



MINISTERIO DE
AGRICULTURA,
GANADERÍA Y
ALIMENTACIÓN



Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura –IICA
Programa Consorcios Regionales de Investigación Agropecuaria -CRIA-
CADENA LOROCO

Identificación morfológica y genética de variedades de loroco (*Fernaldia pandurata* (A. DC.) Woodson) con fines de selección y mejoramiento genético

Zacapa, octubre de 2020.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1 Ácido desoxirribonucleico (ADN)	4
2.2 Marcadores moleculares de diversidad genética	4
2.3 Marcadores genéticos	5
2.4 Cultivos en mesoamerica prehispanicos	5
2.5 Resultados de las investigaciones financiadas por el cria	6
3. OBJETIVOS	8
3.1 Objetivo General	8
3.2 Objetivos Específicos	8
4. HIPÓTESIS	8
5. METODOLOGIA	9
6. RESULTADOS	12
7. CONCLUSIONES	23
8. RECOMENDACIONES	24
9. BIBLIOGRAFÍA	25
10. AGRADECIMIENTOS	27
11. ANEXOS	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores de RAPDS utilizados para la amplificación de secuencias al azar de Loroco.....	10
Tabla 2. Cebadores de microsatélites universales utilizados para la amplificación de secuencias repetitivas del genoma de Loroco.....	11
Tabla 3. Valores de la prueba de Kruskal-Wallis, media y desviación estándar para cada una de las unidades de estudio de Guatemala.....	14
Tabla 4. Estadísticos del Análisis de componentes Principales.....	16
Tabla 5. Bandas polimórficas únicas detectadas en seis cebadores en cinco localidades de loroco.....	20
Tabla 6. Valores de diversidad genética de Loroco, índice de Shanon, de cinco localidades del oriente de Guatemala.....	21
Tabla 7. Distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones de Loroco.....	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagramas de cajas y bigotes de las variables florales medidas.....	15
Figura 2. Análisis de Componentes Principales de las variables medidas de la flor de Loroco en siete localidades del oriente de Guatemala.....	19
Figura 3. Análisis de agrupamiento por el método de Ward utilizando una matriz de distancias de Jaccard.....	21

Citar este documento como:

Barrios-Izás, M. A., Bustmante-Castillo, M. y Aldana-Salguero, E. Y. 2020. *Identificación morfológica y genética de variedades de loroco (Fernaldia pandurata (A. DC.) Woodson) con fines de selección y mejoramiento genético*. Ed. Instituto de Investigaciones, Centro Universitario de Zacapa, Universidad de San Carlos de Guatemala. Zacapa, 85 pp.

RESUMEN

El Loroco (*Fernaldia pandurata* (A. DC.) Woodson) es una planta Mesoamericana que tiene valor alimenticio en Guatemala y El Salvador como un ingrediente en los platillos tradicionales de estos dos países. Es una planta que generalmente crece de forma libre en ecosistemas terrestres por debajo de los 1000 m s. n. m. y se puede encontrar también en ambientes antropizados como cercos y huertos familiares en donde sus hojas y flores son utilizadas en la cocina tradicional por sus propiedades aromáticas que le proporcionan sabor a la comida. En el presente estudio nosotros evaluamos la diversidad genética mediante el uso de RAPD y microsatélites de plantas provenientes de plantaciones y vida silvestre. El índice de diversidad de Shannon muestran una baja diversidad genética dentro de las poblaciones (0.18) frente una alta diversidad genética ($G_{st}=0.82$). Así mismo, el dendrograma muestra que con los marcadores moleculares utilizados no es posible apreciar diferenciación genética entre las plantas cultivadas y las de vida silvestre por el bajo período de domesticación que poseen y el flujo genético entre ambas poblaciones. Estos datos son congruentes con los datos del análisis de variabilidad morfológica realizado en hojas y flores. Así mismo, el análisis morfométrico de las hojas y flores no muestran segregación espacial sobre las formas de estos órganos.

ABSTRACT

The Loroco (*Fernaldia pandurata* (A. DC.) Woodson) is a Mesoamerican plant that has nutritional value in Guatemala and El Salvador as an ingredient in the traditional dishes of these two countries. It is a plant that generally grows freely in terrestrial ecosystems below 1000 m and can also be found in anthropized environments such as fences and home gardens where its leaves and flowers are used in traditional cuisine for their aromatic properties. In the present study we evaluated the genetic diversity through the use of RAPD and microsatellites of individuals from plantations and wildlife. The Shannon diversity index shows low genetic diversity within populations (0.18) versus high genetic diversity ($G_{st} = 0.82$). Likewise, the dendrogram shows that with the molecular markers used, it is not possible to appreciate genetic differentiation between cultivated plants and those of wild life due to their low domestication period and the genetic flow between both populations. These data are congruent with the data from the morphological variability analysis performed on leaves and flowers. Likewise, the morphometric analysis of the leaves and flowers does not show spatial segregation on the shapes of these organs.

Identificación morfológica y genética de variedades de loroco (*Fernaldia pandurata* (A. DC.) Woodson) con fines de selección y mejoramiento genético

Dr. Manuel A. Barrios Izás
Dra. Michelle Bustamante Castillo
Br. Enma Aldana Salguero

1. INTRODUCCIÓN

Mesoamérica esta considerada dentro de los centros de mayor riqueza de biodiversidad del mundo (Myers *et al* 2000) y como uno de los centros de origen de plantas cultivadas prehispánicas (Bukasov, 1930). En el Atlas Guatemalteco de Parientes Silvestres de las Plantas Cultivadas de Azurdia *et al.* (2004) se identifica al Loroco (*Fernaldia pandurata* (A. DC.) Woodson) como una de las especies mesoamericanas y recurso fitogenético de importancia. A diferencia de otras especies mesoamericanas de importancia alimenticia, el Loroco es una especie de reciente incorporación dentro de los sistemas de producción agrícola, de la cual se aprovechan las hojas y las flores, aunque solo las flores poseen valor comercial (Morton *et al.* 1990).

El loroco se encuentra listado de plantas cultivadas subutilizadas en sistemas de producción, medios de subsistencia y en la dieta de los agricultores de Chiquimula (Biodiversity International y Universidad del Valle de Guatemala 2017). En Guatemala se le puede encontrar de forma silvestre a altitudes menores a los 900 msnm (Standley y Williams 1969).

El Loroco es una planta herbácea de la familia Apocynaceae, que habita desde el sureste de México hasta Costa Rica. En Guatemala y El Salvador las hojas y las flores son utilizados en recetas de comida tradicional por el sabor que ofrecen los compuestos orgánicos volátiles que poseen (Morales *et al.* 2017). Generalmente, estos compuestos son un conjunto de terpenos, sin embargo, en la flor de loroco estos compuestos no están presentes (Caceres, 2009). Las raíces son ampliamente conocidas en la región por las toxinas que poseen, la loroquina y lorocina.

Para establecer las plantaciones se obtienen brotes de las raíces que son trasplantados o bien semillas. El material vegetal proviene principalmente de vida silvestre y a pesar de que existen estudios de toxicidad, propiedades medicinales y de contenido nutricional, no se ha procurado realizar una selección genética de los materiales vegetales con el fin de producir cultivares para los diferentes ámbitos de comercio.

En la actualidad el principal órgano del Loroco de importancia comercial es la flor debido a los compuestos volátiles orgánicos que posee, sin embargo, estos volátiles también se encuentran en hojas y tallos. En estos órganos y en especial en las hojas se puede apreciar una amplia variabilidad fenotípica (Granados, Rosales y Duarte, 2019), sin embargo, las diferentes formas de las hojas se encuentran distribuidas ampliamente en las poblaciones por lo que a pesar de ser caracteres fáciles de identificar no se pueden utilizar para diferenciar poblaciones.

Entre algunos de los problemas que se presentan en la producción de loroco se encuentra la clorosis de las inflorescencias, causada probablemente por Potyvirus y Cucumovirus (Guzmán y Morales 2006). La clorosis de las inflorescencias es un factor importante en la comercialización, ya que reduce el precio del producto (Com. Pers. Edgar Guirola y Emerio Portillo, investigadores CUNZAC IICA-CRIA).

Los marcadores moleculares representan una alternativa que se complementan con los análisis morfológicos para el estudio de la diversidad genética de plantas cultivadas. En la actualidad los microsatélites y los polimorfismos de nucleótido único se encuentran entre los marcadores moleculares que proveen información genética de mayor calidad, sin embargo, su estudio resulta en estudios muy caros. En el caso de los microsatélites la secuenciación parcial del genoma “shotgun sequencing” comprende la parte más cara, sin embargo, es posible probar microsatélites que se conozcan de otras especies cercanas. Por otra parte los RAPD son una opción más económica de utilizar aunque la información que proveen posee limitaciones por su baja especificidad.

En el presente estudio se evaluaron caracteres morfológicos y marcadores genéticos universales para RAPD y microsatélites, con los que se evaluó la variación genética del loroco dentro y entre poblaciones (localidades y manejo) en el oriente de Guatemala. Nosotros hipotetizamos que a través del análisis de marcadores morfológicos y moleculares se podrán identificar diferenciación genética en los departamentos del oriente de Guatemala.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Ácido desoxirribonucleico (ADN)

El (ADN) es un ácido nucleico que resguarda la información genética que se transmite de una generación adulta a sus descendientes por medio de la reproducción, lo cual permiten que cada especie sea única (Esto & Las, 2018). La estructura del ADN se conforma por dos cadenas antiparalelas de polinucleótidos que se enrollan alrededor de una cadena sobre la otra conformando así una doble hélice. Las cadenas de ADN están formadas por nucleótidos que se componen de un tipo de azúcar llama desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada de las cuales existen cuatro: adenina (A), timina (T), citosina (C), y guanina (G) (Krebs *et al.* 2017). Entre las funciones del ADN:

- Regula cada célula según su función.
- Controla la transmisión de la información contenida en cada célula en cuanto a tiempo y lugar de acción.
- Regula el proceso de la síntesis de proteínas.
- Forma las unidades funcionales de los cromosomas denominadas genes.
- Regula los procesos relacionados a la reproducción y conservación de las características de cada especie (Martínez-Frías, 2010).

2.2 Marcadores moleculares de diversidad genética

Los marcadores moleculares permiten conocer la expresión de un gen desde cualquier edad o estadio del individuo a estudiar. Estos marcadores son secuencias reconocibles del ácido desoxirribonucleico (ADN) que se encuentra en lugares específicos del genoma, relacionados directamente con la herencia mendeliana, además no son afectados por el ambiente (Krebs *et al.* 2017). Por medio de los marcadores moleculares se pueden hacer estudios directos del material genético los cuales dan a conocer rasgos que en ocasiones no se reflejan en el fenotipo (Collada Collada & Jiménez, 2000).

Los marcadores moleculares son de importancia para el estudio genético de poblaciones silvestres o cultivadas, las técnicas para evaluar cambios genéticos con base en el ADN son utilizadas para estudiar e identificar poblaciones con baja diversidad genética y con probabilidades de ser vulnerables a cambios ambientales. Además permiten distinguir genéticamente entre subpoblaciones para conocer el origen ya sea con fines comerciales o de conservación, entre otros usos (González, 2003). Los marcadores de ADN son importantes en todas las áreas de la biología para estudiar la diversidad de especies ya que permiten estudiar cualquier porción del genoma para determinar si existe polimorfismo en la población (Rentaría, 2000). Entre las ventajas de los marcadores moleculares, se encuentran:

- Se requiere una pequeña porción de la planta

- Se pueden realizar en cualquier edad o estadio
- Poseen un elevado nivel de polimorfismo
- Contienen mayor cantidad de información genética
- No se ve afectado por el medio ambiente
- El período de tiempo para conocer las características de una población se reduce en comparación con los marcadores morfológicos (Yañez Amayo, 2002).

2.3 Marcadores genéticos

Un marcador se define como la presencia de un gen o característica específica de una especie por ejemplo la resistencia a enfermedades de una planta es la presencia de un gen específico. Los marcadores son de importancia para el estudio de poblaciones de individuos y seleccionar los que presenten mejores características genéticas en cuanto a los intereses del hombre (Solís-Ramos & Andrade-Torres, 2005).

Los marcadores genéticos son uno de los instrumentos más eficientes para identificar la procedencia de algunas características genéticas, lo cual permite analizar la estructura genética de las poblaciones para poder realizar comparaciones con otras variedades de la misma especie (Baltián, 2006).

Existen dos tipos de marcadores muy importantes que son: Los marcadores morfológicos y los marcadores moleculares.

Los marcadores morfológicos permiten el estudio de las características fenotípicas de los individuos, como el color y tamaño de las hojas de una planta, por ejemplo. Estos marcadores fueron los primeros que utilizó el hombre para la identificación y potencial de las especies. Una de las desventajas de estos marcadores es que se ven modificados según las condiciones ambientales (Solís-Ramos & Andrade-Torres, 2005).

Los marcadores moleculares permiten conocer la expresión de un gen desde cualquier edad o estadio del individuo a estudiar. Estos marcadores son secuencias reconocibles del ácido desoxirribonucleico (ADN) que se encuentra en lugares específicos del genoma, relacionados directamente con la herencia mendeliana, además no son afectados por el ambiente (Krebs *et al.* 2017).

2.4 Cultivos en mesoamerica prehispanicos

Mesoamérica es una de las regiones con mayor diversidad biocultural por lo que ha sido reconocida como el centro de origen de la domesticación y la agricultura. Desde el punto de la ecología se relacionan diferentes procesos como: la diversidad de recursos, abundancia, distribución y las interacciones bióticas como la dispersión de semillas, especialmente la polinización entre otras (Casas, Rodríguez, Julia, Urbina, & Cruse-sanders, 2017).

La base de la civilización mesoamericana fue la agricultura lo cual tomo siglos para su desarrollo y perfección de las diferentes prácticas. El trabajo constante en la mejora de los cultivos, innovación en técnicas de producción las cuales fueron resguardadas por los agricultores, quienes pasaron de la recolección de productos vegetales al cultivo y domesticación de plantas. Posiblemente las siembras primitivas fueron parecidas a las que aún se realizan en algunas localidades de Chiapas y Guatemala; los cuales son una mezcla de arboles frutales, plantas medicinales, hierbas comestibles, ornamentales, y cacao (Organización de las Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación, 1992).

En Guatemala existe una gran diversidad de especies vegetales y animales gracias a su ubicación geográfica, situándose como un puente que permite el paso de especies entre las regiones de países vecinos, lo que ha generado que surjan diferentes grupos taxonómicos propios del área; en el país se conocen 7,754 especies de plantas debidamente registradas en las divisiones Magnoliophyta y Pinophyta entre las más numerosas. Además, cuenta con 1,171 especies vegetales endémicas, lo que representa el 15% del total de plantas. Guatemala ha sido considerado como uno de los centros de diversidad genética más importantes a nivel mundial, los primeros estudios de diversidad genética remontan al año 1925 con especies del género *Zea*, *Phaseolus*, *Amaranthus*, *Capsicum*, entre otras especies silvestres de importancia (EPIQ, 2002).

Dentro de los principales cultivos que se utilizan para agricultura familiar en Guatemala, se encuentran:

- Frijol
- Yuca
- Maíz
- Arroz
- Plátano
- Tomate
- Papaya

Existe otros cultivos como el loroco que en los últimos años ha empezado a cobrar importancia en los departamentos de Zacapa, Chiquimula, El Progreso, y Jutiapa; gracias a sus características organolépticas y el precio al que se vende sobre todo en las épocas de poca producción. El loroco es una enredadera que se da de forma silvestre y se puede cultivar en grandes extensiones de tierra con un adecuado manejo agronómico, el cual incluye podas, control de plagas y acceso al recurso hídrico.

2.5 Resultados de las investigaciones financiadas por el CRIA

Dentro del estudio de “Caracterización botánica in situ del cultivo de loroco (*Fernadia* sp.) y mapeo de productores en los departamentos de Zacapa y Chiquimula” se determinaron distintas variedades según sus características morfológicas, capacidad productiva, forma de desarrollo, dentro de las parcelas evaluadas ubicadas en el departamento de Zacapa y Chiquimula; fueron identificadas 5 variedades con características similares. Existe una gran cantidad de productores

locales que se dedican a la producción de loroco en los departamentos de Zacapa y Chiquimula, lo que representa un cultivo de importancia económica para las familias (Granados, Rosales y Duarte salguero, 2019).

Según el estudio de “La evaluación de cuatro longitudes de rizomas para la reproducción de plantas de loroco (*Fernaldia* sp.) fase de vivero. Chispan; Estanzuela, Zacapa. La longitud de los rizomas no influye estadísticamente en la brotación, ya que a los 90 días posteriores a la siembra los rizomas aumentaron entre seis y cinco centímetros de longitud. El crecimiento de los brotes de loroco fue directamente influenciado por la longitud inicial de los rizomas; a mayor longitud de los rizomas mayor crecimiento de brotes, según los análisis se determino que la longitud de rizomas de seis centímetros es la mas adecuada para la reproducción asexual de las plantas de loroco en la fase de vivero (Duarte Gutiérrez & García Guirola, 2019).

Se han realizado otros estudios como la evaluación de programas de fertilización en el cultivo de loroco, los cuales no generan ningún efecto en cuanto a la mejora de la producción. Y estudios sobre la aceptación de la flor de loroco para consumo con otras alternativas como la salsa de tomate, pesto, chile en escabeche y requesón con loroco, de las cuales la salsa de tomate con loroco es la que ha obtenido mayor aprobación por las personas.

Uno de los mayores problemas que se presentan en el cultivo de la flor de loroco es la coloración blanca de la flor, la cual según la investigación realizada sobre el “Diagnostico del agente causal de la coloración blanca en el cultivo de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) en los departamentos de Zacapa, Chiquimula y Guatemala” se debe a un estrés abiótico causado por factores climático como las elevadas temperaturas, baja humedad relativa, escases de precipitación en el área, de forma moderada la alta radiación solar; dicha coloración solo aparece en verano en altitudes entre 100-300 metros, lo que descarta que sea por un factor biótico (Portillo, 2018).

Según el análisis bromatológico realizado en el estudio “Caracterización fitoquímica de la flor de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) en los departamentos de Zacapa y Chiquimula”; la flor de loroco abierta puede ser utilizada para la elaboración de concentrados artesanales en animales, ya que la flor abierta deshidratada representa en promedio; 24% de proteína, 41% de carbohidratos y 12% de minerales y además dicha flor figura el 24% de las perdidas del cultivo. El loroco cuenta con un alto contenido de saponinas, taninos, flavonoides y aceites esenciales (Barillas & Rodas, sin fecha)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Medir las variaciones morfológicas y genéticas de las plantas de loroco cultivadas en el oriente de Guatemala y El Salvador con fines de selección y mejoramiento genético.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar las variaciones a nivel de morfología externa, partes florales e histoquímica.
2. Diseñar microsatélites específicos para el estudio de la variación genética del loroco.
3. Identificar los diferentes haplotipos en la región de estudio y sus distancias genéticas.

4. HIPÓTESIS

A través del análisis de marcadores morfológicos y moleculares se podrán identificar diferenciación genética en los departamentos del oriente de Guatemala

5. METODOLOGIA

5.1 Obtención de las muestras

Se colectaron muestras de loroco en los departamentos de Chiquimula (Camotán), El Progreso (El Jícaro), Jutiapa (Jalpatagua) y Zacapa (Zacapa y Estanzuela). Se colectaron hojas de loroco en plantaciones comerciales y en vida silvestre, en las plantaciones se colectaron 10 hojas de diferentes plantas y en vida silvestre se colectó una hoja de cada planta que se encontró.

5.2 Extracción de ADN

Se utilizaron dos métodos de extracción de acuerdo a la disponibilidad de reactivos en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones del Centro Universitario de Zacapa. El primer método de extracción se realizó mediante el uso de columnas silica con el kit de extracción PureLink® Plant Total DNA Purification Kit (Invitrogen Life Technologies) y el segundo método mediante extracción con buffer CTAB. Para la extracción con columnas de silica gel se obtuvo un volumen de elución final de 200µl y para la extracción con CTAB se obtuvo un volumen final de 50µl. Para ambos métodos de extracción de ADN se utilizaron <100mg de tejido vegetal, los cuales se molieron en morteros utilizando nitrógeno líquido.

Para las columnas de extracción se añadieron 250µl de buffer de resuspensión, 20% SDS, 15µl RNasa A (mg/mL), incubación a 55°C (15min), centrifugación a 17,000xg, se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5mL, 100µL de buffer de precipitación, incubación en hielo (5 min), centrifugado a 17,000gx (5 min), transferir 250µL de lisado transparente a un microtubo esteril, añadir 375µl con etanol al lisado, mezclar bien, transferir a una columna con cartucho, centrifugar 10,000xg por 30s, descartar el flujo, lavar con 500µl de buffer W4, centrifugar a 10,000xg por 30s, descartar el flujo, lavar con 500µl de buffer W5 con etanol, centrifugar a 10,000g por 30s, descartar el flujo, centrifugar a 17,000xg por 2min, transferir la columna a un microtubo estéril, añadir 100µl de buffer de elución, incubar por 1min, centrifugar a 17,000xg por 1min, añadir 100µl de buffer de elución, centrifugar a 17,000xg por 1min, almacenar a -20°C.

Para la extracción con CTAB (Bromuro de Hexadeciltri-metilamonio) se añadieron 2 ml de buffer de extracción [1.4M NaCl, 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 2% CTAB y 1% 2-mercaptoetanol] a 65°C e incubación a 65 °C por 45 min con agitación suave cada 10 min. Las proteínas fueron removidas mediante la adición de 2 mL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), luego fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 2 min. Se añadió RNasa (10µg/mL) al supernadante y se incubo por 30 min a 37°C, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min. El sedimento se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó y se resuspendió en 50 µl de buffer de Tris-EDTA (1 mM Tris HCl y 0.1 mM EDTA, pH 8.0).

5.3 Amplificación de regiones variables del ADN

La PCR consistió en una temperatura inicial de 95°C por 7 min, 35 ciclos consistentes en 1 min a 95°C, 30 seg a la temperatura de alineamiento del cebador y 1 min a 72°C. La extensión final fue de 10 min a 72°C. La amplificación del DNA se llevó a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Los cebadores utilizados fueron los RAPD (tabla 1) UBC04, UBC66, UBC135, UBC157, UBC101, UBC111 y UBC199 y los microsatélites (tabla 2) CCSSR4, CCSSR6, CCSSR7 y CCSSR9. Ambos conjuntos de cebadores se sintetizaron en Macrogen Korea (<https://dna.macrogen.com/>).

5.4 Geles de agarosa

Se mezclaron 2.5µl de productos de amplificación junto con 1.0µl de dye que contiene 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15% naranja G, 0.003% de cianol xileno FF, 60% de glicerol y 60mM de EDTA. La mezcla se cargo en geles de agarosa al 1.2% (p/v) sumergido en buffer de 1X Tris Borato EDTA [89mM Tris-Borato, 2mM EDTA (pH 8.3)].

Tabla 1. Cebadores de RAPDS utilizados para la amplificación de secuencias al azar de Loroco.

No.	Nombre	Secuencia 5'-3'
1	UBC-04	5'-CCTGGGCTGG-3'
2	UBC-66	5'-GAGGGCGTGA-3'
3	UBC-135	5'-AAGCTGCGAG-3'
4	UBC-157	5'-CGTGGGCAGG-3'
5	UBC-101	5'-GCGGCTGGAG-3'
6	UBC-111	5'-AGTAGACGGG-3'
7	UBC-199	5'-GCTCCCCAC-3'

Los RAPDS fueron seleccionados con base al estudio de variabilidad genética de Loroco realizado en el El Salvador por Castro (2008). Mientras los cebadores para microsatélites universales se seleccionaron de los estudios de Weising y Gardner (1999) y Chung y Staub (2003).

5.5 Análisis de datos morfológicos

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio de datos, esto permitirá apreciar tendencias, valores extremos o valores erróneos. Posteriormente se realizaron pruebas de normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilks y las pruebas visuales de QQ-Plot y distancia de Cook. Así mismo, se realizaron pruebas para determinar la homocesteidad de los datos. Se realizó un análisis de componentes principales, para lo cual se generarán matrices de distancias para los datos morfológicos. Una vez generado el análisis de componentes principales se analizaron los autovalores y autovectores para determinar cómo quedaron correlacionadas las variables en cada uno de los ejes del análisis de componentes principales.

Tabla 2. Cebadores de microsatélites universales utilizados para la amplificación de secuencias repetitivas del genoma de Loroco.

No.	Oligo	Secuencia
1	ccSSR-4_F	5'-AGG TTC AAA TCC TAT TGG ACG CA-3' (23mer)
2	ccSSR-4_R	5'-TTT TGA AAG AAG CTA TTC ARG AAC-3' (24mer)
3	ccSSR-6_F	5'-CGA CCA ATC CTT CCT AAT TCA C-3' (22mer)
4	ccSSR-6_R	5'-AGA AAA GMA AGG ATA TGG GCT C-3' (22mer)
5	ccSSR7_F	5'-CGG GAA GGG CTC GKG CAG-3' (18mer)
6	ccSSR7_R	5'-GTT CGA ATC CCT CTC TCT CCT TTT-3' (24mer)
7	ccSSR9_F	5'-GAG GAT ACA CGA CAG ARG GAR TTG-3' (24mer)
8	ccSSR9_R	5'-CCT ATT ACA GAG ATG GTG YGA TTT-3' (24mer)

5.6 Análisis de datos genéticos

Debido a que los RAPD son inespecíficos la amplificación de bandas se contabilizó como presencia y la no amplificación de bandas como ausencia en una matriz de 1/0. El número de bandas únicas se calculó para cada localidad. La diversidad genética se estimó mediante el índice de Shannon-Weaver empleando la formula de Brillouin ($H_o = -\sum P_i \log_2(P_i)$, donde P_i es la frecuencia de la banda i). Posteriormente, se construyó una matriz de distancias mediante el índice de Jaccard y posteriormente se elaboró un dendrograma mediante el método de Ward.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de datos morfológicos

Los caracteres morfológicos florales seleccionados mostraron diferentes grados de variación en cada uno de los sitios de muestreo (tabla 3, figura 1). Estas variables fueron medidas con el fin de estimar si hay diferencias entre las poblaciones de loroco cultivadas en el oriente de Guatemala. Para estimar si había diferencias significativas entre cada una de las unidades de estudio inicialmente se realizó un análisis de varianza y se verificó la normalidad de los residuales (anexo 1). Debido a que la mayor parte de los datos no presentó normalidad se procedió a realizar la prueba de Kruskal Wallis, la cual es una prueba no paramétrica.

De acuerdo a las estimaciones de la prueba de Kruskal-Wallis (tabla 3), se aprecia diferencia significativa para cada una de las variables, a excepción de la longitud del estigma.

Para determinar entre que unidades de estudio hubo diferencia, se procedió a realizar una Prueba de Comparaciones Múltiples de Rangos de Medias. Para la longitud del pedúnculo se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Ch-VH-02.

Para la longitud de los sépalos se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-04, L-Z-Ch-04/L-Z-Ch-05 y L-Z-Ch-04/L-ZCh-01.

Para la longitud del tubo de la corola se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-VH-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-05, L-Ju-Ja-02/L-Zse-01, L-Z-Ch-04/L-Z-Ch-05, L-Z-Ch-04/L-Zse-01, L-Z-Ch-05/L-ZCh-01 y L-Z-Ch-05/L-Zse-01.

Para longitud del tubo a la apertura de los pétalos se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-Ca-02/L-ZCh-01, L-Ch-Ca-02/L-Zse-01, L-Ch-VH-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-VH-02/L-ZCh-01 y L-Ch-VH-02/L-Zse-01.

Para la longitud del tubo al ápice del pétalo se encontró diferencia significativa para los sitios L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-Ca-02/L-ZCh-01, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-VH-02/L-ZCh-01, L-Ch-VH-02/L-Zse-01, L-Ju-Ja-02/0.00046, L-Ju-Ja-02/3.1e-05, L-Ju-Ja-02/0.01697, L-Z-Ch-04/L-Zse-01 y L-Z-Ch-05/0.00290.

Para el ancho del tubo se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-Ca-02/L-Zse-01, L-Ch-VH-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-VH-02/L-ZCh-01, L-Ch-VH-02/L-Zse-01, L-Ju-Ja-02/L-Z-Ch-04, L-Z-Ch-04/L-Z-Ch-05, L-Z-Ch-04/L-ZCh-01 y L-Z-Ch-04/L-Zse-01.

Para el ancho del pétalo en el ápice se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-Ca-02/L-ZCh-01, L-Ch-Ca-02/L-Zse-01, L-Ch-VH-02/L-Ju-Ja-02, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-04, L-Ch-VH-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-VH-02/L-ZCh-01 y L-Ch-VH-02/L-Zse-01.

Para la longitud de la antera se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Ju-Ja-02, L-Ju-Ja-02/L-Z-Ch-04, L-Ju-Ja-02/0.01119 y L-Ju-Ja-02/0.00052.

Para la longitud del filamento del estambre se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-Z-Ch-05, L-Ch-Ca-02/L-ZCh-01, L-Ch-Ca-02/L-Zse-01, L-Ch-VH-02/0.04778, L-Ch-VH-02/0.00012, L-Ch-VH-02/0.00196, L-Z-Ch-04/L-ZCh-01, L-Z-Ch-04/L-Zse-01.

Para la longitud del estigma se encontró diferencia significativa entre los sitios L-Ch-Ca-02/L-ZCh-01, L-Ch-VH-02/L-ZCh-01, L-Z-Ch-04/L-ZCh-01 y L-Z-Ch-05/L-ZCh-01.

De acuerdo con el Análisis de Componentes Principales (PCA), hasta en el componente principal número 9 se alcanza a explicar más del 95% de la varianza. Los componentes principales 1 y 2 tan solo acumulan un 40.72% de la varianza.

Con respecto a la diferenciación morfológica de las poblaciones de loroco evaluados se aprecia en los análisis de los ejes 1-2 y 1-3 una separación entre las poblaciones de Vado Hondo y Camotán con respecto a las poblaciones de Zacapa y Jalpatagua en Jutiapa. Entre las poblaciones de Zacapa y Jalpatagua no se aprecia ninguna diferencia entre sí, es probable que el material genético de Jalpatagua se haya obtenido de Zacapa; sin embargo, es un extremo que no se ha confirmado.

Tabla 3. Valores de la prueba de Kruskal-Wallis, media y desviación estándar para cada una de las unidades de estudio de Guatemala.

Variable	Valor de P	L-Ch-Ca-02	L-Ch-Vh-02	L-Ju-Ja-02	L-Z-Ch-04	L-Z-Ch-05	L-ZCh-01	L-Zse-01
Longitud del pedúnculo	0.03984	1.09 ± 0.346	1.27 ± 0.291	1.16 ± 0.271	1.17 ± 0.262	1.14 ± 0.228	1.21 ± 0.226	1.20 ± 0.227
Longitud de los sépalos	2.56e-08	0.25 ± 0.077	0.22 ± 0.071	0.21 ± 0.063	0.17 ± 0.061	0.25 ± 0.064	0.22 ± 0.069	0.23 ± 0.100
Longitud del tubo de la corola	2.2e-16	2.63 ± 0.218	2.52 ± 0.226	2.31 ± 0.232	2.34 ± 0.198	2.18 ± 0.141	2.46 ± 0.183	2.58 ± 0.293
Longitud del tubo a la apertura de los pétalos	2.2e-16	1.55 ± 0.145	1.57 ± 0.165	1.37 ± 0.184	1.34 ± 0.171	1.23 ± 0.174	1.29 ± 0.238	1.32 ± 0.149
Longitud del tubo al ápice del pétalo	2.2e-16	3.56 ± 0.309	3.71 ± 0.406	3.42 ± 0.334	3.00 ± 0.349	2.89 ± 0.508	3.08 ± 0.304	3.33 ± 0.332
Ancho del tubo	2.2e-16	0.44 ± 0.057	0.48 ± 0.059	0.36 ± 0.049	0.47 ± 0.062	0.39 ± 0.046	0.40 ± 0.049	0.38 ± 0.055
Ancho del pétalo en el ápice	2.2e-16	2.52 ± 0.420	2.51 ± 0.352	1.71 ± 0.264	1.51 ± 0.179	1.47 ± 0.269	1.57 ± 0.231	1.81 ± 0.267
Longitud de la antera	1.935e-05	0.60 ± 0.080	0.58 ± 0.082	0.54 ± 0.069	0.61 ± 0.042	0.61 ± 0.081	0.60 ± 0.049	0.61 ± 0.106
Longitud del filamento del estambre	4.655e-09	0.19 ± 0.057	0.19 ± 0.070	0.15 ± 0.057	0.18 ± 0.058	0.15 ± 0.048	0.14 ± 0.122	0.13 ± 0.023
Longitud del estigma	0.06071	0.19 ± 0.049	0.20 ± 0.093	0.20 ± 0.048	0.19 ± 0.045	0.19 ± 0.037	0.17 ± 0.083	0.19 ± 0.033

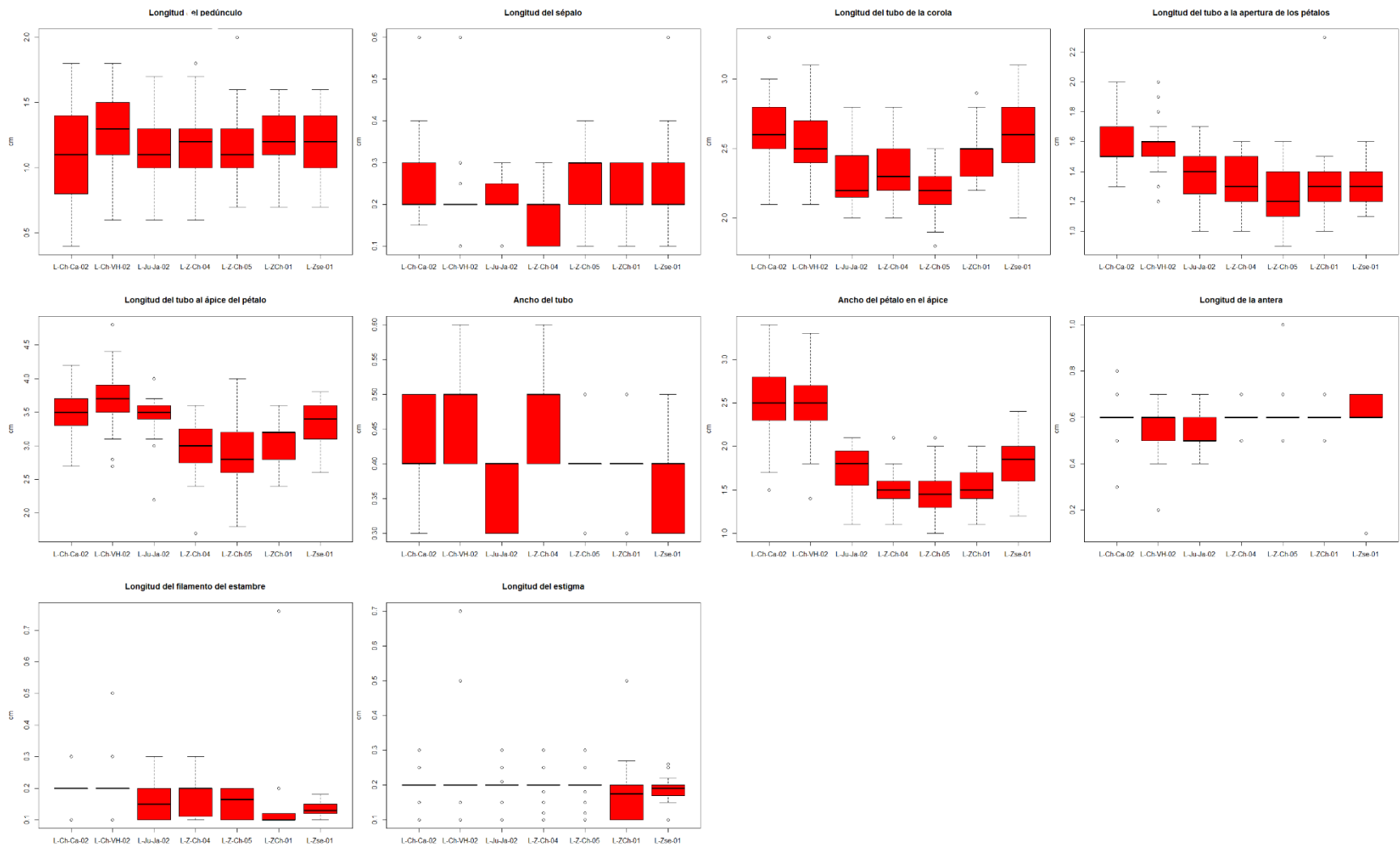
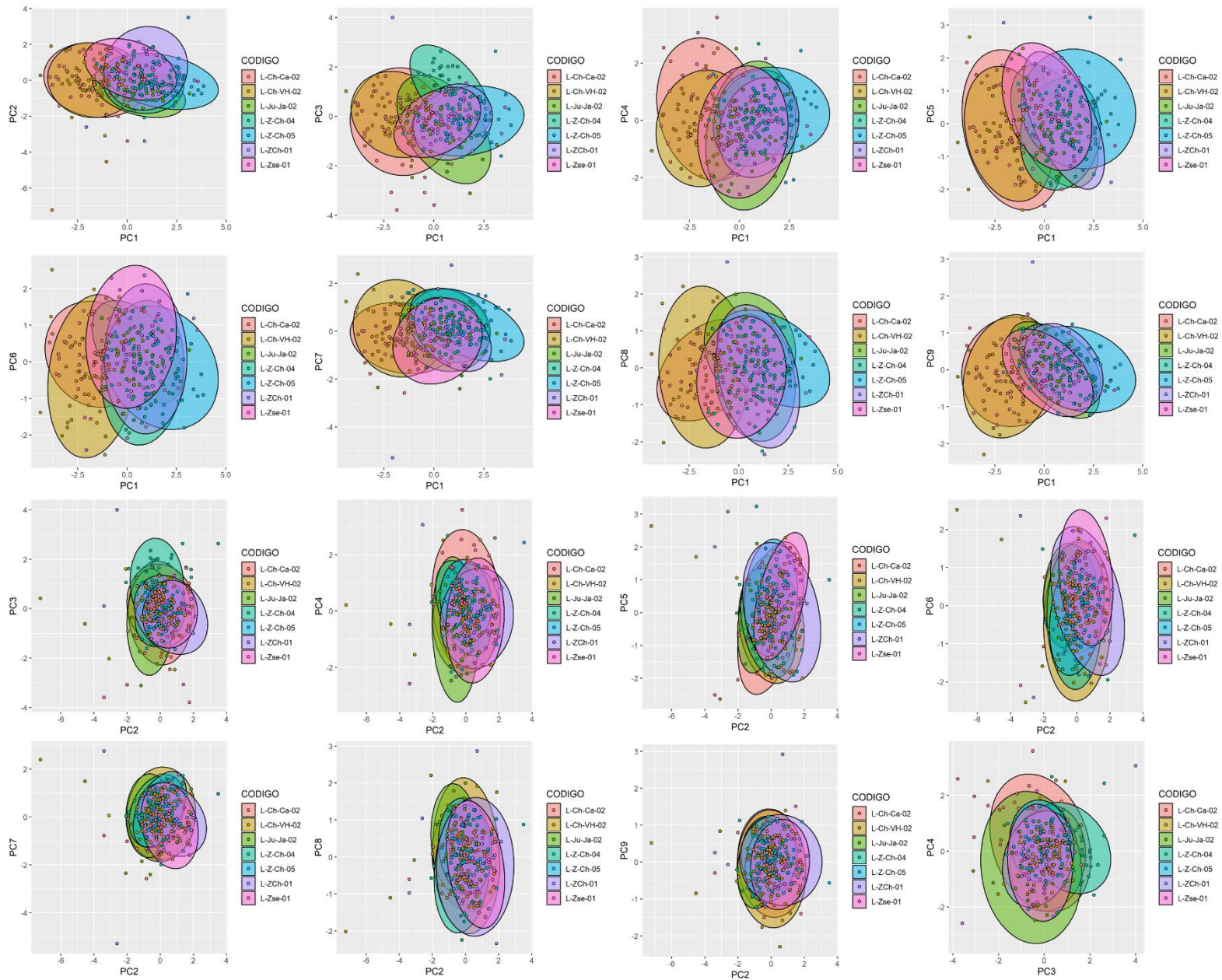
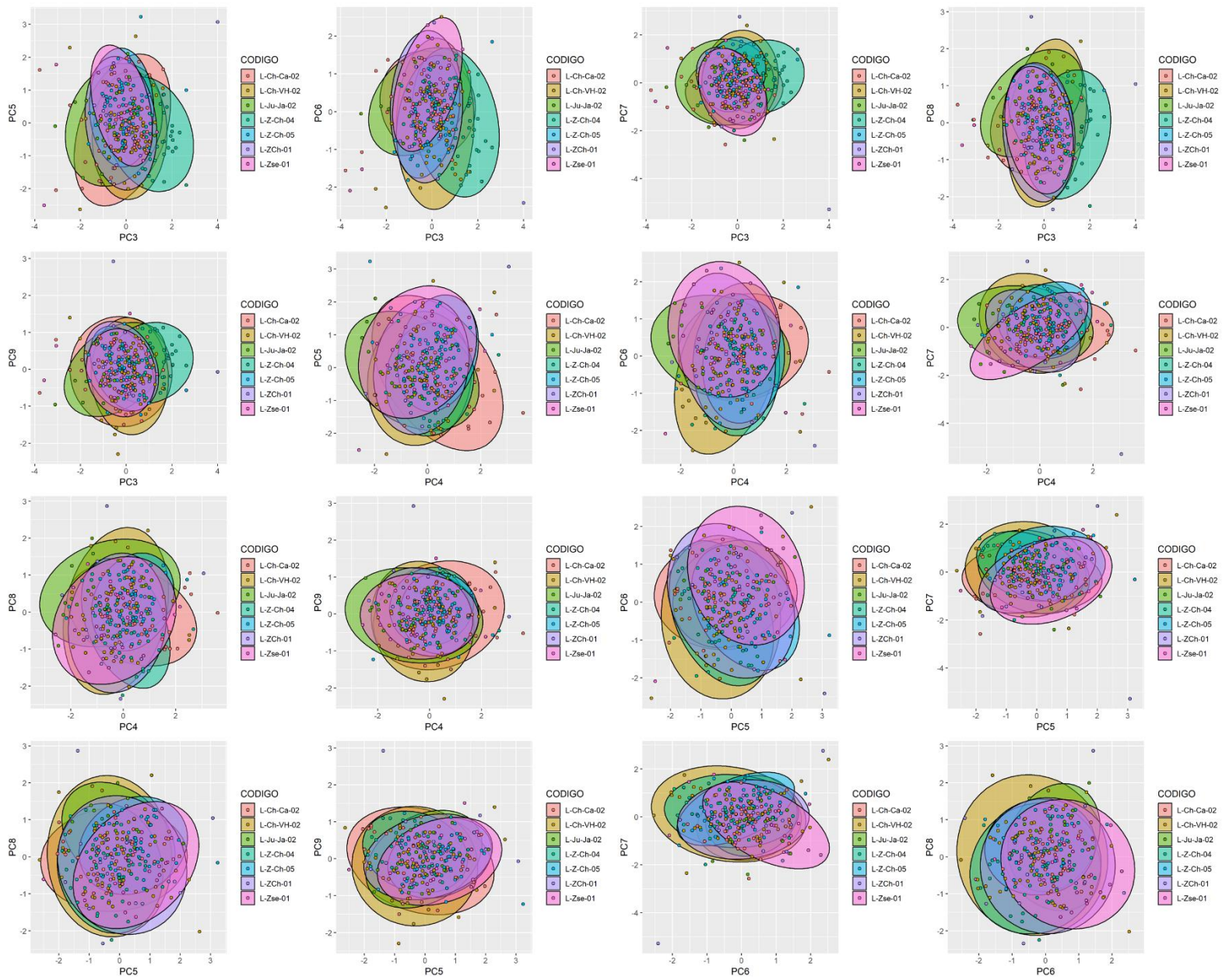


Figura 1. Diagramas de cajas y bigotes de las variables florales medidas. A) longitud del pedúnculo, B) longitud de los sépalos, C) longitud del tubo de la corola, D) longitud del tubo a la apertura de los pétalos, E) longitud del tubo al ápice del pétalo, F) ancho del tubo, G) ancho del pétalo en el ápice H) longitud de la antera, I) longitud del filamento del estambre, J) longitud del estigma y K) diagramas de las partes florales.

Tabla 4. Estadísticos del Análisis de componentes Principales.

IMPORTANCIA DE LOS COMPONENTES										
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10
Desviación estandar	1.7123	1.0678	1.0275	1.0198	0.98657	0.90744	0.87831	0.80692	0.62005	0.47786
Proporción de la varianza	0.2932	0.114	0.1056	0.104	0.09733	0.08234	0.07714	0.06511	0.03845	0.02284
Proporción acumulada	0.2932	0.4072	0.5128	0.6168	0.71412	0.79646	0.87361	0.93872	0.97716	1.00000





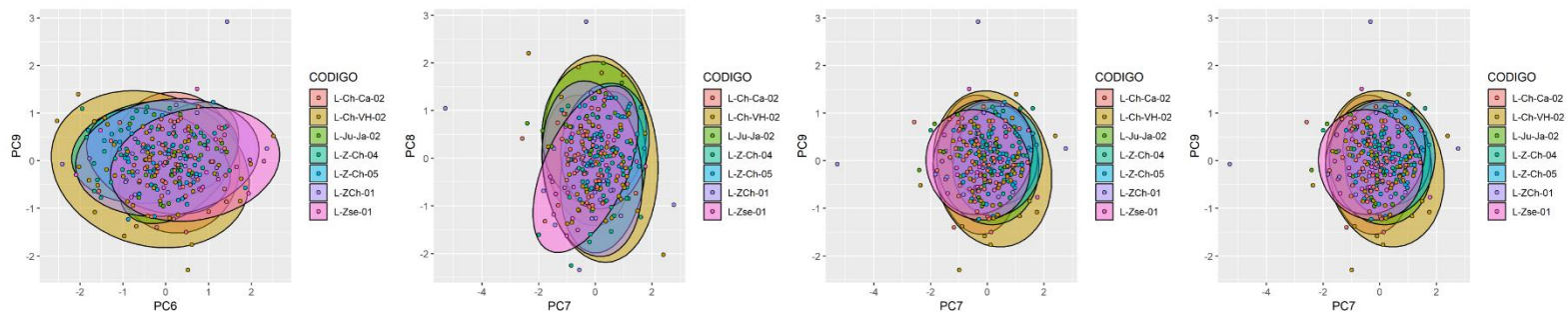


Figura 2. Análisis de Componentes Principales de las variables medidas de la flor de Loroco en siete localidades del oriente de Guatemala.

6.2 Análisis de datos genéticos

Se analizaron un total de 121 bandas para seis cebadores RAPD, de estas el 32% fueron polimórficas. Los polimorfismos únicos van desde el 0% al 56% por cebador. El porcentaje de bandas polimórficas dentro de la población van desde el 0% hasta el 44% (tabla 5). Los valores de variabilidad más altos se encontraron en la población de Chispan y los más bajos en Caparaja y Jalpatagua. Para los microsatélites se analizaron 68 bandas, de las cuales los marcadores CCSSR4, CCSSR7 y CCSSR9 fueron monomórficos, solamente el marcador CCSSR6 amplificó una banda de 150 pares de bases para las muestras de Chispan y doble banda en el rango de 100 y 1200 pares de bases para el resto de localidades.

Tabla 5. Bandas polimórficas únicas detectadas en seis cebadores en cinco localidades de lorocho.

Cebador	Número de bandas amplificadas	Chispan	Caparaja	Guadalupe	Jalpatagua	El Progreso	Polimorfismos únicos
UBC 135	9	4 (0.44)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.11)	5 (0.56)
UBC 199	5	1 (0.20)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.20)	1 (0.20)	1 (0.20)
UBC 04	6	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (0.33)	0 (0.00)	2 (0.33)	2 (0.33)
UBC 66	6	1 (0.17)	1 (0.17)	1 (0.17)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (0.33)
UBC 111	4	1 (0.25)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)
UBC 157	8	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (0.25)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (0.25)
Media	6.33	1.17 (0.18)	0.17 (0.03)	0.83 (0.13)	0.17 (0.03)	0.67 (0.11)	1.17 (0.18)

De acuerdo a los datos del índice de diversidad de Shannon (tabla 6), el cebador UBC157 posee el valor de diversidad más alto y el cebador UBC04 posee el valor de diversidad más bajo. Así mismo, para las localidades Guadalupe posee el valor promedio de diversidad más alto y Jalpatagua el valor promedio más bajo.

Según los valores de diversidad del índice de Shanon la mayor parte de la variabilidad genética se puede encontrar entre las poblaciones, este valor asciende al 82%, y solamente el 18% se encuentra dentro de las poblaciones (tabla 7).

Tabla 6. Valores de diversidad genética de Loroco, índice de Shanon, de cinco localidades del oriente de Guatemala.

Cebador	Chispan	Caparaja	Guadalupe	Jalpatagua	El Progreso
UBC 135	1.79	0.69	1.10	0.69	1.10
UBC 199	1.10	0.00	0.00	1.10	1.39
UBC 04	0.00	0.69	1.10	0.00	1.39
UBC 66	0.00	1.10	1.79	0.00	1.10
UBC 111	1.61	0.69	1.79	0.00	0.00
UBC 157	1.10	0.69	1.39	1.10	1.61
Promedio	0.93	0.65	1.19	0.48	1.10
Shanon sitio	2.84	2.55	2.08	2.20	2.84

Tabla 7. Distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones de Loroco.

Cebador	Diversidad genética dentro de la población	Diversidad genética total	Porcentaje de la diversidad dentro de población	Coefficiente de diferenciación genética entre las poblaciones (Gst)
Promedio	0.60	3.35	0.18	0.82

El análisis de agrupamiento mediante el método de Ward y distancias de Jaccard (figura 3) muestra la presencia de tres grupos, sin embargo, no se aprecia visulamente que los grupos se formen por el origen (plantación comercial o silvestre) o bien por la localidad de colecta. En el primer grupo se agrupan una muestra de Camotán y Jutiapa, en el segundo grupo muestras de Camotán, Jutiapa y Zacapa y en el tercer grupo muestras de El Progreso, Jutiapa y Zacapa.

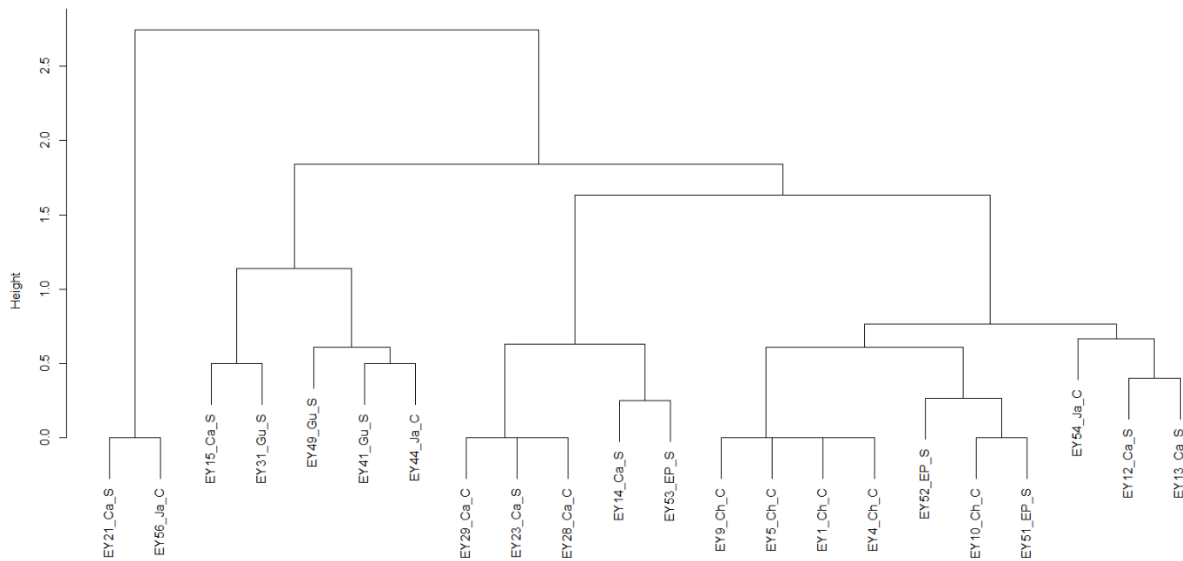


Figura 3. Análisis de agrupamiento por el método de Ward utilizando una matriz de distancias de Jaccard.

Discusión de resultados

Los marcadores RAPD tienen usos en construcción de índices de marcadores, estudios de diversidad y selección basada en alelos raros. Entre las ventajas que presentan es que los procedimientos son rápidos, fáciles de realizar, existen cebadores disponibles, se pueden detectar polimorfismos fácilmente y varios marcadores pueden ser detectados utilizando un solo cebador. Entre las desventajas que presentan se encuentran que son marcadores dominantes, las condiciones experimentales son críticas, baja transferibilidad y reproducibilidad. El principio de funcionamiento de los RAPD se basa en la amplificación de regiones al azar, los polimorfismos se basan en inserciones o deleciones de bases nitrogenadas, son ampliamente abundantes en el genoma y la reacción de PCR requiere de 10-25 μ g de ADN crudo.

Los microsatélites son utilizados para la construcción de índices de mapas, mapeo de tetraploides, estudios de genética de poblaciones, examinar el flujo genético y determinación de híbridos. Entre las ventajas que presentan son la simplicidad de la técnica, son codominantes, altamente polimórficos, fácilmente transferibles, rapidez para su realización y son robustos. Entre las desventajas que presentan es el largo tiempo de diseño de los cebadores, la necesidad de cebadores específicos y el alto costo del diseño de los cebadores. Los microsatélites son secuencias simples repetidas de DNA utilizando pares de cebadores, se basa en los cambios de longitud de secuencias repetidas, son altamente abundantes en el genoma, el nivel de polimorfismo es alto y requieren de 50-100 μ g de DNA relativamente puro.

De acuerdo al análisis de RAPD se aprecia una baja variabilidad genética dentro de las localidades (18%) en contraposición a una mayor variabilidad genética entre localidades (82%). Así mismo, se aprecia en la dendrograma (figura 2) que no hay segregación entre las muestras de plantaciones y vida silvestre. Estos resultados son similares a los estimados en El Salvador por Castro (2008).

El fitomejoramiento es una rama de la agricultura que utiliza técnicas de cruzamiento selectivo y selección artificial para obtener características deseables durante la siembra y cosecha o bien para el mercadeo de los productos finales. Entre algunos de los caracteres deseables del Loroco que se han establecido durante el presente estudio se encuentran: producción de flor durante todo el año, plantas que no padezcan del blanqueamiento de la flor, flores de tamaño homogéneo, mayor tiempo de vida en anaquel y flores que conserven sus propiedades organolépticas después de ser sometidas a técnicas de preservación.

7. CONCLUSIONES

El análisis de frecuencias y el análisis de componentes principales muestran una baja diferenciación poblacional con base los caracteres morfológicos. Algunos autores sugieren que existen variaciones muy claras en las hojas, sin embargo, estos polimorfismos pueden presentarse sobre un mismo individuo lo cual evidencia que no es buen carácter para separar.

Los datos evidencian una baja diferenciación genética en las poblaciones del oriente de Guatemala, lo cual seguramente se ve influenciado por la conectividad de las tierras bajas en donde habitan las poblaciones de Loroco. Aunado a esto los polinizadores pueden incrementar el flujo génico dentro de la región lo cual provoca que se detecta un alto valor de la GST (Estadístico Genético). Así mismo, los datos sugieren que la reciente “domesticación” del Loroco no permite apreciar una segregación genética entre los individuos de las plantaciones y de vida silvestre.

Los marcadores RAPD universales han presentado la ventaja de mostrar más variabilidad genética que los microsatélites universales utilizados, sin embargo, esto solo es un efecto de las técnicas y selección de marcadores ya que la superioridad de los microsatélites está ampliamente demostrada en la literatura.

8. RECOMENDACIONES

Implementar análisis de morfometría geométrica dentro de los análisis morfológicos de los órganos de la planta de loroco. Consideramos que este tipo de análisis incrementará las capacidades de separar grupos en base a las variaciones fenotípicas debido al uso de landmarks equivalentes entre las muestras y de la eliminación del efecto alométrico.

Recomendamos realizar un estudio de las diferentes poblaciones que se encuentran entre el sureste de México y Costa Rica para incrementar la escala geográfica que permita apreciar mayores variaciones, tanto a nivel morfológico como a nivel genético.

Es recomendable realizar una secuenciación completa del genoma para diseñar microsatélites que puedan utilizarse con confiabilidad en la planta de loroco, esto además permitirá realizar anotaciones de los genes y conocer de mejor manera cuáles son los potenciales genotipos que pueden ser sujetos a selección artificial o al menos que se encuentran asociados a las características deseables.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Azurdia, C., Willian, K., Williams, D., Van Damme, V., Jarvis, A. y Castaño, S. 2004. Atlas Guatemalteco de Parientes Silvestres de las Plantas Cultivadas. USDA. 258 pp.
- Cáceres, A. (2009). Actividad Antioxidante de diez especies nativas como posibles preservantes de alimentos y fuente para el desarrollo de nutraceuticos. Guatemala: Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), 134pp.
- Casas, A., Rodríguez, S. G., Julia, C., Urbina, F., & Cruse-sanders, J. (2017). Manejo y domesticación de plantas en Mesoamérica. Una estrategia de investigación y estado del conocimiento sobre los recursos genéticos. In A. Casas, J. Torres-Guevara, & F. Parra-Rondinel (Eds.), Domesticación en el continente americano, Tomo 2: Investigación para el manejo sustentable de recursos genéticos en el Nuevo Mundo (pp. 69–102). UNAM/UNALM.
- Collada Collada, C., & Jiménez, P. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales, 9(2), 237–248.
- Duarte Gutiérrez, J., & García Guirola, J. (2019). Evaluación de cuatro longitudes de rizomas para la reproducción de plantas de loroco (*Fernaldia* sp.), FASE DE VIVERO.
- EPIQ. (2002). Análisis de la Biodiversidad en Guatemala. Retrieved from https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:K3xQe_SDaLQJ:https://rmpport.al.net/library/content/tools/environmental-policy-and-institutional-strengthening-epiq-iqc/epiq-environmental-policy-and-institutional-strengthening-cd-vol-1/epiq-cd-1-techni
- Esto, C., & Las, N. (2018). Ácido Desoxirribonucleico. Ácido Desoxirribonucleico (ADN), (C), 1–3. Retrieved from <https://www.genome.gov/27562614/cido-desoxirribonucleico-adn/>
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia. <https://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.253>
- Granados, L., Rosales, C., & Duarte, J. (2019). Caracterización botánica in situ del cultivo de loroco (*Fernaldia pandurata* W.).
- Krebs, J. E., Goldstein, E. y Kilpatrick, S. (2017). Lewin's Genes XII. Ed. Jones & Bartlett, 12ed. 838pp
- Morton, J. F., E. Alvarez & C. Quiñonez, 1990: Loroco, *Fernaldia pandurata* (Apocynaceae): a popular edible flower of Central America. Economic Botany 44, 301–310.

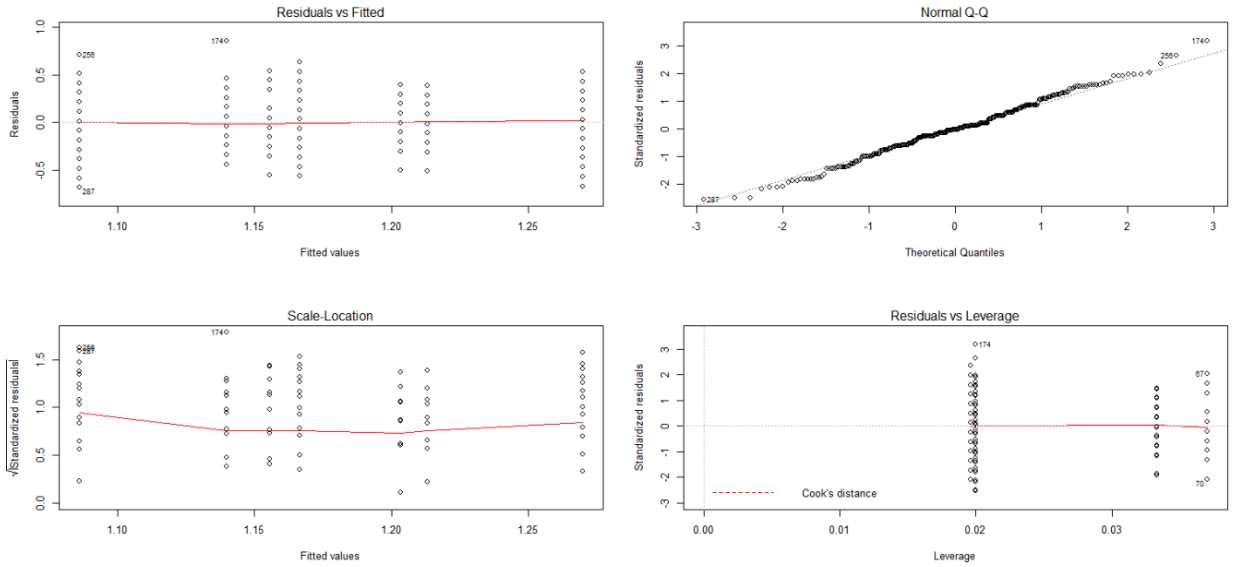
- Barillas, J., & Rodas, A. M. (Sin fecha). Caracterización fitoquímica de la flor de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) en los departamentos de Zacapa y Chiquimula.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (1992). Cultivos marginados de otra perspectiva de 1942. Retrieved from http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/prior/segalim/prodalim/prodveg/cdrom/contenido/libro09/Cap2_1.htm#Top
- Portillo, E. (2018). Diagnóstico del agente causal de la coloración blanca en el cultivo de loroco (*Fernaldia pandurata* W.) en los departamentos de zacapa y chiquimula, Guatemala.
- Rentaría, M. (2000). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Blood*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Solís-Ramos & Andrade-Torres. (2005). ¿Qué son los marcadores moleculares?. *La Ciencia y El Hombre*, 18(1): 41-46.
- Standley, P. & Williams, L. O. (1969). *Flora of Guatemala*. *Fieldiana, Bot.* 24(8).
- Martínez-Frías, M. L. (2010). Estructura y función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. *Semergen*, 36(5), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.semereg.2009.12.014>
- Morales, A. 2017. Evaluación de cuatro extractos vegetales para el manejo de áfidos (*Aphis* spp), en el cultivo de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson), en los departamentos de Zacapa y Chiquimula, Guatemala.
- Pedroza, H. 2007. Enfoque integrado de investigación y extensión en sistemas agropecuarios.
- Prada J. M. E. 2002. El cultivo de loroco (*Fernaldia pandurata*) en El Salvador, Proyecto regional de fortalecimiento de la vigilancia fitosanitaria en cultivos de exportación no tradicional República de China OIRSA, San Salvador, ES, 29 p.
- Salguero, M. 1999. Manejo Agronómico del Cultivo de Loroco, (*Fernaldia pandurata* Woodson), en la finca Las Chichitas, Jutiapa.
- Yañez Amayo, V. O. (2002). Aislamiento y Caracterización de Marcadores Moleculares Microsatélites a partir de la Construcción de Librerías Genómicas Enriquecidas de Camote (*Ipomea batatas* (L.) Lam).

10. AGRADECIMIENTOS

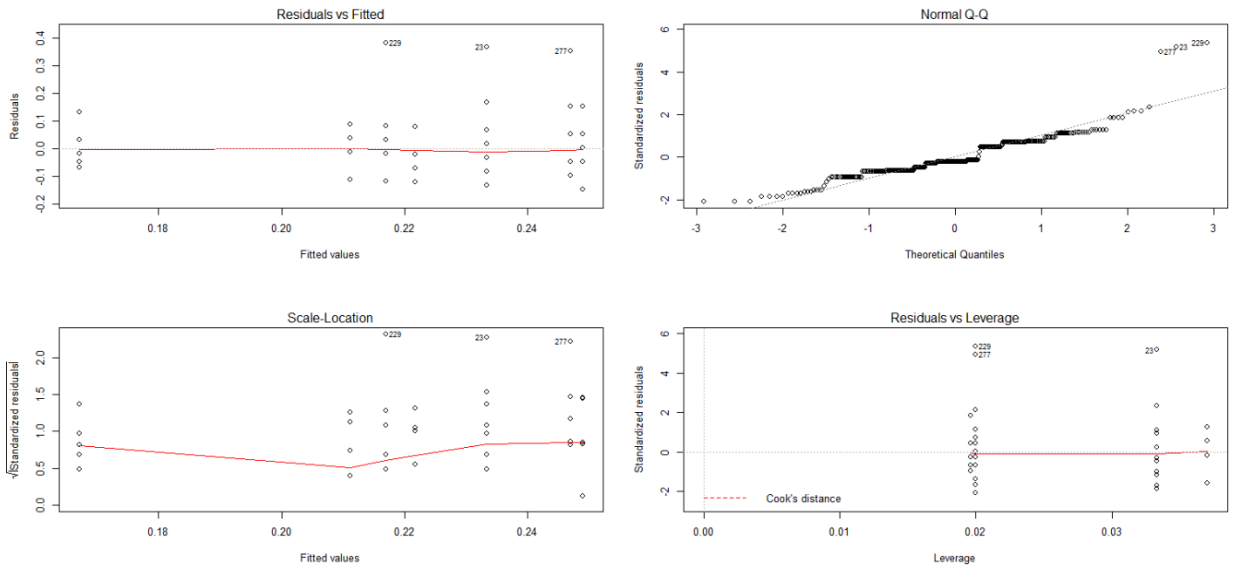
Agradecemos a USAID, al Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y al Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación por el financiamiento del presente proyecto, en especial a la Ingeniera María Febres, Ingeniera Claudia Calderón y licenciado Humberto Monroy. También agradecemos al Maestro Carlos Augusto Vargas Gálvez, Maestro Cristian Alexander Rosales Gómez, Maestro Rolando Guirola y Maestro José Ángel Urzúa Duarte de la Universidad de San Carlos de Guatemala por el apoyo brindado para la ejecución correcta de los proyectos de investigación. También agradecemos a la Dra. Sara Bethsabe Barrios de León por el apoyo brindado en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones del Centro Universitario de Zacapa.

11.ANEXOS

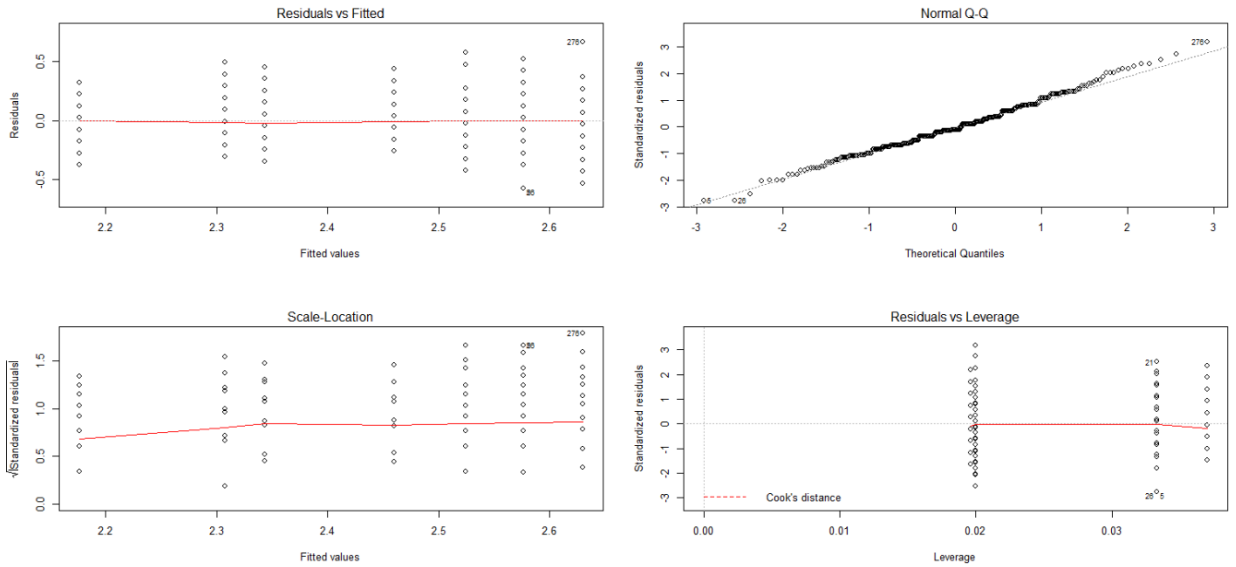
Anexo 1. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud del pedúnculo.



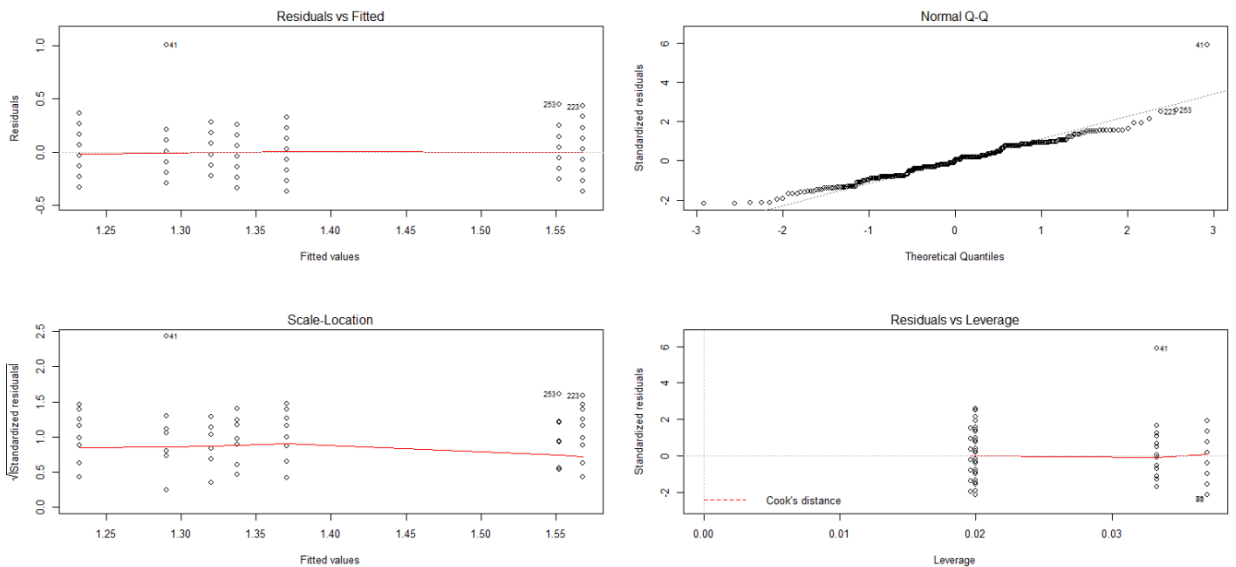
Anexo 2. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud de los sépalos.



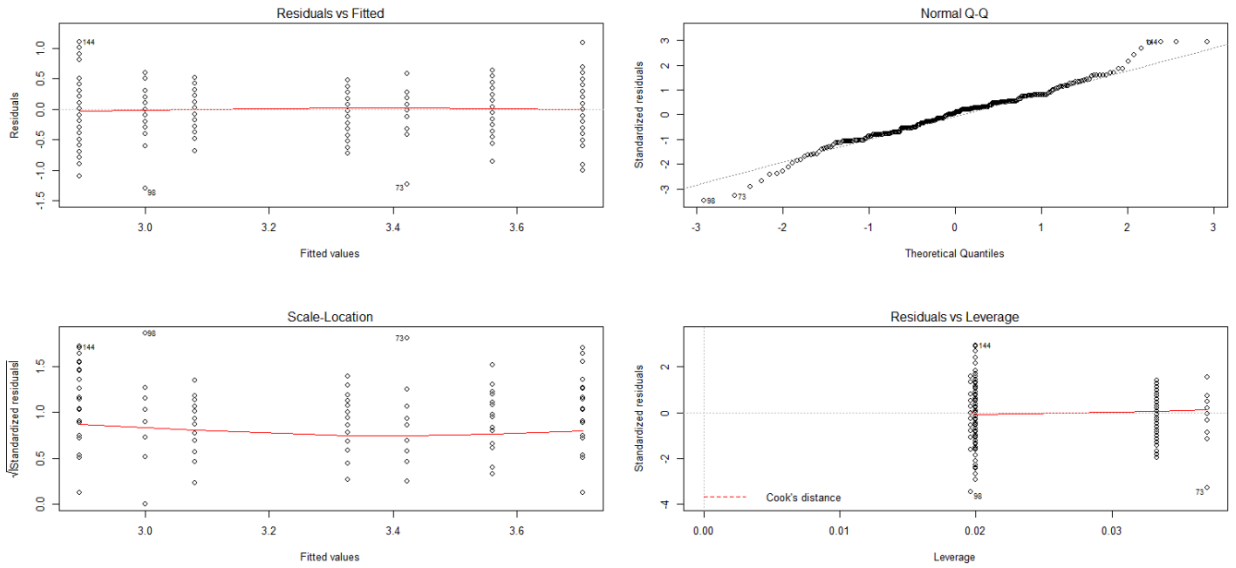
Anexo 3. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud del tubo de la corola.



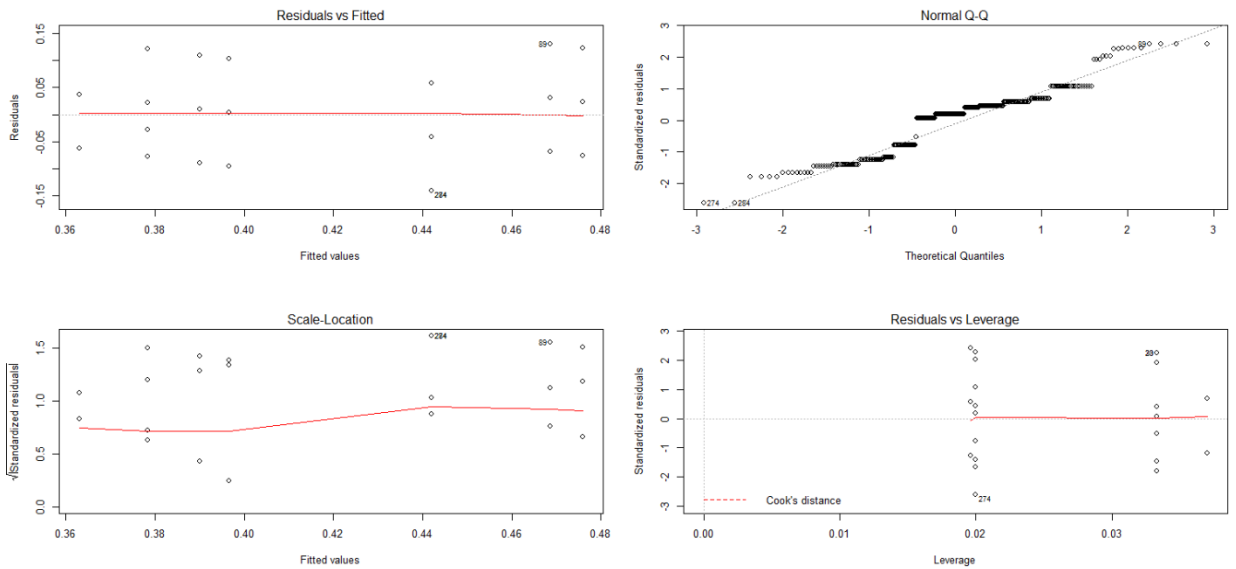
Anexo 4. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud del tubo a la apertura de los pétalos.



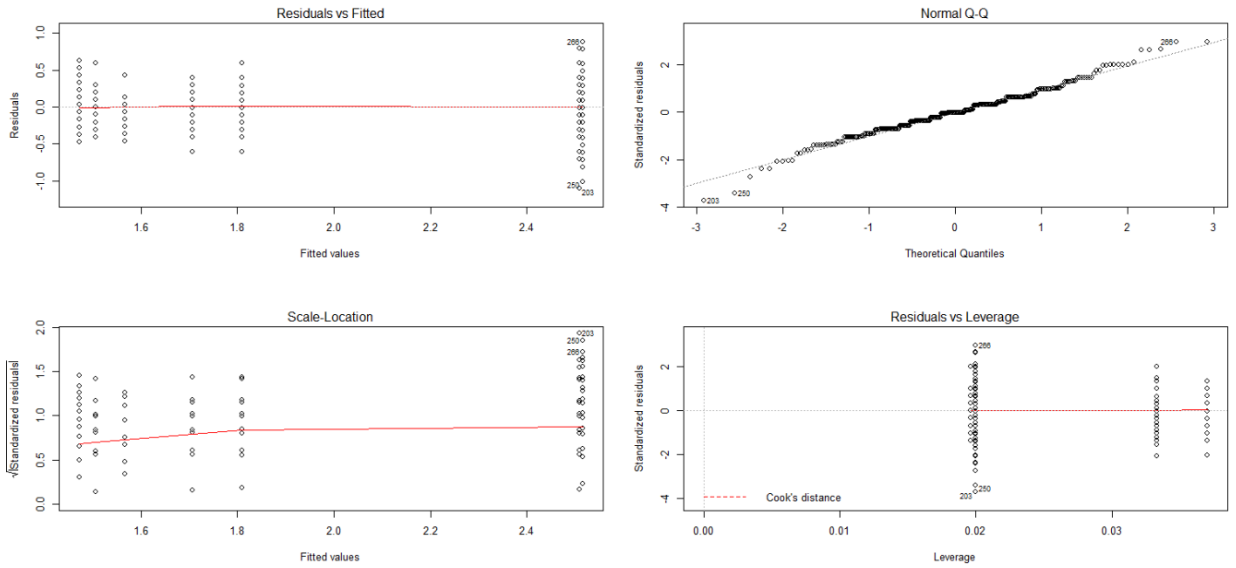
Anexo 5. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud del tubo al ápice del pétalo.



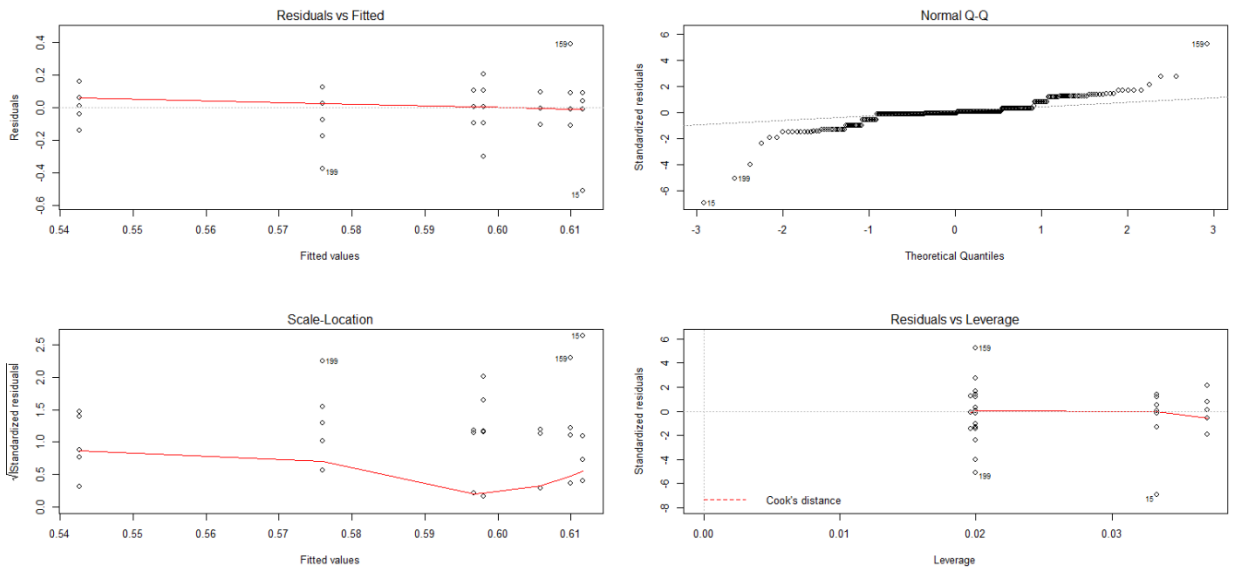
Anexo 6. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de ancho del tubo



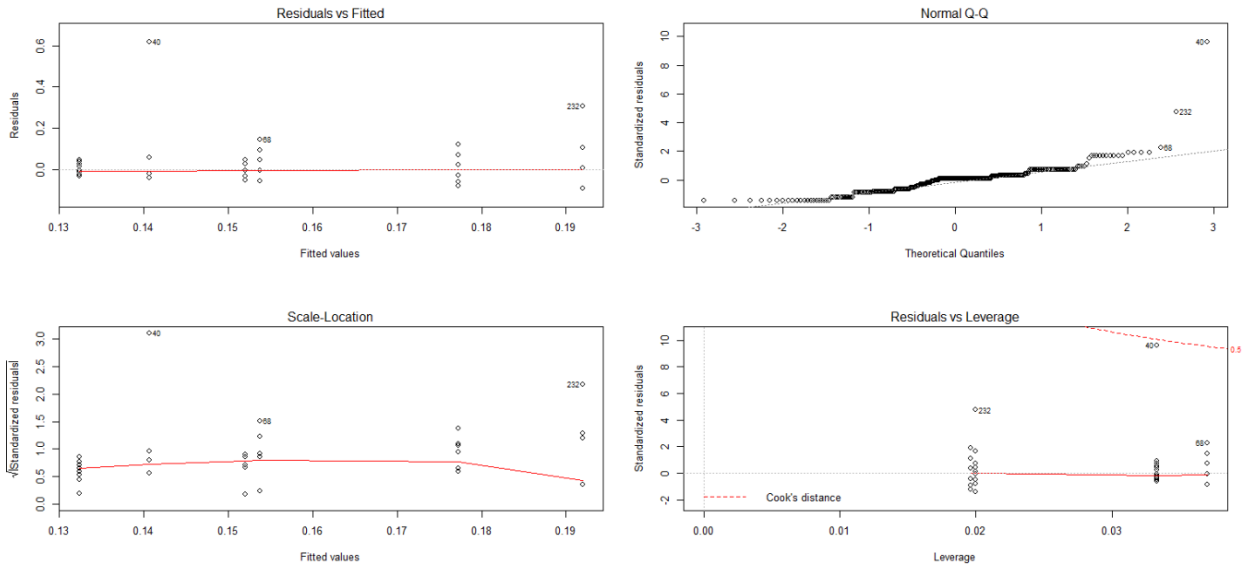
Anexo 7. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de ancho del pétalo en el ápice.



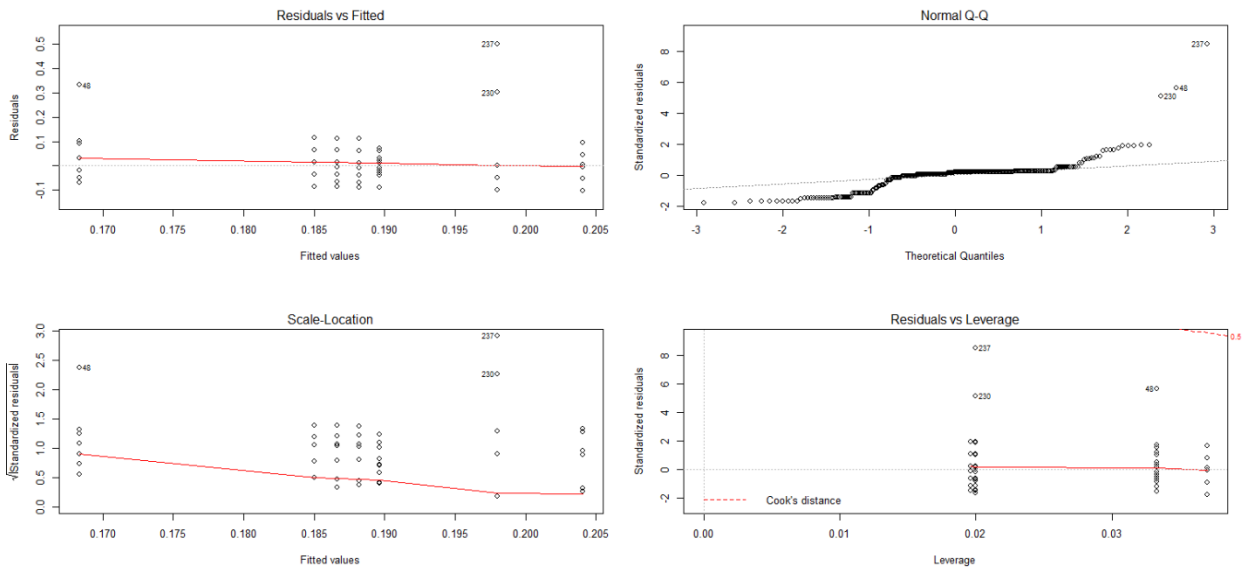
Anexo 8. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud de la antera.



Anexo 9. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud del filamento del estambre.



Anexo 10. Diagrama de residuales del modelo de análisis de varianza de una vía sobre los datos de longitud del estigma.



Anexo 12. Código de programación en lenguaje R para el análisis de los datos morfológicos.

```
bd<-read.csv("C:\\Users\\Manuel\\Documents\\CUNZAC\\Proyectos\\Loroco\\Analisis_R\\base
de datos flor de loroco.csv",header=T)
head(bd)
attach(bd)
names(bd)
plot(CC,mm)
```

```
###subsetting
```

```
#based on variable values
```

```
newdata.1A <- bd[ which(bd$Caracter=='1A'), ]
newdata.2B <- bd[ which(bd$Caracter=='2B'), ]
newdata.3C <- bd[ which(bd$Caracter=='3C'), ]
newdata.4D <- bd[ which(bd$Caracter=='4D'), ]
newdata.5E <- bd[ which(bd$Caracter=='5E'), ]
newdata.6F <- bd[ which(bd$Caracter=='6F'), ]
newdata.7G <- bd[ which(bd$Caracter=='7G'), ]
newdata.8H <- bd[ which(bd$Caracter=='8H'), ]
newdata.9I <- bd[ which(bd$Caracter=='9I'), ]
newdata.10J <- bd[ which(bd$Caracter=='10J'), ]
```

```
##Plots from data subsets based on 10 variables
```

```
plot(newdata.1A$CODIGO,newdata.1A$mm,col="red",main="Longitud del
pedúnculo",ylab="cm")
plot(newdata.2B$CODIGO,newdata.2B$mm,col="red",main="Longitud del sépalo",ylab="cm")
plot(newdata.3C$CODIGO,newdata.3C$mm,col="red",main="Longitud del tubo de la
corola",ylab="cm")
plot(newdata.4D$CODIGO,newdata.4D$mm,col="red",main="Longitud del tubo a la apertura de
los pétalos",ylab="cm")
plot(newdata.5E$CODIGO,newdata.5E$mm,col="red",main="Longitud del tubo al ápice del
pétalo",ylab="cm")
plot(newdata.6F$CODIGO,newdata.6F$mm,col="red",main="Ancho del tubo",ylab="cm")
plot(newdata.7G$CODIGO,newdata.7G$mm,col="red",main="Ancho del pétalo en el
ápice",ylab="cm")
plot(newdata.8H$CODIGO,newdata.8H$mm,col="red",main="Longitud de la
antera",ylab="cm")
plot(newdata.9I$CODIGO,newdata.9I$mm,col="red",main="Longitud del filamento del
estambre",ylab="cm")
plot(newdata.10J$CODIGO,newdata.10J$mm,col="red",main="Longitud del
estigma",ylab="cm")
```

```
##Medidas de tendencia central y dispersión
```

```
tapply(X=newdata.1A$mm, INDEX=newdata.1A$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.1A$mm, INDEX=newdata.1A$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.2B$mm, INDEX=newdata.2B$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.2B$mm, INDEX=newdata.2B$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.3C$mm, INDEX=newdata.3C$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.3C$mm, INDEX=newdata.3C$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.4D$mm, INDEX=newdata.4D$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.4D$mm, INDEX=newdata.4D$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.5E$mm, INDEX=newdata.5E$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.5E$mm, INDEX=newdata.5E$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.6F$mm, INDEX=newdata.6F$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.6F$mm, INDEX=newdata.6F$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.7G$mm, INDEX=newdata.7G$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.7G$mm, INDEX=newdata.7G$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.8H$mm, INDEX=newdata.8H$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.8H$mm, INDEX=newdata.8H$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.9I$mm, INDEX=newdata.9I$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.9I$mm, INDEX=newdata.9I$CODIGO, FUN = sd)
tapply(X=newdata.10J$mm, INDEX=newdata.10J$CODIGO, FUN = mean)
tapply(X=newdata.10J$mm, INDEX=newdata.10J$CODIGO, FUN = sd)
```

```
##Análisis de varianza
```

```
model.1A<-aov(newdata.1A$mm~newdata.1A$CODIGO)
model.2B<-aov(newdata.2B$mm~newdata.2B$CODIGO)
model.3C<-aov(newdata.3C$mm~newdata.3C$CODIGO)
model.4D<-aov(newdata.4D$mm~newdata.4D$CODIGO)
model.5E<-aov(newdata.5E$mm~newdata.5E$CODIGO)
model.6F<-aov(newdata.6F$mm~newdata.6F$CODIGO)
model.7G<-aov(newdata.7G$mm~newdata.7G$CODIGO)
model.8H<-aov(newdata.8H$mm~newdata.8H$CODIGO)
model.9I<-aov(newdata.9I$mm~newdata.9I$CODIGO)
model.10J<-aov(newdata.10J$mm~newdata.10J$CODIGO)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(model.1A)
plot(model.2B)
plot(model.3C)
plot(model.4D)
```

```
plot(model.5E)
plot(model.6F)
plot(model.7G)
plot(model.8H)
plot(model.9I)
plot(model.10J)
```

##Preuba de Kruskal Wallis

```
KW.1A<-kruskal.test(newdata.1A$mm~newdata.1A$CODIGO)
KW.2B<-kruskal.test(newdata.2B$mm~newdata.2B$CODIGO)
KW.3C<-kruskal.test(newdata.3C$mm~newdata.3C$CODIGO)
KW.4D<-kruskal.test(newdata.4D$mm~newdata.4D$CODIGO)
KW.5E<-kruskal.test(newdata.5E$mm~newdata.5E$CODIGO)
KW.6F<-kruskal.test(newdata.6F$mm~newdata.6F$CODIGO)
KW.7G<-kruskal.test(newdata.7G$mm~newdata.7G$CODIGO)
KW.8H<-kruskal.test(newdata.8H$mm~newdata.8H$CODIGO)
KW.9I<-kruskal.test(newdata.9I$mm~newdata.9I$CODIGO)
KW.10J<-kruskal.test(newdata.10J$mm~newdata.10J$CODIGO)
```

```
KW.1A
KW.2B
KW.3C
KW.4D
KW.5E
KW.6F
KW.7G
KW.8H
KW.9I
KW.10J
```

###Prueba Posthoc

```
install.packages("PMCMR")
require(PMCMR)
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.1A$mm, g=newdata.1A$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.2B$mm, g=newdata.2B$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.3C$mm, g=newdata.3C$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.4D$mm, g=newdata.4D$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.5E$mm, g=newdata.5E$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.6F$mm, g=newdata.6F$CODIGO, dist="Tukey")
```

```

posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.7G$mm, g=newdata.7G$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.8H$mm, g=newdata.8H$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.9I$mm, g=newdata.9I$CODIGO, dist="Tukey")
posthoc.kruskal.nemenyi.test(x=newdata.10J$mm, g=newdata.10J$CODIGO, dist="Tukey")

```

```
#####Análisis de conglomerados UPMGA#####
```

```

par(mfrow=c(1,1))
bd_mult<-
read.csv("C:\\Users\\Manuel\\Documents\\CUNZAC\\Proyectos\\Loroco\\Analisis_R\\loroco
oriente multivariado.csv",header=T)
names(bd_mult)

```

```

## Creating data-frame for analysis ##
dataset = data.frame(bd_mult[,c(12,13,14,15,16,17,18,19,20,21)])
head(dataset)
rownames(dataset) = paste(bd_mult[,9], bd_mult[,8], sep=' ')
rownames(dataset) = paste(bd_mult[,11], bd_mult[,8], sep=' ')
rownames(dataset) = bd_mult[,1]

```

```
rownames(dataset)
```

```

## Normalizing the dataset ##
comlog = log(dataset)
dataset
comlog

```

```

##Creating dissimilarity matrix##
dist = dist(comlog, method="euclidean")
dist

```

```

## Clustering ##
plot.cluster = hclust(dist,"average")

```

```

## Calculating cophenetic distances ##
coph = cophenetic (plot.cluster)

```

```

## Calculating linear correlation between cophenetic and original distances ##
cor(dist,coph)

```

```

## Creating figure ##
install.packages("ggdendro")
library(ggdendro)

```

```

library(ggplot2)
plot(plot.cluster,hang=-1,cex =0.6)
plot(plot.cluster,cex =0.5)
rect.hclust(plot.cluster, 7)

pdf(); ff<-72/par()$ps; dev.off();

# if there are more than 20 entries
if (dim(x)[2] > 20) {
  # scale output by font size
  pdf(fout, height=dim(x)[2]/ff)
} else {
  pdf(fout)
}

?plot

#####Análisis de componentes principales#####33333

##LOAD DATA
bd.comp<-read.csv("C:\\Users\\Manuel\\Documents\\CUNZAC\\Proyectos\\Loroco\\bases de
datos loroco\\Loroco oriente multivariado 2.csv",
  header=T)
head(bd.comp)

##PCA
MyPr<-prcomp(bd.comp[,9:18],scale=TRUE)
MyPr
summary(MyPr)

sink("summary_PCA.csv")
print(summary(MyPr),sep=",")
sink()

plot(MyPr,type="l")
biplot(MyPr,scale=0)

##EXTRACT VALUES

str(MyPr)
MyPr$x
bd.comp2<-cbind(bd.comp[,8:18],MyPr$x[,1:10])

```



```
head(bd.comp2)
```

```
##PLOT WITH COPLOT
```

```
library(ggplot2)
```

```
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC2, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_1.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC3, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_2.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC4, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_3.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC5, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_4.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC6, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_5.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC7, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_6.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC8, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_7.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
ggplot(bd.comp2, aes(PC1,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_8.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')  
  
ggplot(bd.comp2, aes(PC2,PC3, col=CODIGO,fill=CODIGO))+  
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+  
  geom_point(shape=21,col="black")+  
  ggsave("PCA_9.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC2,PC4, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_10.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC2,PC5, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_11.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC2,PC6, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_12.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC2,PC7, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_13.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC2,PC8, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_14.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC2,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_15.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

ggplot(bd.comp2, aes(PC3,PC4, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_16.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC3,PC5, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_17.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC3,PC6, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_18.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC3,PC7, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
  geom_point(shape=21,col="black")+
  ggsave("PCA_19.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC3,PC8, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
  stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+

```

```

    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_20.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC3,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_21.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC4,PC5, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_22.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC4,PC6, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_23.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC4,PC7, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_24.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC4,PC8, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_25.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC4,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_26.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC5,PC6, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_27.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC5,PC7, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_28.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC5,PC8, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
    stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
    geom_point(shape=21,col="black")+
    ggsave("PCA_29.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')
ggplot(bd.comp2, aes(PC5,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+

```

```

stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
geom_point(shape=21,col="black")+
ggsave("PCA_30.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC6,PC7, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
geom_point(shape=21,col="black")+
ggsave("PCA_31.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC6,PC8, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
geom_point(shape=21,col="black")+
ggsave("PCA_32.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC6,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
geom_point(shape=21,col="black")+
ggsave("PCA_33.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC7,PC8, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
geom_point(shape=21,col="black")+
ggsave("PCA_34.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC7,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
geom_point(shape=21,col="black")+
ggsave("PCA_35.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

```

ggplot(bd.comp2, aes(PC8,PC9, col=CODIGO,fill=CODIGO))+
stat_ellipse(geom="polygon",col="black",alpha=0.5)+
geom_point(shape=21,col="black")+
ggsave("PCA_36.tiff", units="in", width=5, height=4, dpi=300, compression = 'lzw')

```

Anexo 13. Serie de datos utilizados para los análisis genéticos.

Localidad	UBC 135	UBC 199	UBC 04	UBC 66	UBC 111	UBC 157
EY1_Ch_C	1	1	1	1	1	1
EY4_Ch_C	1	1	1	1	1	1
EY5_Ch_C	1	1	1	1	1	1
EY9_Ch_C	1	1	1	1	1	1
EY10_Ch_C	1	1	1	0	1	1
EY12_Ca_S	1	1	1	1	0	0
EY13_Ca_S	1	1	0	1	0	1

EY14_Ca_S	0	1	1	0	1	1
EY15_Ca_S	1	0	1	0	0	0
EY21_Ca_S	0	0	0	0	0	0
EY23_Ca_S	0	1	1	1	1	0
EY28_Ca_C	0	1	1	1	1	0
EY29_Ca_C	0	1	1	1	1	0
EY31_Gu_S	0	0	1	0	0	0
EY41_Gu_S	0	0	1	0	0	1
EY49_Gu_S	0	0	0	1	0	1
EY44_Ja_C	0	0	1	1	1	1
EY54_Ja_C	1	1	0	0	1	0
EY56_Ja_C	0	0	0	0	0	0
EY51_EP_S	1	1	1	0	1	1
EY52_EP_S	1	1	1	0	0	1
EY53_EP_S	0	1	1	0	1	0

Anexo 14. Código de programación en lenguaje R para el análisis de los datos genéticos.

```
##Shannon index
```

```
library(vegan)
```

```
datos<-read.table("clipboard",header=T)
```

```
head(datos)
```

```
str(datos)
```

```
###Estimar diversidad genetica entre sitios vs primer##
```

```
#subset de datos
```

```
chispan_UBC135 <-datos[1:9,1]
```

```
caparaja_UBC135 <-datos[1:9,2]
```

```
guadalupe_UBC135<-datos[1:9,3]
```

```
jalpatagua_UBC135<-datos[1:9,4]
```

```
progreso_UBC135<-datos[1:9,5]
```

```
chispan_UBC199 <-datos[10:14,1]
```

```
caparaja_UBC199 <-datos[10:14,2]
```

```
guadalupe_UBC199 <-datos[10:14,3]
```

```
jalpatagua_UBC199<-datos[10:14,4]
```

```
progreso_UBC199 <-datos[10:14,5]
```

```
chispan_UBC04 <-datos[15:20,1]
```

```
caparaja_UBC04 <-datos[15:20,2]
guadalupe_UBC04 <-datos[15:20,3]
jalpatagua_UBC04<-datos[15:20,4]
progreso_UBC04 <-datos[15:20,5]
```

```
chispan_UBC66 <-datos[16:26,1]
caparaja_UBC66 <-datos[16:26,2]
guadalupe_UBC66 <-datos[16:26,3]
jalpatagua_UBC66<-datos[16:26,4]
progreso_UBC66 <-datos[16:26,5]
```

```
chispan_UBC111 <-datos[27:30,1]
caparaja_UBC111 <-datos[27:30,2]
guadalupe_UBC111 <-datos[27:30,3]
jalpatagua_UBC111<-datos[27:30,4]
progreso_UBC111 <-datos[27:30,5]
```

```
chispan_UBC157 <-datos[31:39,1]
caparaja_UBC157 <-datos[31:39,2]
guadalupe_UBC157 <-datos[31:39,3]
jalpatagua_UBC157<-datos[31:39,4]
progreso_UBC157 <-datos[31:39,5]
```

```
#Estimar valores de diversidad Shanon index
```

```
Hchispan_UBC135 <- diversity(chispan_UBC135)
Hcaparaja_UBC135 <- diversity(caparaja_UBC135)
Hguadalupe_UBC135 <- diversity(guadalupe_UBC135)
Hjalpatagua_UBC135 <- diversity(jalpatagua_UBC135)
Hprogreso_UBC135 <- diversity(progreso_UBC135)
```

```
Hchispan_UBC199 <- diversity(chispan_UBC199)
Hcaparaja_UBC199 <- diversity(caparaja_UBC199)
Hguadalupe_UBC199 <- diversity(guadalupe_UBC199)
Hjalpatagua_UBC199 <- diversity(jalpatagua_UBC199)
Hprogreso_UBC199 <- diversity(progreso_UBC199)
```

```
Hchispan_UBC04 <- diversity(chispan_UBC04)
Hcaparaja_UBC04 <- diversity(caparaja_UBC04)
Hguadalupe_UBC04 <- diversity(guadalupe_UBC04)
Hjalpatagua_UBC04 <- diversity(jalpatagua_UBC04)
Hprogreso_UBC04 <- diversity(progreso_UBC04)
```

```
Hchispan_UBC66 <- diversity(chispan_UBC66)
Hcaparaja_UBC66 <- diversity(caparaja_UBC66)
Hguadalupe_UBC66 <- diversity(guadalupe_UBC66)
Hjalpatagua_UBC66 <- diversity(jalpatagua_UBC66)
Hprogreso_UBC66 <- diversity(progreso_UBC66)
```

```
Hchispan_UBC111 <- diversity(chispan_UBC111)
Hcaparaja_UBC111 <- diversity(caparaja_UBC111)
Hguadalupe_UBC111 <- diversity(guadalupe_UBC111)
Hjalpatagua_UBC111 <- diversity(jalpatagua_UBC111)
Hprogreso_UBC111 <- diversity(progreso_UBC111)
```

```
Hchispan_UBC157 <- diversity(chispan_UBC157)
Hcaparaja_UBC157 <- diversity(caparaja_UBC157)
Hguadalupe_UBC157 <- diversity(guadalupe_UBC157)
Hjalpatagua_UBC157 <- diversity(jalpatagua_UBC157)
Hprogreso_UBC157 <- diversity(progreso_UBC157)
```

```
Hchispan_UBC135
Hcaparaja_UBC135
Hguadalupe_UBC135
Hjalpatagua_UBC135
Hprogreso_UBC135
```

```
Hchispan_UBC199
Hcaparaja_UBC199
Hguadalupe_UBC199
Hjalpatagua_UBC199
Hprogreso_UBC199
```

```
Hchispan_UBC04
Hcaparaja_UBC04
Hguadalupe_UBC04
Hjalpatagua_UBC04
Hprogreso_UBC04
```

```
Hchispan_UBC66
Hcaparaja_UBC66
Hguadalupe_UBC66
Hjalpatagua_UBC66
Hprogreso_UBC66
```

```
Hchispan_UBC111
```

```
Hcaparaja_UBC111
Hguadalupe_UBC111
Hjalpatagua_UBC111
Hprogreso_UBC111
```

```
Hchispan_UBC157
Hcaparaja_UBC157
Hguadalupe_UBC157
Hjalpatagua_UBC157
Hprogreso_UBC157
```

```
****
```

```
#Crear matriz de resultados
```

```
resultado<-
matrix(c(Hchispan_UBC135,Hcaparaja_UBC135,Hguadalupe_UBC135,Hjalpatagua_UBC135,
Hprogreso_UBC135,
        Hchispan_UBC199,Hcaparaja_UBC199,Hguadalupe_UBC199,Hjalpatagua_UBC199,Hp
rogreso_UBC199,
        Hchispan_UBC04,Hcaparaja_UBC04,Hguadalupe_UBC04,Hjalpatagua_UBC04,Hprogre
so_UBC04,
        Hchispan_UBC66,Hcaparaja_UBC66,Hguadalupe_UBC66,Hjalpatagua_UBC66,Hprogre
so_UBC66,
        Hchispan_UBC111,Hcaparaja_UBC111,Hguadalupe_UBC111,Hjalpatagua_UBC111,Hp
rogreso_UBC111,
        Hchispan_UBC157,Hcaparaja_UBC157,Hguadalupe_UBC157,Hjalpatagua_UBC157,Hp
rogreso_UBC157),6,5,
      dimnames = list(c("UBC135","UBC199","UBC04","UB66","UBC111","UBC157"),
c("Chispan","Caparaja","Guadalupe","Jalpatagua",
  "El_Progreso"))))
resultado
```

```
##Estimar valores de diversidad por sitio
```

```
datos<-read.table("clipboard",header=T)
```

```
head(datos)
str(datos)
```

```
chispan <-datos[1,]
caparaja <-datos[2,]
```



```

guadalupe<-datos[3,]
jalpatagua<-datos[4,]
progreso<-datos[5,]

H1 <- diversity(chispan)
H1
H2 <- diversity(caparaja)
H2
H3 <- diversity(guadalupe)
H3
H4 <- diversity(jalpatagua)
H4
H5 <- diversity(progreso)
H5
paste(H1,H2,H3,H4,H5)

resultado2<-matrix(c(H1,H2,H3,H4,H5),1,5,
  dimnames = list(c("Shanon"), c("Chispan","Caparaja","Guadalupe","Jalpatagua",
  "El_Progreso")));resultado2

##Estimar valores de diversidad de toda la poblacion

datos<-read.table("clipboard",header=T)
H <- diversity(datos)
H

install.packages('factoextra')
library(cluster)
library(proxy)
library(factoextra)

y<-read.table("clipboard",header=T)
yj<-proxy::dist(y, by_rows = TRUE, method = "Jaccard")
yj
cluster<- hclust(yj,method="ward.D")
plot(cluster)
cluster<- hclust(yj,method="ward.D2")
plot(cluster)
cluster<- hclust(yj,method="single")
plot(cluster)
cluster<- hclust(yj,method="complete")
plot(cluster)

```

```
cluster<- hclust(yj,method="average")
plot(cluster)
cluster<- hclust(yj,method="mcquitty")
plot(cluster)
cluster<- hclust(yj,method="median")
plot(cluster)
cluster<- hclust(yj,method="centroid")
plot(cluster)
```