moleculares como RAPD que mostraron las primeras inconsistencias en la clasificación morfológica. La aplicación de marcadores AFLP mostró nuevamente las inconsistencias; sin embargo, se encontró un 33% de bandas polimórficas con lo que fue posible establecer las relaciones genéticas entre los cultivares pero sin poder establecer su origen parental (Rahman *et al.* 1998).

Actualmente existen varios cultivares comerciales de anona, muchos de los cuales son específicos del país productor. Nuevos cultivares no han sido seleccionados desde las últimas décadas; además, la mayoría del material existente en bancos de germoplasma internacionales se basa en razas locales o individuos silvestres de Suramérica introducidos en las últimas décadas y el origen de la mayoría de cultivares es desconocido. De la misma manera que otras especies cultivadas, la caracterización y conservación de un amplio acervo genético son requeridas para la mejora de las características del cultivo y para la selección de nuevas variedades con resistencia tanto a presiones bióticas como abióticas. La existencia de una alta variedad morfológica de los frutos en Loja, al sur de Ecuador, condujo a investigadores proponer la región como el principal centro de diversidad de *A. cherimola*. El interés por la caracterización genética en Ecuador con marcadores AFLP surgió por la mencionada limitación en programas de selección y mejora del cultivo, tanto en anona como en otras especies del género. La caracterización genética con marcadores AFLP produjo 214 bandas cuantificables, de las que el 99.06% fueron polimórficas dentro de la muestra total. El alto nivel de polimorfismo encontrado en la muestra era el esperado al contener genotipos silvestres de Ecuador y además se demostró la baja diversidad genética en los cultivares económicamente importantes (Narváez-Trujillo *et al.* 2007).

El desarrollo de microsatélites para *A. cherimola* fue realizado en instituciones españolas. La aplicación de estos marcadores permitió un avance significativo en la caracterización genética de la especie. Los primeros 15 marcadores microsatélites desarrollados para Annonaceae han sido de gran utilidad al ser la base para nuevos estudios de distintas especies de *Annona* (Escribano *et al.* 2004). Los microsatélites desarrollados han sido aplicados para caracterizar especies silvestres que tienen alto

potencial agronómico, para establecer estrategias de colecta de germoplasma y programas de conservación y domesticación. *A. senegalensis* Pers., es una de las especies caracterizadas con los marcadores desarrollados para *A. cherimola*. *A. senegalensis* resultó poseer alta diversidad en Malawi y se encontraron 23 alelos en las poblaciones estudiadas. La caracterización genética de *A. senegalensis* indica que el fruto puede llegar a ser muy importante para mejorar considerablemente la nutrición, salud e ingresos económicos y por tanto mejorar la calidad de vida de muchas poblaciones rurales del sur de África (Kwapata *et al.* 2007). *A. crassiflora* Mart. es otra especie con potencial agronómico, caracterizada genéticamente para iniciar programas de domesticación y mejora en Brazil (Pereira *et al.* 2008).

**Figura 9.** Riqueza alélica de *A. cherimola* en Ecuador, Perú y Bolivia.



Riqueza dada en número de alelos por locus, la rarefacción implica la eliminación del sesgo de muestreo (van Zonneveld *et al.* 2012).

En Suramérica la aplicación de microsatélites en *A. cherimola* permitió establecer patrones geográficos de la diversidad genética de poblaciones de Ecuador, Perú y Bolivia (ver Figura 9). Los departamentos del norte de Perú mostraron tener una mayor riqueza alélica según el análisis con programas de sistemas de información geográfica (van Zonneveld *et al.* 2012). La alta riqueza en el norte de Perú puede incluso ser parte de un segundo centro de diversidad, ya que las pruebas de aplicación de microsatélites en anonas centroamericanas producen mayores niveles de riqueza

genética en comparación a sus parientes sudamericanos (Hormaza, J.; Investigador Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea, Estación Experimental La Mayora, 2012 comunicación personal). La mayor diversidad centroamericana sugiere que el principal centro de diversidad podría estar en esta área.

**5. Inferencia filogenética.** La inferencia filogenética es un procedimiento de estimación al intentar obtener el “mejor estimado” de la historia evolutiva de los organismos. La filogenia se presenta en topologías de árboles, mostrando las relaciones entre los organismos en base a ramas que se bifurcan a partir de un ancestro común. Existen distintos tipos de datos de los cuales se puede obtener una filogenia; sin embargo, los métodos para obtener los árboles filogenéticos son los mismos. Para obtener el árbol o conjunto de árboles que mejor describen la historia evolutiva existen dos acercamientos principales. El primer acercamiento se basa en definir una secuencia de pasos específica (un algoritmo) que lleve a la determinación de un árbol. La segunda forma es definir un criterio de comparación entre filogenias alternativas y al compararlas una a una, decidir cuál es mejor o que ambas son igualmente aceptables. Los métodos puramente algorítmicos combinan la inferencia del árbol y la definición del árbol que se prefiere dentro del mismo enunciado (métodos UPGMA, *Neighbor-joining*). El segundo grupo de métodos se basa en dos pasos de lógica. El primer paso es definir un criterio de optimización (descrito formalmente por una función objetivo) para evaluar un árbol dado; por ejemplo, se asigna una calificación que posteriormente se usa para comparar con otros árboles. El segundo paso consiste en el uso de algoritmos específicos para el cálculo del valor de la función objetivo y encontrar los árboles que poseen los mejores valores de acuerdo al criterio de optimización. Por tanto, en el segundo grupo de métodos los supuestos evolutivos realizados en el primer paso están separados de los cálculos del segundo. En los métodos puramente algorítmicos, el algoritmo toma un rol de importancia fundamental porque define el criterio de selección de árboles. En los métodos basados en una función objetivo los algoritmos son únicamente la herramienta utilizada para evaluar el criterio y buscar los árboles que optimizan la función (Swofford *et al.* 1996).

Las inferencias filogenéticas se basan en la herencia de características ancestrales y en la existencia de una historia evolutiva definida por los cambios en dichas características. La herencia es mediada por el genoma y por tanto los datos de

inferencia filogenética reflejan directa o indirectamente información genómica. Un supuesto implícito en estos análisis es la unicidad del linaje genómico. La potencial confusión debida a la transferencia lateral de genes ha recibido mucha atención. Cuando la transferencia lateral es común entre los linajes de interés un análisis de genética de poblaciones es el más adecuado. El uso de datos de secuencias de ADN para análisis filogenéticos está siendo muy utilizado. En un conjunto de secuencias los caracteres son representados por las posiciones correspondientes en las secuencias, y los caracteres son el nucleótido presente en dicha posición. En los análisis filogenéticos con secuencias se requiere la existencia de homología en las posiciones. Un alineamiento de secuencias es obtenido al insertar espacios vacíos que corresponden a inserciones o deleciones para lograr que las posiciones homólogas aparezcan en la misma columna de la matriz de datos. Los métodos basados en criterios de optimización son los más utilizados por los biólogos; diferentes métodos son el de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y bayesiano (Swofford *et al.* 1996).

**a. Máxima parsimonia.** El método de máxima parsimonia (MP) se basa en la idea que las hipótesis más simples son preferibles a las hipótesis más complicadas. Los métodos de inferencia filogenética por parsimonia operan seleccionando árboles que minimizan la longitud total del árbol, esto es, el número de pasos evolutivos (transformaciones de un carácter a otro) requeridos para explicar un conjunto de secuencias (Swofford *et al.* 1996).

**b. Máxima verosimilitud.** Los métodos de máxima verosimilitud (*maximum likelihood* ML) para la inferencia filogenética evalúan una hipótesis sobre la historia evolutiva en base a la probabilidad de que un modelo de proceso evolutivo propuesto y la historia hipotética hayan producido los datos observados. Las filogenias se infieren encontrando los árboles con las mayores probabilidades. El cálculo de las probabilidades depende de varios supuestos acerca del proceso de sustitución de nucleótidos, lo cual define un modelo de sustitución (Swofford *et al.* 1996).

**c. Modelos bayesianos.** La inferencia bayesiana es una formalización matemática de un proceso de decisiones que analiza probabilidades. Las inferencias de la filogenia son basadas en las probabilidades posteriores de los árboles filogenéticos. La probabilidad posterior de cada enésimo árbol filogenético se calcula en base al

teorema de Bayes, nombrado en honor de Thomas Bayes (1702-1761), un matemático británico. El teorema de Bayes se basa en sumatorias e integrales que no pueden ser evaluadas analíticamente. El cálculo aproximado de las probabilidades posteriores (PP) se realiza mediante el algoritmo *Markov chain Monte Carlo* (MCMC). MCMC es un método para tomar muestras válidas, aunque dependientes, a partir de la distribución de probabilidades de interés. Los mismos modelos de sustitución utilizados en los análisis de máxima verosimilitud pueden ser usados en los análisis bayesianos de filogenias (Huelsenbeck and Ronquist 2001).

## **B. Justificación**

Guatemala es considerada como un país con una gran diversidad biológica a todos sus niveles por el convenio internacional sobre diversidad biológica (CBD 2011). La investigación biológica en Guatemala debe por lo tanto enfocarse en la conservación de su abundante riqueza. La conservación de la biodiversidad requiere de acercamientos a distintos niveles jerárquicos. La conservación debe aplicarse desde una escala a niveles de ecosistemas, comunidades y genes.

La conservación de la diversidad biológica en Guatemala es de importancia actual; sin embargo, su avance es lento pero promisorio. La degradación de los bosques, principalmente por fragmentación, es una de las causas principales de la pérdida de la diversidad biológica. El desarrollo de estrategias de conservación requiere estudios básicos de las especies, principalmente de su distribución, ecología y genética. El estudio de la genética de poblaciones, a través de técnicas moleculares, está sentando las bases de la distribución geográfica de la riqueza y diversidad genética.

La región centroamericana parece tener una alta riqueza y diversidad genética de anonas. La aplicación de técnicas en el campo de la Biología molecular permitirá conocer las áreas del país con mayor diversidad genética, además de proporcionar una base técnica para establecer estrategias de conservación del fruto local. El conocimiento de la diversidad genética de las anonas del país es importante para la seguridad alimentaria del país. La información generada en la investigación podría usarse para fomentar un cultivo nacional que genere ingresos para comunidades guatemaltecas. Además, la identificación de áreas con alta variabilidad genética permitiría la base para colectas de germoplasma y su posterior conservación *ex situ* e *in situ*. Es importante también la conservación de áreas con alta diversidad genética,

ya que permite que la conservación de la diversidad biológica se lleve a cabo de una manera más dinámica.

## **C. Objetivos**

### **1. General**

- a. Caracterización de la variabilidad genética de especies de *Annona* presentes en diferentes regiones de Guatemala.

### **2. Específicos**

- a. Implementación de la técnica de marcadores de ADN de cloroplasto para estudios de diversidad genética de especies de *Annona*.
- b. Elaboración de la filogenia de las especies de *Annona* presentes en diferentes regiones de Guatemala.
- c. Establecimiento de la distribución geográfica de la diversidad genética de *Annona* presentes en las diferentes regiones de Guatemala.

## II. MÉTODOS

### A. Procedimientos

**1. Localización y muestra.** La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala. Los sitios de colecta se determinaron en base a registros de herbario y comunicaciones personales. Los individuos fueron colectados en huertos y jardines familiares, tomando hojas tiernas y en el mejor de los casos el fruto y la flor para su identificación botánica. Las hojas se almacenaron en frío para su transporte al laboratorio. Finalmente, las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio, hasta ser procesadas.

**2. Identificación botánica.** La identificación botánica se realizó en el herbario UVAL de la Universidad del Valle de Guatemala, donde las muestras fueron identificadas a nivel de especie utilizando las claves dicotómicas en Flora of Guatemala (Stanley y Steyemark 1946) y ayuda de los botánicos expertos E. Pöll y H. Rainer.

**3. Caracterización molecular.** El procedimiento general para la caracterización molecular se muestra en la Figura 10.

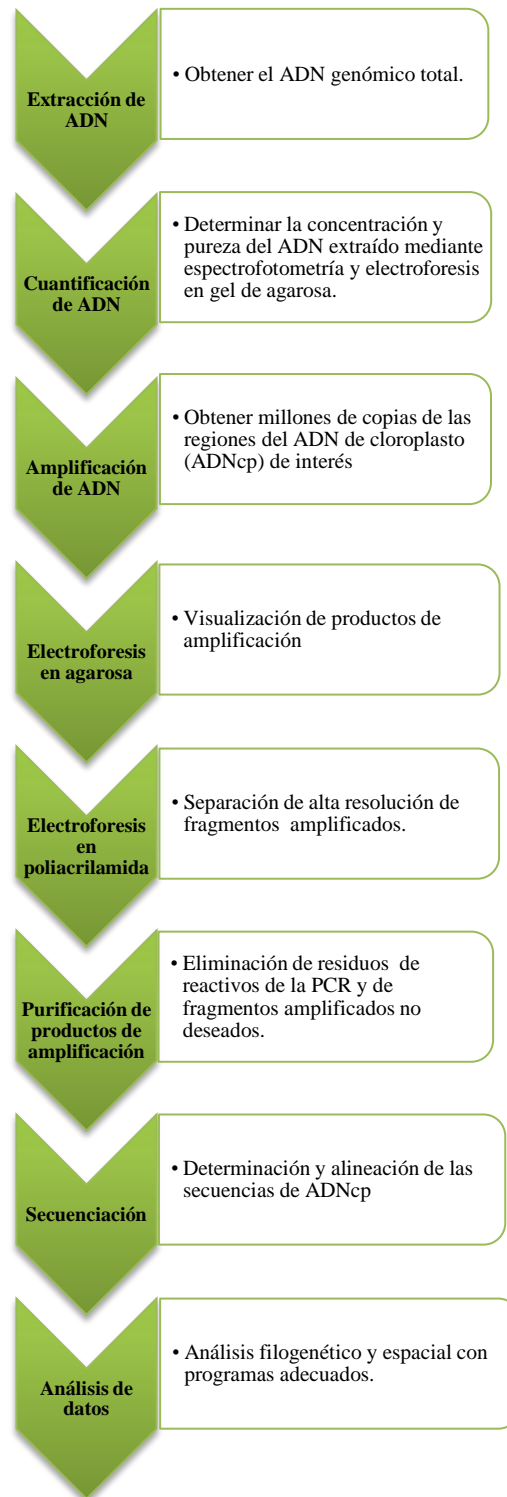
**a. Extracción de ADN.** El ADN se obtuvo a partir del método CTAB propuesto por Murray y Thompson (1980) con ciertas modificaciones. El método requirió el uso de abundante tejido, principalmente de hojas tiernas o brotes. El procedimiento general se muestra en la Figura 11 y el protocolo de extracción se describe en el apéndice A. Al terminar la extracción, se realizó un tratamiento con ARNasa para purificar el ADN con el que se trabajó en la amplificación. El procedimiento para tratar la muestra con ARNasa se describe en el apéndice A.

**b. Cuantificación de ADN.** La estimación de la cantidad de ADN extraído se realizó mediante un espectrofotómetro (Biophotometer plus, Eppendorf). Se realizaron diluciones 1:100 de ADN en agua destilada estéril y se utilizó el programa adecuado en el espectrofotómetro. La estimación de la integridad de ADN se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% en solución amortiguadora TAE 1X (ver apéndice B). Se cargaron 5  $\mu\text{l}$  de ADN o ADN+ARNasa en cada pozo, mezclado con 1  $\mu\text{l}$  de colorante de carga. La electroforesis se corrió durante 45 minutos a 85



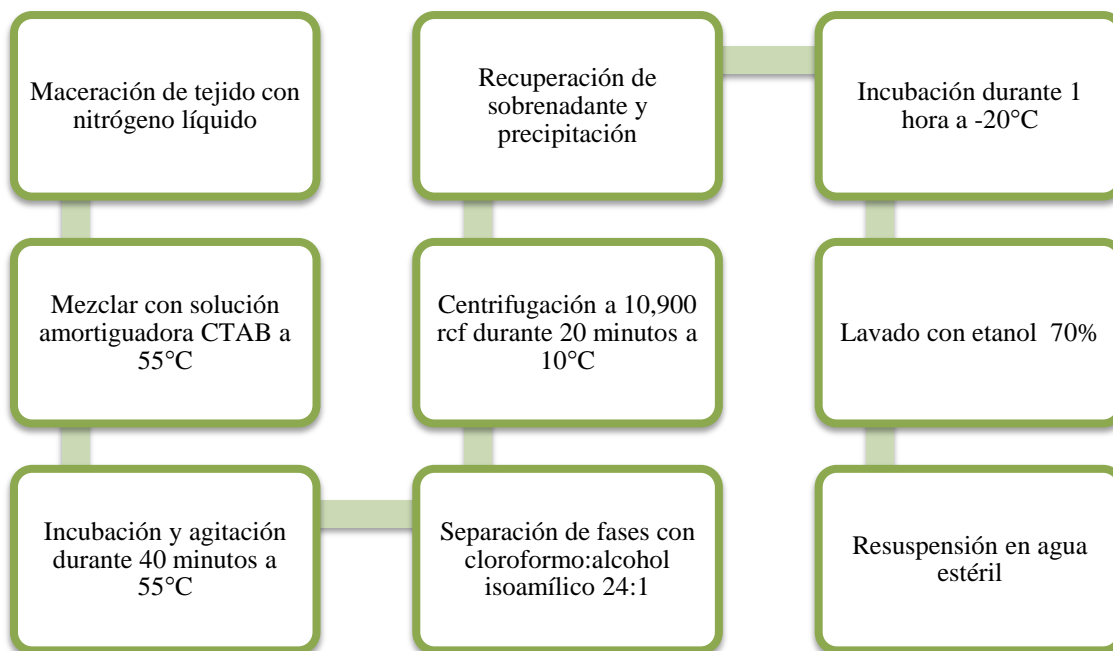
voltios. Los geles obtenidos se visualizaron con un UV Transilluminator (UVP 6.4” LCD) mediante la tinción de bromuro de etidio.

**Figura 10.** Procedimiento general para la caracterización molecular.



Modificado de Palmieri *et al.* (2008).

**Figura 11.** Diagrama del proceso de extracción de ácidos nucleicos por el método CTAB de Murray y Thompson (1980).



**c. Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa.** Se realizó la amplificación de 5 regiones de ADNcp, cada una por separado. Las regiones intergénicas que se amplificaron fueron *trnS-trnT*; *trnL-trnF*; *atpB-rbcL* y *matK*; y el intrón *rpoCl*. Los marcadores seleccionados contienen regiones del ADNcp utilizadas para estudios filogenéticos en angiospermas basales, tales como las anonáceas (Taberlet *et al.* 1991, Goremykin *et al.* 2003, Richardson *et al.* 2004, Su *et al.* 2008). Las secuencias de los cebadores utilizados con sus respectivas temperaturas de anillamiento se muestran en el Cuadro 2.

Las PCR fueron realizadas en una mezcla de 25 µl con Buffer (5X GoTaq Promega) 1X; 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.125 mM dNTP; 0.5 a 0.66 µM de cada cebador (ver Cuadro 3); 1 unidad de GoTaq® polimerasa (Promega) y 30 ng de ADN genómico. La amplificación se realizó en un termociclador (Mastercycler personal Eppendorf) programado con una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50-53.5°C (ver Cuadro 2), 2 minutos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C. De cada muestra se realizó una amplificación en triplicado y los productos de PCR fueron almacenados a -20°C hasta ser enviados para su secuenciación.

**Cuadro 2.** Regiones del ADNcp y cebadores utilizados para su amplificación.

Región	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Temperatura anillamiento
<i>trnS-T</i>	trnS-Tf	CGAGGGTTCGAATCCCTCTC	51°C
	trnS-Tr	AGAGCATCGCATTTGTAATG	
<i>trnL-F</i>	trnL-Ff	CGAAATCGGTAGACGCTACG	52-53.5°C
	trnL-Fr	ATTTGAACTGGTGACACGAG	
<i>rpoC1</i>	rpoC1f	TTCGAATTAACCTCGTAATCG	51°C
	rpoC1r	CATGTGTGGTATTTGAAACGTC	
<i>atpB-rbcL</i>	Ccmp7f	CAACATATAACCACTGTCAAG	50°C
	Ccmp7r	ACATCATTATTGTATACTCTTTC	
<i>matK</i>	390f	CGATCTATTCATTCAATATTTTC	53.5°C
	1326r	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	

**Cuadro 3.** Receta para mezcla de reacción de 25 µl por cada par de cebadores.

Reactivo	<i>trnS-T</i>	<i>trnL-F</i>	<i>rpoC1int</i>	<i>atpB-rbcL</i>	<i>matK</i>
H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-
Buffer 5X (GoTaq)	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM	2.5 mM
dNTP	0.125 mM	0.125 mM	0.125 mM	0.125 mM	0.125 mM
Cebador F	0.66 µM	0.65 µM	0.60 µM	0.5 µM	0.5 µM
Cebador R	0.66 µM	0.65 µM	0.60 µM	0.5 µM	0.5 µM
GoTaq®	1 U	1 U	1 U	1 U	1 U
ADN	30 ng	60 ng	30 ng	30 ng	30 ng

**d. Electroforesis en agarosa.** Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en solución amortiguadora TAE 1X y las condiciones de corrida fueron 85V por 45 minutos. La tinción se realizó con bromuro de etidio y se visualizó en un *UV Transilluminator* (UVP).

**e. Electroforesis en poliacrilamida.** Los productos de amplificación fueron evaluados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Para la preparación de

dos geles se preparó una mezcla con 5.93 µl de agua destilada, 1.2 ml de solución amortiguadora TBE 5X (ver Apéndice B), 4.27 ml de acrilamida:bis 19:1 al 40% (Merck), 16 µl APS y 16 µl TEMED. Se tomaron 2.5-5 µl de los productos de amplificación purificados y se mezclaron con un volumen igual de solución amortiguadora de montaje desnaturizante, posteriormente se cargó 5 µl de la mezcla al gel. Los geles fueron corridos con solución amortiguadora TBE 1X durante 180 minutos a 110 V y se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata. La determinación del largo de los fragmentos de amplificación se llevó a cabo en TotalLab TL120 (Nonlinear dynamics). A cada fragmento amplificado con los distintos marcadores se le tomaron tres mediciones en TotalLab para generar las réplicas para un análisis de diferencia de medias. Para determinar si existió diferencia significativa entre los largos de los fragmentos amplificados entre las especies, se realizó la prueba de diferencia de medias a cada marcador en el programa SPSS versión 20 (IBM); se utilizaron pruebas paramétricas o no paramétricas según el cumplimiento de criterios de normalidad y homocedasticidad por el conjunto de datos.

**f. Purificación de productos de amplificación.** Los productos de amplificación fueron purificados previo a la secuenciación con el kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) y un filtrador al vacío VacMan™ (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Para verificar la purificación se realizó un gel de agarosa al 1.5%.

**g. Secuenciación.** Se enviaron alícuotas de 15 µl de cada producto de amplificación y 1.5 µl de cada cebador a 5 pmol/µl para su secuenciación en la empresa Macrogen Korea.

**h. Análisis filogenético.** El estudio utilizó las secuencias producidas y secuencias de las regiones *trnS-T*, *trnL-F*, intrón *rpoC1*, *atpB-rbcL* y *matK* previamente publicadas en *GeneBank*. Las secuencias fueron alineadas en MEGA ver. 5 (Tamura *et al.* 2011) con el método *ClustalW*. El alineamiento fue visualizado y optimizado manualmente; las regiones con alineaciones ambiguas fueron excluidas del análisis (*trnS-T*: 578 caracteres; *trnL-F*: 176 caracteres; *rpoC1* 51 caracteres; *matK* 121 caracteres). Se realizaron dos análisis filogenéticos, uno de las especies de *Annona* y otro de los individuos de *A. cherimola*. El análisis de máxima parsimonia (MP) se llevó a cabo separadamente y en combinación (*trnL-F*, *rpoC1* y *matK* para

*Annona*; *trnL-F* y *rpoC1* para *A. cherimola*) utilizando MEGA ver.5. Los árboles más parsimoniosos fueron obtenidos con el método *Bootstrap* con una búsqueda de 1000 réplicas mediante *Close-Neighbor-Interchange* (CNI) y preservando 10 árboles de cada adición aleatoria. Se realizaron filogramas y árboles con máxima verosimilitud (ML) en MEGA versión 5 usando la prueba *bootstrap* con 1000 réplicas. El modelo de sustitución de ADN y tasa de heterogeneidad gamma para el análisis ML fueron tomados del estudio de Su *et al.* (2008). Se tomó el criterio de Richardson *et al.* (2004) para considerar que los valores *bootstrap* (BS) de 50-74% tenían un soporte débil; BS de 75-84% tenían soporte moderado y BS de 85-100% tenían soporte fuerte. La inferencia bayesiana de la filogenia fue realizada con el programa MrBayes ver. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003) utilizando dos réplicas independientes de cuatro cadenas y 50 mil generaciones, con árboles muestreados cada 10 generaciones. Las probabilidades bayesianas posteriores (PP) fueron calculadas en base al consenso de los árboles restantes después de eliminar el *burn-in*. Se tomó el criterio de Su *et al.* (2008) para considerar que los valores de PP mayores o iguales a 0.85 tenían un sustento fuerte.

**i. Diversidad de ADNcp de y análisis espacial.** El alineamiento utilizado en el análisis filogenético se utilizó para identificar los *loci* polimórficos y determinar los haplotipos presentes en *A. cherimola*. Las posiciones polimórficas se asignaron de acuerdo a una secuencia de referencia obtenida de *Genebank*. La secuencia de *Annona pruinosa* fue la referencia para la región *trnL-F* y *Magnolia kwangsiensis* para *rpoC1*. Para analizar la riqueza de haplotipos se realizó una cuadrícula con tamaño de celda de 2 minutos (aproximadamente 2 km en el área de estudio) en DIVA-GIS ([www.diva-gis.org](http://www.diva-gis.org)). A la cuadrícula se le aplicó *circular neighborhood* con 18 minutos de diámetro. Para analizar la relación entre los haplotipos encontrados se realizó una red de haplotipos con el método *Median-Joining* en el programa NETWORK versión 4.6.1.0 (Fluxus Technology Ltd.).

### III. RESULTADOS

#### A. Distribución e identificación botánica

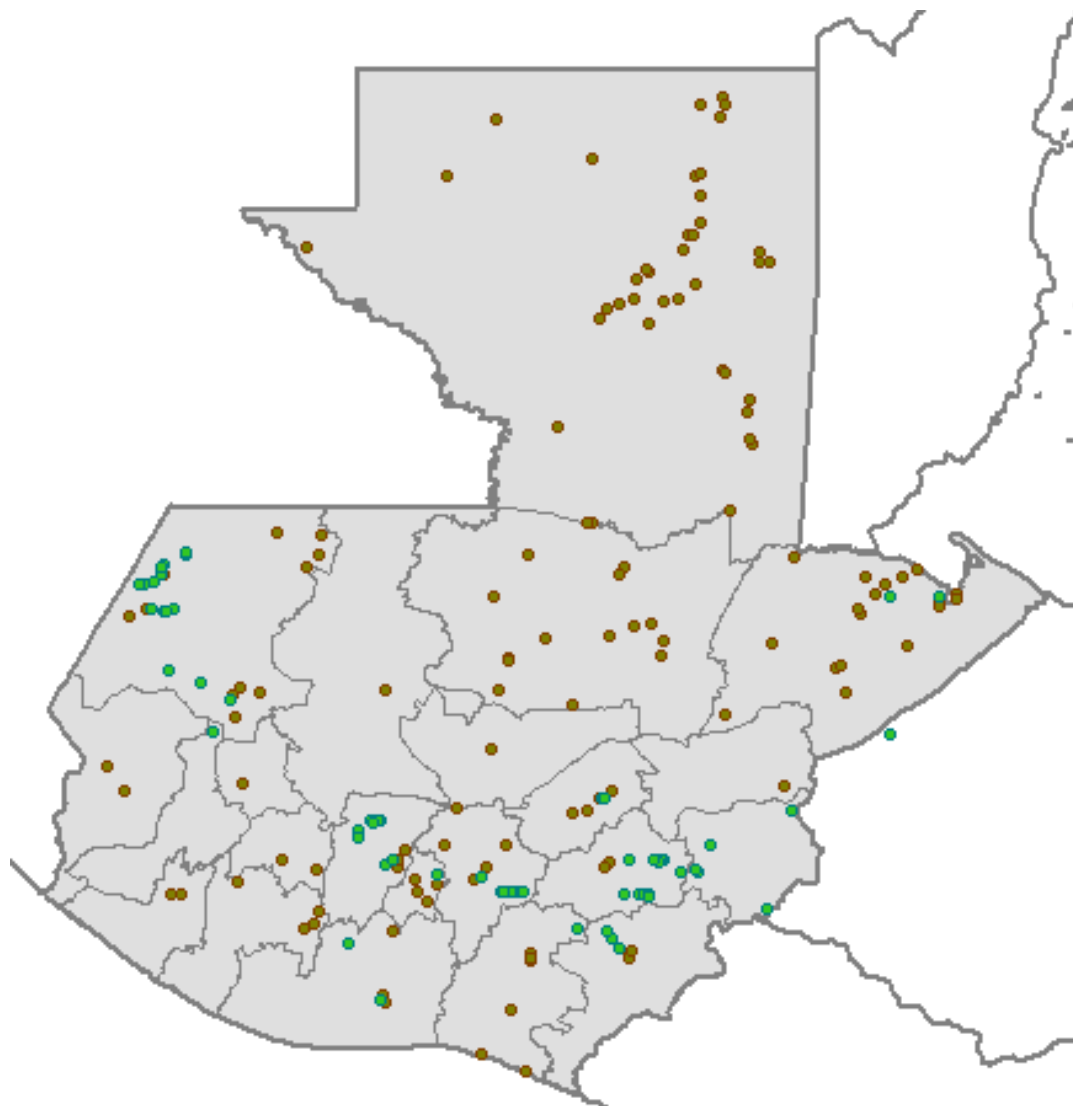
Los registros del herbario UVAL (ver Figura 12) y registros de herbario disponibles en el Atlas de Parientes Silvestres de Guatemala (Azurdía *et al.* 2011), permitieron identificar las regiones en Guatemala con presencia de distintas especies de *Annona*. Para este estudio se colectó un total de 104 individuos de 7 especies de *Annona* (*A. cherimola*, *A. macrophyllata*, *A. glabra*, *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. reticulata* y *A. squamosa*). Los registros de herbario y sitios de colecta del estudio se muestran en un mapa (ver Figura 13) y los datos utilizados para su elaboración se encuentran en el apéndice C. Las especies más colectadas fueron *A. cherimola*, *A. macrophyllata* y *A. reticulata* (ver Figura 14).

**Figura 12.** Registro de herbario.



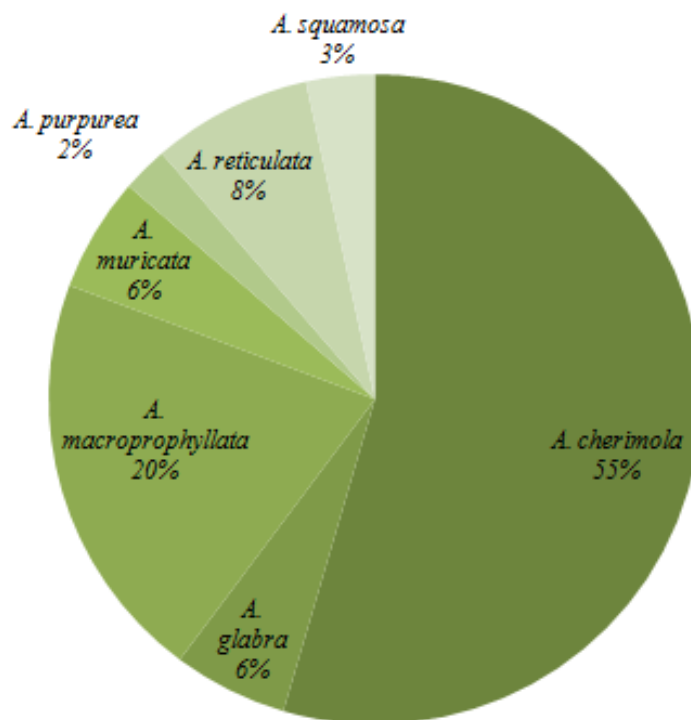
En la foto se muestra un espécimen herborizado de *A. muricata* en el herbario UVAL. Foto: Javier Aju.

**Figura 13.** Distribución y colecta.



En el mapa se muestran los registros de herbario (café) de distintas especies de *Annona* y los sitios donde se realizó colecta de individuos (verde). Mapa elaborado en DIVA-GIS 7.3.

**Figura 14.** Diagrama circular de individuos colectados.



El diagrama muestra la composición por especie de los individuos colectados a los que se extrajo ADN, N=88.

## **B. Extracción de ácidos nucleicos**

Se logró extraer ácidos nucleicos de 88 individuos, el 84.6% del total colectado. Los promedios por especie de las concentraciones de ADN extraído variaron entre 134.5 y 509.9 ng/μl; los promedios por especie de las purezas (relación de absorbancia a 260/280 nm) variaron 1.67 y 2.30 (ver apéndice D). Las integridades del ADN extraído después del tratamiento con ARNasa no mostraron fraccionamiento o degradación (ver apéndice E).

## **C. Amplificación y secuenciación de ácidos nucleicos**

Para este estudio se logró amplificar al menos una región en 48 individuos encontrados en 11 departamentos y representando las 7 especies encontradas, además de dos individuos (*C. odorata* y *Magnolia sp.*) utilizados como grupos salientes. La amplificación exitosa se consideró como una banda marcada en el gel de agarosa. Según la electroforesis en agarosa (ver apéndice F), los fragmentos amplificados tuvieron un tamaño estimado de alrededor de: 1700 pares de bases en la región *trnS-T*; 1100 pares de bases en la región *trnL-F*; 1100 pares de bases en el intrón *rpoCl*;



200 pares de bases en la región *atpB-rbcL* y de 1100 pares de bases en la región *matK*. La amplificación exitosa no implicó obtener una secuenciación de calidad, ya que en muchos casos la secuencia obtenida era de baja calidad y por lo tanto en más del 70% de los sitios existió ambigüedad en la base indicada en el electroferograma. Finalmente, se obtuvieron secuencias de 32 individuos, de por lo menos uno de los marcadores utilizados (ver apéndices H e I). En el Cuadro 4 se resumen los individuos con regiones amplificadas y con secuenciación exitosa.

**Cuadro 4.** Individuos con regiones amplificadas y secuenciadas.

No.	No. De muestra	Especie	Lugar	trnS-T	trnL-F	rpoC1int	atpB-rbcL	matK
1	3	<i>Annona cherimola</i>	San Lucas Sac., Sacátepequez	X	X	X	X	X
2	4	<i>Annona cherimola</i>	San Andrés Itzapa, Chimaltenango	X	X	X	X	X
3	7	<i>Annona cherimola</i>	Sn. José Poaquil, Chimaltenango		X	X		
4	14	<i>Annona macrophyllata</i>	El Rancho, El Progreso		X	X	X	X
5	17	<i>Annona macrophyllata</i>	Aldea el Limonar, Jacaltenango, Hue.		X		X	
6	18	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón, Huehue.		X	X		
7	19	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón, Huehue.		X	X		
8	24	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón, Huehue.	X	X	X	X	X
9	26	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón, Huehue.		X	X		
10	27	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón, Huehue.		X	X		
11	29	<i>Annona macrophyllata</i>	La Memelita, Nentón, Huehue.		X	X		
12	30	<i>Annona squamosa</i>	La Memelita, Nentón, Huehue.	X	X	X	X	X
13	32	<i>Annona macrophyllata</i>	Catarina, Huehue.		X	X	X	X
14	36	<i>Annona cherimola</i>	Jacaltenango, Huehuetenango	X	X	X	X	X
15	38	<i>Annona reticulata</i>	Nentón, Huehuetenango			X	X	
16	40	<i>Annona purpurea</i>	ICTA, Masagua, Escuintla	X	X	X	X	X
17	41	<i>Annona reticulata</i>	ICTA, Masagua, Escuintla		X	X	X	
18	46	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal		X	X	X	X
19	47	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal	X		X		
20	48	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal			X		
21	49	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal			X		
22	50	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal			X		
23	56	<i>Annona squamosa</i>	PROESUR, Escuintla			X		
24	57	<i>Annona cherimola</i>	San José Pinula, Guatemala		X		X	
25	58	<i>Annona cherimola</i>	San José Pinula, Guatemala	X	X	X	X	X

Continuación Cuadro 4

No.	No. De muestra	Especie	Lugar	trnS-T	trnL-F	rpoC1int	atpB-rbcL	matK
26	60	<i>Annona cherimola</i>	San José Pinula, Guatemala		X	X		
27	61	<i>Annona cherimola</i>	San José Pinula, Guatemala		X	X		
28	63	<i>Annona cherimola</i>	Sn Carlos Sija, Quetzaltenango		X	X		
29	64	<i>Annona cherimola</i>	Santa Bárbara, Huehuetenango		X	X	X	X
30	69	<i>Annona cherimola</i>	Santa Ana Huista, Huehuetenango		X	X		
31	70	<i>Annona cherimola</i>	San Antonio Huista, Huehue		X	X	X	X
32	72	<i>Annona cherimola</i>	Concepción Huista, Huehue.		X	X		
33	73	<i>Annona muricata</i>	El Rancho, El Progreso		X		X	
34	75	<i>Annona muricata</i>	El Rancho, El Progreso	X	X	X	X	X
35	76	<i>Annona reticulata</i>	El Rancho, El Progreso		X	X	X	X
36	77	<i>Annona macrophyllata</i>	San Esteban, Chiquimula					X
37	78	<i>Annona purpurea</i>	Ostuman, Copán Ruinas, Honduras				X	
38	82	<i>Annona muricata</i>	Barrio El Campo, Ipala, Jalapa		X	X	X	X
39	83	<i>Annona reticulata</i>	Camino a Sn Luis Jilotepeque, Jalapa				X	
40	85	<i>Annona cherimola</i>	Aldea El límite, San Luis, Jalapa		X	X	X	
41	88	<i>Annona cherimola</i>	Aldea El Durazno, San Pedro Pinula, Jalapa		X	X		
42	95	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Damián, San Manuel Chaparrón, Jalapa		X	X	X	X
43	96	<i>Annona macrophyllata</i>	Aldea Damián, San Manuel Chaparrón, Jalapa	X	X	X	X	X
44	97	<i>Annona reticulata</i>	San Manuel Chaparrón, Jalapa		X	X	X	X
45	100	<i>Annona cherimola</i>	María Montañas, Jutiapa, Jutiapa		X	X	X	
46	104	<i>Annona cherimola</i>	La tablita, Casillas, Santa Rosa		X	X		
47	107	<i>Magnolia sp.</i>	Universidad del Valle de Guatemala	X		X		
48	108	<i>Cananga odorata</i>	Mazatenango, Suchitepéquez			X		

\*En celdas coloreadas se encuentran los individuos de los que se obtuvo una secuencia de calidad utilizada en la caracterización molecular.

#### D. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los largos de los fragmentos amplificados y los geles de poliacrilamida se muestran en el apéndice G. La prueba de ANOVA se aplicó a los datos de las regiones *trnS-T* y *trnL-F*. La prueba no paramétrica correspondiente a un ANOVA

(Kruskal-Wallis) se aplicó a las regiones *rpoClint*, *atpB-rbcL* y *matK*. Las pruebas mostraron que existe diferencia significativa en el largo de fragmento amplificado de todas las regiones de ADNcp entre al menos dos de las especies (*trnS-T*, *trnL-F*, *rpoClint* y *matK*  $p=0.00$ ; *atpB-rbcL*  $p=0.02$ ). Los intervalos de confianza de las medias obtenidas se resumen en el Cuadro 5, los estadísticos obtenidos con SPSS se muestran en el apéndice G.

**Cuadro 5.** Intervalos de confianza del 95% de las medias de largos de fragmentos amplificados por especie y por marcador.

	Especie	Largo de fragmento amplificado [pb]				
		<i>trnS-T</i>	<i>trnL-F</i>	<i>rpoClint</i>	<i>atpB-rbcL</i>	<i>matK</i>
1	<i>A. cherimola</i>	1659 ± 5	1094 ± 6	909 ± 3	152 ± 5	1149 ± 8
2	<i>A. macrophyllata</i>	1722 ± 17	1188 ± 13	915 ± 6	136 ± 1	1198 ± 17
3	<i>A. muricata</i>	1673 ± 28	971 ± 13	906 ± 14	155 ± 5	1212 ± 19
4	<i>A. reticulata</i>	ND*	1084 ± 22	902 ± 7	150 ± 6	1222 ± 24
5	<i>A. squamosa</i>	1662 ± 12	1104 ± 16	900 ± 13	ND*	1225 ± 35
6	<i>A. glabra</i>	1733 ± 20	1089 ± 51	907 ± 4	138 ± 1	1153 ± 13
7	<i>A. purpurea</i>	1671 ± 34	1093 ± 35	878 ± 10	145 ± 5	1138 ± 5

\*ND=No se tienen datos para la especie con el respectivo marcador.

Las pruebas *post hoc* aplicadas mostraron que para la región *trnS-T* existe diferencia significativa entre los largos de los fragmentos de *A. cherimola* con *A. macrophyllata* y *A. glabra*; de *A. macrophyllata* con *A. muricata*, *A. squamosa* y *A. purpurea*; de *A. muricata* con *A. glabra*; de *A. squamosa* con *A. glabra* y de *A. glabra* con *A. purpurea*. Para la región *trnL-F* mostraron que existe diferencia significativa entre los largos de los fragmentos de *A. macrophyllata* y *A. muricata* con los del resto de las especies.

## E. Inferencia filogenética

**1. Filogenia de *Annona*.** El análisis de máxima parsimonia (MP) aplicado a las regiones individuales y combinado (*trnL-F*, intrón *rpoCl* y *matK*) produjo las estadísticas mostradas en el Cuadro 6. Las mayores proporciones de caracteres informativos de parsimonia en las secuencias se produjeron en las alineaciones de la región *trnS-T* (8.9%) y el intrón *rpoCl* (8.4%) (ver apéndice J). Las regiones individuales no mostraron mucha resolución dentro de *Annona*; pero sí mostraron un fuerte soporte para la monofilia de *A. glabra*, *A. macrophyllata* y *A. muricata* (ver

Figura 15). El análisis de la región *trnS-T* mostró un fuerte soporte (BS=99) para la monofilia de *Annona* y Annonaceae; pero mostró que *Calycanthus* (Calycanthaceae: Laurales) era el clado hermano de Annonaceae y no Magnoliaceae. El análisis de la región *trnL-F* incluyó a *A. macrophyllata* dentro del clado de *A. cherimola*; sin embargo el soporte para esta rama fue bajo (BS=52). Existió un fuerte soporte (BS=90) para un clado que contenía *A. squamosa* y *A. reticulata* con el análisis de la región *trnL-F*. El análisis del intrón *rpoC1* produjo un fuerte soporte (BS=87) para un clado que contiene *A. cherimola*, *A. squamosa*, *A. reticulata* y *A. macrophyllata*; sin embargo entre los individuos de *A. cherimola* existió muy baja resolución. El análisis de la región *atpB-rbcL* produjo baja resolución y los clados formados obtuvieron valores de soporte muy bajos. El análisis de la región *matK* produjo baja resolución pero tuvo fuerte soporte para el clado que contiene *A. purpurea* y *A. muricata* (BS=93).

**Cuadro 6.** Estadísticos de los árboles de las regiones *trnS-T*, *trnL-F*, *rpoC1*, *matK* y combinadas obtenidos del análisis de máxima parsimonia.

Región	Longitud de alineamiento (bp)	Número final de caracteres (excluyendo regiones alineadas ambiguamente)	No. de caracteres variables (%)*	No. de caracteres informativos de parsimonia*	No. de árboles igualmente parsimoniosos	LA	CI	RI
<i>trnS-T</i>	1332	754	133 (17.6%)	67 (8.9%)	14	97	0.8305	0.9306
<i>trnL-F</i>	1037	861	93 (10.8%)	34 (3.9%)	219	98	0.7561	0.8649
intrón <i>rpoC1</i>	878	827	91 (11.0%)	24 (8.4%)	190	80	0.8636	0.9531
<i>atpB-rbcL</i>	120	120	17 (14.2)	6 (5.0%)	218	22	0.7778	0.8947
<i>matK</i>	968	847	78 (9.2%)	32 (3.8%)	23	90	0.8049	0.9322
Análisis combinado	2381	2381	704 (29.6%)	51 (2.1%)	68	721	0.7763	0.8365

\*Incluye *outgroups*. LA=longitud de árbol, CI=índice de consistencia, RI=índice de retención.

Los modelos utilizados y los parámetros del análisis de máxima verosimilitud (ML) y bayesiano se muestran en el Cuadro 7. Los resultados obtenidos para cada región individual fueron muy similares entre el análisis bayesiano (ver apéndice K) y de ML (ver Figura 16). Los clados identificados por ML son muy similares a los producidos por el análisis MP con leves variaciones en los valores de BS. En el análisis bayesiano de la región *trnS-T* se obtuvo un fuerte soporte (PP=1.00) para la

monofilia de *Annona* y *A. purpurea* como la especie hermana al resto de anonas incluidas en el análisis de esta región. En el análisis de la región *trnL-F* no se logró buena resolución debido a muchas politomías. En el análisis bayesiano del intrón *rpoC1* se logró buena resolución, aunque para los individuos de *A. cherimola* se mantuvo la politomía.

**Cuadro 7.** Modelos utilizados y valores de parámetros para los análisis de máxima verosimilitud y bayesiano aplicados individualmente y en combinación de las regiones *trnS-T*, *trnL-F*, intrón *rpoC1* y *matK*.

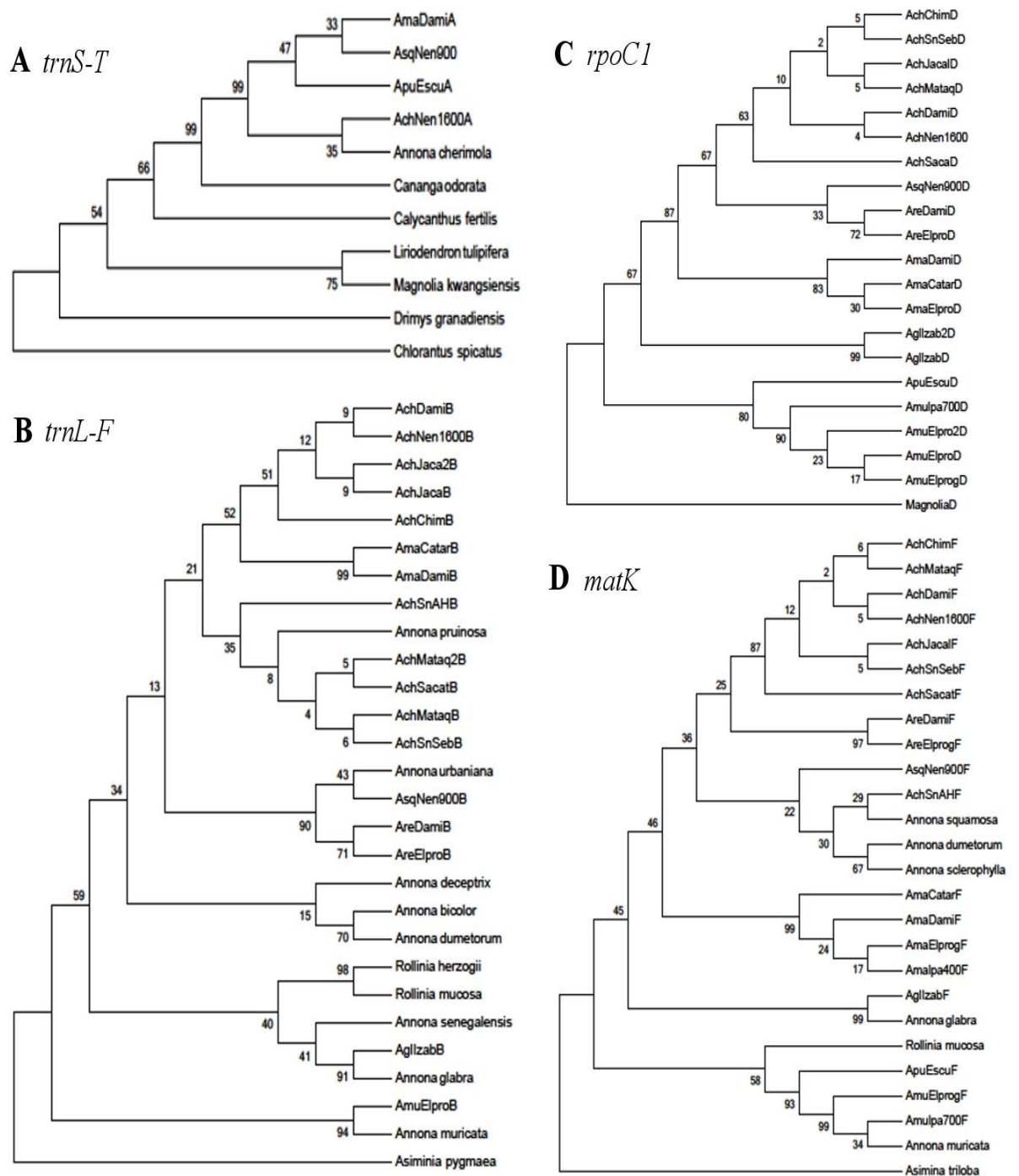
Región	Modelo seleccionado	Promedios de frecuencias de bases			
		A	C	G	T
<i>trnS-T</i>	GTR+G	0.3204	0.1985	0.2832	0.1980
<i>trnL-F</i>	GTR+G	0.2892	0.1968	0.3305	0.1834
intrón <i>rpoC1</i>	GTR+G	0.3009	0.2337	0.2895	0.1759
<i>atpB-rbcL</i>	GTR+G	0.3584	0.1414	0.2043	0.2059
<i>matK</i>	GTR+G	0.3484	0.1986	0.2926	0.1604
Análisis combinado	GTR+I+G	0.3180	0.2111	0.3023	0.1686

Modelo de sustitución GTR=General-time-reversible. Tasa transición-transversión: I=proporción de sitios invariables, G=distribución gamma.

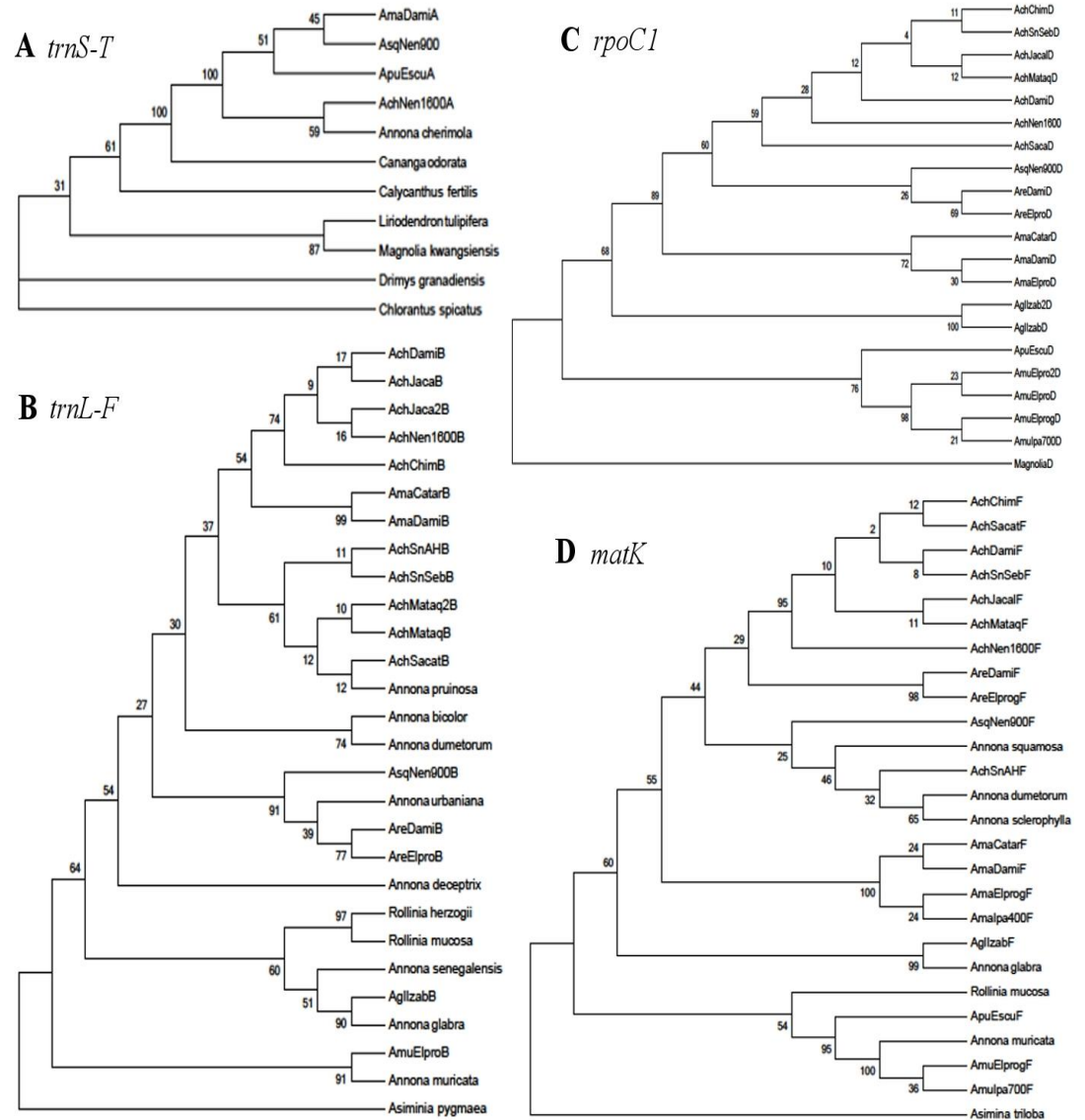
En el análisis bayesiano del intrón *rpoC1* también existió un fuerte soporte para *A. reticulata* como la especie hermana de *A. cherimola* (PP=0.91) y para *A. macroprophyllata* como la especie hermana del clado *A. reticulata* +*A. cherimola* (PP=0.90). En el análisis de la región *matK* se encontraron muchas politomías y se produjo un clado que contenía *A. reticulata* y *A. macroprophyllata* como especies hermanas; sin embargo esta relación tuvo un soporte bajo (PP=0.51).

La región *atpB-rbcL* produjo secuencias problemáticas y se logró extraer información principalmente de la secuencia en dirección *reverse*. El alineamiento producido contuvo abundantes posiciones vacías para muchos individuos y los grupos observados en los árboles filogenéticos obtuvieron bajo soporte (ver Figura 17). En el análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud, *A. reticulata* se agrupó dentro de *A. cherimola*. En el análisis bayesiano, se obtuvo un clado (PP=0.78) que contenía a *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. glabra*, *Asimina* y *Rollinia*. En el análisis bayesiano existió baja resolución para el resto de individuos en el análisis.

**Figura 15.** Consensos estrictos de los árboles más parsimoniosos producidos con análisis de máxima parsimonia individuales de las regiones *trnS-T*, *trnL-F*, *rpoC1* y *matK*.

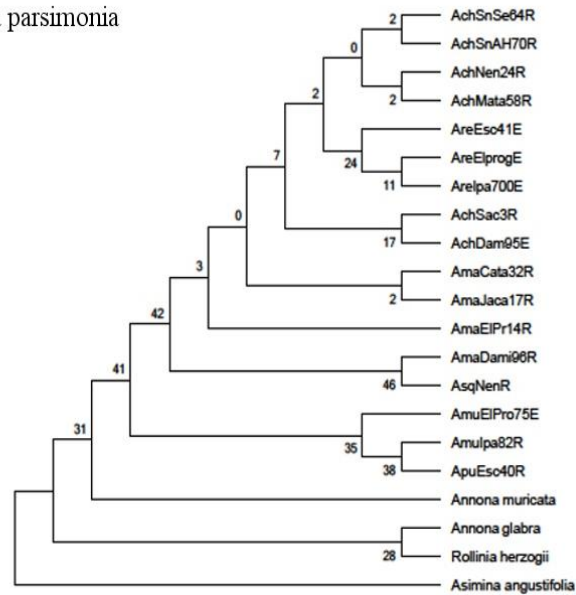


**Figura 16.** Filogenias de *Annona* generadas con el método de máxima verosimilitud aplicado individualmente a las regiones *trnS-T*, *trnL-F*, *intrón rpoC1* y *matK*.

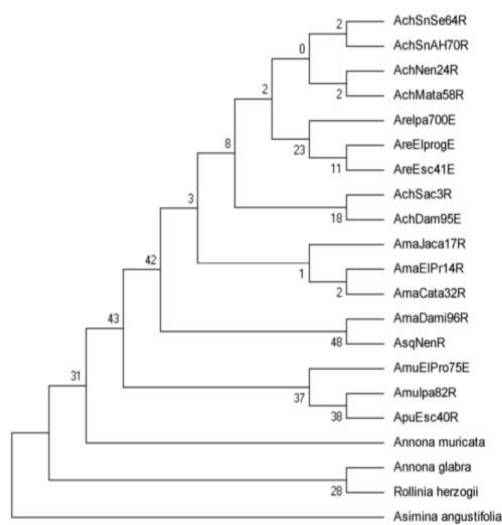


**Figura 17.** Árboles filogenéticos de *Annona* de la región *atpB-rbcL*. (A) Análisis de máxima parsimonia, (B) análisis de máxima verosimilitud y (C) análisis Bayesiano.

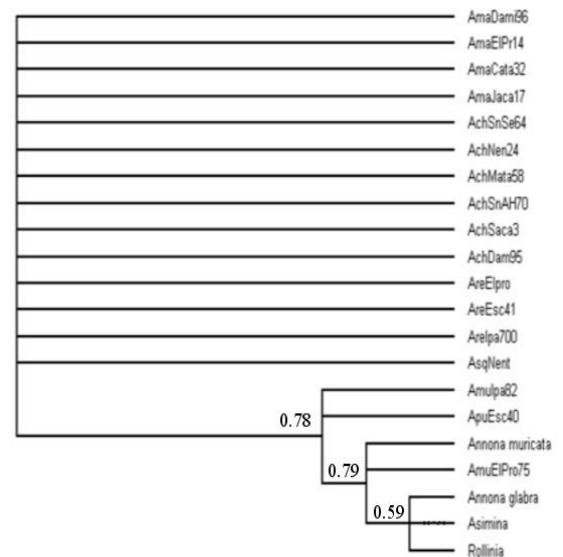
A Máxima parsimonia



B Maximum likelihood



C Bayesiano

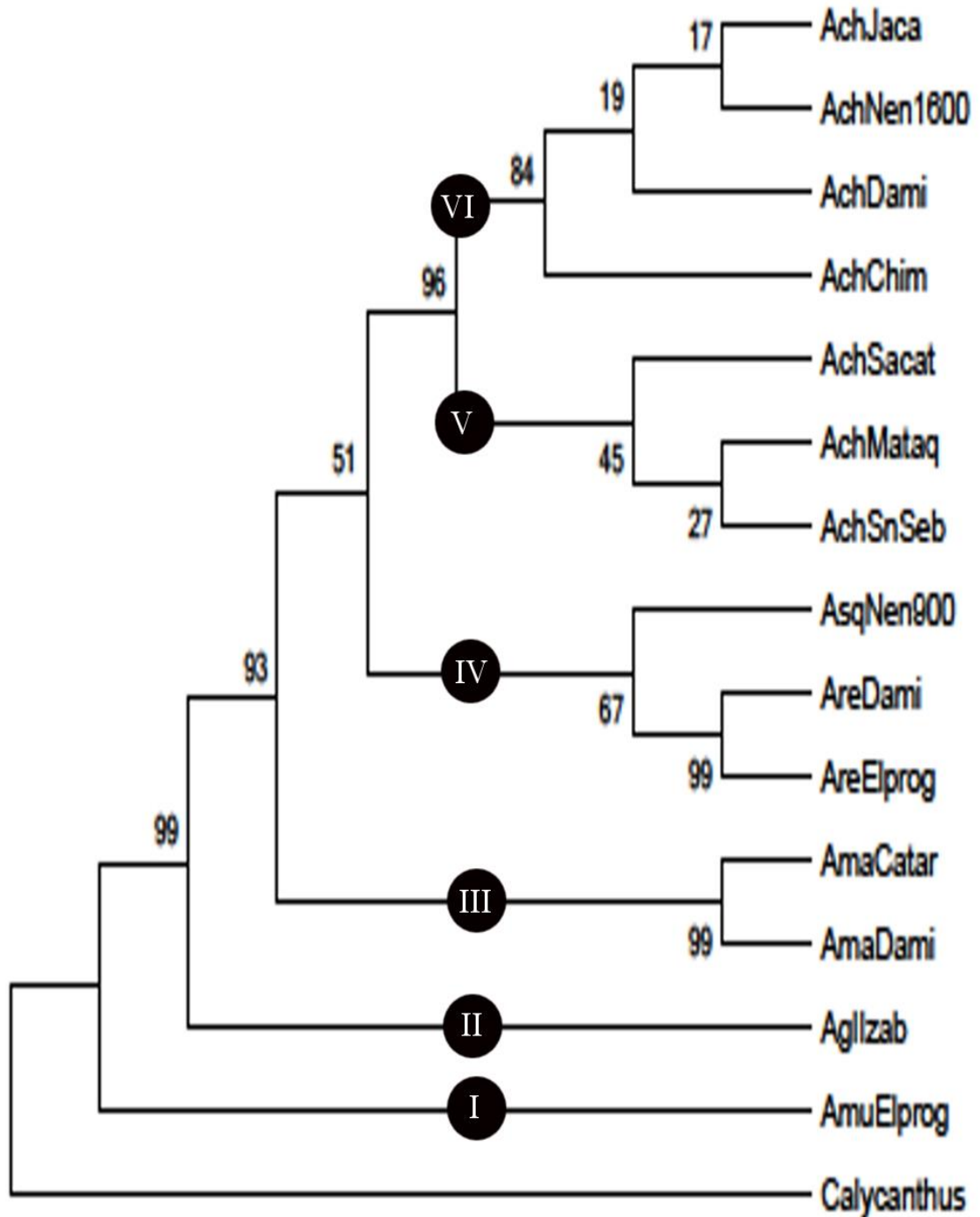




En el análisis combinado se logró incluir las regiones *trnL-F*, intrón *rpoCl* y *matK* que generaron una matriz de 2381 nucleótidos. En todas las inferencias de filogenia se identificaron seis clados consistentes y mínimas variaciones entre los árboles generados con los análisis MP, ML y bayesiano (ver Figuras 18 y 19). Para el análisis MP combinado se obtuvieron índices de consistencia y retención moderadamente altos (CI=0.7763, RI=0.8365), indicando niveles bajos de homoplasias dentro de los datos. El árbol consenso se determinó con 68 árboles igualmente parsimoniosos de una longitud de 721 pasos. En el árbol consenso de MP *A. cherimola*, *A. macroprophyllata* y *A. reticulata* formaron grupos monofiléticos bien definidos (BS=96-99).

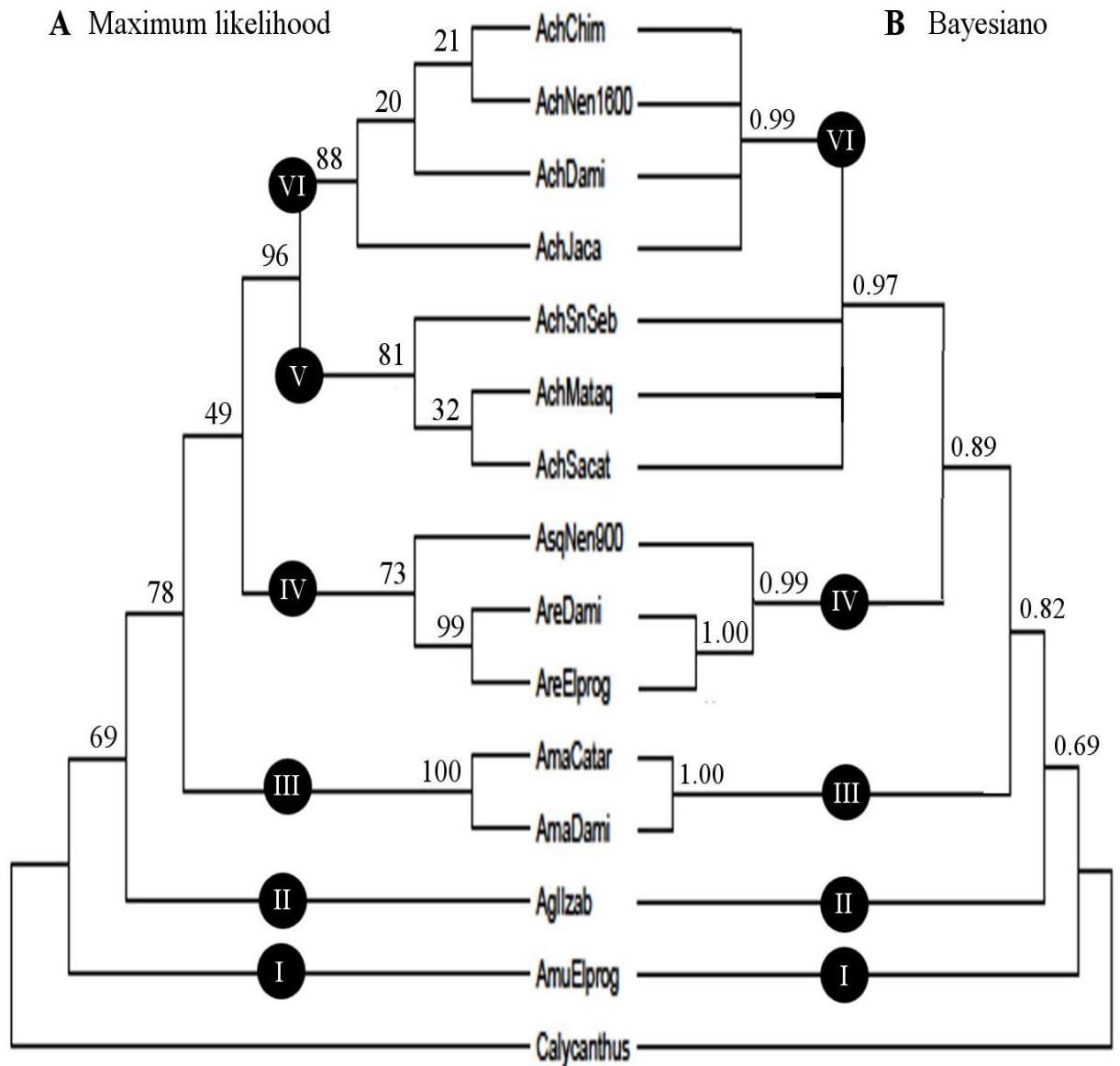
En algunos nodos internos existió bajo soporte estadístico; sin embargo la topología de los árboles fue consistente entre MP, ML y bayesiano. *A. muricata* fue el clado basal (etiquetado I en filogenias) y el resto de anonas formó un grupo con soporte fuerte en MP y moderado en Bayesiano (BS=99 y PP=0.69, respectivamente). El clado de *A. macroprophyllata* (etiquetado III en filogenias) tuvo un soporte fuerte en los tres análisis (MP BS=99, ML BS=1000 y PP=1.00). El clado hermano de *A. cherimola* (etiquetado IV en filogenias) consistió de *A. squamosa* y *A. reticulata* y tuvo un soporte moderado a alto (MP BS=67, ML BS=73 y PP=0.99). La monofilia de *A. cherimola* tuvo un soporte fuerte (MP BS=96, ML BS=96 y PP=0.97). Para los individuos de *A. cherimola* se identificaron dos clados (identificados V y VI en filogenias) de los cuales el clado VI tuvo soporte fuerte (MP BS=84, ML BS=88 y PP=0.99). El clado VI se conformó de los individuos provenientes de Chimaltenango; Nentón (1600msnm) y Jacaltenango en Huehuetenango; y Damián en Jalapa. El clado V no se logró identificar en el análisis bayesiano porque los individuos formaron una politomía y tuvo soporte bajo como clado para MP y moderado para ML (BS=45 y BS=81, respectivamente). En el clado V se agruparon los individuos provenientes de San Sebastián en Huehuetenango, Mataquescuintla en Jalapa y Sacatepéquez.

**Figura 18.** Consenso estricto de 68 árboles igualmente parsimoniosos producido con análisis MP utilizando datos combinados de las regiones *trnL-F*, intrón *rpoC1* y *matK*.



Números sobre las ramas representan valores *bootstrap*. Números romanos dentro de los círculos representan los clados identificados.

**Figura 19.** Filogenia de *Annona* con datos combinados de regiones *trnL-F*, intrón *rpoCl* y *matK*. (A) árbol generado con ML y (B) árbol generado con inferencia bayesiana usando un modelo evolutivo homogéneo (GTR+I+G).



La filogenia bayesiana es un consenso de 3,750 árboles después de eliminar un *burn-in* de 1,250 árboles. Los números sobre las ramas representan valores *bootstrap* (BS) y probabilidades posteriores (PP). Los números romanos indican los clados identificados.

**2. Filogenia de *A. cherimola*.** El análisis de MP aplicado a las regiones combinadas (*trnL-F* e intrón *rpoC1*) produjo las estadísticas mostradas en el Cuadro 8. Se logró producir un alineamiento de 1657 pares de bases para la inferencia filogenética. El número de caracteres variables y caracteres informativos de parsimonia fue reducido (0.84 y 0.3% respectivamente). El análisis de MP produjo dos clados consistentes y otros clados que tuvieron valores de BS debajo de 50. En uno de los clados consistentes (BS=98) se agrupó un individuo de San Antonio Huista y otro de San Luis Pinula (clado I). El otro de los clados consistentes (BS=93) agrupó a varios individuos de las localidades de Chimaltenango, Damián, El Carrizal, San Carlos Sija, Nentón y San Antonio Huista (clado II). Para el análisis de MP se obtuvieron valores muy altos en los índices de consistencia (CI=1.00) y de retención (RI=1.00). El árbol consenso se determinó con 190 árboles igualmente parsimoniosos de una longitud de 14 pasos (ver Figura 20). En el análisis de máxima verosimilitud (MP) y bayesiano se utilizaron los modelos de sustitución de *General Time Reversible* (GTR), proporción de sitios invariables (I) y distribución gamma (G).

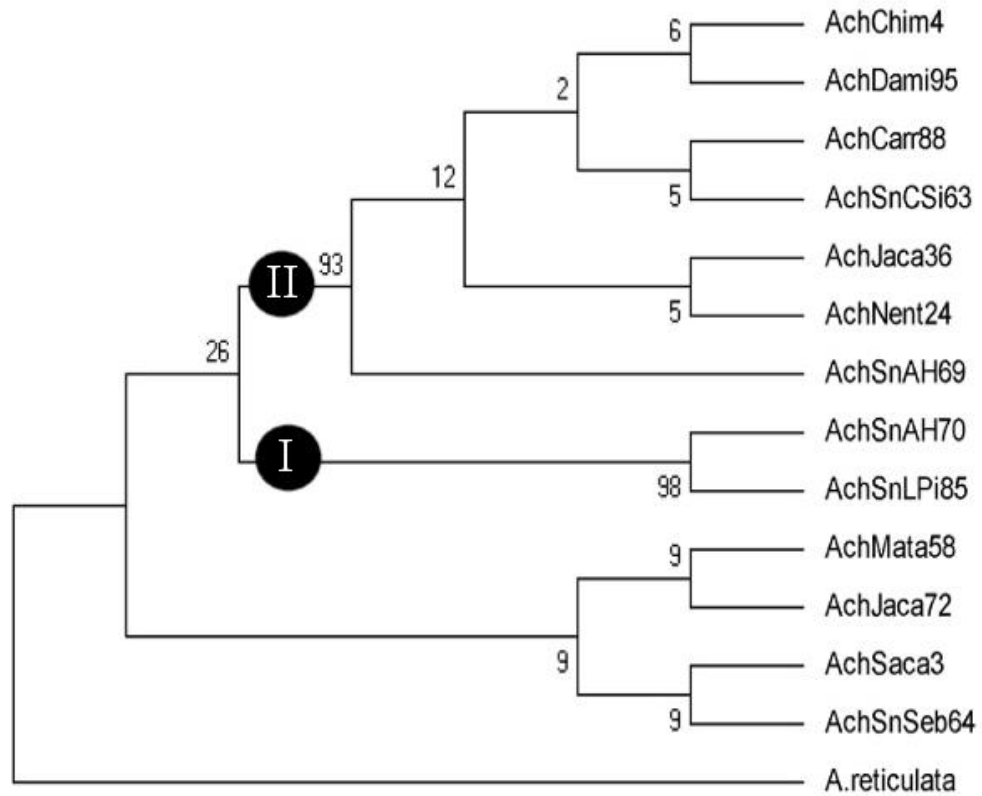
Se encontraron pequeñas variaciones en las filogenias producidas por los tres métodos; sin embargo, todas identificaron dos clados consistentes. Los árboles producidos con los análisis de ML y Bayesiano fueron topológicamente muy similares (ver Figura 21). En el análisis de ML se identificaron los dos clados consistentes I y II con valores de BS de 95 y 86 respectivamente. El resto de clados tuvieron valores bajos de BS. En el análisis bayesiano se produjeron varias politomías; sin embargo, fue posible detectar los clados I (PP=1.00) y II (PP=0.99).

**Cuadro 8.** Estadísticos de los árboles de la combinación de las regiones *trnL-F* y *rpoC1* obtenidos del análisis de máxima parsimonia.

Región	Longitud de alineamiento (bp)	Número final de caracteres	No. de caracteres variables (%)*	No. de caracteres informativos de parsimonia (%)*	No. de árboles igualmente parsimoniosos	LA	CI	RI
Análisis combinado	1657	1642	14 (0.84%)	5 (0.3%)	190	14	1.00	1.00

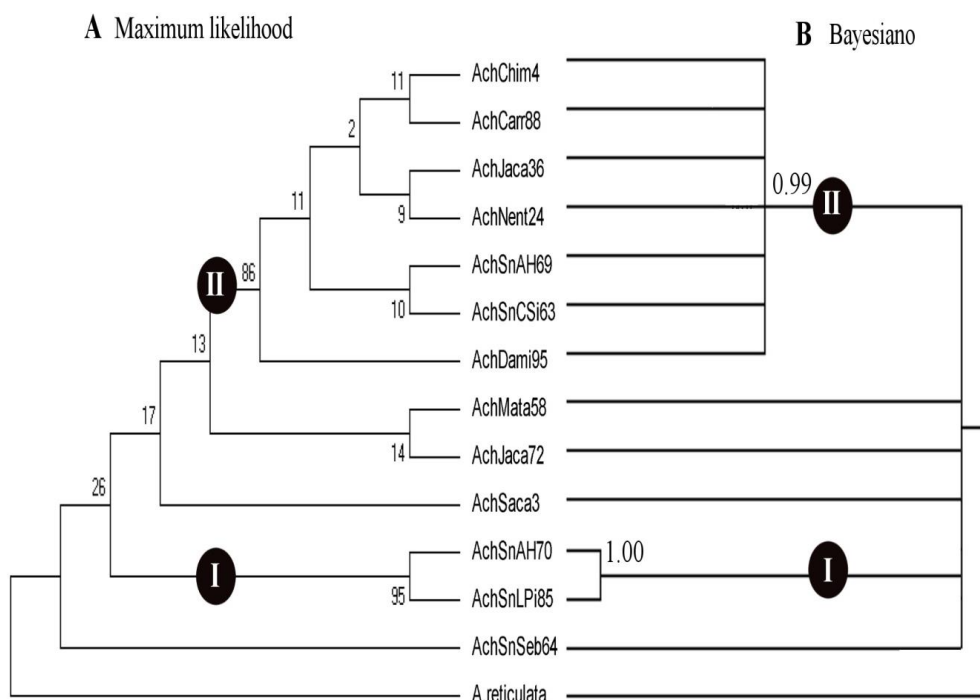
\*Incluye *outgroups*. LA=longitud de árbol, CI=índice de consistencia, RI=índice de retención.

**Figura 20.** Consenso estricto de 190 árboles igualmente parsimoniosos producido con análisis MP utilizando datos combinados de las regiones *trnL-F*, intrón *rpoC1* y *matK*.



Números sobre las ramas representan valores *bootstrap*. Números romanos dentro de los círculos representan los clados identificados.

**Figura 21.** Filogenia de *A. cherimola* con datos combinados de la región *trnL-F* e intrón *rpoCl*. (A) árbol generado con ML y (B) árbol generado con inferencia bayesiana usando un modelo evolutivo homogéneo (GTR+I+G).



La filogenia bayesiana es un consenso de 3,750 árboles después de eliminar un *burn-in* de 1,250 árboles. Los números sobre las ramas representan valores *bootstrap* (BS) y probabilidades posteriores (PP). Los números romanos indican los clados identificados.

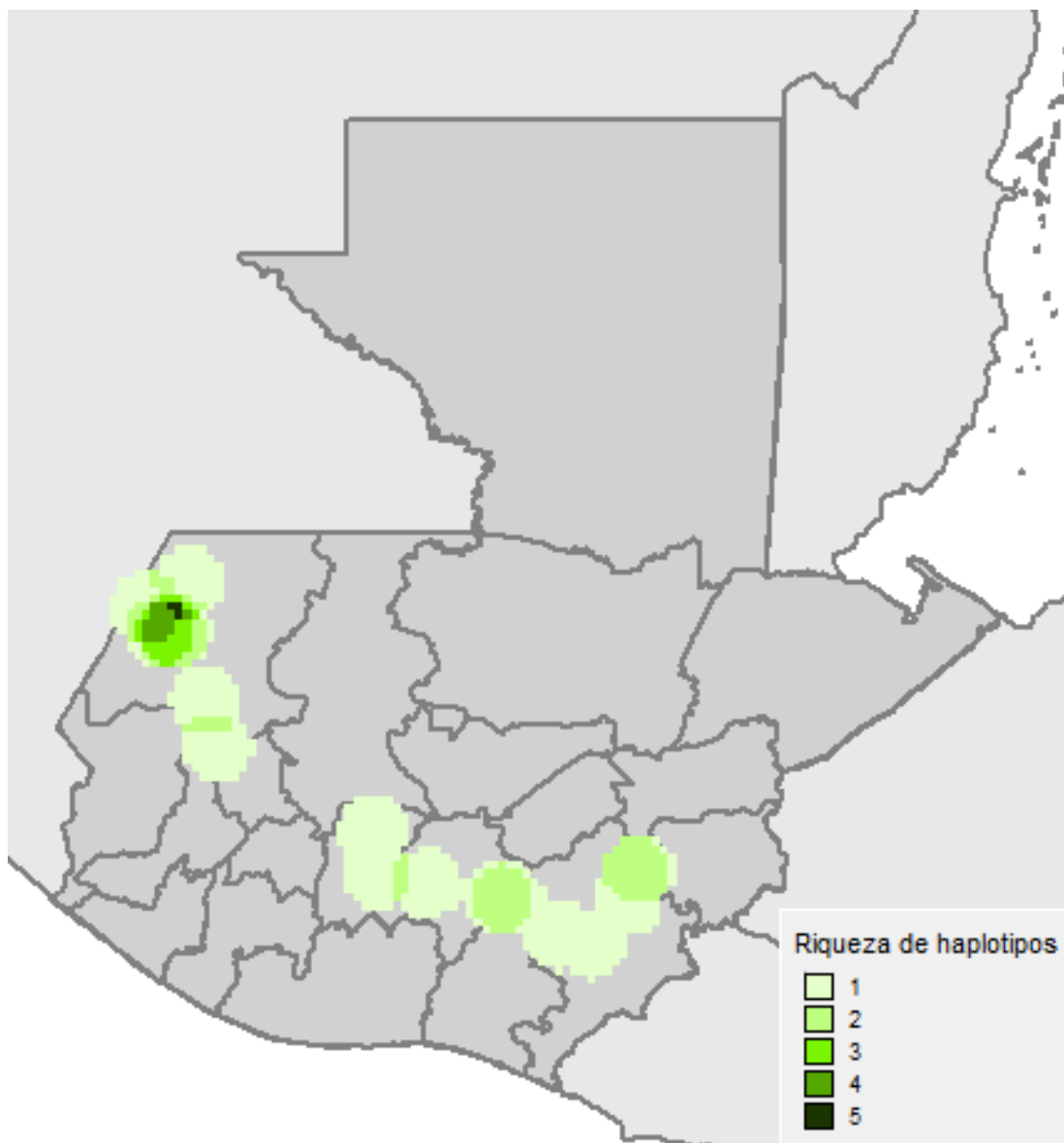
## F. Riqueza de haplotipos

Siete haplotipos fueron identificados en base a la combinación de la región *trnL-F* e intrón *rpoCl* en 18 individuos de *A. cherimola* (ver Cuadro 9). La región *trnL-F* fue la más polimórfica con 12 SNP. El intrón *rpoCl* fue menos polimórfico, con cinco SNP. El análisis espacial de la riqueza de haplotipos sugiere que en el noroeste de Huehuetenango existe la más alta diversidad (hasta cinco haplotipos) en comparación al resto del país (ver Figura 22). En Sacatepéquez y Jalapa se produjeron zonas con moderada riqueza (2 haplotipos). El haplotipo B fue el más común; en Huehuetenango (San Antonio Huista, Jacaltenango y Nentón) se encontraron 3 haplotipos locales: C, D y G. En Sacatepéquez (San Lucas) se encontró un haplotipos local: E. La red de haplotipos encontrados se muestra en la Figura 23.

**Cuadro 9.** Haplotipos de *A. cherimola* encontrados en distintas localidades de Guatemala.

Haplotipo	SNP's por regiones de ADNcp																	Individuos con el haplotipo	Localidades con el haplotipo
	<i>trnL-F</i>												<i>rpoC1int</i>						
Posición	292	293	524	529	571	803	811	812	846	863	886	894	23649	23753	23754	23756	23757		
A	T	-	-	-	-	-	A	G	-	A	C	C	-	C	A	-	-	58,64,72	Guatemala y Huehuetenango
B	-	-	-	-	-	-	C	T	-	A	C	C	-	C	A	-	-	4,7,60,61,63,69,88,95,100,104	Chimaltenango, Guatemala, Quetzaltenango, Huehuetenango, Jalapa, Jutiapa y Santa Rosa
C	T	T	-	-	C	-	A	G	-	C	T	T	-	C	A	-	-	70	San Antonio Huista, Huehuetenango
D	-	-	T	T	-	T	C	T	G	A	C	C	-	C	A	-	-	36	Jacaltenango, Huehuetenango
E	T	-	-	T	-	-	A	G	-	A	C	C	-	T	C	A	C	3	San Lucas Sacatepéquez, Sacatepéquez
F	T	-	-	-	C	-	A	G	-	C	T	T	-	C	A	-	-	85	San Luis Jilotepeque, Jalapa
G	-	-	-	-	-	T	C	T	-	A	C	C	C	C	A	A	C	24	Nentón, Huehuetenango

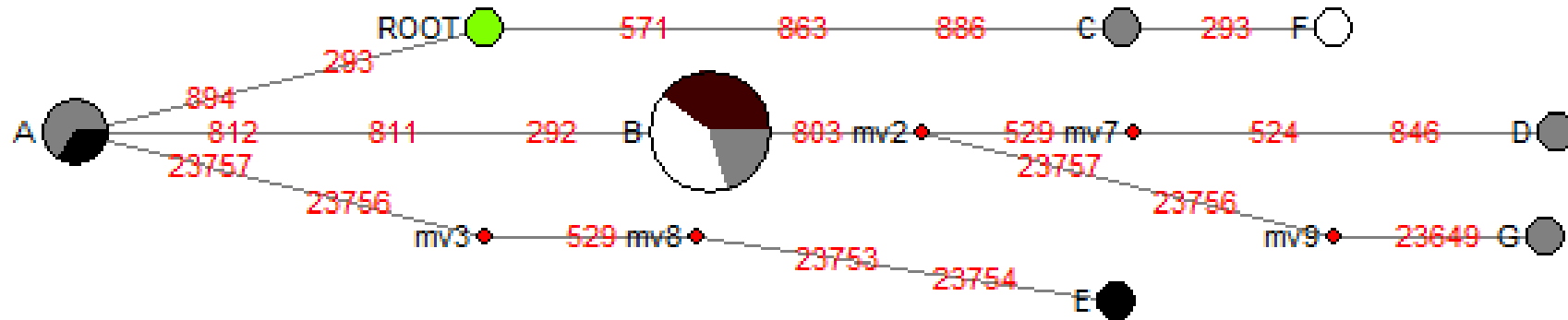
**Figura 22.** Riqueza de haplotipos de *A. cherimola*.



El mapa muestra el número de haplotipos presentes en celdas de 2 minutos y aplicando un *circular neighborhood* de 18 minutos.



**Figura 23.** Red de haplotipos. La red muestra los 7 haplotipos encontrados.



El grupo externo es *A. reticulata* (ROOT) y los números en rojo representan los cambios entre dos haplotipos conectados. Los rombos rojos son vectores intermedios que indican secuencias ancestrales. Los polimorfismos de las posiciones 293, 529, 23756 y 23757 aparecieron más de una vez en los vectores de la red. En gris se encuentran los individuos de la zona occidental (Huehuetenango y Quetzaltenango); en negro los individuos de la zona central (Chimaltenango, Sacatepéquez y Guatemala); en blanco los individuos de la zona occidental (Jalapa, Santa Rosa y Jutiapa).

## IV. DISCUSIÓN

### A. Distribución y botánica de *Annona* en Guatemala

La información disponible en los registros de herbario resultó ser muy útil para determinar las regiones con presencia de varias especies de anonas, tal es el caso de Huehuetenango, El Progreso y Jalapa. En los muestreos fue difícil encontrar una población natural de alguna de las especies (excepto *A. glabra*) y por lo general los individuos colectados se encontraron asociados a poblaciones humanas, en la mayoría de los casos en huertos familiares. *A. glabra* fue la única especie que se encontró de manera silvestre, mientras que *A. reticulata* fue encontrada fuera de huertos familiares pero cerca de comunidades humanas. *A. cherimola* y *A. macrophyllata* siempre se encontraron asociadas a comunidades humanas, encontradas casi exclusivamente en huertos familiares. *A. macrophyllata* se encontró principalmente en tierras bajas, entre los 290 hasta 1300 msnm. *A. cherimola* se encontró desde los 1000 hasta los 2300 msnm, por lo que existió un traslape con *A. macrophyllata* en algunas regiones. *A. muricata* se le encontró exclusivamente en tierras bajas y junto a *A. cherimola* y *A. diversifolia* conforman el grupo de especies comestibles.

La identificación botánica de los individuos se logró en base a las características morfológicas y en la mayoría de los casos únicamente la morfología foliar. En los individuos de los que se colectó fruto y/o flor fue mucho más fácil realizar la identificación. Los individuos de *A. reticulata* mostraron las hojas más lanceoladas de todos los especímenes, por lo que esta característica fue casi diagnóstica para todos los individuos. Las hojas de *A. cherimola* fueron las más redondeadas o elípticas y se distinguían del resto por tener el envés cubierto de tricomas. Las hojas de *A. macrophyllata* eran elípticas, muy similares a las de *A. cherimola*; sin embargo se diferenció por el envés más glabro. Con el resto de especies fue más difícil encontrar un patrón en las hojas; sin embargo los frutos y/o flores fueron muy útiles en estos casos. El fruto de *A. muricata* fue reconocible por su gran tamaño y por tener proyecciones muy puntiagudas y delgadas; en *A. glabra* el fruto también era reconocible por su gran tamaño pero no presentaba proyecciones. El uso de la morfología foliar fue muy útil para la identificación y fue indispensable ya que por temporada del muestreo era difícil encontrar siempre hoja, flor y fruto en el mismo individuo.

## B. Fragmentos amplificados en *Annona*

Existió diferencia significativa en los fragmentos amplificados para las distintas especies, característica que permitirá identificar molecularmente muestras de individuos desconocidos. La región *trnS-T* es útil para diferenciar *A. macrophyllata* y *A. glabra*, ya que los fragmentos amplificados son más pesados en comparación al resto de especies. La región *trnL-F* parece permitir diferenciar mejor entre las especies. Los fragmentos de alrededor de 971pb serían los más livianos y corresponden a *A. muricata*; los fragmentos entre 1038 a 1140bp podrían corresponder a *A. cherimola*, *A. reticulata*, *A. squamosa*, *A. glabra* o *A. purpurea*; los fragmentos más pesados de alrededor de 1188pb corresponden a *A. macrophyllata*. Al resto de regiones no se les aplicó una prueba *post hoc* no paramétrica para conocer qué medias diferían entre los datos, pero existen variaciones que podrían utilizarse para lograr diferenciar las especies que no es posible determinar con las regiones *trnS-T* y *trnL-F*. La región *matK* podría ser útil para diferenciar entre dos grupos: bandas alrededor de 1149pb corresponderían a *A. cherimola* o *A. purpurea* y fragmentos alrededor de 1225bp corresponderían a *A. reticulata* o *A. squamosa*. Finalmente, el intrón de la región *rpoCI* podría ser utilizado para diferenciar entre *A. cherimola* de *A. purpurea*, ya que un fragmento de alrededor de 909pb corresponde a la primer especie y un fragmento de 878bp a la segunda. Estos datos de fragmentos pueden ser muy útiles para distintas aplicaciones y conocer la especie de un individuo cuando no es posible determinarla por medio de caracteres morfológicos.

## C. Relaciones filogenéticas en *Annona*

Los análisis de MP, ML y bayesiano mostraron un fuerte soporte para la monofilia de *Annona*. En los análisis de regiones individuales en los que se incluyó *Rollinia* se observó que los individuos se agruparon dentro de *Annona*, siendo consistente con el análisis filogenético de Richardson *et al.* (2004). La región *trnS-T* y el intrón *rpoCI* tuvieron las proporciones más altas de caracteres informativos de parsimonia por lo tanto su uso para análisis moleculares de anonas debe ser prioritario respecto a las otras regiones. Debido a que se usaron pocos individuos para la región *trnS-T*, la proporción de sitios informativos de parsimonia se vio favorecida. En el análisis de *rpoCI* la proporción de sitios informativos de parsimonia es más certera por contar con más individuos en el cálculo; por tanto se prefiere esta región aunque la

proporción haya sido levemente menor (8.4%). El bajo número de individuos usados en el análisis individual de *trnS-T* pudo ser el origen de las discrepancias encontradas en la filogenia. Una discrepancia importante fue la ubicación de *Calycanthus* como grupo externo a Anonaceae, cuando se esperaba que Magnoliaceae (*Magnolia* y *Liriodendron*) ocuparan esta posición. La discrepancia pudo deberse a la presencia de homoplasias entre *Calycanthus* y las anonáceas, o bien a la necesidad de aplicar una búsqueda más rigurosa para la selección del modelo evolutivo. Otra de las discrepancias importantes se produjo en la región *trnL-F* en la que *A. macrophyllata* se agrupó dentro de *A. cherimola*. Esta agrupación tuvo bajo soporte para MP y ML (MP BS=52 y ML BS=54); en el caso del análisis bayesiano *A. macrophyllata* formó una politomía con otros individuos de *A. cherimola*, reflejando la incosistencia de este agrupamiento. Es probable también que este agrupamiento anómalo se deba a homoplasias. Los problemas en la resolución de la filogenia resaltan la importancia de incrementar el número de individuos en el análisis para dar mayor soporte a los árboles producidos.

El análisis de la región *trnS-T* produjo una filogenia consistente con las publicadas para angiospermas basales (Simpson 2006), con excepción de la posición de *Calycanthus* mencionada anteriormente. *Chloranthus* (Chloranthaceae) apareció como grupo hermano de Magnoliidae (Magnoliales + Laurales + Canellales + Piperales) y en el siguiente grupo externo se encontró *Drimys* (Winteraceae) que pertenece a Canellales. Otra característica consistente fue el agrupamiento de Annonaceae, incluyendo *Annona* y *Cananga*. En la filogenia de *Annona* se logró identificar seis clados consistentes (clados I-VI, numerados según su aparición como grupo externo). El clado I es el basal y contiene a *A. muricata* y *A. purpurea*. El clado II es el siguiente grupo externo en la filogenia y contiene a *A. glabra* y *Rollinia*. A pesar de la diferencia morfológica de las flores, otros estudios han reportado la inclusión de *Rollinia* en *Annona* (Richardson *et al.*, 2004). La flor globosa se presenta en los clados I y II, por lo que puede representar el carácter ancestral en *Annona*. Es importante recalcar que no siempre va existir un equivalente molecular para una sinapomorfía morfológica, sobre todo porque muchas de las regiones estudiadas no son codificadoras. El clado III contiene a *A. macrophyllata*; pero la relación entre los individuos de las diferentes localidades no se resolvió adecuadamente. Para las relaciones entre los individuos de *A. macrophyllata* se obtuvo valores de BS muy

bajos y en el árbol bayesiano formaron politomias entre sí; por tanto es difícil establecer las relaciones de *A. macrophyllata* de las diferentes localidades. El clado VI es el grupo hermano de *A. cherimola* y agrupó a los individuos de *A. reticulata* y *A. squamosa*, especies no comestibles y que crecen de manera silvestre. Es probable que cultivares del ancestro común entre *A. cherimola* y *A. reticulata* hayan sido los primeros en ser cultivados por humanos hasta llevarlos al nivel de domesticación actual.

Los clados V y VI agrupan a individuos de *A. cherimola* y existió soporte fuerte en el análisis de ML (BS=88 y 81) para la separación de esta especie en dos clados. En el análisis bayesiano, existió un fuerte soporte para el clado VI (PP=0.99) pero el clado V no pudo identificarse debido a que los individuos mostraron una politomía entre sí. Dentro del clado V y VI existió baja resolución en las relaciones de los individuos, por lo que se complica la visualización del patrón geográfico en la agrupación de los individuos. El clado VI agrupó a individuos de Chimaltenango, Nentón (Huehuetenango) Damián (Jalapa) y Jacaltenango (Huehuetenango); el clado V agrupó individuos de San Sebastián (Huehuetenango), Mataquescuintla (Jalapa) y Sacatepéquez. La división de *A. cherimola* en estos dos grupos no muestra un patrón geográfico claro; aunque los individuos del clado VI se encontraron por lo general a alturas menores (1037-1654 msnm), con excepción del individuo de Chimaltenango (2025 msnm). Los individuos del clado V se encontraron a mayores alturas (1672-2021 msnm), por lo que este factor puede ser en realidad importante en las relaciones e historia evolutiva de las anonas.

Las relaciones filogenéticas intraespecíficas en *A. cherimola* no se esclarecieron con detalle; sin embargo, se encontraron dos clados con buen soporte. Los árboles filogenéticos obtenidos mostraron bajo soporte para la mayoría de clados y en el caso del análisis bayesiano se presentaron varias politomías. Los clados identificados no mostraron un patrón geográfico en su división. El patrón en los clados reflejó una división por haplotipos. En el clado I (MP BS=98, ML BS=95, PP=1.00) se agruparon los dos individuos con los haplotipos C y F. En el clado II (MP BS=93, ML BS=86, PP=0.99) se agruparon los individuos con los haplotipos B, D y G. Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos del clado II no se esclarecieron a detalle y en el caso del árbol bayesiano todos los individuos formaron una politomía entre sí. Dentro de *A.*

*cherimola* el grupo saliente varió entre cada uno de los árboles obtenidos, por consiguiente obtuvieron un soporte bajo. En el árbol de MP el grupo saliente contiene los individuos de los haplotipos A y E; en el árbol de ML el individuo 64 (San Sebastián/Santa Bárbara) con haplotipo A; en el árbol bayesiano no se identificó grupo saliente porque los individuos de los haplotipos A y E (58, 64, 72 y 3) formaron una politomía con los clados I y II. La presencia de individuos con el mismo haplotipo en distintas regiones puede indicar que aun existe flujo genético entre las poblaciones de *A. cherimola*. El flujo genético puede deberse también a la intervención humana que ha trasladado cultivares entre las distintas regiones del país. Además, *A. cherimola* se caracteriza por ser una especie de altitudes elevadas y de Huehuetenango a Chiquimula prácticamente no existe una depresión significativa para aislar las poblaciones vegetales que por lo general son más vágiles.

La red de haplotipos obtenida complementa el análisis filogenético y muestra que del grupo externo parten dos ramas, una de ellas con solo dos haplotipos y la otra rama con el resto de ellos. Una de las ramas muestra que ocurrieron tres mutaciones a partir de la secuencia ancestral que llevaron al C, posteriormente una nueva mutación produjo el F. La diferencia entre los haplotipos C y F se debe a una supuesta inserción de Timina, por lo que esto también puede deberse a una posible contaminación durante la secuenciación. Los haplotipos C y F podrían ser en realidad uno; sin embargo no se descarta el resultado que ambos haplotipos representan un linaje distinto del resto. El haplotipo A parece ser el ancestral en la rama que contiene al resto (B, D, E y G). Unas cuantas mutaciones en el intrón *rpoCl* del haplotipo A parecen haber generado al E. El B fue el más común, el cual parece haberse generado del A, a partir de tres mutaciones. Una mutación a partir del haplotipo B generaría la secuencia ancestral de la que se originaron el D y G. La mutación 293 aparece dos veces en la red, lo cual indica una posible homoplasia. Otros casos de homoplasia se encuentran en las posiciones 529, 23756 y 23757. Los haplotipos de los cuales parecen haberse originado el resto se encuentran principalmente en Huehuetenango, lo cual indica que en esta área de Guatemala podría estar la mayor riqueza por ser el principal centro de diversidad de *A. cherimola* en el país. De ser Huehuetenango el principal centro de diversidad, el haplotipo B ha logrado migrar hacia el oriente del país, donde es más abundante y aparte de los haplotipos locales, es prácticamente el único.

El ADNcp probó ser muy útil para la elaboración de la filogenia de las anonas de Guatemala. La inferencia de la historia evolutiva muestra que existe un clado que agrupa *A. cherimola*, *A. squamosa*, *A. reticulata* y *A. macrophyllata* y por lo tanto es importante priorizar la conservación de estas especies, sobre todo por su importancia como posibles opciones de diversificación agrícola. Es importante incluir en un análisis filogenético similar a *A. lutescens*, *A. primigenia* y *A. scleroderma* para comprobar si están cercanamente relacionadas con *A. reticulata*. *A. reticulata* y *A. squamosa* fueron las especies más cercanas a *A. cherimola* en la filogenia obtenida, por lo que *A. lutescens* y *A. primigenia* también pueden encontrarse muy emparentadas con *A. cherimola*. *A. macrophyllata* es la especie comestible más emparentada a *A. cherimola*, y su dispersión exclusiva en tierras bajas de Guatemala permite que sea un cultivo que puede generar un ingreso económico importante para el país. Dentro de *A. cherimola* existe una diferenciación en dos linajes, por lo que conservar ambos linajes es importante. Para dar mayor consistencia a la hipótesis que existen dos linajes, se debería incrementar el número de individuos y encontrar más individuos con los haplotipos C y F, que son los que conformarían uno de los linajes de la especie. La prioridad en conservación podría enfocarse en el segundo linaje de la especie, ya que contiene mayor número de haplotipos y los más abundantes en el país (A, B, D, E y G).

#### **D. Áreas de alta diversidad de *A. cherimola* en Guatemala**

Los resultados muestran la existencia de diferencias en la riqueza de haplotipos en las diferentes regiones del país. La región *trnL-F* proporcionó el mayor número de polimorfismos, lo cual facilitó el estudio porque permitió definir varios haplotipos. El nivel de riqueza de haplotipos más alto se encontró en Huehuetenango, principalmente en el área central de Jacaltenango. La riqueza de haplotipos también abarca el sur de Nentón, el norte de San Miguel Acatán, Santa Ana Huista, San Antonio Huista, San Pedro Necta, el norte de Santiago Chimaltenango y parte oeste de Concepción Huista. La alta riqueza en esta región también se ve reflejada en la presencia de un haplotipo local en Nentón, uno en San Antonio Huista y otro en Jacaltenango. Durante la fase de colecta también se observó que el cultivo de anonas en hogares era más frecuente en esta región del país. La predominancia de grupos indígenas mayas y su asociación con cultivos locales puede ser otro factor influyente en la riqueza genética en esta región. Otra región de moderada riqueza se produjo en la parte oeste de Sacatepéquez. En la

región oriental (principalmente Jalapa) la riqueza fue menor; sin embargo esto puede deberse a que el número de individuos analizados fue menor que en Huehuetenango. Una característica de la región de más alta diversidad es la presencia de un alto gradiente altitudinal en un área reducida. Esta característica geográfica puede ser un factor en la diversidad, ya que las adaptaciones fisiológicas varían con los cambios de altura y por lo tanto se requieren adaptaciones genéticas. El gradiente latitudinal en la región de Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa no es tan pronunciado como en Huehuetenango; sin embargo este factor también puede ser importante para dar forma a la diversidad genética y por lo tanto no se puede descartar a la región como otro centro de alta diversidad. Las limitaciones del análisis espacial con un número reducido de individuos es evidente; sin embargo, los patrones de riqueza obtenidos no pueden ser despreciados por completo. Incrementar el número de individuos en el análisis generaría menor sesgo por el esfuerzo de muestreo y puede corroborar con mayor soporte los resultados del estudio.

En la región norte de Guatemala existe un alto grado de endemismo de especies de árboles pertenecientes a las angiospermas basales. El alto grado de riqueza genética de *A. cherimola* en Huehuetenango detectado concuerda con este escenario. *Cymbopetalum steyermarki* (N.A. Murray) es una anonácea endémica encontrada únicamente en Huehuetenango; *Mosannonna guatemalensis* (Lundell) también es endémica y se conoce de Alta Verapaz. *Magnolia guatemalensis* (Donn.Sm.) es una magnoliácea relativamente abundante en zonas pantanosas de Alta Verapaz. *Ocotea* (Lundell) perteneciente a Lauraceae posee una gran diversidad de especies endémicas encontradas principalmente en Quiché, Baja Verapaz, Alta Verapaz y Petén. A pesar del elevado endemismo de angiospermas basales en la zona norte, existe muy poca protección y todas las especies mencionadas se encuentran dentro la lista roja de árboles de Guatemala (Vivero *et al.* 2006). A nivel de endemismo mesoamericano, también se encuentran varias anonáceas (*Anaxagorea*, *Cymbopetalum* y *Desmopsis*), magnoliáceas (*Magnolia*) y lauráceas (*Ocotea*) distribuidas principalmente en Alta Verapaz, Huehuetenango y Petén. El endemismo de angiospermas basales en el norte de Guatemala complementa los resultados del análisis espacial, proponiendo a Huehuetenango como la región con mayor diversidad genética de *A. cherimola* de las zonas muestreadas. La importancia del estudio de las anonas del norte del país fue reconocida por Stanley y Steyemark (1946), sobre todo por la presencia de *A.*



*lutescens*, *A. primigenia*, *A. scleroderma* y *A. volubilis*, todas presentes principalmente en Alta Verapaz. *A. volubilis* es una enredadera encontrada en las orillas del río Sebol, al norte de Alta Verapaz. *A. lutescens*, *A. primigenia* y *A. scleroderma* no son cultivadas, se han propuesto como los parientes silvestres de las anonas cultivadas o como subespecies de *A. reticulata* (Stanley y Steyemark 1946). La presencia de estas especies silvestres en el norte del país recalca la importancia del análisis espacial y molecular de individuos de Alta Verapaz y Petén.

## **E. Conservación de los recursos genéticos de *Annona* de Guatemala**

La conservación de los cultivos locales es una prioridad mundial ante los problemas de seguridad alimentaria, sobre todo en las áreas donde existe alta diversidad en la composición genética de los cultivares. La región centroamericana ha sido propuesta como el centro de origen de *A. cherimola*, por lo que áreas de alta diversidad dentro de la región son clave para la conservación del recurso genético. La zona norte de Guatemala parece tener alta diversidad de angiospermas basales (Magnoliidae), encontrándose especies endémicas de Annonaceae, Magnoliaceae y Lauraceae. Entre las zonas analizadas, la región central de Huehuetenango es la que posee la mayor riqueza de haplotipos, por tanto la conservación de los recursos genéticos de esta región es prioritaria. La conservación *in situ* debe promoverse, sobre todo a mantener y expandir los huertos familiares de anonas. Las pocas poblaciones silvestres de anonas también deben ser protegidas *in situ*, en especial las encontradas en Nentón. Actualmente el Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas (SIGAP) no cuenta con áreas protegidas que abarquen la región de alta diversidad de haplotipos. Dentro del SIGAP se encuentra protegida la Sierra de los Cuchumatanes; sin embargo, la protección debería extenderse a zonas de Nentón, Jacaltenango, Santa Ana, San Antonio y Concepción Huista. La conservación *ex situ* también debe ser un componente prioritario para las anonas de Huehuetenango. La conservación a través de huertos familiares también es una estrategia que debe ser tomada en cuenta para la conservación *ex situ*, sobre todo utilizando individuos provenientes de Huehuetenango. La introducción de individuos de Huehuetenango a huertos familiares puede iniciarse en regiones cercanas al departamento, como Quetzaltenango y Sololá. La colecta de germoplasma también debe ser otra estrategia que debe implementarse. La conservación de germoplasma debe priorizarse para la región de Huehuetenango y puede realizarse mediante bancos de semillas y jardines clonales. La conservación *in*

*situ* y *ex situ* también debe llevarse a la región de Jalapa y Chiquimula; sin embargo ante la escasez de recursos e iniciativas gubernamentales la prioridad se encuentra en la zona de más alta riqueza genética.

En el estudio no se incluyó un muestreo en Alta Verapaz y Petén; sin embargo, los resultados producidos indican que la prioridad en conservación es la zona norte del país. En Alta Verapaz se encuentran especies silvestres que han sido propuestas como parientes silvestres de *A. reticulata*. *A. lutescens* y *A. primigenia* son muy similares morfológicamente a *A. reticulata* y probablemente sean sus parientes silvestres, por lo tanto son prioritarias para la conservación. Mayor esfuerzo de investigación debe invertirse en las anonas de Alta Verapaz, sobre todo en la colecta para análisis molecular y germoplasma de *A. lutescens* y *A. primigenia*.

La cercanía filogenética entre *A. cherimola* y *A. macrophyllata* convierten a esta última especie en una alternativa para la diversificación agrícola del país. La conservación de los recursos genéticos de *A. macrophyllata* es de prioridad para el país, ya que la especie se encuentra en sus tierras bajas y no se le encuentra en otros lugares a excepción del sur de México y El Salvador. El estudio de esta especie debe imitar los programas llevados a cabo en Malawi y Brazil, aplicando marcadores microsatélites en frutos con potencial agronómico. Es altamente recomendable realizar la caracterización molecular con microsatélites en *A. macrophyllata* para iniciar programas de domesticación y mejora. La caracterización molecular debe aplicarse también en las dos especies de *Rollinia* encontradas en Guatemala, sobre todo porque su fruto es comestible y por su inclusión dentro de *Annona* con *A. glabra* y *A. senegalensis* como especies hermanas.

## V. CONCLUSIONES

1. Los registros de herbario de *Annona* muestran que las diferentes especies se encuentran dispersas por todo el país.
2. Las especies más abundantes y por lo tanto más cultivadas fueron *A. cherimola* y *A. macrophyllata*, con 49% y 24% respectivamente del total de individuos colectados.
3. Las secuencias del intrón *rpoCl* produjeron el mayor porcentaje de caracteres variables (11%) e informativos de parsimonia (8.4%).
4. El análisis de MP del intrón *rpoCl* produjo la filogenia con los valores más altos de CI (0.8636) y RI (0.9531).
5. *A. cherimola* es monofilético y formó un clado con fuerte soporte en base a valores de MP BS=96, ML BS=96 y PP=0.97.
6. *A. squamosa* y *A. reticulata* formaron el clado hermano de *A. cherimola* con fuerte soporte en base a un valor de PP=89.
7. Los árboles filogenéticos consenso muestran que *A. muricata* ocupa la posición más basal entre las especies de Guatemala.
8. Siete haplotipos fueron detectados en *A. cherimola*, siendo la región *trnL-F* la que produjo el mayor número de polimorfismos.
9. Los haplotipos de *A. cherimola* en Guatemala se distribuyen en dos linajes principales. Un linaje agrupa los haplotipos C y F, el segundo linaje agrupó A, B, D, E y G.
10. Los haplotipos B, D y G formaron un clado consistente por lo que tienen entre sí un alto parentesco.
11. El área con mayor riqueza de haplotipos fue Huehuetenango, principalmente en Jacaltenango, Nentón, norte de San Miguel Acatán, Santa Ana Huista, San Antonio Huista y San Pedro Necta.

## VI. RECOMENDACIONES

- Los registros de herbario son muy importantes para determinar los sitios de colecta de especímenes. Se sugiere consultarlos previamente para visualizar regiones con presencia de varios *taxa* de interés y poder así planificar de mejor manera las colectas en el campo. Es de mayor importancia consultar registros cuando se tiene poco conocimiento de poblaciones silvestres como en el caso de especies cultivadas localmente.
- Se sugiere utilizar las regiones *trnL-F* y el intrón *rpoCl* para los análisis moleculares en *Annona* porque proveen mayor información y son relativamente fáciles de amplificar. El estudio de otras anonáceas e incluso angiospermas en general, puede llevarse a cabo con estas regiones polimórficas y muy informativas.
- La conservación *in situ* y *ex situ* debe ser prioritaria en Huehuetenango, especialmente en Jacaltenango, Nentón, San Miguel Acatán, Santa Ana Huista, San Antonio Huista, San Pedro Necta, Santiago Chimaltenango y Concepción Huista. Se debe extender el cultivo de anonas en huertos familiares ya que la especie sobrevive principalmente por esta práctica. La colecta de germoplasma debe priorizarse también para esta región.
- El alcance del estudio se ve limitado por la falta de colectas en la parte norte del país. Los resultados indican que en Petén y principalmente Alta Verapaz, puede existir mucha riqueza genética debido al endemismo de Magnoliidae en la región. Los parientes silvestres de *A. cherimola* pueden encontrarse en Alta Verapaz por lo que se les debe evaluar filogenéticamente para comprobar su parentesco. La riqueza de anonas en el norte del país debe ser estudiada más a profundidad y compararla con los resultados obtenidos para Huehuetenango. Es necesario recordar el incremento en el esfuerzo de muestreo, ya que mientras más individuos representativos se incluyan en el análisis, más soporte tendrán las filogenias y los mapas de distribución de riqueza genética.
- La caracterización molecular con marcadores microsatélites debe aplicarse a *A. macroprophyllata*, por ser una especie muy emparentada a *A. cherimola* y por su alto potencial agrícola.

## VII. LITERATURA CITADA

- Anónimo. 2003. *The International HapMap Project*. Nature 426: 789-796.
- Azurdia, C. 2008. *Agrobiodiversidad de Guatemala*. En: *Guatemala y su Biodiversidad*. Azurdia, C., F. García y M. Ríos (eds). Consejo Nacional de Áreas Protegidas, Guatemala. 646 pp.
- \_\_\_\_\_, C. Williams, D. Williams *et al.* 2011. *Atlas de parientes silvestres de los cultivos de Guatemala*. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y Centro Internacional de Agricultura Tropical. [Aplicación Google Earth]. Disponible en: <<http://www.ars.usda.gov/ba/atlaswrguatemala>> [con acceso el 20 de marzo 2011].
- Becker, W., L. Kleinsmith y J. Hardin. 2007. *El mundo de la célula*. 6ª edición. Pearson Educación, España. 1008 pp.
- Bridg, H. *op. cit.* En: García, S. 2009. *Caracterización agromorfológica de frutos de cuatro especies de Annona en los departamentos de Santa Rosa y Jutiapa*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Ingeniería Agrónoma, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 94 pp.
- Contreras, C. 2003. *Estructura microgeográfica de poblaciones de Anopheles albimanus en Guatemala utilizando ADN microsatélite*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Bioquímica, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Convention on Biological Diversity. 2011. *Country profiles: Guatemala*. In: <http://www.cbd.int/countries/profile.shtml?country=gt#status> [Accessed on November 08 of 2011].
- Escribano, P., M. Viruel and J. Hormaza. 2004. *Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (Annona cherimola Mill., Annonaceae)*. Molecular Ecology Notes 4:746-748.
- Garcia, S. 2009. *Caracterización agromorfológica de futos de cuatro especies de Annona en los departamentos de Santa Rosa y Jutiapa*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Ingeniería Agrónoma, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 94 pp.

- Gielly, L. and P. taberlet. 1994. *The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences*. *Molecular Biology and Evolution* 11(5):769-777.
- Goremykin, V., K. Hirsch-Ernst, S. Wölfl and F. Hellwig. 2003. *The chloroplast genome of the "basal" angiosperm Calycanthus fertilis –structural and phylogenetic analyses*. *Plant Systematics and Evolution* 242:119-135.
- Hamilton, M. 2009. *Population genetics*. Wiley-Blackwell, United Kingdom. 407 pp.
- Hernández, J. y J. León *op.cit.* En: García, S. 2009. *Caracterización agromorfológica de frutos de cuatro especies de Annona en los departamentos de Santa Rosa y Jutiapa*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Ingeniería Agrónoma, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 94 pp.
- Huelsenbeck, J. and F. Ronquist. 2001. *MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees*. *Bioinformatics* 8 (17): 754-755.
- Kwapata, K., W. Mwase, J. Bokosi *et al.* 2007. *Genetic diversity of Annona senegalensis Pers. populations as revealed by simple sequence repeats (SSRs)*. *African Journal of Biotechnology* 10(6):1239-1247.
- Martinez, E. y V. Martínez *op. cit.* En: García, S. 2009. *Caracterización agromorfológica de frutos de cuatro especies de Annona en los departamentos de Santa Rosa y Jutiapa*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Ingeniería Agrónoma, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 94 pp.
- McDonald, D. *op.cit.* En: Contreras, C. 2003. *Estructura microgeográfica de poblaciones de Anopheles albimanus en Guatemala utilizando ADN microsatélite*. Trabajo de Graduación de Licenciatura en Bioquímica, Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 144 pp.
- Murillo, J. 2001. *Las annonaceae de Colombia*. *Biota Colombiana* 2(1):49-58.
- Murray, M. y G. Thompson. 1980. *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. *Nucleic Acids Research* 8 (19):4321-4325.
- Narváez-Trujillo, A., J. Barreiro and R. Morales. 2007. *Tracing the genetic base of cherimoya (Annona cherimola) commercial cultivars through AFLP analysis of diversity at the species' putative center of origin*. En: Proc. IS on

- Biotechnolo. Temp. Fruit Crops & Tropical species. R. Litz and R. Scorza (eds). Acta Hort. 738: 459-466.
- Orellana, A. y E. Martínez. 2001. *Distribución geográfica de anonáceas en Guatemala*. ICTA, Guatemala. 23 pp.
- Osorio, E., G. Arango, N. Jiménez *et al.* 2007. *Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae*. Journal of Ethnopharmacology 111:630-635.
- Palmieri, M., F. Mejía, M. Stephenson *et al.* 2008. *Caracterización molecular y fenotípica de variedades altas de cocoteros (Cocos nucifera L.) en la costa sur de Guatemala*. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala. 118 pp.
- Pereira, M., L. Bandeira, A. Blanco *et al.* 2008. *Development of microsatellite markers in Annona crassiflora Mart., a Brazilian Cerrado fruit tree species*. Molecular ecology Resources 8:1329-1331.
- Petit, R., E. Pineau, B. Demesure *et al.* 1997. *Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks*. Proceedings of the National Academy of Sciences 94:9996-10001.
- Provan, J., W. Powell and P. Hollingsworth. 2001. *Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution*. TRENDS in Ecology & Evolution 3 (16):142-147.
- Rahman, M., T. Shimada, T. Yamamoto and others. 1998. *Genetical diversity of cherimoya cultivars revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis*. Breeding Science 48:5-10.
- Richardson, J., L. Chatrou, J. Mols *et al.* 2004. *Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae*. Philosophical transactions of the Royal Society of London Biological Sciences 359:1495-1508.
- Ronquist, F. y J. Huelsenbeck. 2003. *MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models*. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Saeki, I. and N. Murakami. 2009. *Chloroplast DNA phylogeography of the endangered Japanese red maple (Acer pycnanthum): the spatial configuration of wetlands shapes genetic diversity*. Diversity and Distributions 15:917-927.

- Simpson, M. 2006. *Plant Systematics*. Elsevier, Canadá. 590 pp.
- Standley, P.C. and L.O. Williams. 1975. *Flora of Guatemala*. Volume 4. Field Museum of Natural History, United States. 493 pp.
- Su, Y., G. Smith and R. Saunders. 2008. *Phylogeny of the basal angiosperm genus Pseuduvaria (Annonaceae) inferred from five chloroplast DNA regions, with interpretation of morphological character evolution*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48:188-206.
- Swofford, D., G. Olsen, P. Waddell and D. Hillis. 1996. *Phylogenetic inference*. In: *Molecular systematics*. 2<sup>nd</sup> edition. D. Hillis, C. Moritz and B. Mable (eds.) Sinauer, United States. 655pp.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou and J. Bouvet. 1991. *Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA*. *Plant Molecular Biology* 17:1105-1109.
- Tamura K., D. Peterson, N. Peterson and others. 2011. *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods*. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Van Zonneveld, M., X. Scheldeman, P. Escibano and others. 2012. *Mapping Genetic Diversity of Cherimoya (Annona cherimola Mill.): Application of Spatial Analysis for Conservation and Use of Plant Genetic Resources*. *PloS One* 1(7):1-14.
- Vivero, J., M. Szejner, J. Gordon and G. Magin. 2006. *The Red List of Trees of Guatemala*. Fauna & Flora International, United Kingdom. 48pp.



## VIII. APÉNDICES

### A. Protocolos de extracción y purificación

#### 1. Protocolo de extracción de ADN genómico total con solución amortiguadora CTAB

- Se colocó abundante tejido congelado en un mortero previamente desinfectado con etanol al 70% y enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Se maceró el tejido agregando cantidad suficiente de nitrógeno líquido y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Se agregó 10 ml de solución amortiguadora CTAB (ver Apéndice 2) con  $\beta$ -mercapto pre-calentado a  $55^{\circ}$  y se mezcló. Se transfirió únicamente 6 ml del homogenizado a un tubo para centrifuga de 15 ml. Si el homogenizado era muy pastoso se transfirieron 7 ml.
- En el tubo con el macerado se agregó una punta de espátula de PVP-40 y se mezcló.
- Se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  por 40 min, y cada 10 minutos se agitaba bien cada tubo.
- Se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. Se agitó por inversión 1 min, liberando el gas.
- Se centrifugó a 10,900 rcf por 20 min a  $10^{\circ}\text{C}$ .
- El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo cónico de 15 ml. Si el sobrenadante no estaba completamente líquido, se transfirió también el líquido viscoso color crema que quedaba como sobrenadante.
- Se agregó 1/10 de volumen de NaOAc 3M pH 5 y 2/3 de volumen de isopropanol. Se invirtió hasta que precipitara. Si no se observaba precipitación, se dejaba incubar 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En extracciones de varios días se detuvo la extracción en este punto, manteniendo las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  no más de una semana.
- Se centrifugó a 10,000 rcf a  $10^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Se eliminó sobrenadante decantando, se secó el tubo con una servilleta.
- Se lavó (sólo se agregó y no se resuspendió) con 500  $\mu\text{l}$  de etanol 70% frío, se incubó 5-15 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó a 10,000 rcf por 3 minutos.

- Se descartó el sobrenadante, se secó el tubo con servilleta. Se dejó secando el pellet a 37°C con el tubo abierto hasta que se evaporara el etanol.
- Se resuspendió en agua estéril (200-800 µl dependiendo del tamaño del pellet), en un tubo de 1.5 ml. Si el pellet no se resuspendía inmediatamente, se dejó incubando a temperatura ambiente, agitando constantemente.
- Se tomó 115 µl del producto resuspendido y se colocó 100 µl en un tubo de 0.5 ml para realizar tratamiento con ARNasa y 15 µl en otro tubo de 0.5 ml para realizar cuantificación y gel de integridad. El producto restante se almacenó precipitándolo anteriormente con 1/10 volumen NaOAc 3M pH 5 y 2/3 de isopropanol.

## **2. Protocolo de purificación de ADN extraído mediante tratamiento con ARNasa**

- Se agregó 5 µl ARNasa 10 mg/ml en tubo de 0.5 ml con 100 µl de producto de extracción, se incubó a 37°C 50 minutos.
- Se agregó 100 µl fenol:cloroformo:isoamilico. Se centrifugó 8 minutos a 12000 rpm.
- Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol 95% y 1/10 de volumen de NaOAc, se almacenó a -20°C. Aquí se detuvo el tratamiento algunas veces, dejando las muestras a -20°C no más de una semana.
- Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante.
- Se agregó 200 µl etanol 70%, desprender el pellet e incubar a 37°C por 5 minutos.
- Se centrifugó a 12,000 rpm por 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a 45°C hasta que se evaporara el etanol.
- Se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril, si el precipitado era muy grande se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril.
- Se transfirió 15 µl de cada ADN+ARNasa a tubo de 0.5 ml para realizar la cuantificación e integridad. El volumen restante se precipitó con 1/10 de

volumen de NaOAc y 2.5 volúmenes de etanol 95%; finalmente se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## B. Recetas para preparación de soluciones amortiguadoras

### 1. Receta para preparación de solución amortiguadora (*buffer*) CTAB 2X

Reactivo	Stock	Vol
Tris-HCl pH 7.8	1M	10mL
EDTA pH 8.0	0.5M	4mL
NaCl	5M	30mL
CTAB	10%	20mL. 2g/100mL
Vol final (aforar H <sub>2</sub> O destilada)		100mL
$\beta$ -mercapto (en fresco, después de autoclave)	14.4M	1%. 1mL

### 2. Receta para preparación de solución amortiguadora (*buffer*) TAE 50X

Reactivo	Cantidad
Tris base	242g
EDTA	16.8g
Ácido acético glacial (agregar hasta que EDTA se haya disuelto)	57.1ml
Vol final (aforar H <sub>2</sub> O destilada)	1L

### 3. Receta para preparación de solución amortiguadora TBE 5X

Reactivo	Cantidad
Trisma base	54.0 g
EDTA disódico	4.65 g
Ácido bórico(i)	27.5 g
Vol final (aforar con agua desmineralizada)	1 L

(i) El ácido bórico se agregó hasta que Trisma base y EDTA disódico se disolvieran en alrededor de 800 ml de agua desmineralizada.

## C. Registros de herbario

### 1. Registros de herbario en el Atlas de parientes silvestres de los cultivos de Guatemala

ID*	Especie	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
1546	<i>Annona cherimola</i>	San Juan Chamelco, A.V.	15.7971	-88.8128	ND
1548	<i>Annona cherimola</i>	Cerca de Maxbal, Barillas	15.9681	-91.30360	1500
1562	<i>Annona cherimola</i>	Tajumulco	15.0405	-91.9716	2300
1549	<i>Annona cherimola</i>	Tajumulco	15.0405	-91.9716	2300
1543	<i>Annona cherimola</i>	Chiantla	15.3511	-91.4483	1930
1558	<i>Annona cherimola</i>	Aguacatán	15.3375	-91.3689	1950
1552	<i>Annona cherimola</i>	Huehuetenango	15.3195	-91.4763	1880
1550	<i>Annona cherimola</i>	Rio Pucal, Huehuetenango	15.2382	-91.4717	1780
1568	<i>Annona cherimola</i>	Momostenango, Totonicapán	14.9681	-91.4389	2220
1562	<i>Annona cherimola</i>	San Pedro, Sololá	14.6665	-91.2848	1900
89	<i>Annona cherimola</i>	San Miguel Uspantán, Quiché	15.3421	-90.8689	1829
85	<i>Annona cherimola</i>	San Miguel Uspantán, Quiché	15.3421	-90.8689	1829
87	<i>Annona cherimola</i>	Cobán –Tactic, A.V.	15.3421	-90.4156	1200
1557	<i>Annona cherimola</i>	Cerca de Cobán, A. V.	15.4681	-90.3783	1300
1569	<i>Annona cherimola</i>	Cerca de Cobán, A. V.	15.4681	-90.3783	1300
1555	<i>Annona cherimola</i>	Cerca de Cobán, A. V.	15.4681	-90.3783	1300
1551	<i>Annona cherimola</i>	Cerca de Cobán	15.4635	-90.3829	1260
1564	<i>Annona cherimola</i>	Cocola, San Pedro Carchá, A.V.	15.5451	-90.2382	1200
1554	<i>Annona cherimola</i>	Chiquimulilla, Santa Rosa	14.0721	-90.3689	150
1556	<i>Annona cherimola</i>	Cerca de Jutiapa	14.2791	-89.8969	850
1567	<i>Annona cherimola</i>	Cerca de Jjalapa	14.6551	-89.9763	1360
1542	<i>Annona cherimola</i>	Jalapa	14.6395	-90.0001	1400
1553	<i>Annona cherimola</i>	San Raymundo, Guatemala	14.7295	-90.6354	1650
1547	<i>Annona cherimola</i>	Chimaltenango	14.7115	-90.7895	1500
94	<i>Annona cherimola</i>	Chimaltenango	14.7115	-90.7895	1500
1560	<i>Annona cherimola</i>	Chimaltenango	14.6351	-90.8176	1830
1565	<i>Annona cherimola</i>	Pastores, Sacatepéquez	14.5945	-90.7522	1560
1563	<i>Annona cherimola</i>	Pastores, Sacatepéquez	14.5945	-90.7522	1560
91	<i>Annona cherimola</i>	Capetillo, Sacatepéquez	14.5405	-90.7475	1311
88	<i>Annona cherimola</i>	Capetillo, Sacatepéquez	14.5405	-90.7475	1311
3195	<i>Annona cherimola</i>	Parque Florencia, Sacatepéquez	14.5675	-90.6681	1700
1566	<i>Annona cherimola</i>	Santa María de Jesús, Sacatepéquez	14.5001	-90.7055	1800
2887	<i>Annona glabra</i>	Tikal, Petén	17.2025	-89.6168	ND
99	<i>Annona glabra</i>	Cuyuta	14.1035	-90.8736	61
3197	<i>Annona glabra</i>	Taxisco, Santa Rosa	13.8915	-90.4857	2
2291	<i>Annona glabra</i>	Puerto Méndez	15.8691	-89.2428	ND
1572	<i>Annona glabra</i>	Izabal	15.3375	-89.0374	65
95	<i>Annona glabra</i>	Orilla de Lago Izabal	15.4365	-89.0747	ND
98	<i>Annona glabra</i>	Jacolo, Lago Izabal	15.4411	-89.0607	46
1576	<i>Annona glabra</i>	Morales, Izabal	15.5181	-88.7991	35

ID*	Especie	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
1574	<i>Annona glabra</i>	Lago Izabal	15.6441	-88.9857	25
1578	<i>Annona glabra</i>	Lago Izabal	15.6441	-88.9857	25
2290	<i>Annona glabra</i>	Río Dulce	15.6665	-88.9927	1
1573	<i>Annona glabra</i>	Río Dulce	15.7971	-88.8128	0
97	<i>Annona glabra</i>	Río Dulce	15.8241	-88.7521	0
1575	<i>Annona glabra</i>	Puerto Barrios	15.7251	-88.6027	0
1577	<i>Annona glabra</i>	Alrededores de Izabal	15.7071	-88.5981	0
2788	<i>Annona scleroderma</i>	Santo Toribio	16.6171	-89.5281	ND
1619	<i>Annona scleroderma</i>	Poptún, Petén	16.3195	-89.4156	ND
2789	<i>Annona scleroderma</i>	Río la Pasión, Petén	16.3915	-90.1868	ND
1621	<i>Annona scleroderma</i>	Chiblac	15.8375	-91.1868	1800
1617	<i>Annona scleroderma</i>	Ixcán	15.8781	-91.1307	150
141	<i>Annona scleroderma</i>	Chamá	15.8781	-90.3036	274
138	<i>Annona scleroderma</i>	Cerro Ceibal	16.0135	-90.0467	75
1618	<i>Annona scleroderma</i>	Finca Yalpemech	16.0135	-90.0701	50
142	<i>Annona scleroderma</i>	Cahabón	15.6081	-89.8129	ND
140	<i>Annona scleroderma</i>	Jocolo	15.4411	-89.0607	ND
2289	<i>Annona scleroderma</i>	Montañas del Mico	15.6845	-88.6728	600
139	<i>Annona scleroderma</i>	Cerro San Gil	15.6755	-88.6728	ND
1580	<i>Annona diversifolia</i>	Guatemala	14.7251	-90.3889	1110
487	<i>Annona primigenia</i>	Escuintla	14.3871	-90.8362	770
104	<i>Annona primigenia</i>	Lanquín	15.5631	-89.9763	600
2793	<i>Annona primigenia</i>	Seamay	16.0541	-89.5001	ND
2805	<i>Annona primigenia</i>	Los Arcos	16.4455	-89.4341	ND
3210	<i>Annona primigenia</i>	Dolores	16.5009	-89.4203	ND
2800	<i>Annona primigenia</i>	Santo Toribio	16.6035	-89.5181	ND
127	<i>Annona primigenia</i>	Lacandón	17.1081	-91.1821	450
2791	<i>Annona primigenia</i>	Lacandón	17.1081	-91.1821	450
2809	<i>Annona primigenia</i>	La Pita	17.6125	-90.4343	ND
1587	<i>Annona primigenia</i>	Carmelita	17.4591	-90.0467	ND
3209	<i>Annona primigenia</i>	Dos lagunas	17.6755	-89.6168	ND
2811	<i>Annona primigenia</i>	Dos lagunas	17.6981	-89.5327	ND
2807	<i>Annona primigenia</i>	Dos lagunas	17.6711	-89.5187	ND
2806	<i>Annona primigenia</i>	Dos lagunas	17.6215	-89.5387	ND
2892	<i>Annona primigenia</i>	Tikal	17.3061	-89.6214	ND
2801	<i>Annona primigenia</i>	Tikal	17.2025	-89.6168	ND
2790	<i>Annona primigenia</i>	Tikal	17.1575	-89.6494	ND
2797	<i>Annona primigenia</i>	Tikal	17.1575	-89.6635	ND
1586	<i>Annona primigenia</i>	Tikal	17.0911	-89.6868	ND
2890	<i>Annona primigenia</i>	Camino Fallabón-Yaxhá	17.0855	-89.3829	ND
3199	<i>Annona primigenia</i>	Flores, Yaxhá	17.0451	-89.3829	150
2810	<i>Annona primigenia</i>	Macanche	16.9545	-89.6401	ND
2894	<i>Annona primigenia</i>	Santa Elena	16.8915	-89.7662	ND
1591	<i>Annona primigenia</i>	Santa Ana	16.7991	-89.8222	ND
2796	<i>Annona primigenia</i>	Santa Elena	16.8961	-89.8829	ND
2895	<i>Annona primigenia</i>	Santa Elena	16.8601	-89.9904	ND

ID*	Especie	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
2893	<i>Annona primigenia</i>	Santa Elena	16.8241	-90.0187	ND
2804	<i>Annona primigenia</i>	Lago Petén Itzá	16.977	-89.8736	ND
2795	<i>Annona primigenia</i>	Lago Petén Itzá	17.0091	-89.8269	ND
2781	<i>Annona purpurea</i>	Santo Toribio	16.6035	-89.5187	ND
4	<i>Annona purpurea</i>	Jocolo	15.4411	-89.0607	ND
6	<i>Annona purpurea</i>	Entre Lanquín y Cahabón	15.5945	-89.8783	ND
7	<i>Annona purpurea</i>	Cucanhá, cerca Tukurú	15.2881	-90.1261	ND
109	<i>Annona reticulata</i>	Uaxactún	17.3871	-89.6401	ND
1611	<i>Annona reticulata</i>	Uaxactún	17.3961	-89.6167	ND
125	<i>Annona reticulata</i>	Tikal	17.2025	-89.6168	ND
3204	<i>Annona reticulata</i>	Tikal	17.1575	-89.6494	ND
133	<i>Annona reticulata</i>	Laguna Yaxhá	17.0451	-89.3829	ND
3203	<i>Annona reticulata</i>	Lago Petén Itzá	16.977	-89.8736	ND
2794	<i>Annona reticulata</i>	Santa Elena	16.8781	-89.9391	ND
2896	<i>Annona reticulata</i>	Santa Elena	16.9005	-89.7102	ND
1615	<i>Annona reticulata</i>	Ixcán	15.9645	-91.1214	ND
1610	<i>Annona reticulata</i>	Nentón	15.8001	-91.7501	ND
1597	<i>Annona reticulata</i>	Santa Ana Huista	15.6711	-91.8175	ND
122	<i>Annona reticulata</i>	Democracia	15.6395	-91.8829	ND
1599	<i>Annona reticulata</i>	Volcán Tajumulco	14.9455	-91.9062	ND
1600	<i>Annona reticulata</i>	Retalhuleu	14.5271	-91.6868	ND
1605	<i>Annona reticulata</i>	Talculán	14.5361	-91.7195	300
1598	<i>Annona reticulata</i>	Cocales	14.3961	-91.1961	215
1601	<i>Annona reticulata</i>	Masagua	14.1261	-90.8829	75
111	<i>Annona reticulata</i>	Buena Vista	13.8285	-90.3082	ND
1607	<i>Annona reticulata</i>	Chiquimulilla	14.0721	-90.3689	150
1609	<i>Annona reticulata</i>	Cuilapa	14.2941	-90.2941	900
121	<i>Annona reticulata</i>	Cerca de Cuilapa	14.2701	-90.2942	895
1608	<i>Annona reticulata</i>	Este de Cuilapa	14.2745	-90.2895	900
1613	<i>Annona reticulata</i>	Este de Jutiapa	14.2925	-89.8969	800
1612	<i>Annona reticulata</i>	Alrededores de Jutiapa	14.2791	-89.8969	850
1604	<i>Annona reticulata</i>	Jutiapa	14.3105	-89.8876	800
1602	<i>Annona reticulata</i>	Entre Ciuda de Guatemala y Rabinal	14.8735	-90.5841	300
115	<i>Annona reticulata</i>	Entre Salamá y Rabinal	15.1081	-90.4529	ND
1614	<i>Annona reticulata</i>	Barranquillo	14.8511	-90.1261	650
119	<i>Annona reticulata</i>	El Progreso	14.8601	-90.0701	518
117	<i>Annona reticulata</i>	Sierra de las Minas, El Rancho	14.9095	-90.0187	671
118	<i>Annona reticulata</i>	Sierra de las Minas, El Rancho	14.9411	-89.9671	457
112	<i>Annona reticulata</i>	Sepacuite	15.4767	-89.7711	ND
114	<i>Annona reticulata</i>	Secanquim	15.5361	-89.7662	250
113	<i>Annona reticulata</i>	Entre Lanquín y Cahabón	15.5945	-89.8783	ND
2813	<i>Annona volubilis</i>	La Cumbre	16.3421	-89.4249	ND
2288	<i>Annona volubilis</i>	Río Sebol	15.8331	-89.9249	ND

\*ID es el código asignado en el atlas. ND=No disponible

## 2. Registros de *Annona* en el herbario UVAL de la Universidad del Valle de Guatemala

ID*	Especie	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud	Fecha de colecta
541	<i>Annona cherimola</i>	San Lucas Tolimán, Sololá	14°37'59''	-91°08'54''	1650	14/04/1991
11610	<i>Annona cherimola</i>	Chimaltenango, Chimaltenango	14°40'	-90°49'	2220	25/08/2000
14483	<i>Annona diversifolia</i>	Samayac, Suchitepéquez	14°35'05''	-91°27'38''	550	24/06/2003
129	<i>Annona diversifolia</i>	Finca "El Paraíso", Patulul, Suchitepéquez	14°25'08''	-91°09'	400	19/06/1988
9003	<i>Annona glabra</i>	Camino a la calera, Guatemala	14°38'06''	-90°28'10''	1500	27/08/1996
7593	<i>Annona glabra</i>	Muelle Puntarenas, Río Dulce, Izabal	15°43'29''	-88°55'36''	50	06/03/1998
14688	<i>Annona glabra</i>	Biotopo Chocón Machacas, Izabal	15°45'50''	-88°53'14''	50	03/05/2001
4908	<i>Annona glabra</i>	Laguna Salvador, Biotopo Chocón Machacas, Izabal	15°47'29''	-88°57'39''	50	15/07/1995
2088	<i>Annona muricata</i>	Zona 14, Guatemala	14°35'23''	-90°31'01''	1510	08/06/1993
2222	<i>Annona muricata</i>	La Unión, Zacapa	14°58'	-89°17'	1400	23/05/1993
4906	<i>Annona muricata</i>	El Estor, Izabal	15°31'38''	-89°20'09''	50	16/06/1995
9630	<i>Annona primigenia</i>	El Caoba, El Petén	17.3915	-90.6214	160	20/02/1999
9558	<i>Annona primigenia</i>	Río Dolores, Alta Verapaz	15°42'38''	-90°26'28''	340	06/08/1997
14467	<i>Annona purpurea</i>	Samayac, Suchitepéquez	14°35'05''	-91°27'38''	550	24/06/2003
10862	<i>Annona scleroderma</i>	Paraiso, Sierra de las Minas, Izabal	15°14'29''	-89°31'27''	550	14/02/2000
4156	<i>Annona scleroderma</i>	Camino a Nakún, Yaxhá, Petén	17°02'35''	-89°20'21''	250	25/06/1994
4977586	<i>Annona scleroderma</i>	Montañas del Mico, 7-8km O de Santo Tomás de Castilla	15°40'50''	-88°40'13''	625	19/08/1988
13728	<i>Annona squamosa</i>	San José, Petén	17°00'50''	-89°49'55''	150	¿?/06/2001
18276	<i>Annona volubilis</i>	Río Sebol, Alta Verapaz	15°48'19''	-89°56'43''	150	30/07/1964
16044	<i>Annona sp</i>	Finca San Julián, Patulul, Suchitepéquez	14°27'50''	-91°7'56''	450	14/10/2006

\*Número de registro asignado en el herbario UVAL

### 3. Información de individuos de *Annona* colectados y utilizados en la caracterización molecular

No	ID	Especie	Lugar	N	W	Altura (msnm)	Fecha de colecta	Observaciones y ubicación del árbol
1	3	<i>Annona cherimola</i>	Santiago, Sacátepequez	14.6093	-90.6644	2021	08/11/2010	Orilla de carretera, Proceso en lab.
2	4	<i>Annona cherimola</i>	Chimaltenango	14.6457	-90.8744	2025	08/11/2010	Esqueje descartado/Hojas en proceso, orilla de carretera
3	7	<i>Annona cherimola</i>	Sn. José Poaquil, Chimaltenango	14.82335	-90.89265	2021	08/11/2010	En Cerco
4	14	<i>Annona macrophyllata</i>	El Rancho, El Progreso	14.91619	-90.00433	1240	14/02/2011	Proceso en laboratorio, En casa
5	17	<i>Annona macrophyllata</i>	Aldea el Limonar, Jacaltenango	15.7686	-91.8248	774	21/03/2011	Papausa
6	18	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón	15.8789	-91.6658	1654	22/03/2011	En casa
7	19	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón	15.8789	-91.6658	1654	22/03/2011	En casa
8	24	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón	15.87805	-91.6662	1654	22/03/2011	quebex, cementerio
9	26	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón	15.87805	-91.6662	1654	22/03/2011	Cementerio
10	27	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Subajasum, Nentón	15.89501	-91.6627	1654	22/03/2011	Entrada aldea
11	29	<i>Annona macrophyllata</i>	La Memelita, Nentón	15.8353	-91.7571	968	22/03/2011	Papausa morada
12	30	<i>Annona squamosa</i>	La Memelita, Nentón	15.8384	-91.7523	968	22/03/2011	anona silvestre
13	32	<i>Annona macrophyllata</i>	Catarina	15.7775	-91.7878	837	23/03/2011	Papausa morada
14	36	<i>Annona cherimola</i>	Jacaltenango, Huehue	15.667	-91.7111	1446	23/03/2011	anona, en casa
15	38	<i>Annona reticulata</i>	Nentón, Huehuetenango	15.8011	-91.7561	789	22/03/2011	anona silvestre
16	40	<i>Annona purpurea</i>	ICTA, Masagua, Escuintla	14.759	-90.978	46	29/03/2011	sincuya, cultivada
17	41	<i>Annona reticulata</i>	ICTA, Masagua, Escuintla	14.759	-90.978	46	29/03/2011	anona criolla, cultivada
18	46	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal	15.71402	-88.6699	5	18/04/2011	Silvestre, entre manglar
19	47	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal	15.71404	-88.86679	5	18/04/2011	Silvestre, entre manglar
20	48	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal	15.71372	-88.86666	5	18/04/2011	Silvestre, entre manglar
21	49	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal	15.171362	-88.86609	5	18/04/2011	Silvestre, entre manglar
22	50	<i>Annona glabra</i>	El Golfete, Izabal	15.171362	-88.86609	5	18/04/2011	Silvestre, entre manglar
23	56	<i>Annona squamosa</i>	PROESUR, Escuintla	14.333	-91.017		2011	
24	57	<i>Annona cherimola</i>	San José Pinula	14.53974	-90.40564	1665	03/07/2011	
25	58	<i>Annona cherimola</i>	Agua Tibia, hacia Mataquesuintla	14.54151	-90.37019	1672	03/07/2011	
26	60	<i>Annona cherimola</i>	Fca. Las Minas, Mataquesuintla	14.54456	-90.32671	2109	03/07/2011	



No	ID	Especie	Lugar	N	W	Altura (msnm)	Fecha de colecta	Observaciones y ubicación del árbol
27	61	<i>Annona cherimola</i>	Fca. Las Minas, Mataquescuintla	14.54314	-90.32412	2064	03/07/2011	
28	63	<i>Annona cherimola</i>	Sn Carlos Sija, Quetzaltenango	15.17889	-91.55041	2045	29/06/2011	Orilla de carretera
29	64	<i>Annona cherimola</i>	Sn Sebastián, Huehuetenango	15.37763	-91.59927	1742	29/06/2011	anona, puente Selegua
30	69	<i>Annona cherimola</i>	San Antonio Huista, Huehue	15.76624	-91.84681	1128	29/06/2011	Monaji, km 358.8
31	70	<i>Annona cherimola</i>	San Antonio Huista, Huehue	15.66344	-91.79482	1101	30/06/2011	un árbol de papausa cerca, Cantón el Progreso
32	72	<i>Annona cherimola</i>	Jacaltenango, Huehue	15.65493	-91.73833	1748	30/06/2011	Entrada jacaltenango
33	73	<i>Annona muricata</i>	El Rancho, El Progreso	14.53816	-90.39962	292	04/07/2011	Cerca de casas
34	75	<i>Annona muricata</i>	El Rancho, El Progreso	14.91176	-90.00015	306	04/07/2011	Dentro de casa
35	76	<i>Annona reticulata</i>	El Rancho, El Progreso	14.91117	-90.00049	304	04/07/2011	árbol viejo
36	77	<i>Annona macrophyllata</i>	San Esteban, Chiquimula	14.9154	-90.00057	432	04/07/2011	
37	78	<i>Annona purpurea</i>	Ostuman, Copán Ruinas, Honduras	14.86574	-89.26007	583	04/07/2011	A orilla del camino
38	82	<i>Annona muricata</i>	Barrio El Campo, Ipala	14.62688	-89.63718	796	06/07/2011	
39	83	<i>Annona reticulata</i>	Camino a Sn Luis Jilotepeque, Ipala	14.61924	-89.69197	762	06/07/2011	km 207+900
40	85	<i>Annona cherimola</i>	Aldea El límite, San Luis Pinula	14.66586	-89.77039	1317	06/07/2011	Entrada en una casa
41	88	<i>Annona cherimola</i>	Aldea El Durazno, San Pedro Pinula	14.65796	-89.7879	1619	06/07/2011	
42	95	<i>Annona cherimola</i>	Aldea Damián, Jalapa	14.52854	-89.8245	1037	06/07/2011	
43	96	<i>Annona macrophyllata</i>	Aldea Damián, Jalapa	14.52854	-89.8245	1037	06/07/2011	
44	97	<i>Annona reticulata</i>	Adelante Aldea Damián, Jalapa	14.52397	-89.81982	1074	06/07/2011	árbol joven
45	100	<i>Annona cherimola</i>	María Montañas, Jalapa	14.3568	-89.9728	1428	06/07/2011	
46	104	<i>Annona cherimola</i>	La tablita	14.39087	-90.10931	1577	06/07/2011	
47	107	<i>Magnolia sp.</i>	Universidad del Valle de Guatemala	14.6041	-90.4889	1531	23/04/2012	
48	108	<i>Cananga odorata</i>	Mazatenango, Suchitepéquez	14.533	-91.500	375	22/04/2012	En casa

## D. Cuantificación de ADN por espectrofotometría

1. **Cuantificación de producto de extracción.** En el Cuadro se muestran los promedios de concentración y relación de absorbancias (a 230, 260 y 280 nm) de los productos de extracción. El total de individuos se muestra en la casilla “N”.

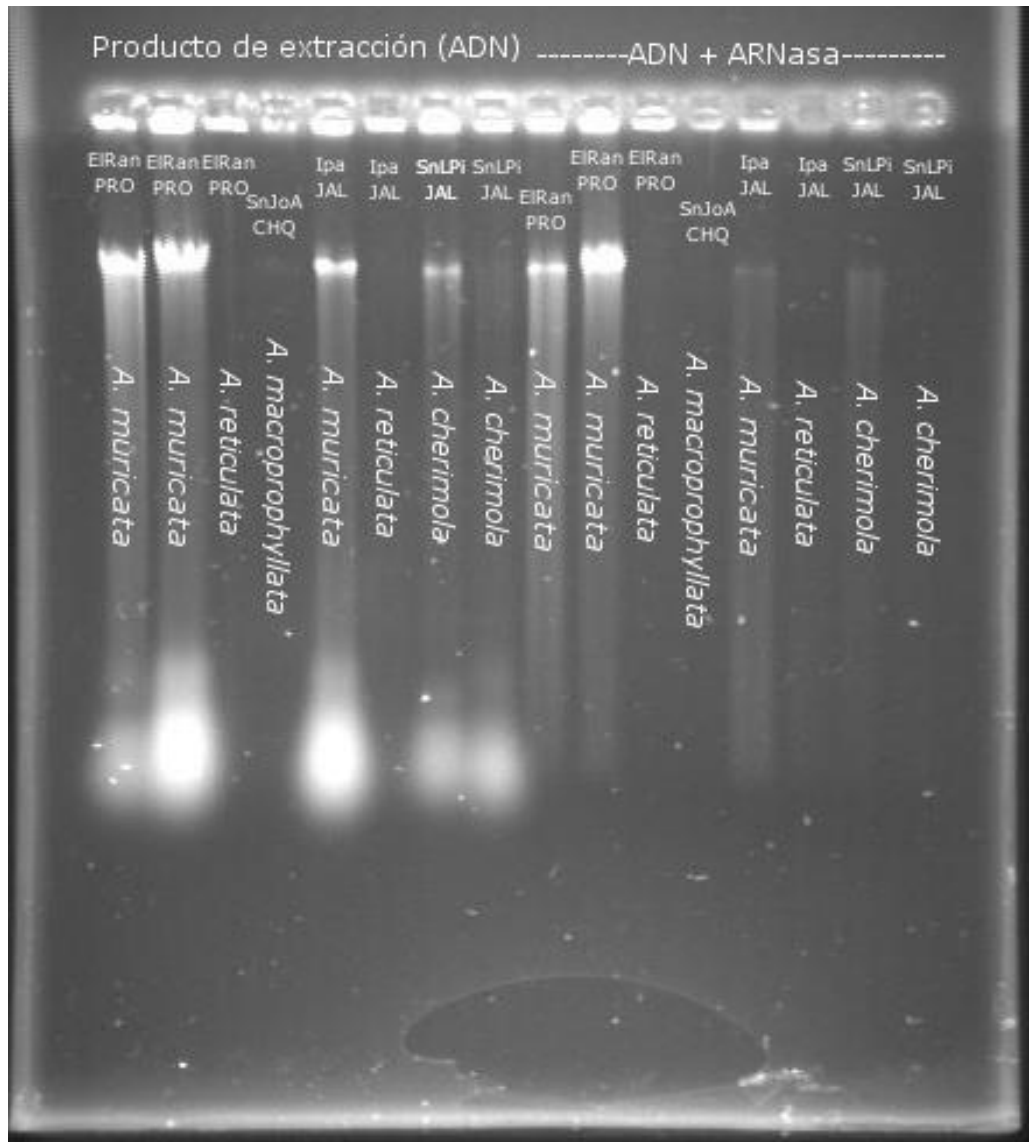
Especie	Concentración ng/μl	260/280	260/230	N
<i>A. cherimola</i>	509.9	1.67	0.86	48
<i>A. glabra</i>	275.2	2.30	0.22	5
<i>A. macrophyllata</i>	282.1	2.03	0.47	18
<i>A. muricata</i>	300.0	2.11	0.51	5
<i>A. purpurea</i>	134.5	1.71	0.88	2
<i>A. reticulata</i>	270.5	1.77	0.31	7
<i>A. squamosa</i>	344.4	1.71	0.44	3

2. **Cuantificación de producto de extracción posterior a tratamiento con ARNasa.** En el Cuadro se muestran los promedios de concentración y relación de absorbancias (a 230, 260 y 280 nm) de los productos de extracción después del tratamiento con ARNasa.

Especie	Concentración ng/ μl	260/280	260/230	N
<i>A. cherimola</i>	226.0	1.64	0.69	48
<i>A. glabra</i>	192.4	1.69	1.02	5
<i>A. macrophyllata</i>	285.4	1.47	0.36	18
<i>A. muricata</i>	735.2	1.37	0.58	5
<i>A. purpurea</i>	199.0	1.83	0.38	2
<i>A. reticulata</i>	572.9	1.40	0.58	9
<i>A. squamosa</i>	602.3	1.6	0.8	3

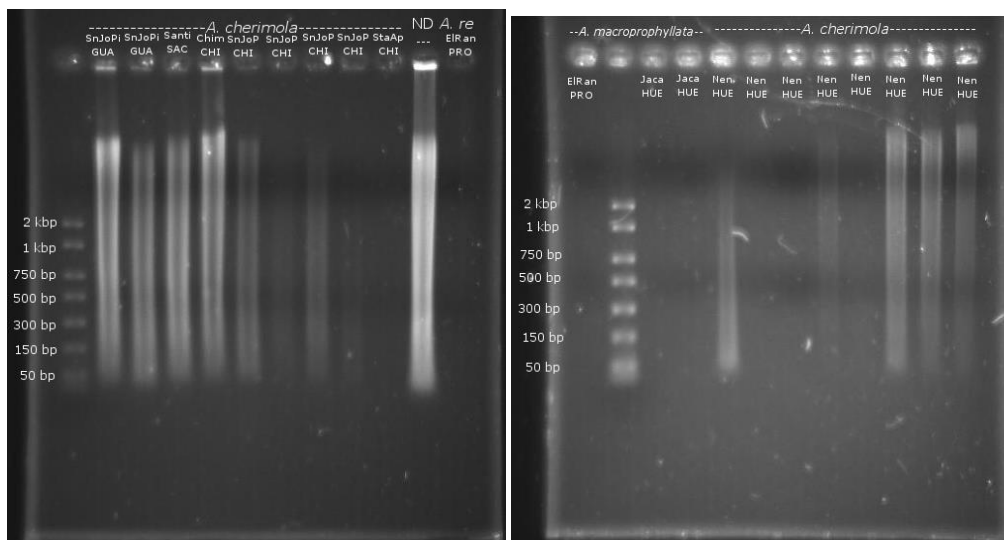
## E. Integridad de ADN por electroforesis en agarosa

### 1. Gel de agarosa al 1% con producto de extracción antes y después del tratamiento con ARNasa



Las especies se muestran en cada carril, las localidades se encuentran en la parte superior. Nótese que las muestras de la derecha no poseen la nube de contaminantes después del tratamiento con ARNasa. EIRan=El Rancho, SnJoA=San José la Arada, Ipa=Ipala, SnLPi=San Luis Pinula, PRO=El Progreso, CHQ=Chiquimula, JAL=Jalapa.

## 2. Geles de integridad de ADN en agarosa al 1%



En los geles se muestran los productos de extracción tratados con ARNasa después de permanecer tres meses almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La especie y las localidades se muestran en la parte más superior del gel. ND=no disponible, *A. re*=*A. reticulata*, SnJoPi=San José Pinula, Santi=Santiago, Chim=Chimaltenango, SnJoP=San José Poaquil, StaAP= Santa Apolonia, ElRan=El Rancho, Jaca=Jacaltenango, Nen=Nentón, GUA=Guatemala, SAC=Sacatepéquez, CHI=Chimaltenango, PRO=El Progreso y HUE=Huehuetenango.

## F. Amplificación de regiones de ADNcp

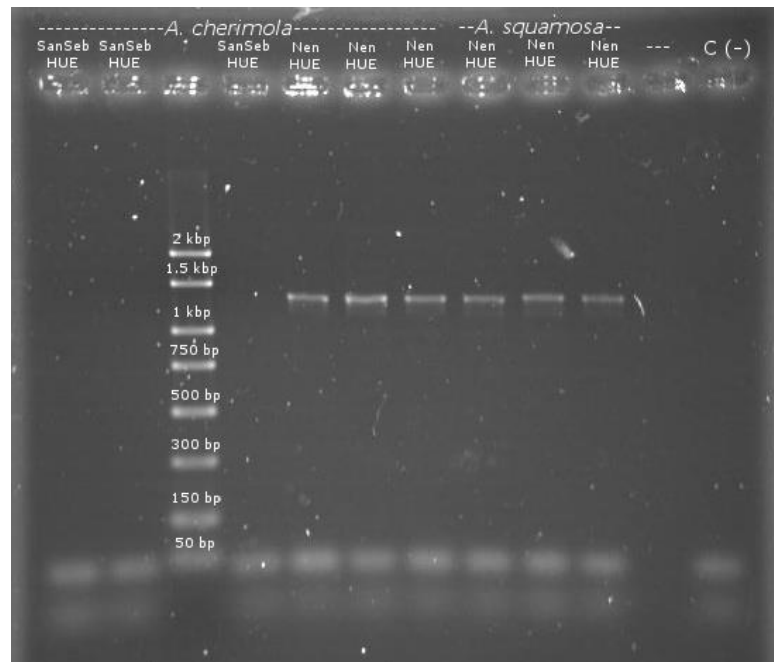
### 1. Programa inicial para termociclador

Paso	Temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Tiempo (minutos)
1. Desnaturalización inicial	94	5
2. Desnaturalización	94	1
3. Anillamiento	51	1
4. Extensión	72	2
5. Ciclos=30 (Pasos 2, 3 y 4).		
6. Extensión final	72	5

### 2. Condiciones iniciales para la preparación de una reacción para la PCR

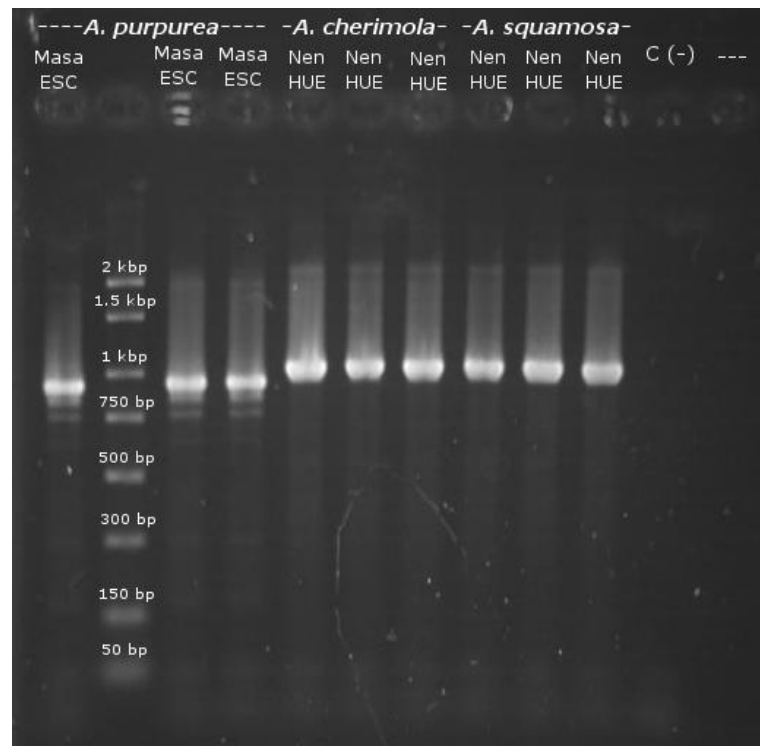
Reactivo	Concentración final	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
H <sub>2</sub> O UV/UP	-	14.8
Buffer 10X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	2.5 mM	2.5
dNTP's	0.125 mM	2
Primer F [100ng/ $\mu\text{l}$ ]	0.66 $\mu\text{M}$	1
Primer R [100ng/ $\mu\text{l}$ ]	0.66 $\mu\text{M}$	1
Taq Polimerasa	1 U	0.2
ADN [15ng/ $\mu\text{l}$ ]	15 ng	1

### 3. Amplificación de la región *trnS-T*



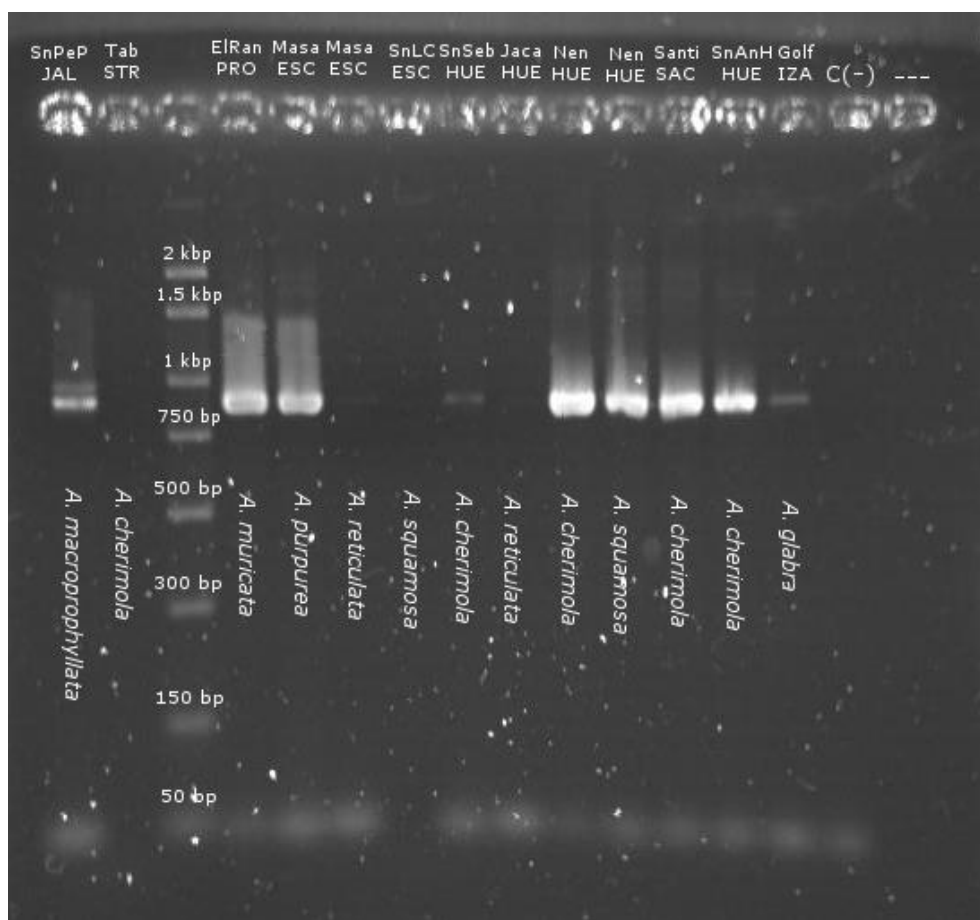
La Figura muestra el gel de agarosa al 1.5% con productos de amplificación. SanSeb=San Sebastián, Nen=Nentón, HUE=Huehuetenango.

### 4. Amplificación de la región *trnL-F*



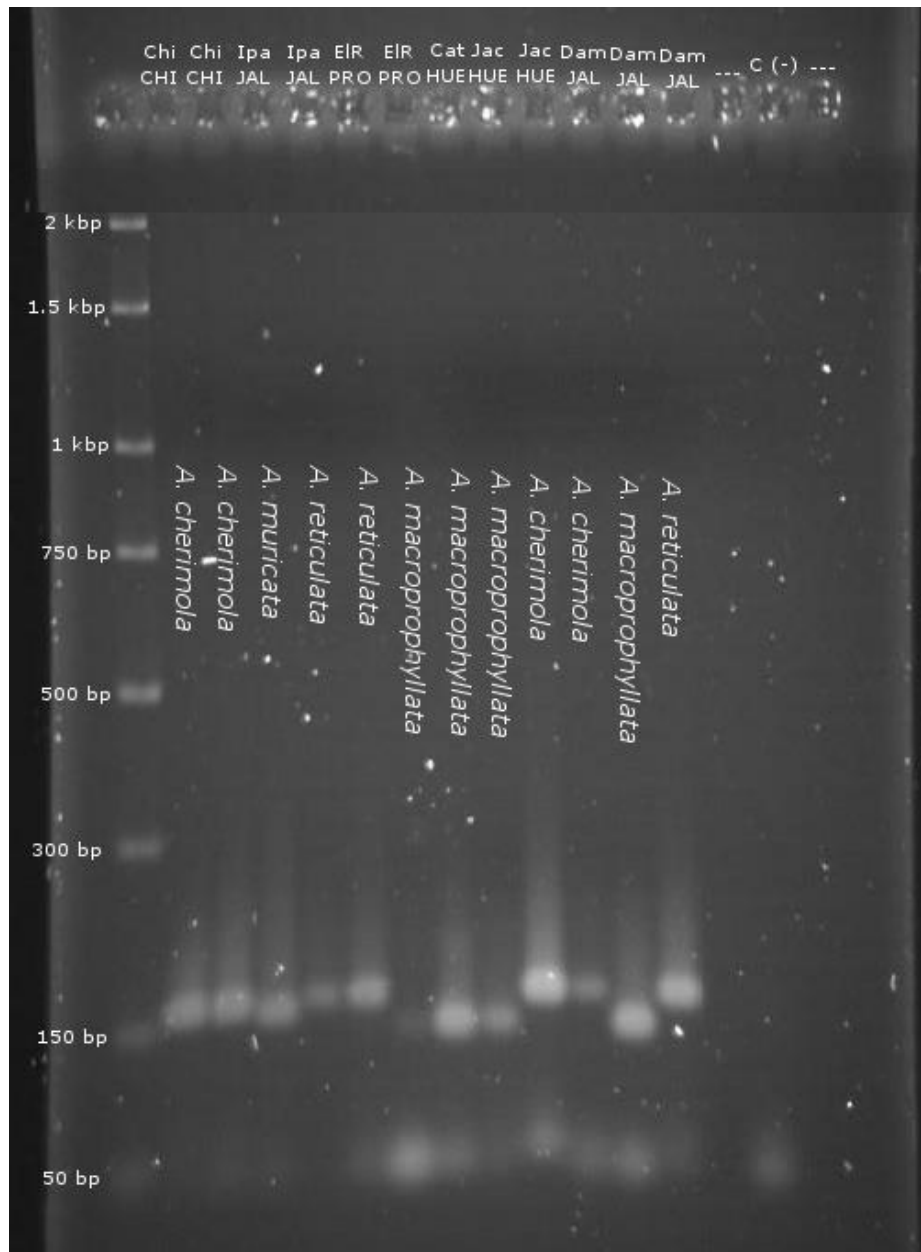
La Figura muestra el gel de agarosa al 1.5% con productos de amplificación. Masa=Masagua, Nen=Nentón, ESC=Escuintla, HUE=Huehuetenango.

## 5. Amplificación del intrón *rpoC1*



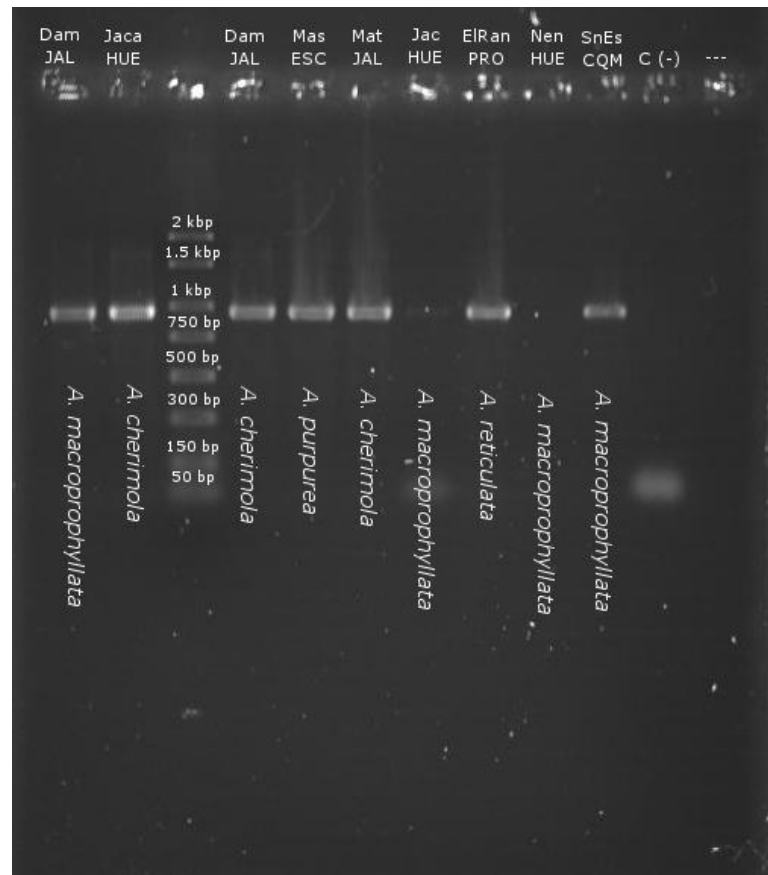
La Figura muestra el gel de agarosa al 1.5% con productos de amplificación. SnPeP=San Pedro Pinula, Tab=El Tablón, ElRan=El Rancho, Masa=Masagua, SnLC=Santa Lucia Cotz., SnSeb=San Sebastián, Jaca=Jacaltenango, Nen=Nentón, Santi=Santiago, SnAnH=San Antonio Huista, Golf=El Golfete, JAL=Jalapa, STR=Santa Rosa, PRO=El Progreso, ESC=Escuintla, HUE=Huehuetenango, SAC=Sacatepéquez, IZA=Izabal.

## 6. Amplificación de la región *atpB-rbcL*



La Figura muestra el gel de agarosa al 2% con productos de amplificación. Chi=Chimaltenango, Ipa=Ipala, EIR=El Rancho, Cat=Catarina, Jac=Jacaltenango, Dam=Damían, CHI=Chimaltenango, JAL=Jalapa, PRO=EL Progreso, HUE=Huehuetenango.

## 7. Amplificación de la región *matK*

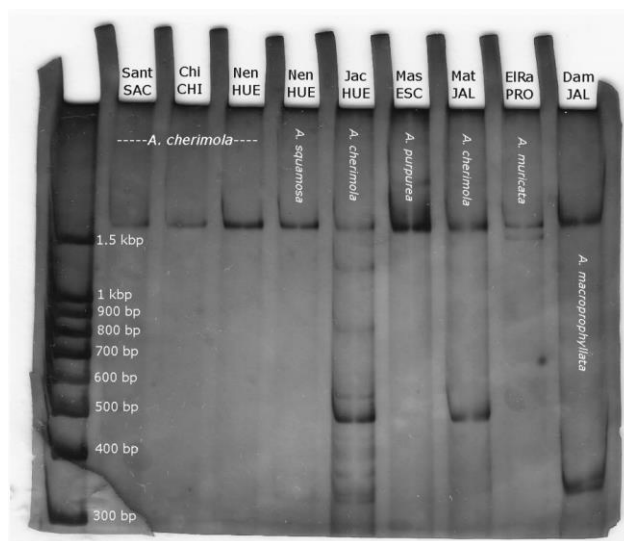


La Figura muestra el gel de agarosa al 1.5% con productos de amplificación. Dam=Damián, Jaca=Jacaltenango, Mas=Masagua, Mat=Mataquesuintla, ElRan=El Rancho, Nen=Nentón, SnEs=San Esteban, JAL=Jalapa, HUE=Huehuetenango, ESC=Escuintla, PRO=El Progreso, CQM=Chiquimula.



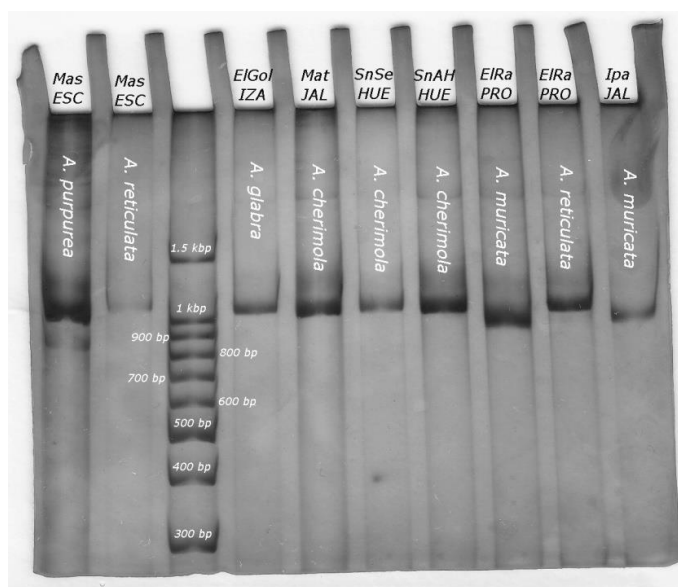
## G. Análisis de electroforesis en poliacrilamida

### 1. Amplificación de la región *trnS-T* en gel de poliacrilamida al 15%



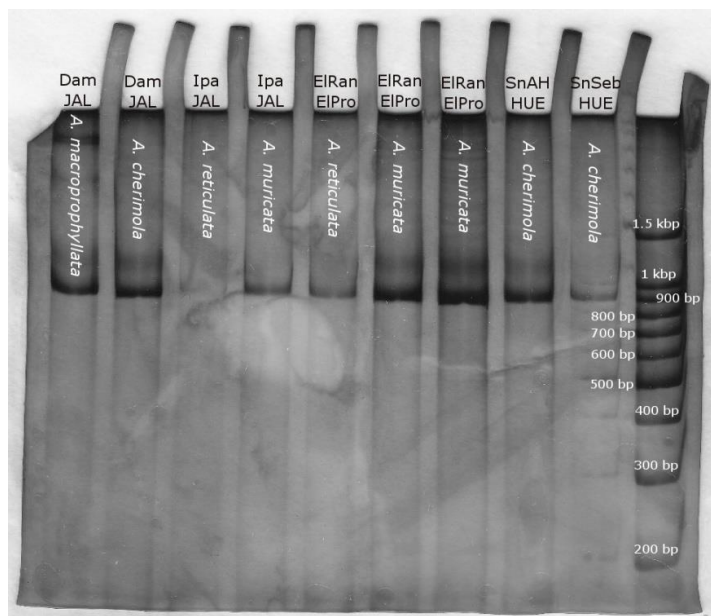
Sant=Santiago, Chi=Chimaltenango, Nen=Nentón, Jac=Jacaltenango, Mas=Masagua, Mat=Mataquesuintla, ElRan=El Rancho, Dam=Damián, SAC=Sacatepéquez, CHI=Chimaltenango, HUE=Huehuetenango, ESC=Escuintla, JAL=Jalapa, PRO=El Progreso.

### 2. Amplificación de la región *trnL-F* en gel de poliacrilamida al 15%



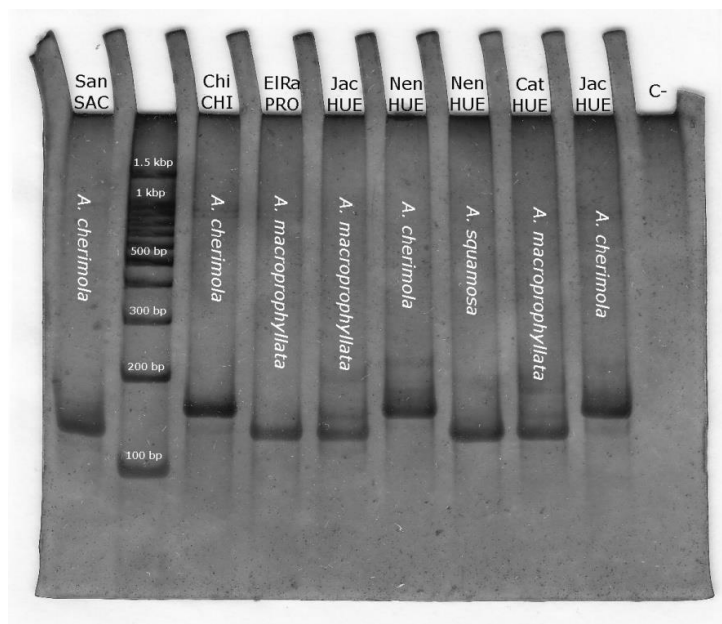
Mas=Masagua, ElGol=El Golfete, Mat=Mataquesuintla, SnSe=San Sebastián, ElRa=El Rancho, Ipa=Ipala, ESC=Escuintla, IZA=Izabal, JAL=Jalapa, HUE=Huehuetenango, PRO=El Progreso.

### 3. Amplificación del intón *rpoC1* en gel de poliacrilamida al 15%



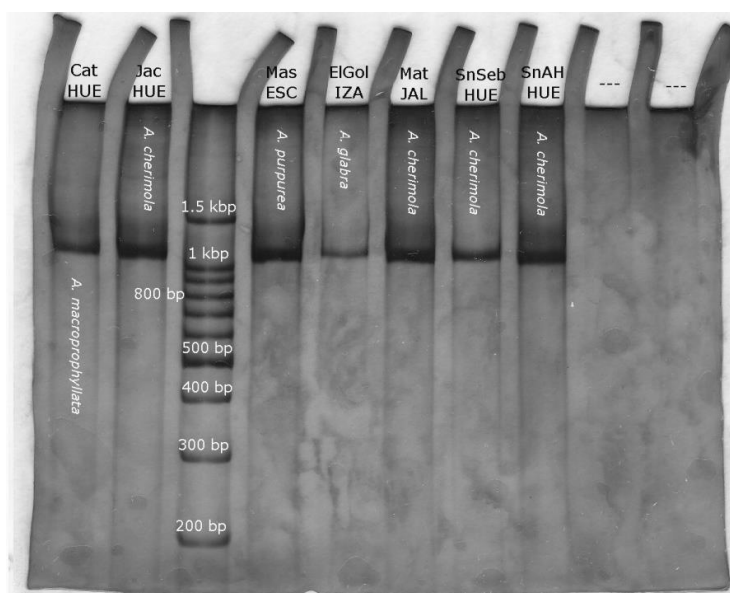
Dam=Damián, SnAH=San Antonio Huista, SnSeb=San Sebastián, ElRan=El Rancho, Ipa=Ipala, JAL=Jalapa, HUE=Huehuetenango, ElPro=El Progreso.

### 4. Amplificación de la región *atpB-rbcL* en gel de poliacrilamida al 15%



Sant=Santiago, Chi=Chimaltenango, Nen=Nentón, Jac=Jacaltenango, ElRan=El Rancho, Cat=Catarina, SAC=Sacatepéquez, CHI=Chimaltenango, HUE=Huehuetenango, PRO=El Progreso, C-=Control negativo.

## 5. Amplificación de la región *matK* en gel de poliacrilamida al 15%



Cat=Catarina, Jac=Jacaltenango Mas=Masagua, ElGol=El Golfete, Mat=Mataquesuintla, SnSeb=San Sebastián, SnAH=San Antonio Huista, ESC=Escuintla, IZA=Izabal, JAL=Jalapa, HUE=Huehuetenango.

## 6. Estadísticos de análisis de varianzas de largos de fragmentos de la región *trnS-T*

Los estadísticos fueron obtenidos mediante SPSS 17.0. 1=*A. cherimola*, 2=*A. macrophyllata*, 3=*A. muricata*, 4=*A. reticulata*, 5=*A. squamosa*, 6=*A. glabra*, 7=*A. purpurea*, 8=*Cananga odorata*, 9=*Magnolia* sp.

### Pruebas de normalidad

Especie	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pares_bases 1	.094	15	.200*	.957	15	.642
2	.333	3	.	.862	3	.274
3	.369	3	.	.787	3	.085
5	.349	3	.	.832	3	.194
6	.263	3	.	.955	3	.593
7	.253	3	.	.964	3	.637
9	.385	3	.	.750	3	.000

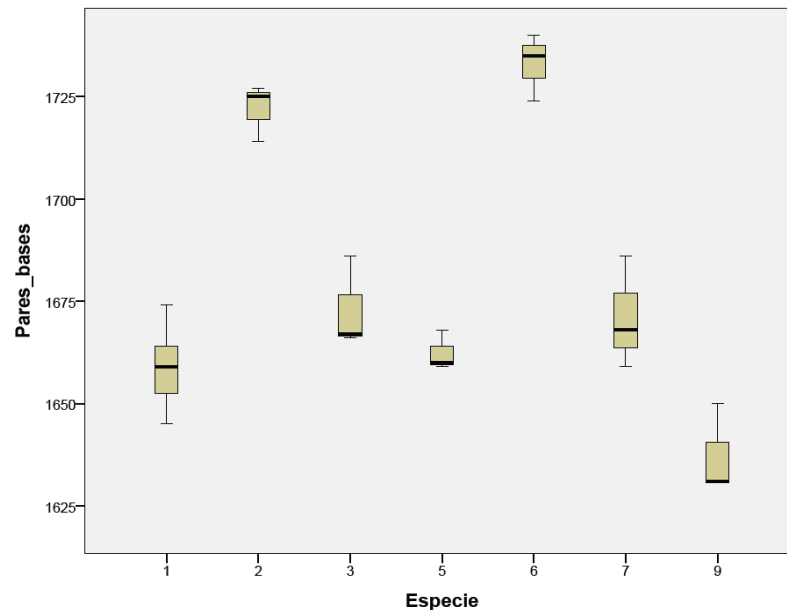
\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Pares\_bases

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
.681	6	26	.667



#### ANOVA de un factor

Pares\_bases

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	25221.333	6	4203.556	46.613	.000
Intra-grupos	2344.667	26	90.179		
Total	27566.000	32			

#### Pruebas post hoc

##### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Pares\_bases

HSD de Tukey

(I) Especie	(J) Especie	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-63.333*	6.006	.000	-82.49	-44.17
	3	-14.333	6.006	.244	-33.49	4.83
	5	-3.667	6.006	.996	-22.83	15.49
	6	-74.333*	6.006	.000	-93.49	-55.17
	7	-12.333	6.006	.408	-31.49	6.83
	9	21.333*	6.006	.022	2.17	40.49
2	1	63.333*	6.006	.000	44.17	82.49
	3	49.000*	7.754	.000	24.27	73.73
	5	59.667*	7.754	.000	34.93	84.40
	6	-11.000	7.754	.787	-35.73	13.73
	7	51.000*	7.754	.000	26.27	75.73
	9	84.667*	7.754	.000	59.93	109.40
3	1	14.333	6.006	.244	-4.83	33.49
	2	-49.000*	7.754	.000	-73.73	-24.27
	5	10.667	7.754	.809	-14.07	35.40
	6	-60.000*	7.754	.000	-84.73	-35.27
	7	2.000	7.754	1.000	-22.73	26.73
	9	35.667*	7.754	.002	10.93	60.40
5	1	3.667	6.006	.996	-15.49	22.83
	2	-59.667*	7.754	.000	-84.40	-34.93
	3	-10.667	7.754	.809	-35.40	14.07
	6	-70.667*	7.754	.000	-95.40	-45.93
	7	-8.667	7.754	.917	-33.40	16.07
	9	25.000*	7.754	.046	.27	49.73
6	1	74.333*	6.006	.000	55.17	93.49
	2	11.000	7.754	.787	-13.73	35.73

(I) Especie	(J) Especie	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
7	3	60.000*	7.754	.000	35.27	84.73
	5	70.667*	7.754	.000	45.93	95.40
	7	62.000*	7.754	.000	37.27	86.73
	9	95.667*	7.754	.000	70.93	120.40
	1	12.333	6.006	.408	-6.83	31.49
	2	-51.000*	7.754	.000	-75.73	-26.27
	3	-2.000	7.754	1.000	-26.73	22.73
	5	8.667	7.754	.917	-16.07	33.40
	6	-62.000*	7.754	.000	-86.73	-37.27
9	1	-21.333*	6.006	.022	-40.49	-2.17
	2	-84.667*	7.754	.000	-109.40	-59.93
	3	-35.667*	7.754	.002	-60.40	-10.93
	5	-25.000*	7.754	.046	-49.73	-.27
	6	-95.667*	7.754	.000	-120.40	-70.93
	7	-33.667*	7.754	.003	-58.40	-8.93

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

## 7. Estadísticos de análisis de varianzas de largos de fragmentos de la región *trnL-F*

Los estadísticos fueron obtenidos mediante SPSS 17.0. 1=*A. cherimola*, 2=*A. macrophyllata*, 3=*A. muricata*, 4= *A. reticulata*, 5=*A. squamosa*, 6=*A. glabra*, 7=*A. purpurea*, 8=*Cananga odorata*, 9=*Magnolia* sp.

### Pruebas de normalidad

Especie	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pares_bases 1	.108	69	.044	.978	69	.271
2	.151	15	.200*	.941	15	.393
3	.170	9	.200*	.920	9	.392
4	.302	9	.018	.764	9	.008
5	.292	3	.	.923	3	.463
6	.312	3	.	.896	3	.373
7	.373	3	.	.780	3	.067

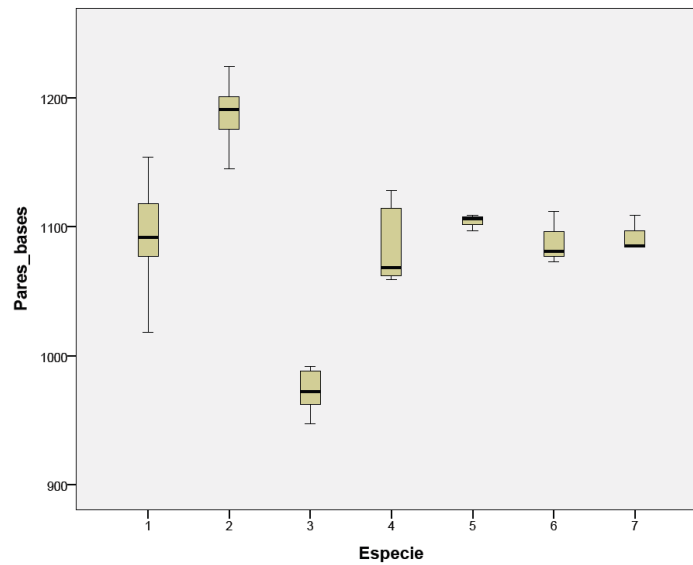
\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Pares\_bases

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1.599	6	104	.155



ANOVA de un factor

Pares\_bases

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	268705.018	6	44784.170	66.590	.000
Intra-grupos	69943.793	104	672.536		
Total	338648.811	110			

## Pruebas post hoc

## Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Pares\_bases

HSD de Tukey

(I) Especie	(J) Especie	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	-94.339 <sup>a</sup>	7.388	.000	-116.55	-72.12
	3	122.261 <sup>a</sup>	9.191	.000	94.63	149.90
	4	9.483	9.191	.945	-18.15	37.12
	5	-10.406	15.295	.993	-56.39	35.58
	6	4.928	15.295	1.000	-41.06	50.92
	7	.928	15.295	1.000	-45.06	46.92
	2	1	94.339 <sup>a</sup>	7.388	.000	72.12
3		216.600 <sup>a</sup>	10.934	.000	183.72	249.48
4		103.822 <sup>a</sup>	10.934	.000	70.94	136.70
5		83.933 <sup>a</sup>	16.402	.000	34.62	133.25
6		99.267 <sup>a</sup>	16.402	.000	49.95	148.58
7		95.267 <sup>a</sup>	16.402	.000	45.95	144.58
3		1	-122.261 <sup>a</sup>	9.191	.000	-149.90
	2	-216.600 <sup>a</sup>	10.934	.000	-249.48	-183.72
	4	-112.778 <sup>a</sup>	12.225	.000	-149.54	-76.02
	5	-132.667 <sup>a</sup>	17.289	.000	-184.65	-80.68
	6	-117.333 <sup>a</sup>	17.289	.000	-169.32	-65.35
	7	-121.333 <sup>a</sup>	17.289	.000	-173.32	-69.35
	4	1	-9.483	9.191	.945	-37.12
2		-103.822 <sup>a</sup>	10.934	.000	-136.70	-70.94
3		112.778 <sup>a</sup>	12.225	.000	76.02	149.54
5		-19.889	17.289	.911	-71.87	32.10
6		-4.556	17.289	1.000	-56.54	47.43
7		-8.556	17.289	.999	-60.54	43.43
5		1	10.406	15.295	.993	-35.58
	2	-83.933 <sup>a</sup>	16.402	.000	-133.25	-34.62

(I) Especie	(J) Especie	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
6	3	132.667	17.289	.000	80.68	184.65
	4	19.889	17.289	.911	-32.10	71.87
	6	15.333	21.174	.991	-48.33	79.00
	7	11.333	21.174	.998	-52.33	75.00
	1	-4.928	15.295	1.000	-50.92	41.06
	2	-99.267*	16.402	.000	-148.58	-49.95
	3	117.333*	17.289	.000	65.35	169.32
	4	4.556	17.289	1.000	-47.43	56.54
	5	-15.333	21.174	.991	-79.00	48.33
	7	-4.000	21.174	1.000	-67.67	59.67
7	1	-.928	15.295	1.000	-46.92	45.06
	2	-95.267*	16.402	.000	-144.58	-45.95
	3	121.333*	17.289	.000	69.35	173.32
	4	8.556	17.289	.999	-43.43	60.54
	5	-11.333	21.174	.998	-75.00	52.33
	6	4.000	21.174	1.000	-59.67	67.67

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

## 8. Estadísticos de análisis de varianzas de largos de fragmentos del intrón *rpoC1*

Los estadísticos fueron obtenidos mediante SPSS 17.0. 1=*A. cherimola*, 2=*A. macrophyllata*, 3=*A. muricata*, 4= *A. reticulata*, 5=*A. squamosa*, 6=*A. glabra*, 7=*A. purpurea*, 8=*Cananga odorata*, 9=*Magnolia sp.*

### Pruebas de normalidad

Especie	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pares_bases 1	.145	66	.001	.967	66	.076
2	.138	12	.200*	.963	12	.825
3	.390	9	.000	.697	9	.001
4	.191	15	.144	.904	15	.111
5	.189	6	.200*	.951	6	.746
6	.205	15	.090	.920	15	.195
7	.292	3	.	.923	3	.463
8	.324	3	.	.878	3	.317
9	.279	3	.	.939	3	.525

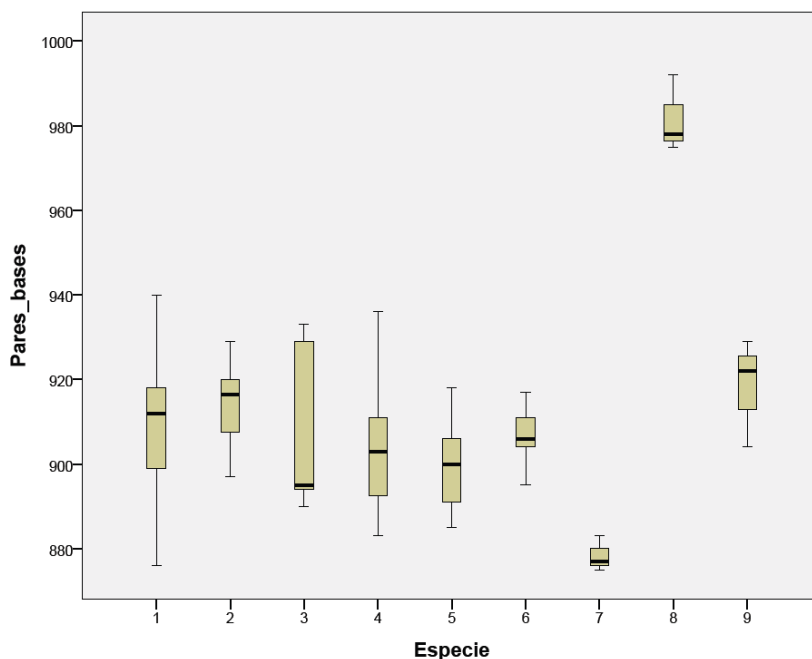
\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

### Prueba de homogeneidad de varianzas

Pares\_bases

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
2.638	8	123	.011



#### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Pares_bases es la misma entre las categorías de Especie.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	.000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

### 9. Estadísticos de análisis de varianzas de largos de fragmentos de la región *atpB-rbcL*

Los estadísticos fueron obtenidos mediante SPSS 17.0. 1=*A. cherimola*, 2=*A. macrophyllata*, 3=*A. muricata*, 4=*A. reticulata*, 5=*A. squamosa*, 6=*A. glabra*, 7=*A. purpurea*, 8=*Cananga odorata*, 9=*Magnolia* sp.

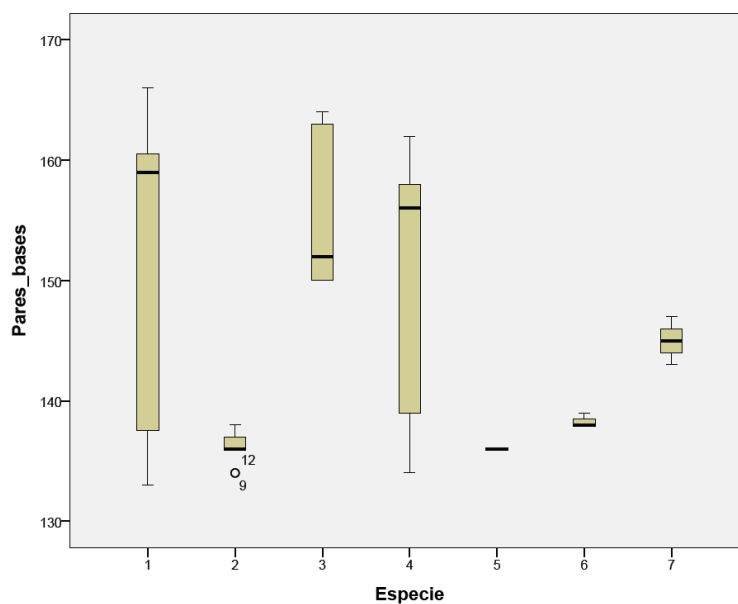
#### Pruebas de normalidad<sup>b</sup>

Especie	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pares_bases 1	.320	24	.000	.780	24	.000
2	.256	12	.028	.879	12	.086
3	.351	9	.002	.713	9	.002
4	.319	15	.000	.795	15	.003
6	.385	3	.	.750	3	.000
7	.175	3	.	1.000	3	1.000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

b. Pares\_bases es una constante cuando Especie = 5 y se ha desestimado.





#### Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Pares_bases es la misma entre las categorías de Especie.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	.002	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

### 10. Estadísticos de análisis de varianzas de largos de fragmentos de la región *matK*

Los estadísticos fueron obtenidos mediante SPSS 17.0. 1=*A. cherimola*, 2=*A. macrophyllata*, 3=*A. muricata*, 4=*A. reticulata*, 5=*A. squamosa*, 6=*A. glabra*, 7=*A. purpurea*, 8=*Cananga odorata*, 9=*Magnolia* sp.

#### Pruebas de normalidad

Especie	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pares_bases 1	.098	24	.200*	.970	24	.677
2	.175	12	.200*	.904	12	.177
3	.245	6	.200*	.864	6	.202
4	.213	9	.200*	.873	9	.134
5	.333	3	.	.862	3	.274
6	.269	3	.	.949	3	.567
7	.175	3	.	1.000	3	1.000

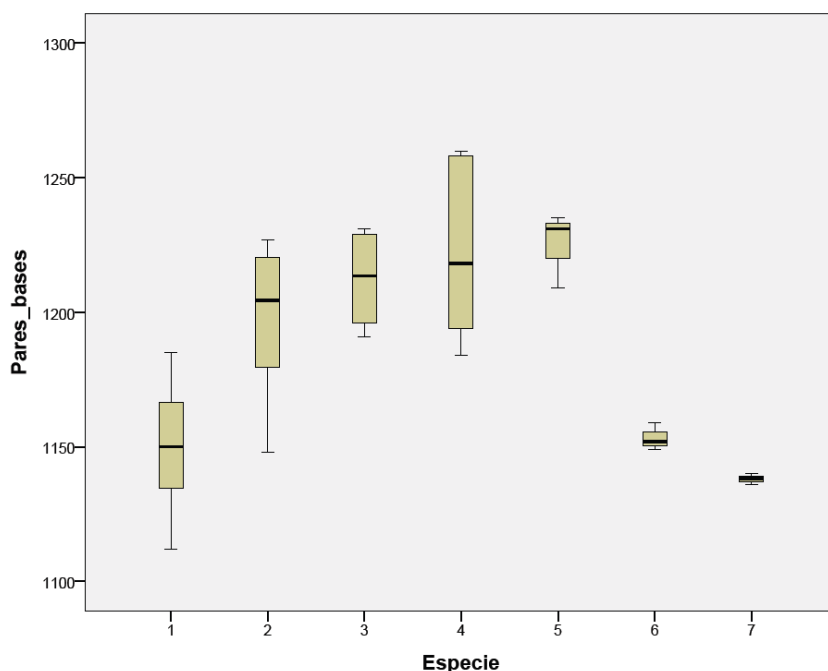
\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

##### Pares\_bases

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3.009	6	53	.013



Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Pares_bases es la misma entre las categorías de Especie.	Prueba Kruskal-Wallis de muestras independientes	.000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

## 11. Largo de fragmentos amplificados obtenidos con geles de electroforesis en poliacrilamida

Individuo	Especie	Marcador	PB1	PB2	PB3
3	<i>A. cherimola</i>	trnS-T	1645	1645	1661
4	<i>A. cherimola</i>	trnS-T	1659	1654	1651
24	<i>A. cherimola</i>	trnS-T	1664	1654	1660
30	<i>A. squamosa</i>	trnS-T	1668	1659	1660
36	<i>A. cherimola</i>	trnS-T	1670	1650	1656
40	<i>A. purpurea</i>	trnS-T	1668	1659	1686
47	<i>A. glabra</i>	trnS-T	1724	1735	1740
58	<i>A. cherimola</i>	trnS-T	1673	1664	1674
75	<i>A. muricata</i>	trnS-T	1686	1667	1666
96	<i>A. macrophyllata</i>	trnS-T	1727	1714	1725
107	<i>Magnolia sp.</i>	trnS-T	1631	1631	1650
3	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1066	1083	1061
4	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1070	1075	1075
7	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1127	1101	1130
14	<i>A. macrophyllata</i>	trnL-F	1211	1220	1224
17	<i>A. macrophyllata</i>	trnL-F	1150	1201	1200
18	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1132	1086	1114

Individuo	Especie	Marcador	PB1	PB2	PB3
19	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1113	1078	1106
24	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1079	1096	1096
26	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1113	1093	1122
27	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1119	1093	1122
29	<i>A. macrophyllata</i>	trnL-F	1197	1187	1201
30	<i>A. squamosa</i>	trnL-F	1097	1106	1109
32	<i>A. macrophyllata</i>	trnL-F	1182	1187	1191
36	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1123	1127	1123
40	<i>A. purpurea</i>	trnL-F	1085	1109	1084
41	<i>A. reticulata</i>	trnL-F	1125	1114	1128
46	<i>A. glabra</i>	trnL-F	1081	1112	1073
57	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1018	1046	1027
58	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1059	1066	1062
60	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1113	1108	1138
61	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1136	1124	1154
63	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1128	1118	1121
64	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1085	1088	1084
69	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1113	1118	1121
70	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1064	1066	1062
72	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1077	1096	1092
73	<i>A. muricata</i>	trnL-F	975	947	963
75	<i>A. muricata</i>	trnL-F	972	951	962
76	<i>A. reticulata</i>	trnL-F	1059	1062	1062
82	<i>A. muricata</i>	trnL-F	988	992	992
85	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1091	1044	1081
88	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1083	1088	1092
95	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1117	1102	1089
96	<i>A. macrophyllata</i>	trnL-F	1169	1154	1145
97	<i>A. reticulata</i>	trnL-F	1074	1068	1065
100	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1087	1061	1073
104	<i>A. cherimola</i>	trnL-F	1084	1078	1081
3	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	907	913	909
4	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	913	913	919
7	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	911	911	906
14	<i>A. macrophyllata</i>	rpoC1 int	917	906	909
18	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	917	923	918
19	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	917	917	912
24	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	894	882	891
26	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	917	923	912
27	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	917	917	912
29	<i>A. macrophyllata</i>	rpoC1 int	917	929	918
30	<i>A. squamosa</i>	rpoC1 int	894	885	891
32	<i>A. macrophyllata</i>	rpoC1 int	913	897	903
36	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	886	886	879

Individuo	Especie	Marcador	PB1	PB2	PB3
38	<i>A. reticulata</i>	rpoC1 int	889	889	894
40	<i>A. purpurea</i>	rpoC1 int	875	883	877
41	<i>A. reticulata</i>	rpoC1 int	892	893	883
46	<i>A. glabra</i>	rpoC1 int	904	906	904
47	<i>A. glabra</i>	rpoC1 int	917	906	916
48	<i>A. glabra</i>	rpoC1 int	917	911	911
49	<i>A. glabra</i>	rpoC1 int	906	895	895
50	<i>A. glabra</i>	rpoC1 int	906	906	900
56	<i>A. squamosa</i>	rpoC1 int	918	906	906
58	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	893	886	876
60	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	894	911	900
61	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	929	923	924
63	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	918	918	920
64	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	918	915	908
69	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	913	918	913
70	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	895	895	894
72	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	906	912	906
73	<i>A. muricata</i>	rpoC1 int	895	894	894
75	<i>A. muricata</i>	rpoC1 int	890	895	894
76	<i>A. reticulata</i>	rpoC1 int	910	905	911
82	<i>A. muricata</i>	rpoC1 int	932	933	929
83	<i>A. reticulata</i>	rpoC1 int	911	911	911
85	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	912	894	899
88	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	938	938	940
95	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	900	895	900
96	<i>A. macrophyllata</i>	rpoC1 int	916	922	929
97	<i>A. reticulata</i>	rpoC1 int	903	896	936
100	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	925	925	920
104	<i>A. cherimola</i>	rpoC1 int	913	900	894
107	<i>Magnolia sp.</i>	rpoC1 int	929	922	904
108	<i>Cananga odorata</i>	rpoC1 int	992	975	978
3	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	143	142	140
4	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	161	161	160
14	<i>A. macrophyllata</i>	atpB-rbcL	137	136	134
17	<i>A. macrophyllata</i>	atpB-rbcL	136	137	134
24	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	160	160	159
30	<i>A. squamosa</i>	atpB-rbcL	136	136	136
32	<i>A. macrophyllata</i>	atpB-rbcL	138	136	136
36	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	159	160	161
38	<i>A. reticulata</i>	atpB-rbcL	139	139	139
40	<i>A. purpurea</i>	atpB-rbcL	145	147	143
41	<i>A. reticulata</i>	atpB-rbcL	134	134	136
46	<i>A. glabra</i>	atpB-rbcL	139	138	138
58	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	134	134	135

<b>Individuo</b>	<b>Especie</b>	<b>Marcador</b>	<b>PB1</b>	<b>PB2</b>	<b>PB3</b>
64	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	134	133	135
70	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	160	158	159
73	<i>A. muricata</i>	atpB-rbcL	164	163	164
75	<i>A. muricata</i>	atpB-rbcL	152	151	152
76	<i>A. reticulata</i>	atpB-rbcL	156	156	156
82	<i>A. muricata</i>	atpB-rbcL	150	150	150
83	<i>A. reticulata</i>	atpB-rbcL	158	158	157
95	<i>A. cherimola</i>	atpB-rbcL	163	165	166
96	<i>A. macrophyllata</i>	atpB-rbcL	138	136	137
97	<i>A. reticulata</i>	atpB-rbcL	162	160	160
3	<i>A. cherimola</i>	matK	1140	1150	1150
4	<i>A. cherimola</i>	matK	1149	1167	1175
14	<i>A. macrophyllata</i>	matK	1208	1226	1217
24	<i>A. cherimola</i>	matK	1166	1167	1156
30	<i>A. squamosa</i>	matK	1231	1235	1209
32	<i>A. macrophyllata</i>	matK	1159	1180	1148
36	<i>A. cherimola</i>	matK	1154	1158	1142
40	<i>A. purpurea</i>	matK	1140	1138	1136
46	<i>A. glabra</i>	matK	1159	1152	1149
58	<i>A. cherimola</i>	matK	1171	1125	1117
64	<i>A. cherimola</i>	matK	1146	1144	1123
70	<i>A. cherimola</i>	matK	1129	1126	1112
75	<i>A. muricata</i>	matK	1231	1224	1229
76	<i>A. reticulata</i>	matK	1259	1260	1258
77	<i>A. macrophyllata</i>	matK	1220	1221	1227
82	<i>A. muricata</i>	matK	1203	1191	1196
83	<i>A. reticulata</i>	matK	1210	1224	1218
95	<i>A. cherimola</i>	matK	1157	1171	1185
96	<i>A. macrophyllata</i>	matK	1201	1179	1193
97	<i>A. reticulata</i>	matK	1194	1184	1188

## H. Secuencias

### 1. Secuencia en dirección 5'→3' y sin edición alguna de *A. cherimola* de Nentón, Huehuetenango (ID=24) de la región *trnS-T*

```

      20                               40
AATACCATAA AGAGTAGAAA GGGATGAAAA TCTCACCACC GACCCGTTTG
      60                               80                               100
TGATACGTGA ATGGGAGAAA AATCCGGATC AAAACCCTTC TTTATTTACT
      120                               140
TAACTTTGGC GAAAAAAGGG AGGACAAAAAT TATCCAAAGC TTTGTTATTT
      160                               180                               200
TAGTTAGGTT TAGGTCTGAC GGGAATAATA TTCTACGACT CGTAACTCTT
      220                               240                               260
TGATTTTCAA ACCGACCCAT TTCCTATCTA TTATTTGTTT TACTAATCGT
      280                               300
TTATATTGGG ATGGGCGAAA GGTCAAATGG TTTACCCATT TCTTGTTCCT
      320                               340
GGGGGGGAT GAATCGATAT GATTTTGAAT CAGAGCTCGG GATCTTTGTT
      360                               380                               400
TATCCCTCGT AGTAATAATA TCTTGGGGTT TGCAGCGATA ACTGGGGATA
      420                               440
TCTACTATAC GACCATTAACT TAAAATATGT CTATGGTTAA CTAATTGCCT
      460                               480                               500
GGCCCGGGGA ATGGTGAAG CGATACCTAA TCGAAAAAGG ATGTTATCGA
      520                               540
AACGCATCTC AAGTAGTTGT AGTAAAAACCT GACCCGTTGA CCCTTTAGTT
      560                               580                               600
TTTCAGCGA TATGAACATA TCTAAGCAAT TGTGCTCTG TCAGACCATA
      620                               640
ATGAAAAAGC AATTTTTGTT TTTCTTCTAG ACGAATACGA TATTGAGATT
      660                               680                               700
TTTTTCTGAA ACGCGATTTT TTTCTTCTAA GATAACCCCC CGGTCTAGGC
      720                               740
CTTTTACTAG TTAGTCCGGG TAAAGCCCCC AGACGACGTA TTTTTTTGAA
      760                               780                               800
ACGAGGTCTT CGGTAACGAG ACATAAAGAC TCCTTTTTTT GAAATTTGAT
      820                               840
ITCATAGAAT AACCTAGATT CAGGCTGAAC TAAACGATAA ACGAAGATAA
      860                               880                               900
ATCTACTGAA GTGAAGTACT AGAAAGAAGA ATGAGATGGG TTGGATCAAT
      920                               940
ITCTGGGCIG CTTTATATAT GTATATACAT ATGTAATATT AGGCATTAGG
      960                               980                               1,000
AAGTTAGAGG TCCTTTTCCT GATTTGTTCT GTAGAGATTT AACTGCCCA
      1,020                               1,040
AGCCGTTTTT TATTCATAGT CGGAAATTCC CGGGCATAAT AGATCGGGGA
TCITGT

```



2. Secuencia en dirección 5'→3' y sin edición alguna de *A. cherimola* de San Carlos Sija, Quetzaltenango (ID=63) de la región *trnL-F*

```

      20                               40
CTTGATTGGA ITGAGCCITG GTATGGAAAC CTAATAAAGT GAGAACITTC
      60                               80                               100
AAACTTTCAGA GAAACCCCGG AATTAATAAAT GGGCAATCCT GAGCCAAATC
      120                               140
CTGTGTTTCAAG AAAACAAGGT TCAGAAAGCG AGAATCAAAA AAAGGATAGG
      160                               180                               200
TGCAAGAGACT CAATGGAAGC TGTTCCTAACA AATAGAGTTG ACTGCATCGG
      220                               240
TAAGGGAATT CTTTCCTTTT ATCCAAACGA CAGAAAGGAT GACCTTGTAT
      260                               280                               300
AGGTACGTAT ACATACTGAA ACATCAAAAG ATTAATCAGG ACTCGAATCG
      320                               340
GTTTTTTTTT CTGAAAAAAT TCAGAATAGA AGGATTGTGA ATTGATTCCA
      360                               380                               400
AGTTGAAGGA AGAATCGAAT ATTCAGAGAT CAAATCATCC ATTCCCGAGT
      420                               440
CTAATAGATC TTTTGAAGAA CCGATGAATC GGACGAGAAT AAAGATAGAG
      460                               480                               500
TCCC GTTCTA CATGTCAATA CAGACAACAA TGAAATTGAT AGTAAGAGGA
      520                               540
AAATCCGTCG ACTTTATAAA TCGTGAGGGT TCAAGTCCCT CTATCCCAA
      560                               580                               600
CACTATCCCC AAGAAAAAAG CCCATTTTCC CCCCCTAATT ATTTATCCTC
      620                               640
TTTTTTGICA GTTCTTCCAA ATTCGTTATG TTTCTCATTC ACTCTACTCT
      660                               680                               700
TTCACAAATG GATCCGACCA GAAATGTTTC TCTCTTATCG CAGGTTTTGT
      720                               740
GATAGATATG ATTTACGTAC ATGCGTACAA ATGAACAGAT AATGAATAGG
      760                               780                               800
CAAGGAATCT CCACTATTGA ATCATTACAA GTAATATCAT TACTCTTATA
      820                               840
CAAAGTCTTC TTTTTTCAGG GCCCTGGAAT TCCAGGCGCT AGGTGAGCTT
      860                               880                               900
ITGTAATGTT TTTTGAAGTCT CTTTAAATTC ATTGACATAG ACTCAAGCCC
      920
TCTTCCTCTC GCGGGATGAT GCATCGAGA

```

3. Secuencia en dirección 5'→3' y sin edición alguna de *A. macrophyllata* de Damián; Jalapa (ID=96) del intrón *rpoC1*

```

TAGTTATAGG CCTAGCAAAA GAAAGATTGG GATAGGTTTC GGGGGACCC
      20
      60
CCCTTAAAAA TCGGACGTGA AGGTTTCCTC TCATCCGGCT CAAGTAGTTA
      120
      160
CATCAAATAA AAGAGGTTCT CGCTTTCCAA TTTTGTTCTA TTCTAGAAAA
      180
      220
CTCAACCCCC ATAAAGATCT ACTCCTTACT CAAGTTCCCA GCGAGGACCA
      240
      280
ACGAATATTT CATTGATTCA TTCTTGCTTC GAATTTGACT TTATGAATCA
      320
      360
CTTAGTCAAT TACTGCATAA ACGAAATGTG AAATTGTTGA GTAGTCTACT
      380
      420
TCCCCTCGAA TGACGAATCC CCTTACCTGA AAGGAATCCA TTGAAACTCA
      440
      480
TAAGGGATTT ACTTGTCTAT GTATCCTTTC GTTCGACCCT TTAGGTCCCC
      500
      540
ACTTCACCTC GACGGTTATG CCATGAATTC CCTTGAAGCC TATATGCGAT
      560
      600
GTATAGACTT CTGTAACCGT GCCTACTCGA ACAGAATCTC TTTCTAAAAG
      620
      660
AAATGGAATG TCTAATTCCA TGAATACGAA AGAAGTCTTT TCACGAGGTA
      680
      720
CAACCAGTAA TTCGTATTTA TCTGTTATAG GGTGACCCAT GGACCAATTC
      740
      780
CGCTCTCATT TGGAAGTATT GAATAGACCC ATAATTCTGA GCTTCATGTT
      800
      840
CCTCCTCCCA AGAGACATGT CAGATCCAGG GGCATCCCAA TCGGATTGAA
      860
      900
TGGGATGACA GTTTCTCGTT CCGAGTCTGT AAAATCAGAA TTTGATCAA
      920
      960
ATCACACACC GCAGTATACT AGGCCTTCTA ATTCCTTGAG GGGTTTATCT
      980
AACAAAATTCG CGAT

```



4. Secuencia en dirección 5'→3' y sin edición alguna de *A. reticulata* de Ipala, Jalapa (ID=83) de la región *atpB-rbcL*

```

      20                               40
TCAACATATA CCACTGTCAA GAGTCAATTT GTTCTATTTA TATGAAATCA
      60                               80                               100
ATTTGTTTCT ATTTTATATG GAAAAAAGGA AGGGGGGGTC GTTAGAAAA
      120                               140
CCTGCAAAAAC AAGATTGGGT TGGGCCATAC ATATGAAAGA GTATACAATA
AT
  
```

5. Secuencia en dirección 5'→3' y sin edición alguna de *A. muricata* de El Rancho, El Progreso (ID=75) de la región *matK*

```

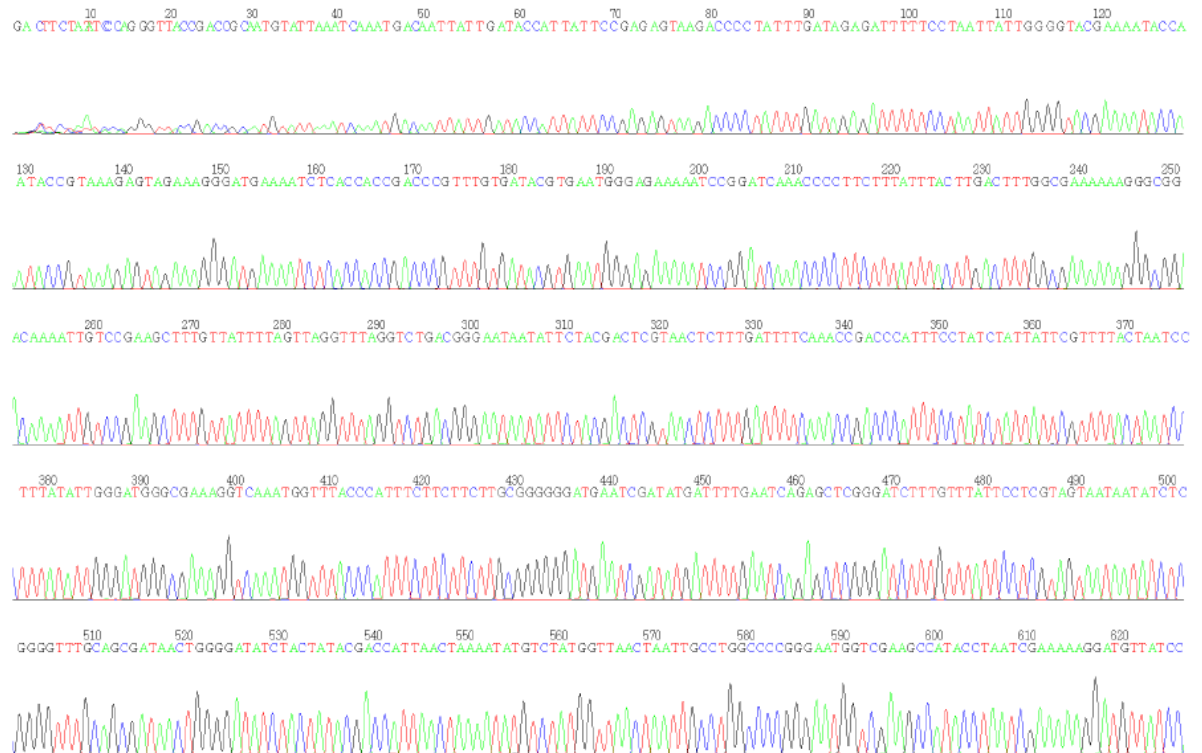
      20                               40
CAAATTATCA CATTAAATC ATGTGTCAGA TATACTAATA CCTTACCCCG
      60                               80                               100
CCCATCTGGA AATCTTGGTT CAAATACCTT GCTCTTGCAT ACAAGATGCT
      120                               140
CCCTCTTTAC ATTTATTGGG ATTCITTTCT CAGGACTATC AGAATTGAA
      160                               180                               200
TAGTCTCAAA GCTCGAAAAG AATCCATTTT TGTITGTTCA AAAGAGAATC
      220                               240
GAAGATTCTT CTTGTTCTTA TATAATATTG ATGTATATGA ATGTGAATCG
      260                               280                               300
GTATTTGTTT TTCTCCGTAA ACAATCTTTT CATTACGAT CAAACATCCTT
      320                               340
TAGAACTGTT CTTGAGCGAA CACATTTCTA TGGAAAAATA GAACATCTTG
      360                               380                               400
TAGTAGTGCT TCGGAATGAT TTTCAGAAGA CTTATGGAT GTTCAAAGAC
      420                               440
CCCTTTATGC ATTATGTGAG ATATCAAGGA AATTCCTTTC TGGGCTCAAA
      460                               480                               500
GGGGACTCAT CTTGCTATGA AGAAATGGAA ATCTTACCTT GTCCATTTTTI
      520                               540
GGCAATCTCA TTTTTACTTG TGGTCTCAAC CGAACAGGAT CCATATAAAC
      560                               580                               600
CAATTATACA ATCATTCTTT CTATTTTATG AGCTATCTTT TAAGTGTACG
      620                               640
CCAAAATTCT TCGGAGGTAA GGAGTCAAAAT GTTAGAGAAT TCATTTCTAA
      660                               680                               700
TAGATACTTC TATAAAGAAA TTTGAGAGCC TAGTTCCAA C AATTCCTCTG
      720                               740
ATTGGATTAT TGGCTAAGG GAAATTTTGT AATGTATTTG GGCACTCTAT
      760                               780                               800
TAGTAAGCCG GCCCGGGCCG ATTCGTCCGA TTCTGATATT ATCAGTCGAT
      820                               840
TTGGGGGCAT ATACAGAAAT CTTTCTCATT ATTACAGTGG ATCCTCAAAA
      860
AAAACAGACTT TGTATCGG
  
```

## I. Electroferogramas

### 1. Electroferograma de la secuencia del segmento *forward* de *A. purpurea* de Masagua, Escuintla (ID=40) de la región *trnS-T*

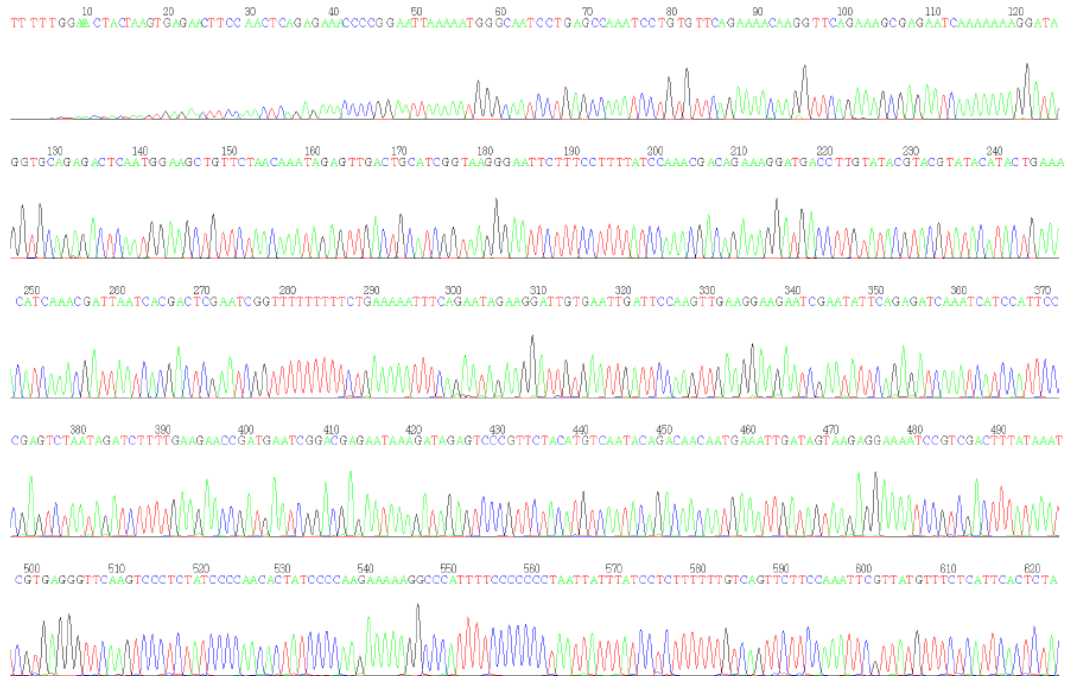
File: JA002-trnS-T\_F.ab1 Run Ended: 2012/5/1 3:12:23 Signal G:1872 A:3166 C:2143 T:2543  
 Sample: JA002\_trnS-T\_F Lane: 48 Base spacing: 15.273795 1452 bases in 17398 scans Page 1 of 2

MACROGEN  
 Advancing through Genomics



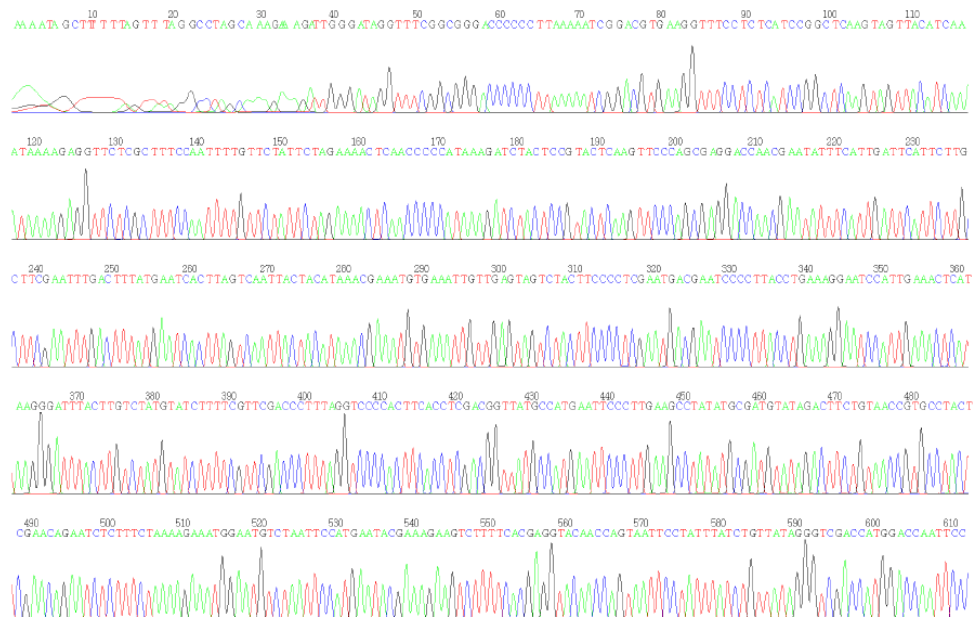
## 2. Electroferograma de la secuencia del segmento *forward* de *A. cherimola* de Jacaltenango, Huehuetenango (ID=36) de la región *trnL-F*

File: JA010-trnL-F.ab1 Run Ended: 2012/5/1 3:12:23 Signal G:5283 A:10103 C:8593 T:8468  
 Sample: JA010-trnL-F\_F Lane: 7 Base spacing: 15.198222 987 bases in 11883 scans Page 1 of 2



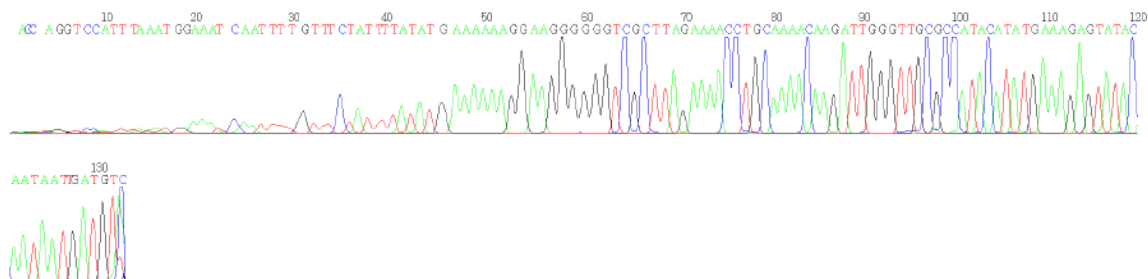
## 3. Electroferograma de la secuencia el segmento *forward* de *A. cherimola* de Jacaltenango, Huehuetenango (ID=72) del intrón *rpoC1*

File: JA111\_rpoC1int\_F.ab1 Run Ended: 2012/6/8 21:25:45 Signal G:3623 A:8184 C:9799 T:8288  
 Sample: JA111\_rpoC1int\_F Lane: 89 Base spacing: 15.923575 868 bases in 10608 scans Page 1 of 2



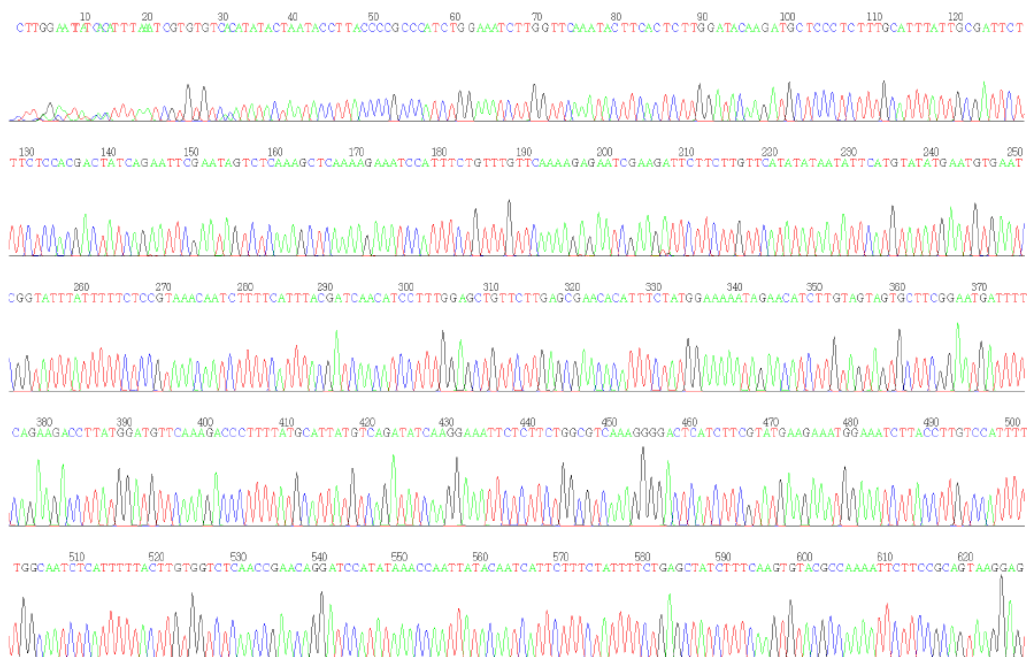
#### 4. Electroferograma de la secuencia el segmento *forward* de *A. reticulata* de El Rancho, El Progreso (ID=76) de la región *atpB-rbcL*

File: JA060-atpB-rbcL\_F.ab1 Run Ended: 2012/5/1 3:12:23 Signal G:8387 A:9984 C:5755 T:7114  
 Sample: JA060\_atpB-rbcL\_F Lane: 59 Base spacing: -16.163063 133 bases in 1653 scans Page 1 of 1



#### 5. Electroferograma de la secuencia el segmento *forward* de *A. macrophyllata* de Damián, Jalapa (ID=96) de la región *matK*

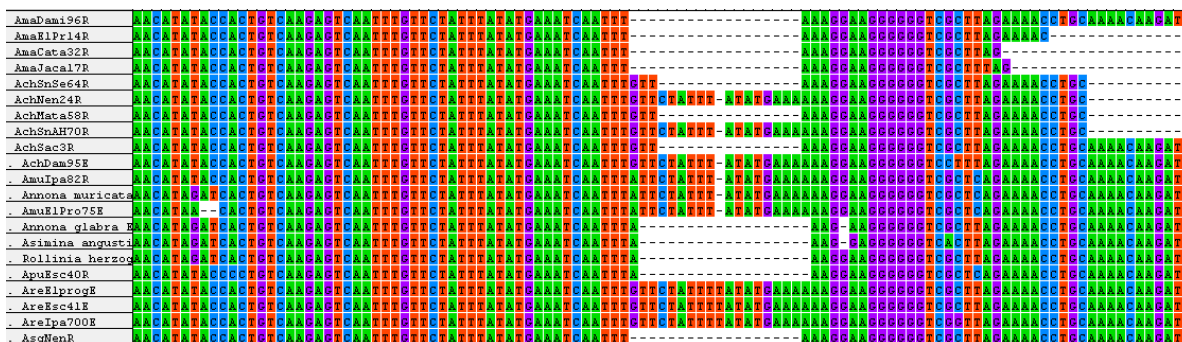
File: JA077-matK\_F.ab1 Run Ended: 2012/5/1 3:12:23 Signal G:4877 A:8731 C:8579 T:9832  
 Sample: JA077\_matK\_F Lane: 73 Base spacing: 15.343853 916 bases in 10981 scans Page 1 of 2





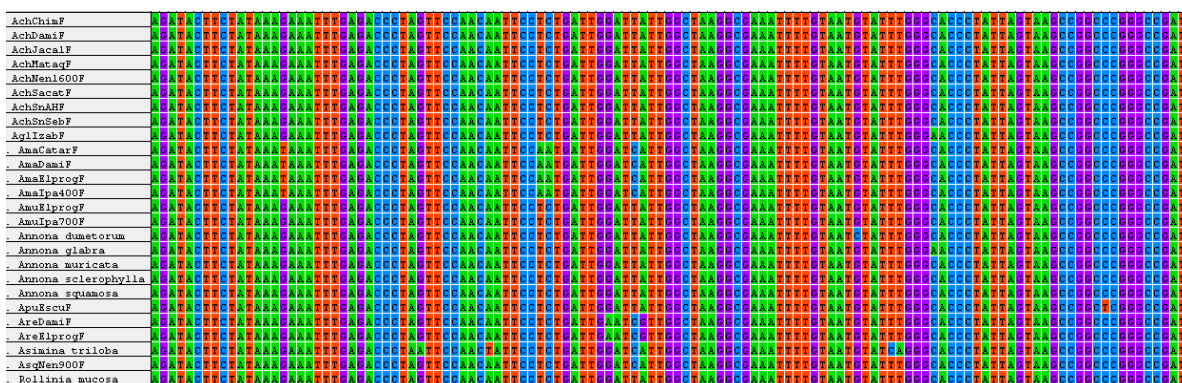


#### 4. Alineamiento parcial de la región *atpB-rbcL*



En el alineamiento se muestran las posiciones 1 a 111 de la matriz generada.

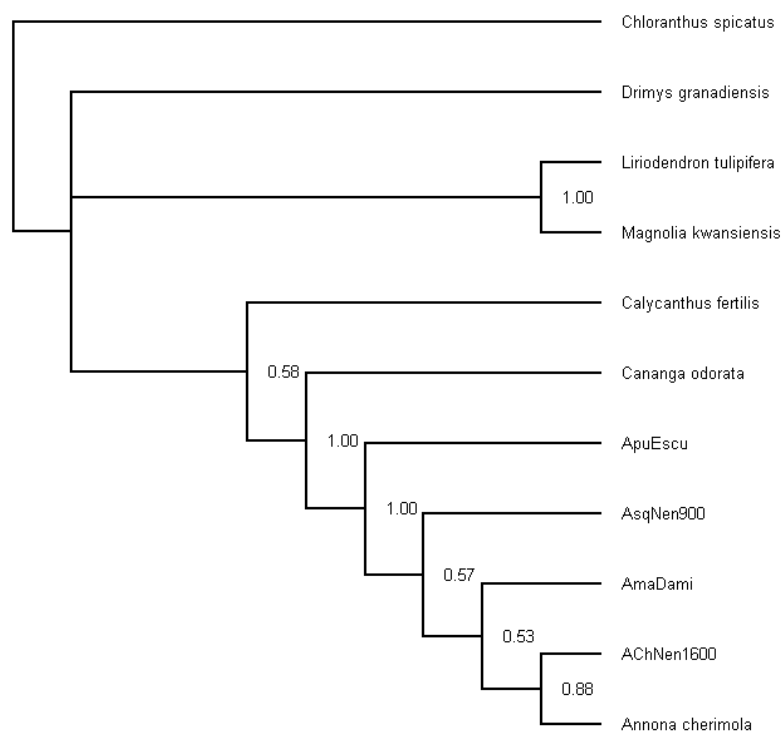
#### 5. Alineamiento parcial de la región *matK*



En el alineamiento se muestran las posiciones 653 a 774 de la matriz generada.

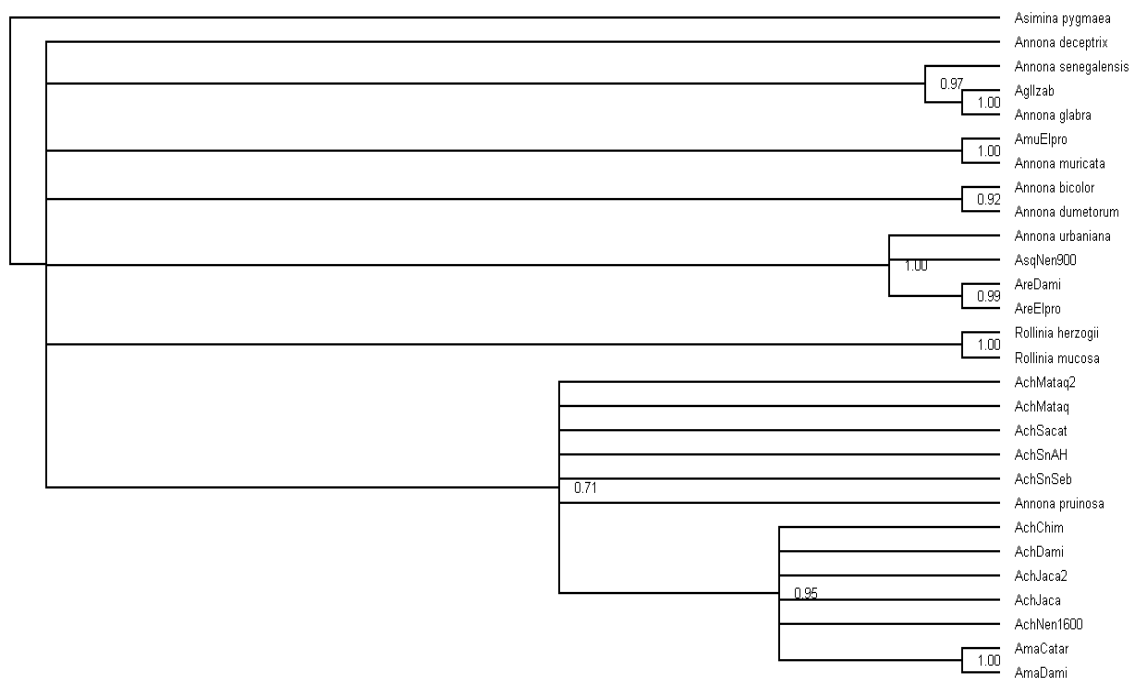
## K. Árboles filogenéticos bayesianos

### 1. Árbol filogenético bayesiano de la región *trnS-T*



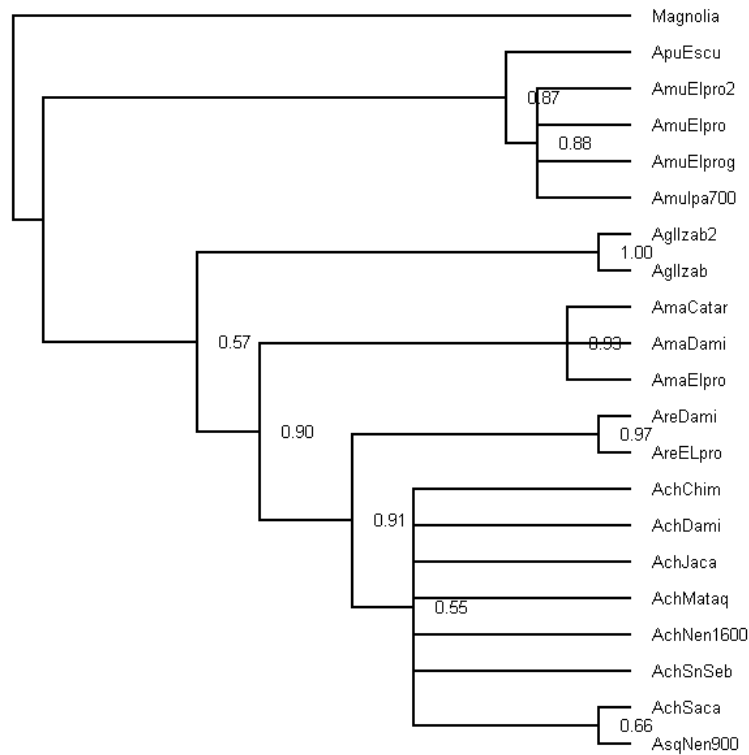
Los números indican las probabilidades posteriores.

### 2. Árbol filogenético bayesiano de la región *trnL-F*



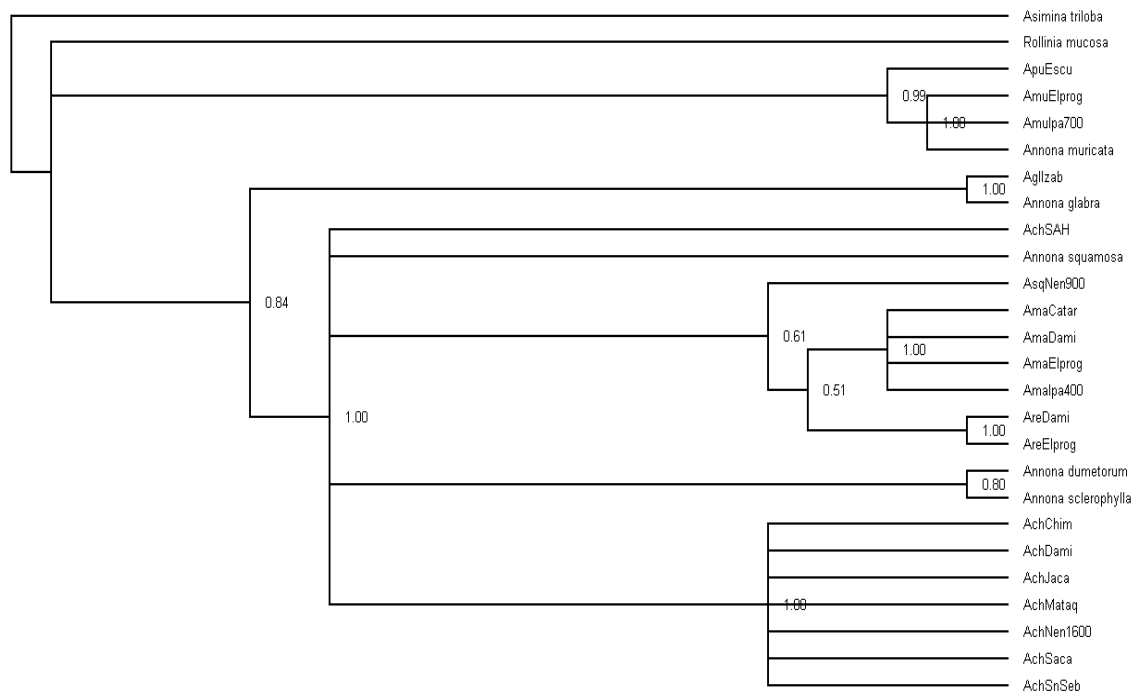
Los números indican las probabilidades posteriores.

### 3. Árbol filogenético bayesiano del intrón *rpoC1*



Los números indican las probabilidades posteriores.

### 4. Árbol filogenético bayesiano de la región *matK*



Los números indican las probabilidades posteriores.



## **IX. GLOSARIO**

***atpB-rbcL***: Región del ADN del cloroplasto (ADNcp) que contiene los genes codificadores de las proteínas ATP sintetasa y Rubisco.

**Centro de diversidad**: Área geográfica en la que un taxon posee elevada diversidad genética. Se ha utilizado el término centro de origen; sin embargo, no siempre se cuenta con evidencia fósil relevante, por lo tanto su uso no es adecuado.

**Clado**: Secuencia de poblaciones ancestro-descendiente a través del tiempo; es un conjunto de organismos interconectados a través del tiempo y espacio mediante la transferencia de material genético desde los padres hacia los hijos, representado como una línea en un dendrograma.

**Filogenia**: Estudio de la historia evolutiva, conexiones genealógicas fundamentales o patrón de descendencia entre organismos.

**Grupo externo**: Un taxon o grupo de taxa que no es miembro del grupo interno. Su utilidad radica en el enraizamiento de los árboles filogenéticos.

**Haplotipo**: Es un conjunto de marcadores genéticos cercanamente relacionados presentes en un cromosoma o en un plastoma, que tienden a ser heredados juntos. La palabra haplotipo es una contracción de la frase genotipo haploide. Los haplotipos pueden ser identificados mediante patrones de polimorfismos de un nucleótido o SNP's (*single nucleotide polymorfism*).

**Heteroplasmia**: Es la presencia de una mezcla de más de un tipo de genoma organelar dentro de una célula o individuo. En muchos casos se debe a la presencia de ADN mutante en algunos organelos (en este caso cloroplastos) y ADN normal en otros organelos del mismo tipo (en este caso cloroplastos).

**Homoplasia**: Similitud que no se debe a homología o ancestría común. Una homoplasia es el resultado de un cambio evolutivo que se origina de manera independiente.

**Índice de consistencia**: Cuantificación de la cantidad relativa de homoplasias presentes en la inferencia filogenética. El índice permite conocer el nivel de dificultad de resolver un conjunto de datos a un árbol dado. El índice se calcula como el número

de pasos esperados dado un número de estados de carácter en los datos, dividido por el número real de pasos multiplicado por 100.

**Índice de retención:** Es otra medida de la cantidad relativa de homoplasias requeridas por un árbol filogenético. El índice de retención mide la cantidad de sinapomorfias esperadas de un conjunto de datos que es retenida como sinapomorfias en un cladograma. En otras palabras, el índice de retención es una medida de la proporción de similitudes en un cladograma.

**Longitud de árbol:** Es el número de pasos evolutivos (transformaciones de un estado de carácter a otro) requeridos para explicar un conjunto de datos. Cuando un árbol explica de mejor manera los datos, menos homoplasias y menos cambios de caracteres se requieren. Por tanto, un árbol con longitud baja asume menos homoplasias y es más parsimonioso.

**Magnoliidae:** Agrupación de angiospermas basales que contiene los órdenes Laurales, Magnoliales, Canellales y Piperales.

**Magnoliophyta:** Agrupación que contiene a las plantas vasculares que producen flor.

**Marcador molecular:** Secuencia de ADN fácilmente detectable y cuya herencia puede ser analizada.

**matK:** Región del ADN del cloroplasto (ADNcp) que contiene los genes codificadores de la proteína maturasa.

**Monofilia:** Estado que se refiere a un grupo que incluye el ancestro común además de todos sus descendientes.

**Parafilia:** Estado que se refiere a un grupo que incluye el ancestro común además de algunos, pero no todos, los descendientes de tal ancestro común.

**Politomía:** Estado en el cual tres o más linajes surgen de un único ancestro común en un cladograma, representando datos conflictivos o escasez de resolución en las relaciones entre el grupo de organismos.

**rpoClint:** Intrón único de la región del ADN del cloroplasto (ADNcp) que contiene los genes codificadores de la proteína RNA polimerasa.

**Sinapomorfía:** Una apomorfia que une dos o más taxa o linajes. Una apomorfia es una condición derivada o estado de un carácter que representa una novedad evolutiva.

***trnL-F*:** Región del ADN del cloroplasto (ADNcp) que contiene genes codificadores de ARN.

***trnS-T*:** Región del ADN del cloroplasto (ADNcp) que contiene genes codificadores de ARN.

**Vagilidad:** La capacidad o habilidad de dispersión de los organismos.