

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CARDAMOMO (*Elettaria cardamomum* L.) EN ALTA VERAPAZ, QUICHÉ E IZABAL

Martha Patricia Herrera

mpherrera@uvg.edu.gt

Lizbeth Karina Coxaj lkcoxaj@uvg.edu.gt

Ana Gabriela Oliva

agoc1994@gmail.com

Margarita Palmieri palmieri@uvg.edu.gt

Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios / Laboratorio de Protección Vegetal

RESUMEN

El cardamomo, *Elettaria cardamomum*, ingresó a Guatemala entre 1910 a 1912, sin embargo en 1975 y 2011 experimentó una disminución en la producción de la costa sur debido a la presencia del virus del mosaico del cardamomo (CdMV), y en el norte por la presencia de *Sciothrips cardamomi*. Esto provocó un cuello de botella el cual afectó la diversidad genética. Es por ello, que el objetivo principal de este estudio fue determinar las variedades de cardamomo presentes en las regiones de mayor producción. Para ello se seleccionaron muestras de las regiones más productivas que comprenden los departamentos de Alta Verapaz, Quiché e Izabal. Se colectaron 282 muestras, a las que se les llevó un registro de características morfológicas, incluyendo la cápsula, panícula, tallo y hojas. Un estudio piloto fue requerido para la selección de marcadores microsatélites usados en la caracterización molecular de las muestras. Se incluyó marcadores tipo SSR, ISSR y EST-SSR. De los 62 marcadores originales, se seleccionaron nueve marcadores, los más polimórficos y los más universales, para ser utilizados con todas las muestras colectadas. Estos resultados se complementaron con la caracterización botánica y agronómica para seleccionar las diferentes líneas sembradas en las regiones. Los resultados del análisis del agrupamiento jerárquico de las características botánicas mostraron dos grupos, uno que contenía la mayoría de muestras (70.32%) y el otro únicamente el 29.68%. Es importante notar que las características encontradas no fueron exclusivas de un grupo. Sin embargo, se pueden aprovechar características que identifiquen plantas de alta productividad para establecer líneas de cardamomo. A nivel genérico, tampoco se encontró significancia que explique las diferencias fenotípicas, por lo que se hizo un análisis de correspondencia canónica para determinar si estas diferencias podrían deberse a factores geográficos o ambientales. Finalmente, este análisis mostró una diferencia significativa con un alfa de 0.05 con la variable de subregión, indicando que es la variable que más influye en la diversidad genética. La subregión IV fue la única que presentó relación con las subregiones IX, III y VI pero no con las otras subregiones.

PALABRAS CLAVE: Cardamomo, SSR, ISSR, EST-SSR, diversidad botánica, diversidad genética.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CARDAMOM (*Elettaria cardamomum* L.) IN ALTA VERAPAZ, QUICHÉ, AND IZABAL

Elettaria cardamomum was introduced in Guatemala between 1910 to 1912, however in 1975 and 2011 experienced a decrease in production, in the Southern coast of Guatemala due to the presence of the Cardamom Mosaic Virus (CdMV) in the Northern region due to the invasion of *Sciothrips cardamomi*, respectively. This caused a bottleneck that affected the genetic diversity in the cardamom. The principal objective of this study was to detect the different cardamom varieties present in the

most productive areas. Eleven subregions from Alta Verapaz, Quiché and Izabal were selected. A total of 282 samples were collected and different morphological characteristics were registered, such as capsules, panicles, stems and leaves. A pilot study was conducted to select the microsatellites markers to be used in the study for the characterization of the samples. It included markers such as SSR, ISSR and EST-SSR. Nine markers were selected from the 62 originals, the most polymorphic and universal, to be used with all the collected samples. These results were complemented with the botanical and agronomical characterization to select the different lines planted in the different regions. The results from the Hierarchical Grouping Analysis for the botanical characteristics of the samples showed two different groups, one that contained most of the samples (70.32%) and the other 29.68%. It is important to observe that the characteristics found were not exclusive to one group. Nevertheless, we can value and take advantage of characteristics that identify plants of high productivity and establish cardamom lines. At genetic level, we did not find differences between samples or lines that explained the phenotypic differences in plants. We implemented a Canonical Correspondence Analysis to find if these differences could be due to geographical or environmental factors. Finally, this analysis showed us that the most significant difference with an alpha of 0.05, was the variable subregion, meaning that it is the variable that mostly influences these differences. Subregion IV was the only one that showed relations with subregions IX, III and VI and not with the rest of the subregions.

KEY WORDS: Cardamom, SSR, ISSR, EST-SSR, botanic diversity, genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

El cardamomo (*Elettario cardamomum*) es una planta herbácea perenne que pertenece a la familia Zingiberaceae (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 2014). Esta especie puede llegar a medir hasta cinco metros de altura. Posee un rizoma tuberculoso horizontal, donde se desarrolla el sistema radicular y de él salen los tallos florales que pueden alcanzar 1.70 mm de longitud (De Paz, 2009; Deulofeu, 2006). Las hojas son lineares y lanceoladas y pueden ser de tipo glabras o con pubescencias (De Paz, 2009; Deulofeu, 2006). Las flores poseen brácteas de color verde y un pétalo de color lila; generalmente, se encuentran en panículas y cada panícula posee entre 3 a 4 flores hermafroditas (De Paz, 2009). El fruto es una cápsula de aproximadamente 8.5 mm de diámetro y adentro contiene entre 15 a 20 semillas (De Paz, 2009; Deulofeu, 2006).

También, *E. cardamomum* se caracteriza por prosperar en áreas montañosas y ser tolerante a excesos de humedad (Deulofeu, 2006). Por ello en 1910 y 1912 se introdujo el cardamomo a Guatemala, en Alta Verapaz (De Paz, 2009); siendo el punto de partida para la incorporación de un nuevo sistema de producción agrícola en el país. En 1911, la siembra y producción migró del municipio de Cobán a la Costa Sur; y actualmente se concentra en la Franja Transversal del Norte, siendo los departamentos de Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Huehuetenango y Quiché los mayores productores de cardamomo en el país (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 2014).

En más de 100 años de producción, han ocurrido cuellos de botella que posiblemente han comprometido la diversidad genética del cultivo. El primer cuello de botella en Guatemala, fue en 1975 al reportarse por primera vez el virus del mosaico del Cardamomo (CdMV) en Quetzaltenango. Este virus afectó por casi diez años la producción de la Costa Sur y es la razón por la que ahora la mayor producción está concentrada en la Franja Transversal del Norte. Más adelante, en 2011, nuevamente se vio afectado por la plaga de trips (*Sciothrips cardamomi*), la cual tuvo un impacto entre el 15 a 50% de las plantaciones; y en algunos casos llegó hasta el 90% (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, 2015).

Además de las enfermedades y plagas asociadas al cardamomo que han comprometido la viabilidad del mismo, no se han llevado registros de cómo se ha propagado el material vegetal en las diferentes regiones del país. Se desconoce la variedad genética del cardamomo cuando se introdujo por primera vez al país y por la falta de control en la propagación de rizomas, tampoco se conocen las variedades que han surgido desde hace más de 100 años.

En Guatemala, se han realizado caracterizaciones morfológicas llevadas a cabo por Pöhl (1987; 1989; 1990) en las que se han identificado hasta 21 variedades de cardamomo en la región. Las diferencias estaban relacionadas con el tipo de inflorescencia, forma de la cápsula, forma de las hojas, entre otros.

Se identificaron en la Costa Sur, 16 variedades y 8 en la parte norte. Sin embargo, estos resultados no se complementaron con estudios genéticos, por lo que la relación entre las mismas es incierta.

En estudios de países asiáticos, especialmente de la República de la India, se ha recurrido al análisis de marcadores moleculares para evaluar la diversidad genética. En el estudio realizado por Cyriac et al, (2016) utilizaron 20 variedades de cardamomo pequeño con características morfológicas distintas y se utilizaron 59 marcadores microsatélites para identificar la divergencia entre las accesiones de cardamomo del Instituto de Investigación del Cardamomo de la India (ICRI, por sus siglas en inglés), del Instituto de Investigación de Especies de la India (IISR, por sus siglas en inglés) y de agricultores locales.

Los microsatélites (SSR: *Simple Sequence Repeats*) son los marcadores moleculares más utilizados para análisis genéticos

y están presentes en las subregiones codificantes y no codificantes (Cyriac et al, 2016). Los marcadores ISSR (*Inter simple sequence repeat*) son secuencias de SSR utilizadas como marcadores capaces de diferenciar fragmentos de ADN genómico (Pradeep et al, 2002; Vargas, 2011). Los EST-SSR (*Expressed sequence tag-derived simple sequence repeat markers*), son marcadores abundantes, codominantes, altamente polimórficos y son fácilmente transferibles entre especies relacionadas filogenéticamente (Zhang et al, 2019).

Actualmente, los estudios que se han llevado a cabo en Guatemala se enfocan en los últimos eslabones de la cadena de valor del cardamomo y son pocos los estudios enfocados en el primer eslabón de insumos. Por ello, el objetivo principal del estudio fue la utilización de microsatélites de tipo SSR, ISSR y EST-SSR para la evaluación de la diversidad genética en 11 subregiones comprendidas en Alta Verapaz, Quiché e Izabal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

La toma de muestras se concentró en la zona norte del país, en los departamentos de Alta Verapaz, Quiché e Izabal, divididos en 11 subregiones (Cuadro 1). De estas regiones se colectaron 39 muestras para la elaboración de una prueba piloto, de la cual se seleccionaron los marcadores microsatélites más polimórficos. Por otro lado, se colectaron 282 muestras, de hojas frescas y jóvenes empleadas para la caracterización molecular con los marcadores seleccionados, y se recopiló información geográfica y botánica de cada planta muestreada, así como rizomas para futuros estudios.

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1987) con modificaciones: Las muestras fueron previamente maceradas con PVP 10%, metabisulfito de sodio 5%, 2-mercaptoetanol 5% y agua destilada estéril. La concentración, pureza y calidad del ADN extraído se determinó utilizando un espectrofotómetro UV-Visible y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se agregó 1 μ l de ARNasa a todas las muestras de la caracterización para mejorar la pureza del ADN extraído.

Amplificación (PCR)

En la prueba piloto del estudio, por cada muestra se analizaron 62 marcadores, conformados por 16 de tipo SSR, 26 ISSR y 20 EST-SSR (Anjali et al, 2015; Anjali et al, 2016, Cyriac et al, 2016), para determinar el porcentaje de amplificación de cada uno, la claridad de las bandas, el grado de polimorfismo y comparación con el tamaño esperado del producto con la literatura. De estos resultados se seleccionaron los marcadores más polimórficos, los cuales se emplearon en las 282 muestras correspondientes al estudio de la caracterización. Las amplificaciones se llevaron a cabo en los termocicladores MJ Research PTC-100® Thermal Cycler y Eppendorf MasterCycler® Nexus Gradient Thermal Cycler.

• Análisis SSR

El contenido de la reacción consistió en 25 μ l, con una concentración final de 1X de buffer de PCR sin $MgCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 0.1 mM de dNTPs, 0.2 μ M de cada primer, 0.5U de Taq polimerasa y 1 μ l de ADN. Se amplificó el ADN utilizando una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min y 40 ciclos de desnaturalización a

Cuadro 1. Descripción de muestras colectadas en las 11 subregiones del estudio (n = 282).

Variable	Categoría	Frecuencia	Porcentaje (%)
Subregión / Municipio	I Ixcán	29	10.28
	II Chajul y Nebaj	23	8.16
	III Cobán	60	21.28
	IV Chicamán y Uspantán	11	3.90
	V Chisec	18	6.38
	VI San Pedro Carchá	21	7.45
	VII Chajal y Fray Bartolomé de Las Casas	24	8.51
	VIII Cahabón y Lanquín	48	17.02
	IX Senahú, Tamahú y Tucurú	21	7.45
	X Panzos, Santa Catalina La Tinta	18	6.38
	XI El Estor	9	3.19
Edad de la plantación	1 - 5 años	231	81.91
	5 - 10 años	38	13.48
	> 10 años	13	4.61
Altitud	100 - 500	110	39.01
	500 - 1000	101	36.52
	1000 - 1500	70	24.47
	1500 - 2000	1	0.35
Sistema de producción	Latifoliado	201	71.28
	Latifoliado + pino	14	4.96
	Pino	19	6.74
	Monocultivo (al sol)	48	17.02
Enfermedad en la parcela*	Ausente	2	0.71
	Presente	280	99.29

*Basado en sintomatología.

94 °C por 30 segundos, alineamiento a 60 °C por 45 segundos, extensión a 72 °C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 10 minutos (Cyriac et al, 2016).

• **Análisis ISSR**

El contenido de la reacción consistió en 25 μ l, con una concentración final de 1X de buffer de PCR con $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 0.2 μ M de primer, 1U de Taq polimerasa y 1 μ l de ADN. La amplificación se llevó a cabo con el siguiente programa: 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a

94 °C, alineamiento por 1 min (temperatura específica para cada primer) y la extensión por 2 min a 72 °C. La extensión final fue por 7 min a 72 °C (Anjali et al, 2016).

• **Análisis EST-SSR**

El contenido de la reacción consistió en 25 μ l, con una concentración final de 1X de buffer de PCR sin $MgCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 200 μ M de solución de dNTPs, 0.2 μ M de cada primer, 1U de Taq polimerasa y 1 μ l de ADN.

La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización de 2 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, temperatura específica de alineamiento por 1 min, extensión por 2 min a 72 °C; y una extensión final por 7 min a 72 °C (Anjali et al, 2015).

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de poliacrilamida al 10%, utilizando la metodología de tinción con nitrato de plata (Avalos, 2018). Se utilizó escalera molecular para medir el tamaño de las bandas de los productos de 100 bp, para los marcadores SSR y EST-SSR y de 1 Kb para los marcadores ISSR.

Medición de bandas

Las bandas obtenidas para cada marcador se registraron como caracteres dialélicos, en donde 1 denota presencia y 0 ausencia. La medición de las bandas de cada muestra por marcador se realizó con el programa GelAnalyzer 19.1 y se registró en una base de datos en Microsoft Excel.

Software utilizado para el análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa R (versión 3.6.2) y los paquetes utilizados fueron: vegan, cluster y fpc.

Las gráficas fueron generadas utilizando los paquetes de R: ggplot2 y ggrid.

Análisis de características botánicas

Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico de las características botánicas recolectadas de cada muestra. Se utilizó la medida de distancia de Gower para generar una matriz de distancias con datos de las variables categóricas y cuantitativas (Gower, 1971). Para seleccionar el número de grupos generados por el agrupamiento jerárquico se evaluó la opción con el mayor ancho de la silueta de cada agrupamiento formado (Rousseeuw, 1987).

Análisis de variabilidad genética

Se realizaron dos análisis de ordenación. El primero consistió en un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS por sus siglas en inglés), para comparar la variabilidad genética con respecto a los grupos generados por el agrupamiento jerárquico obtenido a partir de las variables botánicas. El segundo fue un análisis de correspondencia canónica (CCA por sus siglas en inglés) para asociar la variabilidad genética según los marcadores evaluados con las variables botánicas y geográficas. Para determinar la significancia del modelo y las variables se utilizó la prueba estadística pseudo-F, con un valor alfa de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de características botánicas

Según las características botánicas registradas de cada planta muestreada, se observó que la mayoría del cardamomo de la Franja Transversal del Norte tiene hojas de tipo oblongas (94.33%, IC95%: 91.62 - 97.03) y en menor proporción se encontraron hojas lanceoladas y ovaladas (Figura 1). En relación a la pubescencia de la hoja, predomina el tipo glabra (48.52%, IC95%: 42.74 - 54.43), seguido de pubescencia densa (28.72, IC95%: 23.43 - 34.01) y pubescencia espaciada (22.70, IC95%: 17.80 - 27.59).

El color del rizoma predominante fue el lila en un 58.16% (IC95%: 52.39 - 63.92%), seguido de verde claro (30.50%, IC95%: 25.11 - 35.88) en las muestras colectadas. Los tallos florales del cardamomo que surgen del rizoma pueden medir

entre 90 a 150 cm de longitud y de ellos surgen las panículas las cuales pueden originar de 3 a 4 flores (De Paz, 2009). En este estudio se encontró que el 37.23% (IC95%: 31.58 - 42.89) de las plantas tenían entre 16 a 30 tallos y el 29.43% (IC95%: 24.10 - 34.76) tenían 31 - 45 tallos, esto está relacionado con la productividad del cardamomo. La base de los tallos fue de color verde claro en la mayoría (97.52%, IC95%: 95.70 - 99.34), los colores verde y amarillo estuvieron presentes en menor proporción (Figura 2).

Las panículas que surgen de los tallos de cardamomo se consideran como la parte más importante ya que en ellas se desarrollan las flores y dan lugar a la formación de cápsulas que son el producto comerciable (Velásquez, 1986). Pueden clasificarse según su origen (basal o terminal) y disposición (rastrera, semi-erecta o erecta). En todas las plantas, las



Figura 1. Formas de las hojas desarrolladas, categorizadas como (a) oblonga, (b) lanceolada, y (c) ovalada. Todas las hojas (a, b, c) son glabras.



Figura 2. Color de la base del tallo, categorizada como (a) verde claro, (b) verde, y (c) amarillo.



Figura 3. Origen basal de la panícula de cardamomo.



Figura 4. Formas de las cápsulas, categorizadas como (a) globosa, (b) ovoide, y (c) elipsoide.



Figura 5. Color de las cápsulas, categorizadas como (a) amarillo, (b) verde, (c) verde oscuro y (d) verde claro.

panículas se originaron de forma basal (Figura 3) y la mayoría es de tipo semi-erecta (98.23%, IC95%: 96.68 - 99.77). Además, el 42.55% (IC95%: 36.77 - 48.33) de las plantas tiene más de 31 panículas en total, el 30.50% (IC95%: 25.11 - 35.88) entre 21 a 30 panículas, el 19.86% (IC95%: 15.19 - 24.52) entre 11 a 20 panículas y el 7.09% (IC95%: 4.09 - 10.09) menos de 10 panículas.

Por tallo, el 89.70% (IC95%: 86.16 - 93.27) de las plantas tiene dos panículas. Se encontró que el número de inflorescencias por panícula va desde 20 a 30 en el 62.77% de las muestras (IC95%: 57.11 - 68.42), menor a 20 inflorescencias en el 31.56% (IC95%: 26.13 - 36.99) y en un 1.06% (IC95%: 2.97 - 8.38) es mayor a 30. La longitud internodal entre inflorescencia es de 0 - 5 cm en la mayoría de las muestras (97.87%, IC95%: 96.19 - 99.56) y en menor proporción la longitud es mayor a 5 cm. Las panículas no se ramifican a excepción de un 4.26% (IC95%: 1.90 - 6.62) que la ramificación fue de tipo proximal.

Las cápsulas pueden clasificarse en globosas, ovoides o elipsoides y se pueden encontrar en diferentes tonalidades de verde. La mayoría era de tipo ovoide (70.21%, IC95%: 64.87 - 75.56) y el resto globosas (25.53%, IC95%: 20.43 - 30.63) y elipsoides (4.26%, IC95%: 1.90 - 6.62). En este estudio se encontró diversidad de los tres tipos de cápsula, pero la mayoría, sin importar el tipo de forma, son de color verde claro (64.89%, IC95%: 59.31 - 70.47) y en menor proporción verde (26.60%, IC95%: 21.43% - 31.76%), verde oscuro (4.61%, IC95%: 2.16 - 7.06) y amarillas (3.90%, IC95%: 1.64 - 6.16) (Figura 4 y 5). En un 48.58% (IC95%: 42.74 - 54.43) de las muestras se encontraron entre 5 a 10 cápsulas por racimo y en un 46.45% (IC95%: 40.62 - 52.29) más de 10 cápsulas por racimo, lo cual es importante para considerar la productividad de la planta.

Análisis de variabilidad botánica

Para establecer grupos según características botánicas, se elaboró un análisis de agrupamiento jerárquico divisivo. Las muestras colectadas se dividieron en dos grupos según criterios de ancho de la silueta de cada agrupamiento formado, propuestos por Rousseeuw (1987). El primer grupo está compuesto por 199 muestras y comparten características sobre el mayor número de racimos por panícula registrado (20 - 30), mayor número de panículas por planta (>31) y, en su mayoría, las cápsulas son de tipo ovoide. El segundo grupo se caracteriza por la altura de planta (entre 2 a 3 m), mayor diversidad de tipo de cápsula (ovoide o globosa) y por un menor número de racimos por panícula. Sin embargo, se pudo observar que las variables botánicas anteriormente mencionadas no son exclusivas para cada grupo (resultado no mostrado).

A pesar de que no fue posible establecer grupos botánicos con características distintivas entre ellos, es posible aprovechar las características de alta productividad para establecer líneas de cardamomo. Entre estas características, se podría escoger plantas con mayor número de tallos, número de panículas por tallo, número de panículas por planta, largo de la panícula, número de inflorescencias por panícula y número de cápsulas por racimo.

Análisis de variabilidad genética

El objetivo de la prueba piloto del estudio fue determinar los marcadores que presentaban mayor polimorfismo para establecer las variedades de *Elettaria cardamomum* que hay en la Franja Transversal del Norte de Guatemala con base en la caracterización molecular. Para las amplificaciones de las 39 muestras de la prueba piloto, se emplearon 62 marcadores de tipos SSR, ISSR y EST-SSR. De los 62 marcadores utilizados para la prueba piloto, se escogieron 15: cuatro SSRs, nueve ISSRs y dos EST-SSRs.

Los SSR seleccionados fueron los de mayor porcentaje de amplificación (ECMG26, ECMG23) y polimorfismo (ECM47a, ECMG28) según el estudio realizado por Cyriac et al (2016). Para determinar las variaciones intraespecíficas del cardamomo, se seleccionaron más microsatélites de tipo ISSR (S809, S817, S820, S829, S836, S842, S850, S864, S849) (Anjali et al, 2016). Estos presentaron mayor cantidad de bandas, siendo los marcadores más polimórficos, y los de alto porcentaje de amplificación. Los EST-SSR seleccionados (CaSSR26 y CaSSR35) son los que presentaron mayor porcentaje de amplificación; estos tipos son utilizados como marcadores de anclaje para mapeo comparativo y estudios evolutivos (Anjali et al, 2015).

Los marcadores seleccionados se utilizaron para las 282 muestras colectadas en las 11 subregiones para determinar las variantes en la Franja Transversal del Norte de Guatemala. Al finalizar las pruebas de laboratorio, nuevamente se seleccionaron marcadores de los 15 antes seleccionados ya que no todos presentaron polimorfismo o bandas definidas con el total de muestras. Con la matriz de alelos generada a partir del análisis de laboratorio de los marcadores moleculares y los dos grupos jerárquicos generados a partir de variables botánicas, se realizó un escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés). Este análisis permite saber la relación entre los grupos botánicos generados y la diversidad genética.

El análisis NMDS no permitió establecer diferencias a nivel genético entre los dos grupos clasificados según características botánicas (resultados no mostrados). Es posible que las regiones del genoma que cubren los marcadores en este estudio no permiten explicar diferencias fenotípicas, a pesar

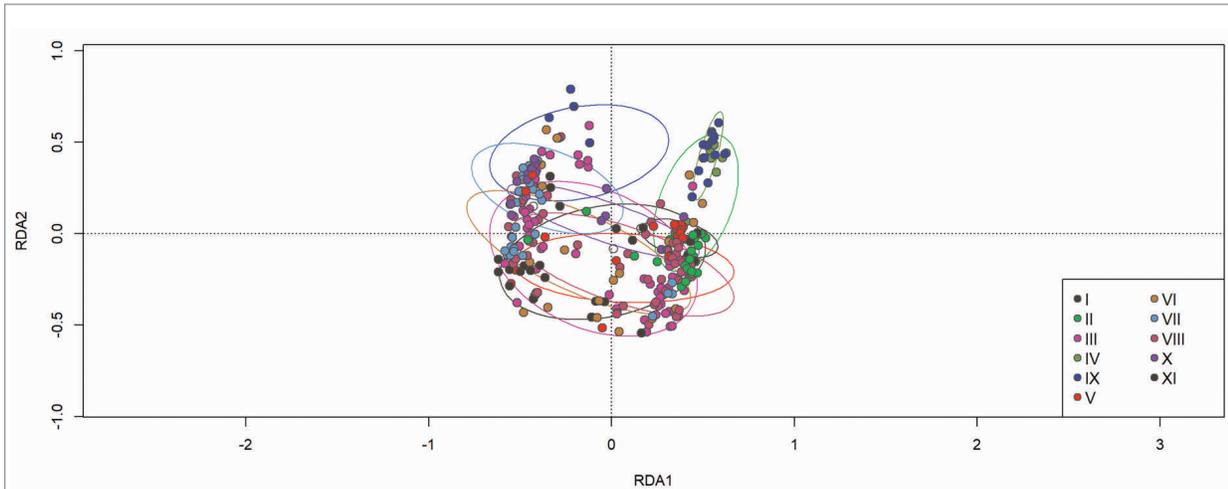


Figura 6. CCA de variabilidad genética según subregión de colecta de Alta Verapaz, Quiché e Izabal.

de que se utilizaron tres tipos de marcadores (SSR, ISSR y EST-SSR) para abarcar regiones codificantes y no codificantes. Las diferentes características morfológicas también se pueden deber a factores ambientales y/o geográficos.

Se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA por sus siglas en inglés) para determinar el efecto entre las variables botánicas sin agrupar, geográficas y genéticas. Para seleccionar las variables botánicas y geográficas significativas se construyeron modelos estadísticos basados en un análisis de varianza (resultados no mostrados). Se llegó a la conclusión que la única variable significativa ($p=0.001$, $\alpha=0.05$) fue la de subregión. Con esta variable se colocaron elipses de las subregiones sobre la gráfica CCA.

En la Figura 6 se puede observar que todas las subregiones están relacionadas genéticamente a excepción de la subregión IV (Usphantán y Chicamán) que difiere al resto en cierto nivel ya que comparte relación únicamente con las subregiones IX (Senahú, Tukurú y Tamahú), III (Cobán) y VI (San Pedro Carchá). El material genético que está distribuido en todas las subregiones, es el de la subregión III. El municipio de Cobán es a donde se llevó por primera vez el cardamomo en 1911 y se puede considerar como el inicio de la propagación del cultivo por medio de rizomas en otras áreas, como la Costa Sur y el resto de municipios contemplados en este estudio.

Debido a que no se lleva un control de la propagación del material vegetal se puede suponer que hay intercambios de rizomas entre productores de cardamomo de diferentes áreas evitando mantener líneas genéticas con determinadas características fenotípicas. Este estudio está limitado a los

marcadores moleculares de SRR, ISSR y EST-SRR originalmente empleados en variedades genéticas asiáticas, por lo que se propone el desarrollo de marcadores basados en el material genético del cardamomo de Guatemala. Sin embargo, se observó diversidad de patrones entre las muestras analizadas con estos marcadores, pero no fue posible establecer grupos genéticos debido a la variabilidad que se mantiene entre subregiones. Esto hace poco probable que se encuentren marcadores que puedan seleccionar fragmentos que agrupen a los diferentes patrones de las plantas de cardamomo encontradas en el estudio.

Se considera que la principal causa de la similitud entre las variables botánicas y genéticas en la Franja Transversal del norte es por el intercambio descontrolado de rizomas de cardamomo en el territorio guatemalteco. Además, el cardamomo tiene una reproducción sexual por medio de polinización, este proceso es llevado a cabo principalmente por abejas del género *Apis* (Lang, 1982). La polinización también da origen a intercambio genético y explica por qué en Guatemala no se identifican las mismas variedades botánicas (Malabar, Misore y Vazhukka) que otros autores han descrito en otros países, principalmente en la República de la India (Phadnis y Peter, 2017; Vijayan et al., 2018). Desde 1987, en un catálogo elaborado por Pöll, se indica que en la Costa Sur no se encuentran las variedades Malabar y Misore y que en lugar de estas, el cardamomo de Guatemala es una combinación de las dos e incluso con características que antes no habían reportado (Pöll, 1987).

En el estudio de Pöll (1987) se describieron 10 tipos de cardamomo de la Costa Sur basado exclusivamente en

características botánicas. En este estudio, se agrupó el material vegetal en dos grandes grupos con las características botánicas más representativas para cada uno. Independientemente de los grupos o tipos de cardamomo que se han descrito, es importante invertir esfuerzos para conservar las plantas con

características botánicas asociadas a una mayor productividad y que ya están en el campo. La preservación de líneas genéticas de cardamomo se puede realizar por medio de cultivo de tejidos para luego distribuir el material vegetal con las características deseadas a los productores.

CONCLUSIONES

- A pesar de que es evidente la diversidad botánica en las plantas de cardamomo muestreadas en este estudio, no fue posible explicar estas diferencias con la información genética generada por medio de marcadores moleculares de tipo SSR, ISSR y EST-SSR. Es posible que se necesite analizar otras regiones del genoma del cardamomo o emplear marcadores genéticos específicos para el cultivo de cardamomo de Guatemala, para establecer variedades genéticas que expliquen la diversidad botánica.
- El análisis de diversidad genética por subregión reveló que la subregión IV (Uspantán y Chicamán) es diferente al resto de subregiones ya que solo guarda relación genética con las subregiones III (Cobán), IX (Senahú, Tukurú y Tamahú) y VI (San Pedro Carchá), a diferencia del resto que mantienen una relación entre todas.
- Se debe conservar las plantas de cardamomo que ya se encuentran en el campo y que presentan características botánicas deseadas para mejorar la producción. La preservación de líneas genéticas se puede realizar por medio de cultivo de tejidos.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), al Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) por su compromiso con la investigación al lanzar la convocatoria para el estudio de la cadena de producción del cardamomo y a la Universidad del Valle de Guatemala por permitir la ejecución de este proyecto. Por

último, agradecemos al personal técnico y administrativo del Laboratorio de Protección Vegetal y del Centro de Estudios Agrícolas y Alimentarios (UVG) que formaron parte de este estudio al Lic. Alejandro Vásquez por la ejecución del análisis Bioinformático y a la Dra. Elfriede de Pöll por la información que generó anteriormente y que fue de gran utilidad en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Aldana, J. (2012). Impactos socioeconómicos del beneficiado de cardamomo (*Elettaria cardamomum*, Zingiberaceae), en la Asociación de Productores Indígenas La Catarata (APIC), Lanquín, Alta Verapaz, del 2006 al 2010. Tesis de Pregrado. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Anjali, N., Dharan, S., Nadiya, F. y Sabu, K. (2015). Development of EST-SSR markers to assess genetic diversity in *Elettaria cardamomum* Maton. *Int J Appl Sci Biotechnol.* 3(2): 188-192.
- Anjali, N., Ganga, M., Nadiya, F., Shefeek, S. y Sabu, K. (2016). Intraspecific variations in cardamomo (*Elettaria cardamomum* Maton): assessment of genomic diversity by flow cytometry, cytological studies and ISSR analysis. SpringerPlus. S:1560.
- Avalos, D. (2018). Identificación de variedades de cacao (*Theobroma cacao* L.) presentes en la finca "La Cruz", Cuyotenango, Suchitepéquez, Guatemala, mediante el análisis de ADN basado en marcadores microsatélites. Tesis de Licenciatura. Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Cyriac, A., Ritto, P., Anupama, K., Senthil, R., Sheeja, T.E., Nirmal, K., Parthasarathy, V. (2016). Isolation and characterization of genomic microsatellite markers for small cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) for utility in genetic diversity analysis. *Physiol Mol Biol Plants.* 22(2):219-229.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin.* 19: 11-15.
- De Paz, J. (2009). Fortalecimiento de la cadena productiva de Cardamomo (*Elettaria cardamomum* L. Maton) con énfasis en el asocio de la entomofauna, especies arvenses y fitopatógenos, en la aldea Campur, San Pedro Carchá, Alta Verapaz. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Deulofeu, N. (2006). Determinación del rendimiento de la oleoresina de tres distintas clases de cardamomo (*Elettaria cardamomum* Maton) cultivado en Alta Verapaz, extraída por maceración dinámica y dos solventes distintos, a nivel laboratorio. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Gower, J. (1971). A general coefficient of similarity and some of its properties. *Biometrics.* 27: 857-874.
- Lang, F. (1982). La flor, polinización y polinizadores del cardamomo (*Elettaria cardamomum* M.) en Cobán, Alta Verapaz (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA). (2014). Perfil comercial Cardamomo. Disponible en: <https://www.maga.gob.gt/download/Perfil%20cardamomo.pdf> [Con acceso: 15/04/2021]
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA). (2015). Plan de Manejo Integrado de Thrips del Cardamomo. Disponible en: <http://proyectoadaintegracion.minex.gob.gt/ada/docs/MINISTERIO%20DE%20AGRICULTURA%20GANADERIA%20Y%20ALIMENTACION/Manual%20de%20Plan%20de%20manejo%20integrado%20de%20Thrips%20de%20Cardamomo.pdf> [Con acceso: 15/04/2021]
- Phadnis, S. y Peter, A. (2017). Morphological Studies and Genetic Diversity Analysis of Cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton.) Genotypes and *Hedychium coronarium* Using RAPD Markers. *Trends in Biosciences.* 10(27): 5737-5745.
- Pöll, E. (1987). Características diferenciales en cardamomo zona costa del Pacífico de Guatemala: Región I. Programa de Genética y cultivo de tejidos en cardamomo/Asociación de productores de cardamomo/Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Pöll, E. (1989). Características diferenciales en cardamomo zona costa del Pacífico de Guatemala: Regiones 2 y 3.. Programa de Genética y cultivo de tejidos en cardamomo/Asociación de productores de cardamomo/Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Pöll, E. (1990). Características diferenciales en cardamomo zona norte de Guatemala, regiones 4, 5 y 6. Programa de Genética y cultivo de tejidos en cardamomo/Asociación de productores de cardamomo/Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala.
- Pradeep, M., Sarla, N. y Siddiq, E. (2002). Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica.* 128, 9-17.
- Rousseuw, P. (1987). Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational And Applied Mathematics.* 20: 53-65.
- Vargas, P. (2011). Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñón (*Jatropha curcas* L.) utilizando marcadores de tipo ISSR (Inter-microsatélites) (Tesis de pregrado). Universidad Zamorano. Honduras.
- Velazquez, M. (1986). Respuesta del periodo de iniciación de panícula a diferenciación floral en genotipos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) en la costa de Nayarit. Tesis de ingeniería. Universidad de Guadalajara, México.
- Vijayan, A., Kumark, P. y Remashree, A. (2018). Small Cardamom Production Technology and Future Prospects. *International Journal of Agriculture Sciences.* 10(16): 6943-6948.
- Zhang, Z., Xie, W., Zhao, Y., Zhang, J., Wang, N., Ntakirutimana, F., Yan, J. y Wang, Y. (2019). EST-SSR marker development based on RNA-sequencing of *E. sibiricus* and its application for phylogenetic relationships analysis of seventeen *Elymus* species. *BMC Plant Biol* 19, 235. doi: <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1825-8>.