

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Estandarización de métodos moleculares y filogeografía para la conservación de *Tillandsia guatemalensis* L.B. Sm. (Bromeliaceae) en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado
por Samuel Herrera Duarte
para optar al grado al grado académico de Licenciado en Biología.

Guatemala
2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades

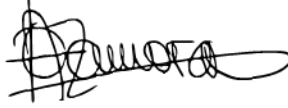


Estandarización de métodos moleculares y filogeografía para la conservación de *Tillandsia guatemalensis* L.B. Sm. (Bromeliaceae) en Guatemala.

Trabajo de graduación presentado
por Samuel Herrera Duarte
para optar al grado al grado académico de Licenciado en Biología.

Guatemala
2022

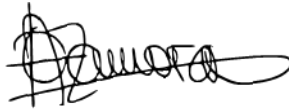
Vo. Bo. : (f)



PhD. Alejandra Zamora Jerez

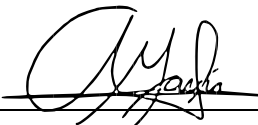
Tribunal Examinador:

(f):



PhD. Alejandra Zamora Jerez

(f) :



Licda. Ana Isabel García Ambrosy

(f) :



MSc. Gabriela Alfaro Marroquín

Fecha de Aprobación: Guatemala, 06 de junio de 2022

Agradecimientos

Agradezco a mi papá (Mario Herrera) y a mi mamá (Eva Duarte) por apoyarme y por permitirme la oportunidad de estudiar, no estaría donde estoy sin su apoyo cariño y experiencia. A mis hermanos (Gabriel y Daniela) y demás familia les agradezco por apoyarme y motivarme a siempre ser un buen estudiante.

A mi asesora principal PhD. Alejandra Zamora, agradezco mucho su amistad su conocimiento su buena disposición para enseñar y en especial agradezco que lograra transmitirme esa pasión y cariño hacía el área molecular y todas las increíbles aplicaciones que hay para ella. Mi formación profesional se vio fuertemente beneficiada por sus enseñanzas y es por lo cual estoy muy agradecido.

Agradezco a la Lic. María Renée Álvarez curadora del herbario UVAL por ser una catedrática tan profesional y dedicada y por abrirme las puertas del herbario para poder realizar esta y muchas otras investigaciones a lo largo de la carrera. Agradezco su paciencia y buena disposición para enseñar y por alentarme a realizar la presente investigación.

Agradezco a mis amigos Eduardo Monge, Francisco Herrarte, Flor Morales, Ericka García, Hellen Dahinten por todo el apoyo que me brindaron para el trabajo de campo y por apoyarme en momentos buenos y difíciles a lo largo de toda la carrera. A el resto de la promoción de Biología agradezco mucho haber convivido con ustedes, y tener muchas experiencias agradables con muchos de ustedes, hicieron que esos 5 años fueran una época muy especial para mí, estoy seguro de que recordare con cariño por siempre estos 5 años que vivimos juntos. A todos les deseo unas carreras profesionales muy exitosas.

Agradezco al Lic. Zabdi López, Msc. Diego Incer, Lic Diego Martínez y Lic. Marcelo Serrano por todo el apoyo recibido a lo largo de esta investigación en diferentes áreas y por abrirme las puertas a la reserva natural privada Pamac II para que pudiera hacer mis muestreos de tesis.

Por último me gustaría agradecer al personal del departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala particularmente a la Lic. Priscila Juárez, Msc. Gabriela Alfaro y a Ericka Santos por todo el apoyo y asesoría que recibí desde el primer día de universidad y por los reactivos necesarios para realizar el presente estudio.

Índice

Agradecimientos.....	i
Listado de cuadros.....	iv
Listado de figuras.....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vi
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	2
A. Familia Bromeliaceae.....	2
B. Funciones y uso de las Bromelias.....	2
C. Las bromelias del género <i>Tillandsia</i>	3
D. Uso etnobotánico de <i>Tillandsia</i> sp.....	4
E. <i>Tillandsia guatemalensis</i> L. B. Sm.....	4
1. Descripción.....	4
2. Distribución.....	5
3. Importancia.....	5
4. Amenazas y conservación de <i>T. guatemalensis</i>	6
5. Desarrollo de métodos de estudio genéticos en <i>T. guatemalensis</i>	6
F. Modelación de nicho ecológico.....	7
G. Cambio climático.....	8
H. Especies crípticas, conservación y herramientas moleculares.....	9
I. Marcadores cloroplastidiales, nucleares y ribosomales.....	9
III. Justificación.....	11
IV. Objetivos.....	12
A. Objetivo general.....	12
B. Objetivos específicos.....	12
V. Métodos.....	13
A. Sitio de muestreo.....	13
B. Colecta de muestras.....	14
C. Métodos de laboratorio.....	14
1. Extracción por método CTAB + Sorbitol.....	14

2. Extracción por método CTAB-FENOL	15
3. Kit de extracción.....	16
4. Cuantificación de concentración, pureza e integridad de ADN	16
5. Amplificación de los marcadores cloroplastidiales y secuenciación.....	17
D. Modelación de nicho ecológico para <i>Tillandsia guatemalensis</i>	17
E. Reconstrucción de relaciones filogenéticas	18
F. Análisis estadístico	18
VI. Resultados	19
A. Colecta de muestras.....	19
B. Extracción y amplificación de ADN	19
C. Comparación entre protocolos, tejidos y morfotipos.....	23
D. Reconstrucción de relaciones filogeográficas de <i>T. guatemalensis</i>	26
VII. Discusión	30
A. Comparación entre métodos de extracción.....	30
B. Rendimiento de extracciones de ADN a partir de tejidos vegetales y morfotipos .	31
C. Filogeografía y conservación de <i>Tillandsia guatemalensis</i>	32
VIII. Conclusiones	35
IX. Recomendaciones	36
X. Literatura citada	37
XI. Apéndices	45

Listado de cuadros

CUADRO		PÁGINA
1.	Recuento de muestras por morfotipo, tejidos colectados y procedencia de muestras.	19
2.	Extracción y cuantificación de concentración de ADN para muestras de <i>T. guatemalensis</i> a partir de 3 protocolos y 2 tejidos diferentes.	19
3.	Variables ambientales de Worldclim con resolución espacial de 1 Km ² para generar los modelos de nicho ecológico en MaxEnt.	48

Listado de figuras

FIGURA		PÁGINA
1.	Puntos de colecta de tejidos de <i>T. guatemalensis</i> .	13
2.	Perfil de electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de <i>T. guatemalensis</i> para marcadores nucleares y cloroplastidiales.	22
3.	Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 3 protocolos diferentes (CTAB/Fenol/Kit de extracción) con estadístico Kruskall-Wallis y prueba de Dunn.	23
4.	Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 2 tejidos vegetales (hoja/bráctea) con estadístico Kruskall-Wallis y prueba de Dunn.	24
5.	Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 2 morfotipos diferentes (MF1/MF2) con estadístico Kruskall-Wallis y prueba de Dunn	25
6.	Distribución potencial de <i>Tillandsia guatemalensis</i> modelada para registros desde 1970 a el año 2000, calculado a partir de 19 variables bioclimáticas.	26
7.	Distribución potencial de <i>Tillandsia guatemalensis</i> proyectada para el período 2041-260 a partir de 19 variables bioclimáticas calculada a partir modelos climáticos de nueva generación (CMIP6)	27
8.	Árbol filogenético construido a partir de método de Máxima Verosimilitud para <i>Tillandsia guatemalensis</i> y otros organismos del mismo género.	28
9.	Árbol filogenético construido a partir de método de Estadística Bayesiana para <i>Tillandsia guatemalensis</i> y otros organismos del mismo género.	29
10.	Campana de Gauss de datos distribuidos normalmente.	45
11.	Gráfico de densidad de concentración de valores de concentración de ADN.	45
12.	Gráfico Q-Q para datos de concentración de ADN extraído a partir de 3 protocolos y 2 tejidos diferentes de <i>T. guatemalensis</i> .	46
13.	Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 3 protocolos diferentes (CTAB/Fenol/Kit de extracción) solo tomando en cuenta extracción a partir de hojas con estadístico Kruskall-Wallis y prueba de Dunn.	47
14.	Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 2 tejidos vegetales (hoja/bráctea) solo tomando en cuenta extracciones a partir de protocolo CTAB-Fenol, con estadístico Kruskall-Wallis y prueba de Dunn.	48

Resumen

Se ha evidenciado un alto grado de variabilidad morfológica en la bromelia de la especie *Tillandsia guatemalensis* (Martínez Márquez, 2017), que podría corresponder, a un evento de especiación. Existen varias presiones selectivas creadas por factores antropomórficos y ambientales que pueden ser las causantes de estos patrones. El presente estudio hizo uso de 2 marcadores cloroplastidiales (de la región que se traduce para la síntesis de la enzima maturasa K) y herramientas de sistemas de información geográfica basadas en modelación de nicho ecológico para poder determinar si las variedades morfológicamente distintas de *T. guatemalensis* son un complejo de especies o una sola especie.

Se establecieron protocolos de extracción y amplificación de ácidos nucleicos que permiten extraer y amplificar ADN de diferentes tejidos para esta especie. Se encontró que la evidencia genética no apoya la separación de los morfotipos de *T. guatemalensis* en dos especies diferentes pero que dentro de la misma sí existe un considerable grado de variación genética. También se encontró que las presiones ambientales del futuro ejercerán una considerable presión sobre las poblaciones de este organismo por lo que es importante establecer objetivos, estrategias y planes de conservación para preservar este recurso.

Abstract

A high degree of morphological variability has been evidenced in the bromeliad species *Tillandsia guatemalensis* (Martínez Márquez, 2017), that could correspond to a speciation event. There are several selective pressures created by anthropomorphic and environmental factors that can be the cause of these patterns. The present study made use of 2 chloroplast markers (from the region that translates for the synthesis of the enzyme maturase K), and geographic information system tools based on ecological niche modeling to determine if morphologically distinct varieties of *T. guatemalensis* make up a complex of species or not.

Nucleic acid extraction and amplification protocols were established, that allowed the extraction and amplification of DNA from different tissues for *T. guatemalensis*. It was found that the genetic evidence does not support the separation of the morphotypes of *T. guatemalensis* into two different species, but within the specie's populations there is a considerable degree of genetic variation. It was also found that the environmental conditions of the future will exert considerable pressure on the populations of this organism, which is why it is important to establish objectives, strategies and conservation plans to preserve this valuable resource.

I. Introducción

El género *Tillandsia* tiene un alto potencial tanto en factores ecológicos y ambientales como en factores sociales y económicos (Dix y Dix, 2006). De hacerse de manera correcta, Guatemala podría ser uno de los principales productores y exportadores de especies ornamentales del género *Tillandsia*. En la actualidad, la comercialización de la especie está teniendo un efecto contraproducente sobre las poblaciones silvestres de una de las especies más comercializadas de este género *Tillandsia guatemalensis* (CONAP, 2010). Añadido a esto, el grado de diferenciación morfológica de esta especie dificulta el desarrollo de estrategias de conservación y planes de manejo para este recurso. Por esto mismo el presente estudio utilizó información genética de los cloroplastos y modelaciones de nicho ecológico para brindar información acerca del estado y grado de diferenciación genética de las poblaciones silvestres y que herramientas son necesarias para desarrollar estrategias efectivas de conservación para esta especie.

II. Antecedentes

A. *Familia Bromeliaceae*

Las familia de las bromeliáceas (perteneciente al orden Poales, comúnmente llamadas Bromelias) comprende uno de los grupos de monocotiledóneas más distintivos y ecológicamente diversos de la flora nativa del nuevo mundo (Benzing, 2000). Se conoce que en la actualidad esta familia cuenta con al menos 3,248 especies distribuidas en 58 géneros a lo largo del continente americano. Debido a la gran cantidad de ecosistemas y hábitats dentro de los cuales pueden ser encontradas, el grupo es considerado como uno de los más exitosos evolutivamente hablando y Parte de dicho éxito puede ser atribuido a su rápida capacidad de especiación en eventos de radiación adaptativa (Gomes-da-Silva y Ferreira da Costa, 2013).

Esta familia también es distintiva por compartir con otras familias el metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas por sus siglas en ingles). Este tipo de metabolismo comprende una especialización del proceso de fotosíntesis, en el cual se maximiza la captación nocturna de CO₂ atmosférico y se reduce la evapotranspiración mediante mecanismos de anatómicos y metabólicos de uso y almacenamiento de agua. El metabolismo CAM frecuentemente esta acompañado de modificaciones morfológicas como por ejemplo tejidos suculentos, cutículas engrosadas, ceras epicuticulares, reducido número de estomas etc. (Niechayev, Pereira y Cushman, 2019).

B. *Funciones y uso de las Bromelias*

La amplia diversidad morfológica y funcional de este grupo, les confiere la capacidad de llenar un amplio espectro de nichos ecológicos (Benzing, 2000). A lo largo de toda su distribución, estas plantas confieren múltiples servicios ecosistémicos dentro de los cuales se puede destacar: servicios de soporte, apoyo a la biodiversidad, ciclado de nutrientes y obtención de productos farmacéuticos.

Los servicios de soporte se refieren a la capacidad de las bromelias de mantener la biodiversidad formando parte de diversos procesos ecosistémicos. Técnicamente considerado como un servicio, el apoyo a la biodiversidad se ve reflejado en la cantidad de grupos taxonómicos diferentes que utilizan a las bromelias o estructuras de estas como microhábitat. Dentro de los grupos que utilizan estas especies se pueden mencionar bacterias, plantas, hongos macro/micro invertebrados, anfibios y reptiles) (Montero, Feruglio y Barberis, 2010).

Debido a su hábito epifito (es decir que viven sobre otro organismo, pero no lo llegan a parasitar), muchas especies de bromelias también están muy involucradas en el reciclaje de nutrientes del sistema. Las bromelias con tanque permiten el intercambio de nutrientes a través de los microecosistemas que forman. Procesos que ocurren dentro del tanque de estas, como por ejemplo la descomposición de detritos, permiten que elementos como fósforo, nitrógeno, calcio, magnesio y hierro se transformen a compuestos biodisponibles para otros seres vivos. También es importante mencionar que a partir de estas plantas es posible extraer productos farmacéuticos de considerable importancia social y económica. (Ladino *et al.* 2019).

Por otro lado, dentro del ámbito social y cultural, una bromelia es una de las especies de horticultura, más cultivada del mundo (Ananas cosmos). Sin embargo no es la única bromelia con potencial alimenticio (Ladino *et al.* 2019). Atribuido a sus inflorescencias brillantes vistosas, muchas de estas plantas son comercializadas para arreglos florales lo cual genera divisas considerables para países productores como lo es Guatemala o Brasil (Dix y Dix, 2006; Negrelle *et al.* 2012)

C. *Las bromelias del género Tillandsia*

Tillandsia como género cuenta con más de 600 especies que varían considerablemente en aspectos morfológicos como fisiológicos (Granados, Salazar y Flores-Cruz 2016). Dentro de la familia Bromeliaceae, el género Tillandsia es considerado como el más primitivo y xerofítico del grupo. Todas las especies de este género son epifitas facultativas, comúnmente encontradas en árboles con cortezas sólidas como las de *Quercus* spp, a nivel del suelo o en superficies con altos grados de inclinación como laderas y montañas (Estrella-Parra *et al.* 2019). Una de sus características, es que poseen hojas tapizadas por tricomas peltados (con algunas notables excepciones) que están arreglados en una disposición de roseta e inflorescencias. También presentan inflorescencias alargadas con brácteas de coloraciones llamativas y contrastantes (como morado o rojo intenso).

El género Tillandsia abarca aproximadamente 460 especies; estas se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, incluyendo las islas de las Antillas, con un rango altitudinal que va desde el nivel del mar hasta alrededor de los 3800 m de altitud. Los géneros con mayor representatividad para la familia son: *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Guzmania*, *Mezobromelia*, *Tillandsia*, y *Vriesea*. Guatemala alberga un relativo elevado número de estas especies (alrededor de 28) que se encuentran distribuidas por todo el país, la mayoría con potencial para su comercialización especialmente hacia mercados ornamentales en Estados Unidos y Europa (Calderón-Oliva, 2008).

D. *Uso etnobotánico de Tillandsia sp.*

En cuanto a su importancia cultural y económica, se ha registrado múltiples usos a lo largo del continente americano para diferentes especies pertenecientes al grupo de las tillandsias. Siendo las más reportadas en la literatura *T. useneoides* y *T. recurvata* (Cano, 2006). En países como Perú o Brasil, los tejidos aéreos de estas plantas son utilizados en conjunto con otras especies para la formulación de remedios caseros que sirven como antiinflamatorios, antitusivos y antialérgicos. En la medicina tradicional mexicana se utilizan, para combatir los síntomas y molestias de afecciones como bronquitis, reumatismo, úlceras, hemorroides, quemaduras entre otros (Estrella-Parra *et al.* 2019).

Adicionalmente muchas de estas especies representan un fuerte recurso económico por su naturaleza ornamental. Solo en el estado de Florida se ha estimado que los beneficios generados por la comercialización y distribución de estas bromelias, ronda los 20 millones de dólares anuales (Cathcart, 1995).

Naturalmente Guatemala, por ser uno de los principales sitios de origen y diversificación de estas plantas, aporta un buen porcentaje para suplir la demanda en Estados Unidos y Europa. A tal punto que el Dr. Michael Dix y su esposa la Dra. Margaret Dix (2006), afirman con base en datos anecdóticos y a información recabada durante el ejercicio de su profesión que Guatemala tiene el potencial de convertirse en el principal exportador de tillandsias del continente americano. Sin embargo dicha exportación debe manejarse de manera cuidadosa y bajo estándares de producción sostenibles, puesto que estos autores sí han logrado registrar disminuciones poblacionales en tillandsias guatemaltecas como *T. guatemalensis* por factores como la sobrexplotación y el tráfico ilegal de especies (Cano, 2006).

E. *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.

1. Descripción

Tillandsia guatemalensis es una bromelia perteneciente al complejo de especies más caracterizado por la inclusión de *T. excelsa*; el cual es popular dentro de la comunidad científica por presentar un elevado grado de variación morfológico dentro del complejo de especies; a tal punto de ser descrito por investigadores (Dix y Dix, 2006) con dos distintivas variedades morfológicas (también denominadas morfoespecies). De dicho grupo *T. guatemalensis* puede ser diferenciada del resto por la presencia de brácteas florales más cortas que se encuentran conspicuamente nervadas, erectas a divergentes en la anthesis, finamente nervadas a todo lo largo,

con la ausencia de tricomas sobre superficies foliares u otro tipo de tejidos (Morales y Alfaro, 2003; CONAP, 2010).

Al igual que muchas otras especies de este género, *T. guatemalensis* muere después de su periodo de floración. Muchas de las descripciones de *T. guatemalensis* tienden a variar en algunos parámetros morfológicos, lo que hace cuestionar si en realidad el fenotipo de la especie es tan plástico o bien se podría tratar un conjunto de especies (Dix y Dix, 2006).

2. Distribución

T. guatemalensis se encuentra distribuida desde México en las tierras altas del estado de Chiapas hasta el sur de Panamá. Habita principalmente bosques muy húmedos, bosques estacionalmente secos y robledales que se encuentran entre los 1300 y 3000 metros de elevación sobre el nivel del mar (Morales y Alfaro, 2003). Para Guatemala la especie está registrada en los departamentos de: Baja Verapaz, Zacapa, Jalapa, Santa Rosa, Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Totonicapán, Quiché, Quetzaltenango, Huehuetenango y San Marcos (CONAP, 2010).

3. Importancia

T. guatemalensis está implicada de manera considerable en la reincorporación de elementos esenciales como potasio, calcio y magnesio en bosques lluviosos (Dix y Dix, 2006). También funge como fuente de alimento y refugio para muchos grupos diferentes de seres vivos. En parte debido a su morfología que presenta un tanque (estructura hueca que sirve a estas plantas y otros organismos para el almacenamiento de agua) comprenden también un importante reservorio de agua en muchos tipos de bosque (Ruano-Fajardo *et al.* 2014).

Esta bromelia y otras son utilizada de manera muy diversa en diferentes sitios de del continente americano. Principalmente en Perú y Brasil muchas de estas bromelias son utilizadas para la formulación de fármacos naturales que sirven para el tratamiento de dolor, molestias respiratorias, estomacales e inclusive como anticonceptivos (Estrella-Parra *et al.* 2019).

En el país no se cuentan con grandes plantaciones de esta bromelia, sin embargo Dix y Dix (2006) han registrado que un porcentaje de las poblaciones de esta especie son altamente comercializadas en países del norte, a tal punto de causar un efecto cuantificable en las poblaciones locales. Por esto el consejo nacional de áreas protegidas CONAP, la asigna bajo la categoría 3, la cual indica

que no está en riesgo en la actualidad, sin embargo podría estarlo en un futuro si no se regula su comercialización (CONAP, 2010). Este registro necesita actualización urgente si se pretende conservar la especie.

4. Amenazas y conservación de *T. guatemalensis*

Paradójicamente para *T. guatemalensis* (pero también cierto para otras especies de tillandsias como *T. xerographica* o *T. harrisii*) su mayor provecho económico es también la mayor amenaza a poblaciones silvestres. Muchas especies de tillandsias son explotadas extensivamente por su potencial ornamental en arreglos florales (Dix y Dix, 2006). Aunque esto no es del todo negativo puesto que genera beneficios sociales y económicos, se ha evidenciado un decrecimiento en números poblacionales de esta y otras especies debido a esta actividad.

Por dimensionar el mercado que existe para este producto, estimaciones sugieren que Guatemala podría ser el principal exportador de tillandsias en el continente americano, generando ganancias de hasta 1.4 millones de dólares (Toledo, 1997). Casos similares han sido reportados en otros países como Brasil, Colombia y Costa Rica (Negrelle *et al.* 2012). En donde la comercialización de un producto ornamental está causando un impacto negativo sobre las poblaciones de este.

Para comercializar individuos de *T. guatemalensis* es necesario un permiso de colecta emitido por el consejo nacional de áreas protegidas (CONAP). En la actualidad no se cuentan con propuestas o planes para la conservación de esta y otros grupos de bromelias.

5. Desarrollo de métodos de estudio genéticos en *T. guatemalensis*

La conservación de este producto ornamental debe forzosamente considerar también el manejo de los recursos genéticos de las poblaciones de *T. guatemalensis* dentro del país. Para lograr lo anterior es importante desarrollar métodos estandarizados de estudio de los factores genéticos, que incluyan pero no se limiten a: protocolos de cuantificación de la diversidad genética, cuantificación del potencial evolutivo, identificación linajes evolutivos potencialmente explotables, protocolos estandarizados de cuantificación y amplificación de ADN, aplicaciones biotecnológicas etc.

Todos los protocolos previamente mencionados cuentan con una dificultad extra (específicamente para plantas), por la presencia de una pared celular y la producción de metabolitos secundarios. Así como también una considerable variación debido a la concentración de ADN en diferentes tejido vegetales (Barfuss

et al. 2005; Gomes-da-Silva y Ferreira-da Costa, 2013). Los protocolos en cuestión deben de tomar en cuenta los factores previamente mencionados y modificar su metodología acorde a estos para optimizar los resultados. Por lo anterior, este trabajo pretende estandarizar los protocolos de extracción y amplificación de ácidos nucleicos a partir de tejidos de *T. guatemalensis*.

F. Modelación de nicho ecológico

La modelación de nicho ecológico comprende una clase de métodos, que utilizan datos de ocurrencia de una o varias especies en conjunto con información ambiental, para lograr generar un modelo correlativo de las condiciones ambientales necesarias para poder suplir las necesidades ecológicas de una especie dada (Warren y Seifert, 2011).

Por lo general estos modelos son más comúnmente reportados en la literatura en tres líneas de investigación principales. Como modelos predictores, que sirven para cuantificar la sustentabilidad de un hábitat para albergar una especie que no ha sido previamente descrita para el área. Para estimar la sustentabilidad de un hábitat que se sabe es abarcado dentro de la distribución geográfica de una especie; o bien para cuantificar los cambios en un hábitat y como estos cambios pueden llegar a afectar la distribución geográfica de una especie.

Otra línea de investigación que ha tomado fuerza en años recientes es el utilizar estos modelos de manera predictiva para cuantificar cómo bajo escenarios ambientales futuros las comunidades de diferentes especies van a cambiar (ampliar/reducir/trasladar etc) sus distribuciones geográficas y qué implicaciones puede tener esto (Hampe, 2004).

Para lograr lo anterior, estos modelos predictivos se valen de posibles escenarios futuros (también llamados vías socioeconómicas compartidas o SSP por sus siglas en inglés) desarrollados a partir de variables climáticas actuales y futuras. Los escenarios de última generación (también llamadas trayectorias de concentración representativa según el IPCC) se dividen en cinco familias principales que siguen los comportamientos descritos a continuación:

- SSP 1: El mundo cambia de manera gradual, pero generalizada, hacia un camino más sostenible, enfatizando un desarrollo más inclusivo que respete los límites ambientales percibidos. Este modelo asume que las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) disminuyen inmediatamente a niveles preindustriales.
- SSP 2: El mundo sigue un camino en el que las tendencias sociales, económicas y tecnológicas no se apartan mucho de los patrones históricos.

Se sigue de la misma tendencia histórica de emisión de GEI pero luego estas empiezan a disminuir a partir del 2060 en parte debido a la implementación de políticas pro-ambiente.

- SSP 3: El resurgimiento del nacionalismo, la preocupación por la competitividad, seguridad y los conflictos regionales empujan a los países a centrarse cada vez más en cuestiones internas o, como mucho, regionales. Por ende se dejan de lado muchas políticas y agendas proambientales lo cual genera la degradación de algunos sistemas naturales y el aumento de emisiones de GEI.
- SSP 4: Las inversiones altamente desiguales en capital humano, combinadas con la creciente desigualdad de oportunidades económicas y poder político, conducen a mayores desigualdades y estratificación tanto entre países como dentro de ellos. Este escenario asume un decrecimiento de las emisiones de GEI pero solamente por los países desarrollados que tienen la oportunidad invertir en tecnologías más amigables con el ambiente.
- SSP 5: Este mundo confía cada vez más en los mercados competitivos, la innovación y las sociedades participativas para producir un rápido progreso tecnológico y desarrollo del capital humano. Bajo este modelo se asume una dependencia a los combustibles fósiles como medio para lograr el desarrollo, lo que dispara la emisión de GEI y todos los efectos asociados a estos.

(Riahi *et al.* 2017)

G. Cambio climático

El cambio climático es un fenómeno social, ambiental y científico que se caracteriza por su relación con futuros escenarios globales. La comunidad científica trata de predecir los niveles de concentraciones de carbono y otros gases de efecto invernadero para poder hacer predicciones del futuro a partir de modelos climáticos globales. Mientras tanto los políticos apelan a una participación colectiva del mundo para diseñar el futuro a través de políticas preventivas y medidas de mitigación. En paralelo las grandes industrias intentan manejar y especular sobre los posibles riesgos de los patrones de clima del futuro.

La modelación de escenarios futuros como área de estudio ha recibido atención cada vez mayor en años recientes, en particular para la relación a la gestión de riesgos, gestión de desastres y construcción de posibles escenarios futuros. El cambio climático comprende una amenaza seria para muchos de los ecosistemas del planeta y para toda la biodiversidad y servicios ambientales que estos albergan (Yusoff y Gabrys, 2011).

H. *Especies crípticas, conservación y herramientas moleculares*

Delimitar y diferenciar especies suele ser complicado si se basa en morfología solamente, un hecho que ha exigido una integración taxonómica, que abarque fuentes adicionales de información como datos moleculares, biogeográficos y ecológicos (Jörger y Schrödl, 2013). Lo anterior es aplicable particularmente para organismos del reino Plantae, los cuales se sabe que presentan mecanismos como la hibridación y la poliploidía, que aportan considerablemente a su diversificación y especiación. Y que también complican en igual proporción la delimitación clara de sus relaciones filogenéticas (Wissemann, 2006).

Es precisamente bajo esta premisa que se hace evidente y necesaria la investigación con información molecular (Jörger y Schrödl, 2013). Esto porque permite identificar claramente relaciones que, bajo otros acercamientos, no sería posible. Por ejemplo, el estudio por Bell y sus colaboradores (2012), lograron describir y diferenciar una nueva especie de hepática del género *Herbertus*; utilizando solamente información genética de marcadores cloroplastidiales y un marcador nuclear (Bell *et al.* 2012). La utilización de información en estudios genéticos en plantas ha permitido el descubrimiento de otras regiones del genoma que permite diferenciar (con base en las secuencias de dichas regiones) especies muy cercanamente emparentadas (Wolfe y Liston, 1998).

Debido a lo anteriormente mencionado, es importante utilizar herramientas moleculares para dilucidar de manera correcta la taxonomía de especies descritas y nuevas, además de generar mejores estrategias de conservación. Permite, por ejemplo, que especies que son muy similares y que a simple vista parecen ser una sola especie con un amplio rango de distribución; pueda ser identificada como dos especies distintas y que por ende se desarrollen estrategias de conservación específicas para cada una, lo cual puede tener un efecto considerable en la supervivencia de dicha especie/s (Tempelton, 1991; Palma-Silva *et al.* 2011).

I. *Marcadores cloroplastidiales, nucleares y ribosomales*

Los marcadores genéticos pueden ser definidos como un gen o una secuencia de ADN, que cuentan con una ubicación conocida dentro del cromosoma y que pueden estar asociados a la expresión de característica específicas de un individuo (Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Las aplicaciones de estas secuencias comprenden un amplio espectro dentro de las cuales puede ser nombrada, pero no limitado: cuantificación de la biodiversidad, identificación de muestras en biología forense, producción de bienes a través de herramientas de biotecnología, control de calidad en la industria alimenticia, mejoramiento de cultivos de importancia alimenticia,

desarrollo de variedades de cultivos resistentes a plagas/enfermedades (Cheng *et al.* 2015).

Para el reino Plante existen tres principales grupos de marcadores moleculares, utilizados para la delimitación de relaciones filogenéticas. El primer grupo está comprendido por los marcadores cloroplastidiales. Este grupo de marcadores puede abarcar regiones codificantes y no codificantes y sitios de restricción (como los marcadores *matK* y *trnK*). A pesar de su utilidad a la hora de realizar estudios moleculares, estos marcadores por si solos no suelen ser suficiente para delimitar claramente las relaciones genéticas y evolutivas a niveles de especie y subespecie en muchas familias del reino Plantae. Esto es principalmente debido a su relativa baja variabilidad (Chew, De Luna y González, 2010; Barfuss *et al.* 2005).

El ADN de origen cloroplastidial ha sido ampliamente secuenciado y utilizado para la reconstrucción de relaciones filogenéticas dentro de múltiples familias de plantas; así como también para evaluar la evolución de caracteres como el mecanismo CAM de fotosíntesis y la adaptación de epifitas a sus ambientes (Chew, De Luna y González, 2010).

El segundo gran grupo de marcadores reportado para plantas, está comprendido por los marcadores nucleares. Particularmente aquellos del espaciador interno transcrito (conocido como ITS por su nombre en inglés) (White *et al.* 1990). Entre estos marcadores la región ITS es una de las más utilizada en estudios de sistemática molecular de plantas, tanto a nivel de género como a nivel de especie. Esto es gracias a que los marcadores en cuestión cuentan con un elevado poder de resolución para definir relaciones a niveles inter e intraespecíficos (Cheng *et al.* 2015).

Técnicamente parte del grupo anterior de marcadores, los genes de ARN ribosomal también son frecuentemente reportados para estudios genéticos en plantas. Estas regiones comprenden, los genes más conservados y repetidos dentro del grupo de los eucariotas (Eickbush y Eickbush, 2007). El ARN ribosomal en plantas superiores se dispone en largas unidades repetitivas en tándem, muy parecidas a los de otros eucariotas. Las regiones 18S, 5.8S y 25S se agrupan y se transcriben como una sola unidad (Rogers y Bendich, 1987). Debido a la alta demanda de ribosomas necesaria en periodos de división celular, estas regiones son más abundantes en el genoma de todos los eucariotas que los marcadores discutidos anteriormente. Lo mismo hace que sean marcadores muy prácticos para estudios filogenéticos en eucariotas, haciendo la salvedad que por ser compartidos por muchos grupos, es relativamente fácil que se den casos de contaminación cruzada.

III. Justificación

La especie *Tillandsia guatemalensis* cuenta con un considerable grado de diversidad morfológica en algunas estructuras como hojas e inflorescencia (Martínez Márquez, 2017) lo cual da indicios que las poblaciones podrían ser separadas en un complejo de especies. Es por ello que es importante realizar esfuerzos en la investigación para determinar si es una especie con variabilidad intraespecífica o en realidad un complejo de especies. Conocer el grado de diversidad genética de la especie facilitará a largo plazo la implementación de estrategias de conservación.

Se ha documentado un descenso poblacional de *T. guatemalensis* (Dix y Dix, 2006; Negrelle *et al.* 2012). Esta planta por su naturaleza ornamental y vistosa es muy comercializada para la fabricación de arreglos florales. A tal punto que se estima que dicha actividad, está teniendo un efecto cuantificable sobre las poblaciones silvestres. Añadido a esto, el cambio climático también representa una amenaza potencial para el hábitat natural de la especie. Aún con estas consideraciones la entidad encargada de salvaguardar los recursos naturales del país, el consejo nacional de áreas protegidas CONAP le confiere a esta especie una categoría III dentro de su listado de especies amenazadas. Esta clasificación no le confiere ningún tipo de protección.

Es necesario actualizar los estados de conservación para que abarquen tanto el enfoque genético como el biogeográfico de las poblaciones en Guatemala. Lo cual se puede usar como herramienta para la implementación de acciones de conservación efectivas, de las poblaciones y de los recursos genéticos de esta especie. Para lograr esto, es imprescindible el desarrollo previo de métodos de biología molecular y genética estandarizados. Este enfoque también debe considerar el área de distribución de la especie y como esta puede cambiar debido a factores ambientales como el cambio climático.

A nivel nacional no existen reportes en la literatura de estudios genéticos con este grupo y los que existen a nivel internacional se han centrado en análisis de grupos más grandes como la relación entre géneros dentro una misma familia (Barfuss *et al.* 2005; Gomes-da-Silva y Ferreira-da Costa, 2013). El presente estudio pretende estandarizar los protocolos de extracción y amplificación de este grupo utilizando marcadores cloroplastidiales. Así como también hacer una evaluación de los recursos genéticos de la especie con la ayuda de modelación de nicho ecológico.

IV. Objetivos

A. Objetivo general

Establecer las relaciones evolutivas y genéticas de *Tillandsia guatemalensis* dentro de la filogenia del género *Tillandsia* y sus implicaciones para conservación.

B. Objetivos específicos

- Generación de datos genéticos de origen cloroplastidial de *Tillandsia guatemalensis*.
- Determinar cuáles son los tejidos vegetales óptimos para la recuperación de ácidos nucleicos.
- Establecer un protocolo estandarizado de extracción y amplificación de ADN para *Tillandsia guatemalensis*
- Generación de mapas de distribución potencial de *T. guatemalensis* para el país utilizando modelaje de nicho ecológico.

V. Métodos

A. Sitio de muestreo

Las colectas se llevaron a cabo en los departamentos de Guatemala (14°36'21.79"N 90°29'36.49"O) y Baja Verapaz (15°24'35.53"N 90°36'18.72"O) en el área de Colecciones Biológicas de la Universidad del Valle y la reserva natural privada Pamac II respectivamente. Los muestreos se realizaron en los meses de Julio a Septiembre del 2021. La elección de los sitios de muestreo se hizo conforme a la disponibilidad de horarios y recursos económicos, buscando obtener muestras de al menos dos sitios diferentes del país que se encuentren dentro del rango natural de la especie (1300 – 2800 msnm) (CONAP, 2010).



Figura 1. Puntos de colecta de tejidos de *T. guatemalensis*.

B. Colecta de muestras

Las colectas se realizaron bajo la licencia 01025 emitida por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas (CONAP) a nombre del herbario de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG).

Entre ambos sitios de muestreo se seleccionaron 20 individuos adultos de *T. guatemalensis* de cada morfotipo (es decir se colectaron muestras de 20 individuos cada variante morfológica de la especie) creciendo en diferentes árboles. Se llevó un registro fotográfico de cada uno (para facilitar su identificación en el laboratorio) y se colectaron 3-5 hojas enteras saludables con un pequeño pedazo de la inflorescencia. Los tejidos fueron colocados en bolsas de plástico de cierre hermético con gel de sílice para ser almacenadas y transportadas al laboratorio de biología celular y molecular del Departamento de Biología de la UVG. Donde se congelaron a -20°C hasta el momento de la extracción.

C. Métodos de laboratorio

Para el presente estudio se compararon tres métodos de extracción descritos a continuación:

1. Extracción por método CTAB + Sorbitol

- a. Pesar 0.2 g de tejido vegetal en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Sumergir el tubo en nitrógeno líquido y macerar la muestra mecánicamente, utilizando un pistilo plástico, hasta obtener un polvo fino.
- b. Agregar solución de Sorbitol (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.35 M sorbitol, 5 mM EDTA pH 8.0, 1% PVP – 40 y agua ultrapura) hasta llenar $\frac{3}{4}$ de la capacidad del tubo Eppendorf
- c. Centrifugar las muestras a 2500 rpm por 5 minutos. Decantar el sobrenadante y agregar 600 μL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 3 M NaCl, 3% sol. CETAB y 1% PVP).
- d. Resuspender muestras con vortex.
- e. Incubar muestras al menos 12 horas a 65°C con agitación.
- f. Añadir 650 μL de CIA (solución de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) y agitar vigorosamente por 1 minuto.
- g. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos y trasladar fase acuosa a nuevos tubos (evitando en medida de lo posible cualquier resto de la solución que pueda contaminar el ADN).
- h. Añadir 40-60 μL de acetato de sodio pH 5.2 3 M y 260 μL etanol absoluto (EtOH) frío. Mezclar por inversión 10 veces.
- i. Refrigerar muestras a -20°C por al menos 2 horas o toda la noche.

- j. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y agregar 600 µL de etanol absoluto (EtOH).
- k. Refrigerar a -20 °C por 40 minutos.
- l. Decantar sobrenadante y secar los tubos invertidos en un pedazo de papel.
- m. Agregar 1 mL de etanol 70%. Centrifugar por 10 minutos por 13000 rpm.
- n. Descartar etanol 70% y secar los tubos por inversión al menos 1 h.
- o. Resuspender pellet en 100 µL de buffer TE (Tris HCl-EDTA) incubar a 37 °C por 1 h

(Inglis *et al.* 2018)

2. Extracción por método CTAB-FENOL

- a. Conservar tejidos a -20° C previo a la extracción.
- b. Pesar 0.2 g de tejido vegetal en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Sumergir el tubo en nitrógeno líquido y macerara muestra mecánicamente con pistilo plástico, hasta obtener un polvo fino.
- c. Agregar 600 µL de buffer CETAB (precalentado a 60 °C). Mezclar con vortex por 10 segundos.
- d. Incubar muestras a 60 °C por 1 h. Dejar enfriar a temperatura ambiente vencido el tiempo.
- e. Agregar 500 µL de solución CIA (24:1). Pasar vortex por 10 s.
- f. Centrifugar muestras a 13,000 rpm por 10 minutos.
- g. Transferir sobrenadante a (~500 µL) a nuevo tubo de 15 mL.
- h. Agregar a nuevo tubo 500 µL de etanol absoluto (EtOH) y 50 µL de acetato de amonio 7.5 M. Mezclar con vortex por 10 s.
- i. Mezclar por inversión e incubar a -20 °C por 20 minutos o toda la noche.
- j. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min. Descartar sobrenadante.
- k. Lavar pellet con 150 µL de etanol 70% frío.
- l. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos. Descartar sobrenadante.
- m. Secar precipitado al aire o en horno con agitador a 60 °C, por 30 minutos.
- n. Resuspender pellet en 100 µL de buffer TE (precalentado a 50 °C). Agregar 6 µL de ARNasa. Mezclar con vortex y centrifugar a 13000 por 10s.
- o. Incubar muestra por 30 minutos a 37 °C.
- p. Agregar 150 µL de solución CIA (24:1) y 150 µL de solución de fenol.
- q. Mezclar con vortex por 10 segundos.
- r. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 minutos.
- s. Trasvasar sobrenadante a nuevo tubo y agregar 150 µL de EtOH y 15 µL de acetato de amonio. Incubar a -20 °C por 24 h.
- t. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min. Descartar sobrenadante.
- u. Agregar 50 µL etanol 70% frío. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
- v. Descartar sobrenadante, secar en horno a 60 °C por 1 hora.
- w. Resuspender ADN en 50 µL de buffer TE

(Murray y Thompson, 1998)

3. Kit de extracción

- a. Pesar 0.2 g de tejido vegetal en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Sumergir el tubo en nitrógeno líquido y macerar la muestra mecánicamente, utilizando un pistilo plástico, hasta obtener un polvo fino.
- b. Agregar 20 μ L de proteinasa K y ajustar a un volumen final de 220 μ L con buffer PBS.
- c. Agregar 200 μ L de buffer AL (sin etanol añadido). Mezclar por inversión vigorosamente por cerca de 15 segundos.
- d. Incubar a 56 C por 10 minutos, mezclando por inversión cada dos minutos. Vencido el tiempo añadir 200 μ L de etanol absoluto a cada muestra. Mezclar por inversión vigorosamente por cerca de 15 segundos.
- e. Trasvasar la solución (de aproximadamente 900 μ L) y nuevos tubos. Centrifugar por 4 minutos por 6000 rpm.
- f. Después de centrifugar agregar 500 μ L de buffer AW1 a cada una de las muestras. Centrifugar nuevamente por 2 minutos a 6000 rpm.
- g. Agregar 500 μ L de buffer AW2 a cada muestra (agregar etanol absoluto a la solución AW2 previo a este paso)
- h. Centrifugar muestras por 15 minutos a 6000 rpm.
- i. Agregar 200 μ L de buffer AE a cada muestra. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar por 4 minutos por 6000 rpm.

(Lauro *et al.* 2007)

4. Cuantificación de concentración, pureza e integridad de ADN

Luego de extraer el ADN se procedió a determinar la concentración e integridad de cada muestra. Para cuantificar las muestras se utilizó el equipo Nanodrop (ThermoFisher TM). Se anotaron los valores de 260/280 y 230/260 para poder determinar la pureza de las muestras extraídas. Aquellas muestras con concentraciones mayores a 100 ng/ μ L fueron diluidas en agua hasta obtener una concentración de 20 ng/ μ L. Como control de calidad de ADN, se utilizaron los fragmentos de ADN en una electroforesis capilar en gel de agarosa al 1% (Figura 2). Se tomó como íntegra la muestra, cuando su perfil de electroforesis presento una banda discreta. El grado de degradación de la banda se determinó por la pérdida de definición de la banda y el acompañamiento de una "smear" a lo largo del gel.

5. Amplificación de los marcadores cloroplastidiales y secuenciación.

El ADN extraído se amplificó mediante una reacción de la polimerasa en cadena (PCR) siguiendo la metodología de (Cuenoud *et al.* 2002). Para este estudio se utilizarán los cebadores matK-390F (‘5-CGATCTATTTCATTCAATATTTTC-3’) y matK- 1326R R (‘5-TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT3’) de dicho trabajo, que amplifican para un fragmento de aproximadamente 930 pb. La amplificación de todos los marcadores se llevó a cabo en un volumen final 20 µL, conteniendo 7 µL de polimerasa (buffer Gotaq® G2 Colorless Máster Mix), 1 µL de cada cebador (0.5 µM), 10 µL de agua ultrapura y 1 µL del ADN extraído. El programa del PCR consistió en un paso de 3 min a 95 °C y 35 ciclos de desnaturalización de 1 min a 94 °C, 30 segundos de annealing a 48 °C y 1 min, de extensión a 72 °C, seguido por una extensión final de 7 min a 72 °C y un paso final de hold a 4 °C.

Los amplicones producidos fueron visualizados mediante la técnica de electroforesis capilar en gel de agarosa al 1%, para comprobar la calidad de los productos aislados. Diez productos de las reacciones de PCR fueron enviados a las sedes de Macrogen Inc en Corea, por vía aérea para ser secuenciados bidireccionalmente por el método Sanger. Las secuencias resultantes fueron utilizadas para para realizar los análisis filogenéticos y estadísticos.

D. Modelación de nicho ecológico para *Tillandsia guatemalensis*

La modelación de nicho ecológico de *T. guatemalensis* se realizó con la ayuda del algoritmo de modelación basado en la máxima entropía, del programa MaxEnt (Phillips *et al.* 2006). La obtención de los registros geográficos de *T. guatemalensis* se realizó a través del portal Global Biodiversity Information System-GBIF (https://www.gbif.org/es/occurrence/search?country=GT&taxon_key=2694792), del cual se obtuvo una base de datos registros históricos de presencia de la especie que van desde el año 1970 hasta el 2001. La base de datos fue depurada para eliminar aquellos registros faltos de información o con información extra que no fue considerada en la presente investigación. Las variables bioclimáticas de tipo raster fueron descargas a partir del portal WorldClim (<https://www.worldclim.org/data/worldclim21.html>) y se eligió una resolución de píxel de 30s que corresponde a una resolución espacial de 1 Km².

Utilizando las variables bioclimáticas (Apéndices, Cuadro 3) y los datos de presencia de *T. guatemalensis*, se llevó a cabo el modelaje con MAXENT. Se utilizó un umbral de convergencia de 0.0001 con 1000 iteraciones como límite superior para cada corrida. Para estimar la capacidad de predicción de cada modelo, se analizó el área bajo la curva (AUC). También se utilizó la prueba de Jackknife para calcular la contribución relativa de cada variable al modelo. Ambos análisis (Jackknife y AUC)

fueron implementados en MAXENT. Para la modelación de nicho ecológico futuro se siguió el procedimiento descrito anteriormente y se adicionaron los modelos de escenarios futuros SSP 1-2.6, SSP 2-4.5, SSP 3-7.0 y SSP 5-8.5 para cuantificar el cambio de la distribución actual de *T. guatemalensis* bajo las presiones ambientales del futuro.

E. Reconstrucción de relaciones filogenéticas

Las secuencias obtenidas se verificaron y depuraron mediante el software MEGA-X (Kumar *et al.* 2018). Una vez limpiadas, fueron ensambladas para obtener la secuencia consenso de cada marcador e individuo. Con las secuencias consenso se determinó el mejor modelo de sustitución nucleotídica utilizando el software Jmodel Test (Darriba *et al.* 2012) y se diagramaron árboles filogenéticos por los métodos de: de máxima verosimilitud (1000 repeticiones de bootstrap) y estadística bayesiana (100 millones de repeticiones de MCMC), utilizando los programas MEGA-X, Mr. Bayes 3 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), Mesquite (Maddison y Maddison, 2019) y FigTree (Rambaut y Drummond, 2012).

Para este análisis también se utilizaron secuencias de esta región pertenecientes a organismos emparentadas con *T. guatemalensis* descargadas de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=matK+tillandsia>. Lo que permitió hacer una clara diferenciación genética entre los morfotipos y otras especies de la misma familia y género. Se utilizó como punto de enraizamiento de los árboles las secuencias de la especie hermana *T. adpressiflora* como es sugerido por (Barfuss *et al.* 2016). Dichas filogenias fueron analizadas e interpretadas para el reporte final.

F. Análisis estadístico

Para el componente estadístico del presente estudio se comprobó la normalidad de los valores de concentración de ADN (medido en ng/ μ L) y demás variables mediante un gráfico de dispersión y distribución (Fig. 11 y 12). Teniendo en cuenta lo anterior se realizaron pruebas de Shapiro Wilks, Dunn y gráficos de caja y bigote para evidenciar la presencia o ausencia de una diferencia estadísticamente significativa entre las variables (tejido, protocolo y morfotipo) y la concentración de ADN, así como también para comprobar el supuesto de normalidad.

VI. Resultados

A. Colecta de muestras

Cuadro 1 – Recuento de muestras por morfotipo, tejidos colectados y procedencia de muestras.

Morfotipo	No.	Tejidos	Pamac II	C.B- UVG
1	20	H, B	12	8
2	18	H, B	11	7

El Cuadro 1 muestra el número de tejidos colectados. Para el morfotipo 1, doce muestras fueron colectadas en la reserva natural Pamac II y ocho del área de colecciones biológicas. Para el morfotipo 2, se lograron colectar once muestras en la reserva natural Pamac II y siete en el área de colecciones biológicas de la universidad del valle de Guatemala.

B. Extracción y amplificación de ADN

Cuadro 2 – Extracción y cuantificación de concentración de ADN para muestras de *T. guatemalensis* a partir de 3 protocolos y 2 tejidos diferentes.

No.	No. de muestra	ADN (ng/ μ L)	Protocolo	Morfotipo	Tejido
1	4	19.8	C	MF1	Hoja
2	5	27.2	C	MF1	Hoja
3	8	37.2	C	MF1	Hoja
4	11	48.2	C	MF1	Hoja
5	14	67	C	MF1	Hoja
6	17	24.7	C	MF1	Hoja
7	18	32.6	C	MF1	Hoja
8	21	169.5	C	MF1	Hoja
9	22	144.7	C	MF1	Hoja
10	23	141.4	C	MF1	Hoja
11	24	32.3	C	MF1	Hoja
12	26	14.7	C	MF1	Hoja
13	27	9.2	C	MF1	Hoja
14	30	41.7	C	MF1	Hoja

15	31	208.1	C	MF1	Hoja
16	32	97	C	MF1	Hoja
17	33	74	C	MF1	Hoja
18	34	14.8	C	MF1	Hoja
19	35	37.1	C	MF1	Hoja
20	36	35.7	C	MF1	Hoja
21	6	1.3	C	MF2	Hoja
22	7	37.7	C	MF2	Hoja
23	9	24.3	C	MF2	Hoja
24	10	39.1	C	MF2	Hoja
25	12	35.9	C	MF2	Hoja
26	13	27.8	C	MF2	Hoja
27	15	69.6	C	MF2	Hoja
28	16	20.3	C	MF2	Hoja
29	20	67.2	C	MF2	Hoja
30	27	16.1	C	MF2	Hoja
31	28	46.7	C	MF2	Hoja
32	29	42.9	C	MF2	Hoja
33	30	32.5	C	MF2	Hoja
34	31	46.7	C	MF2	Hoja
35	32	46.4	C	MF2	Hoja
36	33	53.5	C	MF2	Hoja
37	34	35.1	C	MF2	Hoja
38	4	44.1	F	MF1	Hoja
39	5	23.6	F	MF1	Hoja
40	8	59.4	F	MF1	Hoja
41	24	43.6	F	MF1	Hoja
42	26	45.9	F	MF1	Hoja
43	27	19.8	F	MF1	Hoja
44	7	279.9	F	MF2	Hoja
45	12	44.2	F	MF2	Hoja
46	15	728.6	F	MF2	Hoja
47	27	20.8	F	MF2	Hoja
48	30	221	F	MF2	Hoja
49	31	470	F	MF2	Hoja
50	6	309.2	F	MF2	Bráctea
51	9	95.6	F	MF2	Bráctea
52	10	454.9	F	MF2	Bráctea
53	12	773.3	F	MF2	Bráctea
54	15	167.1	F	MF2	Bráctea
55	16	1301	F	MF2	Bráctea
56	29	548.7	F	MF2	Bráctea
57	37	870	F	MF2	Bráctea

58	4	210	F	MF1	Bráctea
59	5	382.7	F	MF1	Bráctea
60	8	266.9	F	MF1	Bráctea
61	11	474.5	F	MF1	Bráctea
62	27	812.2	F	MF1	Bráctea
63	30	1286.3	F	MF1	Bráctea
64	38	710	F	MF1	Bráctea
65	37	929.5	F	MF1	Bráctea
66	4	1.5	K	MF1	Hoja
67	21	0.5	K	MF1	Hoja
68	27	1.3	K	MF1	Hoja
69	31	8.1	K	MF1	Hoja
70	6	3.3	K	MF2	Hoja
71	9	2.9	K	MF2	Hoja
72	16	0	K	MF2	Hoja
73	30	1.4	K	MF2	Hoja

El Cuadro 2 muestra las concentraciones de ADN obtenidas en el presente estudio. En la columna de 'Protocolo' la simbología esta representa de la siguiente manera: C = extracción a partir de protocolo de CTAB + Sorbitol, F= extracción a partir de protocolo de CTAB + Fenol, K = extracción a partir de kit de extracción.

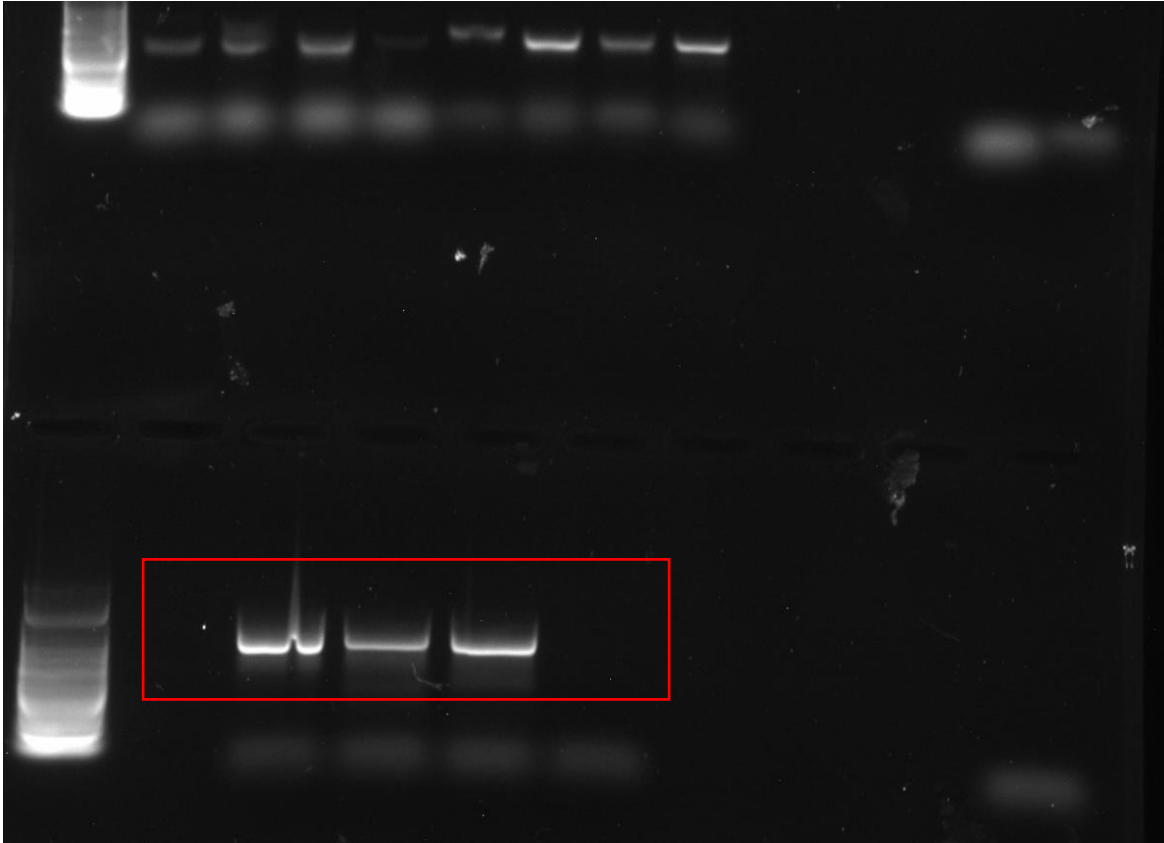


Figura 2. Perfil de electroforesis en gel de agarosa al 1% de muestras de *T. guatemalensis* para marcadores nucleares y cloroplastidiales.

En la Figura 2 se muestra el perfil de electroforesis en gel de agarosa de muestras de *T. guatemalensis* extraídas a partir de 3 protocolos diferentes. En rojo se resaltan las bandas amplificadas con los cebadores utilizados en el presente estudio (Cuenoud *et al.* 2002) matK-390F y matK- 1326R. El primer pozo muestra la escalera de ADN de 100 pares de bases y el último contiene máster mix que se utilizó como control negativo. Se evidencia la formación de un amplicón de aproximadamente 600 pares de bases.

C. Comparación entre protocolos, tejidos y morfotipos

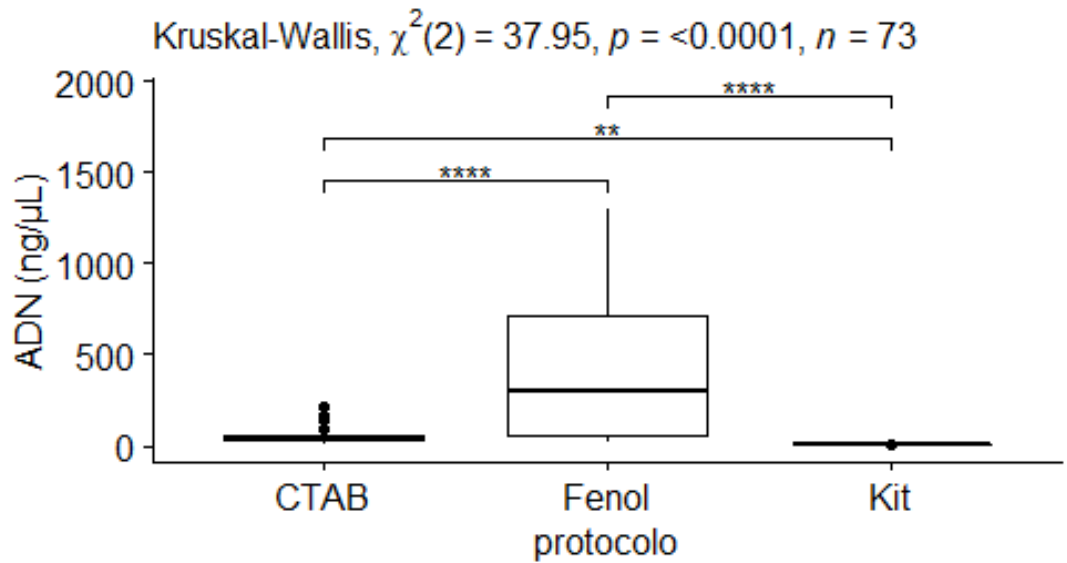


Figura 3. Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 3 protocolos diferentes (CTAB/Fenol/Kit de extracción) con estadístico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn.

Se puede apreciar en la Figura 3 que todos protocolos produjeron resultados diferentes (a nivel estadístico) como se observa en el estadístico de Kruskal-Wallis. La prueba de Dunn demostró que las todas las interacciones entre los protocolos resultaron ($X^2 = 4.12, -5.70$; $p = 2.52e-12, 1.62e-3, 1.21e-8$). En general las medias de las extracciones por CTAB y kit de extracción son bastante similares; mientras que los datos a partir de extracciones de Fenol son mucho más variables y en promedio más elevados. Es importante mencionar que un mayor número de muestras fueron procesadas a partir de hojas en comparación a otros tejidos.

Esto podría haber sesgado los rendimientos entre los diferentes protocolos. Por lo mismo, el análisis aquí descrito fue repetido, pero solo tomando en cuenta aquellas muestras procesadas a partir de hojas (Apéndices, Figura 13). La significancia entre los rendimientos de los protocolos cambió y bajo estas condiciones solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el protocolo de Fenol y el kit y entre el kit de extracción y el protocolo de Fenol ($X^2 = 290, 96$; $p = 0.0000747, 0.0000477$).

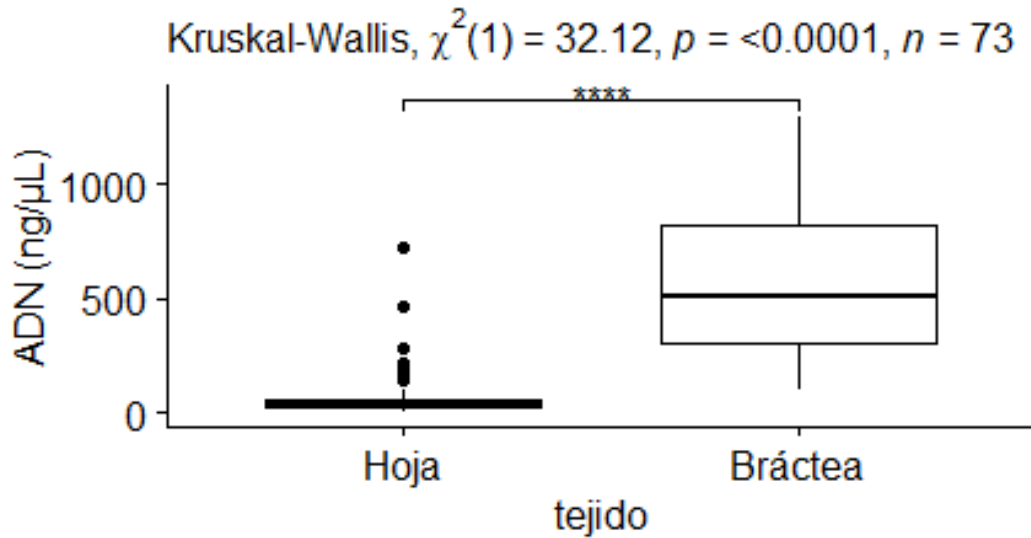


Figura 4. Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de dos tejidos vegetales (hoja/bráctea) con estadístico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn.

En la Figura 4 se puede observar que la extracción de ADN a partir de brácteas produjo una mayor concentración con respecto a la extracción a partir de hojas. Es importante mencionar que las extracciones de brácteas produjeron datos mucho más variables, mientras que las extracciones a partir de hojas no varían tan evidentemente. La diferencia entre los tejidos se evaluó con una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Existe una diferencia significativa entre las extracciones de ambos tipos de tejidos.

La prueba de Dunn confirmó que la interacción hoja-bráctea es diferente, con un estadístico y un valor p de ($X^2 = 5.67; p = 1.45e-8$). Se optó por utilizar las extracciones con buffer CTAB para comparar los rendimientos de los tejidos individuales. Lo anterior podría tener un efecto en los rendimientos de ambos tejidos. Por lo cual el presente análisis se repitió, pero solo tomando en cuenta aquellas muestras procesadas con el método de extracción con fenol (Apéndices, Figura 14). Se encontró que la interacción permaneció igual a pesar de las consideraciones mencionadas con un estadístico y un valor p de ($X^2 = 3.34; p = 0.000830$).

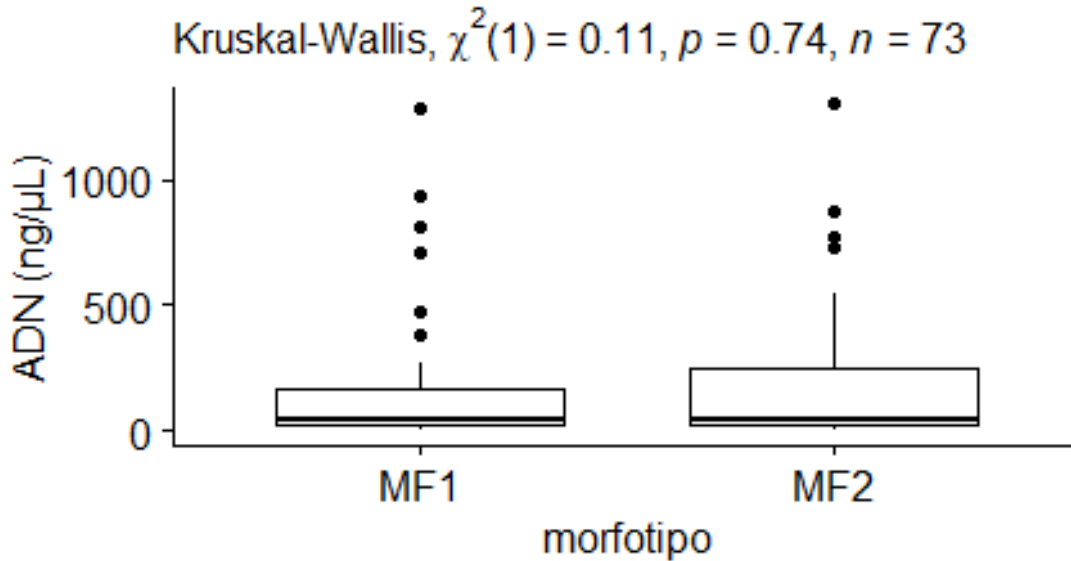


Figura 5. Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de dos morfotipos diferentes (MF1/MF2) con estadístico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn.

Se puede apreciar, mediante la prueba de Kruskal-Wallis de la Figura 5 que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los rendimientos de extracción de ADN a partir de dos diferentes morfotipos. En general ambos conjuntos de datos similares en cuanto a su variabilidad y su media. Con la salvedad que el morfotipo presente concentraciones de ADN ligeramente más elevadas que el morfotipo 2, sin embargo no lo suficiente, para asumir significancia estadística.

D. Reconstrucción de relaciones filogeográficas de *T. guatemalensis*

La Figura 6 muestra la probabilidad de distribución de *T. guatemalensis* calculado a partir de 19 variables bioclimáticas (apéndices, Cuadro 3) con el programa Maxent (Phillips, Dudík y Schapire. 2022).

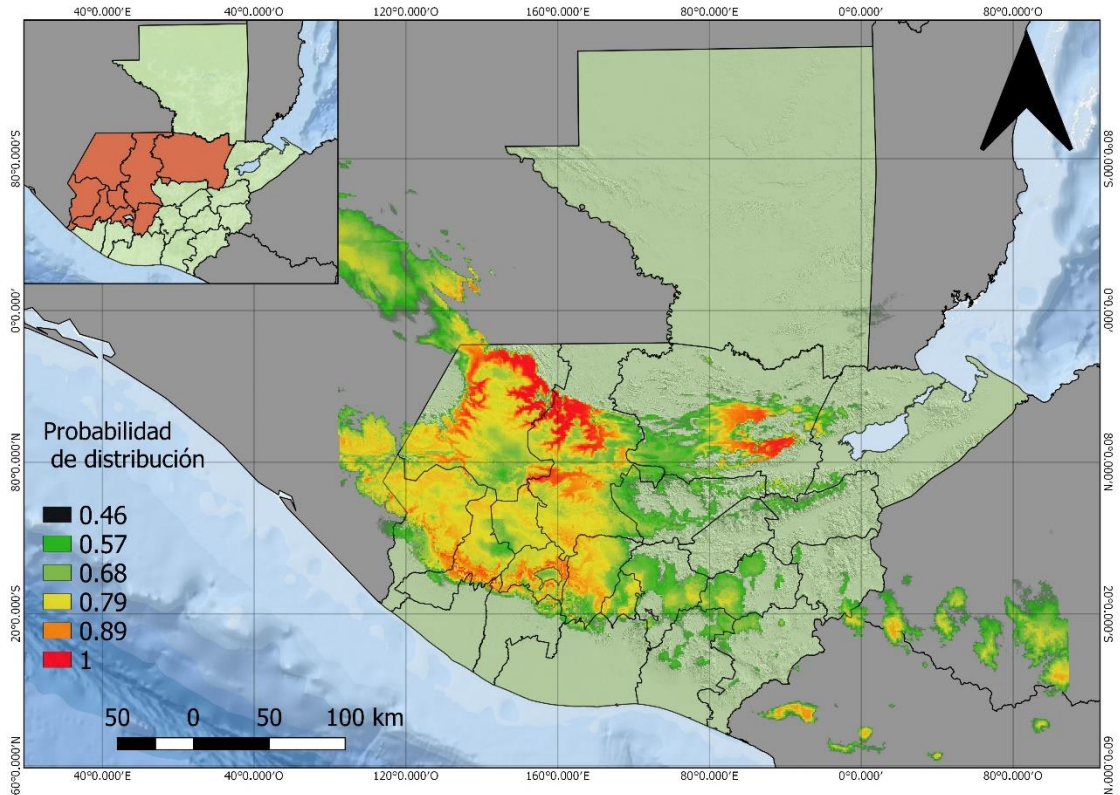


Figura 6. Distribución potencial de *Tillandsia guatemalensis* modelada para registros desde 1970 a el año 2000, calculado a partir de 19 variables bioclimáticas.

En general se puede observar que la mayor probabilidad de ocurrencia en la especie ocurre en los departamentos de Huehuetenango, Quiché, Quezaltenango y Alta Verapaz. También es probable que la distribución de la especie abarque los departamentos de Sololá, Chimaltenango y San Marcos. Aunque es importante mencionar que la probabilidad de ocurrencia en estos departamentos es menor en comparación a otros como Huehuetenango o Quiché.

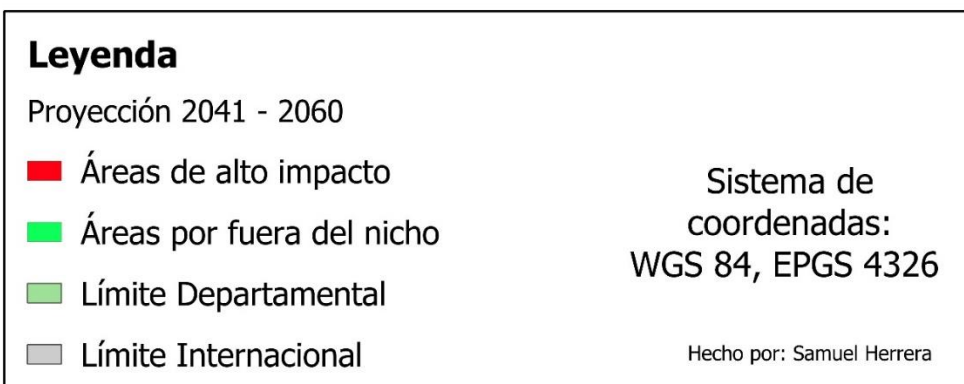
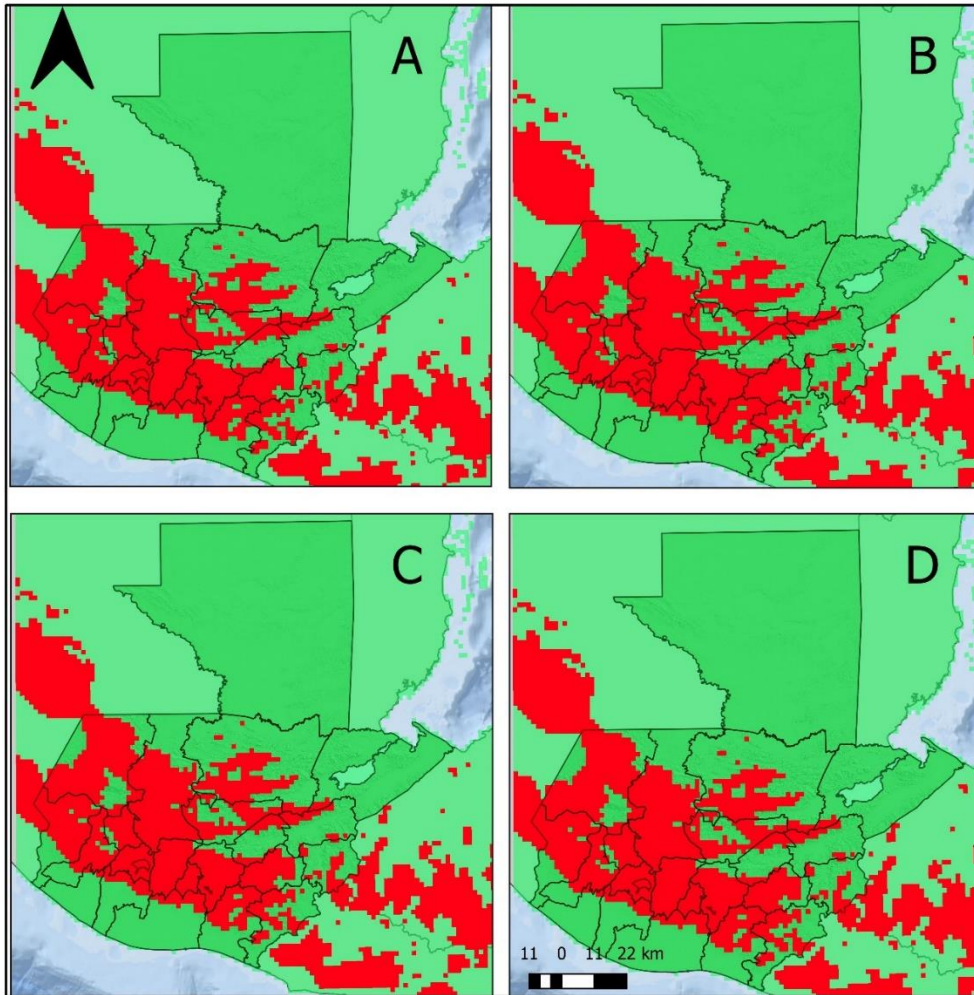


Figura 7. Distribución potencial de *Tillandsia guatemalensis* proyectada para el período 2041-260 a partir de 19 variables bioclimáticas calculada a partir modelos climáticos de nueva generación (CMIP6): **A)** modelo de mitigación (SSP 1-2.6), **B)** modelo de estabilización (SSP 2-4.5), **C)** modelo punto medio (SSP 3-7.0) y **D)** aumento drástico de emisiones (SSP 5-8.5)

En rojo se puede observar las áreas que serán más afectadas por las presiones ambientales del futuro, es decir las áreas que en la actualidad pueden o no albergar a la especie pero que debido a presiones climáticas dejarán de ser idóneas para esta. En verde claro se observan las áreas que no son aptas para albergar poblaciones de *T. guatemalensis*.

Se observa en esta figura que las áreas afectadas reemplazan en su mayoría la distribución de *T. guatemalensis* en el país. Esto indica que es muy probable que esta especie desaparezca del país para el próximo medio siglo solo tomando en cuenta el análisis de variables climáticas. Aún bajo el escenario más optimista (Figura 7, escenario A) SSP 1-2.6) que asume una drástica disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero en un periodo menor a 20 años y la implementación de políticas pro-ambiente, las áreas que tendrán un fuerte impacto abarcan la totalidad de la distribución proyectada de la especie.

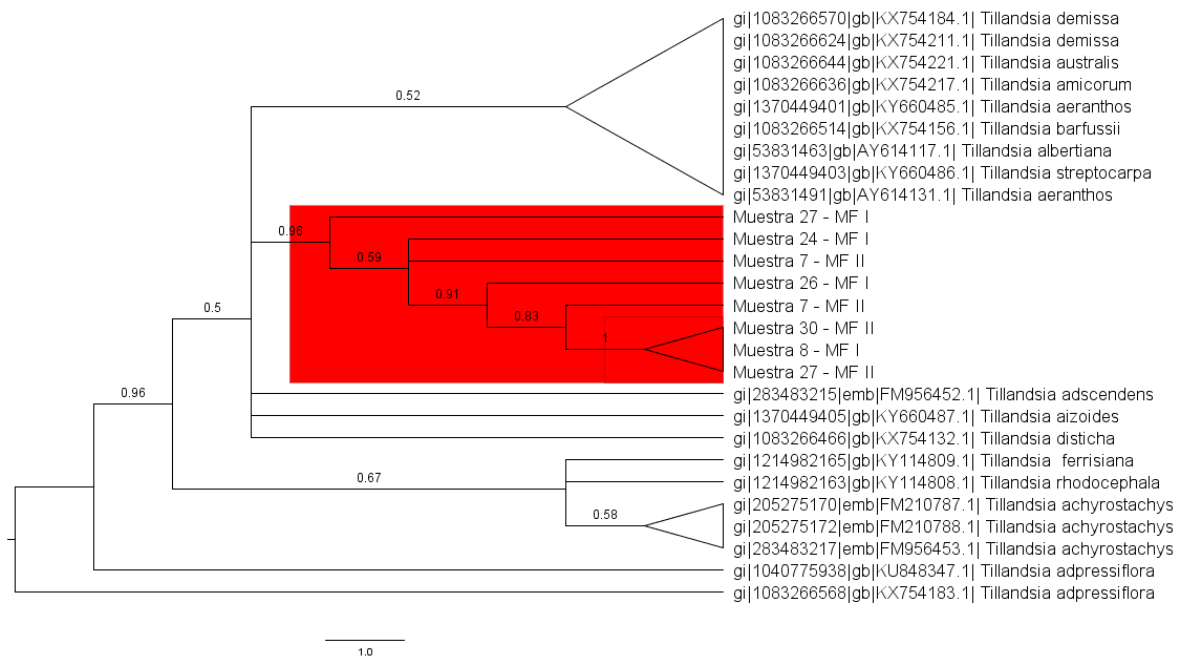


Figura 8. Árbol filogenético construido a partir de método de Máxima Verosimilitud para *Tillandsia guatemalensis* y otros organismos del mismo género.

Se utilizaron los métodos de máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana para construir árboles filogenéticos de *T. guatemalensis*. Para el árbol de máxima verosimilitud se realizó un alineamiento de un total de 27 secuencias utilizando el modelo evolutivo HYK+I. El árbol filogenético consenso, muestra claramente la formación de un grupo genético distintivo formado por individuos de *T. guatemalensis* colectados, extraídos y secuenciados en la presente investigación (resaltado de color rojo).

VII. Discusión

A. Comparación entre métodos de extracción

Para el presente estudio se compararon tres métodos diferentes de extracción de ácidos nucleicos. Los tres protocolos lograron extraer exitosamente ADN; pero la comparación en cuanto a rendimiento (Figura 3) varió considerablemente. Como parte de la comparación se comprobó la tendencia de los datos. Al observar que estos no cumplen el supuesto de normalidad (figuras 11 y 12 en Apéndices), se procedió a realizar pruebas no paramétricas (pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn) y en ambas se encontraron diferencias estadísticamente significativas. De los tres protocolos (Figura 3), el protocolo que logró extraer una mayor cantidad de ADN fue el protocolo de buffer CTAB con baños en solución de fenol.

Ambos protocolos de CTAB tienen protocolos y rendimientos similares. Utilizando CTAB para la lisis de las células y la pared celular, ambos utilizan una sal mineral para la separación y precipitación de proteínas y otras moléculas que pueden llegar a contaminar los ácidos nucleicos (Murray y Thompson, 1998; Inglis *et al.* 2018). Para ambos protocolos es importante mencionar que se utilizó nitrógeno líquido como mecanismo de rompimiento celular.

El reactivo utilizado para la purificación de los ácidos nucleicos es diferente entre protocolos. Un protocolo utiliza una solución de cloroformo alcohol isoamílico 24:1 (CIA), mientras que el otro utiliza fenol con CIA. El fenol no es miscible en agua por su polaridad. Al utilizarse en conjunto con cloroformo y alcohol isoamílico, permite un mayor grado de purificación, lo que resulta en la eliminación de proteínas y polisacáridos contaminantes (Heikrujam, Kishor y Mazumder, 2020). Esto es particularmente útil en plantas ricas en polisacáridos, taninos y otras macromoléculas complejas, como las que pueden encontrarse en diferentes especies de la familia Bromeliaceae (Benzing, 2000).

Otro rasgo que diferencia a ambos protocolos es el tiempo necesario para la lisis de las células. El tiempo destinado a lisado en el protocolo a partir de fenol es considerablemente más largo si se compara con los tiempos de lisis del protocolo CTAB y el kit de extracción. Periodos más largos de lisis pueden provocar que un mayor número de células rompan sus núcleos y como resultado se obtengan mayores concentraciones de ADN, lo cual es ventajoso para lisar los tejidos vegetales y la pared celular. La variación en el tiempo de lisis y los efectos sobre el rendimiento de la extracción de ácidos nucleicos cambia según el grupo que se esté trabajando.

Por ejemplo, Meacle y sus colaboradores (2004) demostraron que aumentar el tiempo de lisis no siempre aumenta la concentración de ADN extraído en células de *E. coli* (Meacle *et al.* 2004). Al menos para propósito de la presente investigación

los datos experimentales sí indican que un periodo de lisis más largo y el uso de fenol puede aumentar la concentración de ADN en muestras de *T. guatemalensis*. A partir de lo anterior, sería beneficioso repetir el protocolo de Fenol descrito en otras especies de plantas y observar si la misma propiedad se mantiene o, si es algo específico para plantas dentro del grupo de las tillandsias o de Bromeliaceae.

B. Rendimiento de extracciones de ADN a partir de tejidos vegetales y morfotipos

A diferencia de los protocolos, no parece haber una diferencia entre las extracciones de los morfotipos (Figura 5). Las comparaciones entre tejidos sí presentaron diferencias con significancia estadística. Se observa que las extracciones a partir de brácteas resultaron en una mayor concentración de ADN, comparándolas con las extracciones en hojas (Figura 4). Esto puede explicarse en parte debido a la composición estructural y funcional de los tejidos.

Las hojas (salvo algunas notables excepciones como las cactáceas) son el principal órgano fotosintético de las plantas (Benzing, 2000). Adicionalmente las Tillandsias y todas las bromelias pertenecen a las plantas CAM. Es decir que en algún punto de su linaje evolutivo modificaron su metabolismo fotosintético, para optimizar la asimilación de CO₂ atmosférico y captación de agua en hábitats epífitos y terrestres limitados por agua (Silvera *et al.* 2010).

Los organismos pertenecientes a este grupo de plantas han evolucionado una serie de modificaciones morfológicas importantes. Por ejemplo, las plantas CAM cuentan con una gruesa y estratificada capa parenquimática, cuya principal función es el almacenamiento de agua. Adicionalmente en bromelias y otras plantas la primera capa de tejidos foliares, está comprendida por una hipodermis escarificada (que quiere decir que está formada por conjuntos de células con una engrosada y densa pared celular formada principalmente por sílice) (Monteiro, Forzza y Mantovani, 2011).

Estas dos características tienen relevancia para la primera fase de los protocolos de extracción, el rompimiento celular. La presencia de una hipodermis rígida y una gruesa capa de parénquima debajo de esta dificulta el rompimiento de las células; ya que parte de las funciones de estos tejidos es proteger a la planta de daños mecánicos a la vez que proveer estructura. En comparación la bráctea (y particularmente para *T. guatemalensis*) es un tejido mucho menos resistente y denso. La principal función de esta estructura es proteger a los órganos florales (Neves *et al.* 2019). Y todo esto explicaría él por qué se obtiene una concentración de ADN más alta a partir de extracciones en brácteas comparado con hojas.

Es relevante considerar también el rol que la bioquímica juega en cada uno de los tejidos. Los metabolitos secundarios en plantas comprenden una plétora de

compuestos químicos producidos por la célula vegetal a través de vías metabólicas derivadas de las vías metabólicas primarias como la respiración celular y la fotosíntesis, almacenados en las vacuolas (Hussein y El-Anassary, 2018; Shitan, 2015). Como se estableció antes las hojas son el tejido fotosintético por excelencia, lo cual implica una mayor producción de metabolitos secundarios en hojas en comparación de otros tejidos como por ejemplo brácteas o sépalos. No es inverosímil considerar que algún metabolito secundario este influyendo sobre las extracciones de ADN en hojas provocando una menor concentración en comparación a las brácteas. Teniendo en cuenta lo anterior sería interesante desarrollar futuras líneas de investigación que amplíen el conocimiento acerca de este fenómeno.

C. Filogeografía y conservación de *Tillandsia guatemalensis*

La distribución histórica y potencial para el año 2060 de *T. guatemalensis* fue computada gracias al algoritmo de máxima entropía del programa MAXENT. En general con la distribución histórica de la especie (Figura 6) se observa que los principales sitios en la actualidad que reúnen las características idóneas se encuentran distribuidos mayoritariamente en el noroccidente del país. En los departamentos de Huehuetenango y Quiché y también, (aunque en menor medida) al norte en los departamentos de Alta y Baja Verapaz.

Es probable también encontrar poblaciones al sur del país en departamentos como Sololá y Guatemala. Es importante mencionar para este y otros acercamientos de modelación de nicho ecológico que existe una probabilidad de que la especie no abarque todas las áreas de distribución potencial representadas por el modelo. Esto debido a que la dispersión de la especie está limitada por su sistema de reproducción, y la presencia de barreras biogeogeográficas las cuales no pueden ser acopladas al algoritmo de MAXENT (Phillips, Dudík y Schapire. 2022). A pesar de sus limitaciones el programa brinda una buena idea de donde es más probable encontrar la especie basado en datos históricos.

Sabiendo lo anterior, las predicciones futuras de los cambios en la distribución debido a factores ambientales de esta especie, ya insta a tomar medidas de urgentes de conservación. La modelación a futuro del nicho ecológico de esta especie (Figura 7) evaluó 4 modelos de futuros posibles y como estos pueden llegar a afectar la distribución geográfica para el año 2060. Se tomaron en cuenta 2 modelos conservadores (SSP 1-2.6 y SSP 2-4.5, porque asumen cosas que en realidad tienen una baja probabilidad de suceder como una disminución drástica y rápida de la emisión de GEI) un modelo más apegado al comportamiento actual de emisiones y legislación ambiental (SSP 3-7.0) y un modelo más pesimista (SSP 5-8.5).

A pesar de las libertades tomadas por algunos modelos en todos se evidenció la disminución casi completa o desaparición del hábitat natural de esta especie y, por

ende muy probablemente de las poblaciones dentro del país (Figura 7). Al igual que en el caso de la modelación de nicho histórica, es importante mencionar las limitaciones de esta técnica.

Las predicciones del modelo solamente trabajan con impacto potencial; es decir que los modelos pueden llegar a sobreestimar el impacto del cambio climático puesto que la especie puede poseer la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones climáticas (Anderson, Lew y Peterson, 2003). No se puede saber con total certeza si las poblaciones de *T. guatemalensis* seguirán totalmente el comportamiento predicho por la modelación de nicho ecológico futuro, pero con estos modelos ya se tiene una buena idea de qué escenarios son los más probables.

Otro factor que este modelo no cuantifica es el potencial genético de la especie para adaptarse. Es aquí donde cobra relevancia la investigación genética. La resiliencia hacia estos cambios modelados a futuro yace en la diversidad genética (Hughes y Stachowicz, 2004). Entender las relaciones filogenéticas de *T. guatemalensis* y su estructura permite hacer predicciones sobre como este factor puede interactuar con las presiones ambientales del futuro. También permite el desarrollo de estrategias de conservación de esta especie, que representa un importante recurso social, económico y ecológico (Dix y Dix, 2004; Benzing, 2000).

Con respecto a las relaciones filogenéticas de *T. guatemalensis* la topología y el valor de los nodos en ambos árboles filogenéticos parece apoyar la noción de la formación de dos grupos genéticos agrupados en un mismo clado. Esta especie ya cuenta con registros de que existe una diferencia significativa entre algunos caracteres morfológicos como el largo de las hojas y el tamaño de la inflorescencia (Martínez Márquez, 2017). Lo suficiente como para que dos profesionales con una considerable trayectoria sugieran que podrían ser las bases para reclasificar a la especie en dos distintas (Dix y Dix, 2004).

Sin embargo los datos genéticos no parecen apoyar la noción anterior o al menos no completamente (Fig. 8, 9). Más bien parece que *T. guatemalensis* forma un grupo con dos distintivos linajes evolutivos (Fraser y Bernatchez, 2002). Dicho de otra manera, la filogenia presenta dos grupos genéticos lo suficientemente distintivos como para ser separados entre sí, pero no lo suficiente para denominarlos dos especies distintas.

Antes de poder abstraer cualquier tipo de conclusión debe ser considerado que todas las filogenias fueron formuladas a partir de un solo marcador genético (de tipo cloroplastidial). Esto puede provocar algo de sesgo (Chew, De Luna y González, 2010; Barfuss *et al.* 2005) por lo que complementar los datos recabados con datos de otros marcadores y de otras poblaciones añadiría mucha más robustez

Sea cual sea el caso, la presencia de dos linajes evolutivos sumado a la alta probabilidad de que futuras presiones ambientales disminuya las poblaciones dentro del país, resalta la importancia de implementar acciones de conservación adecuadas

para cada linaje. La definición más actualizada de conservación no busca conservar especies per se sino sus procesos evolutivos (Latta, 2008; Thomassen *et al.* 2011); esto incluye tanto salvaguardar a la especie y a su hábitat natural. Los datos de esta investigación demuestran que para conservar los procesos evolutivos de la especie es necesario conservar ambos linajes y su hábitat. En especial si se considera que nos encontramos bajo un contexto de cambio climático y que la especie se encuentra amenazada por factores humanos.

VIII. Conclusiones

Se logró extraer ADN de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. a partir de dos tejidos vegetales, utilizando tres protocolos de extracción diferentes.

Se produjeron 10 amplicones de 930 pares de bases de origen cloroplastidial codificantes para el gen de la enzima maturasa K.

Se determinó que el tejido vegetal con mejor rendimiento en cuanto a extracciones de ADN son las brácteas florales ($X^2 = 5.67$; $p = 1.45e-8$).

Se encontró que el protocolo con mejor rendimiento en cuanto a extracciones de ADN es el de buffer CTAB con baños de fenol ($X^2 = -5.70$, $p = 1.62e-3$).

Se evidenció la formación de dos linajes evolutivos para *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. bajo dos métodos de reconstrucción de filogenia.

Las modelaciones de nicho ecológico realizadas a partir de los 4 escenarios del IPCC para el año 2060, mostraron que el hábitat natural de *T. guatemalensis* tiende a desaparecer su distribución; lo que representa una amenaza seria para ambos linajes evolutivos.

IX. Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios genéticos de *T. guatemalensis* utilizando marcadores moleculares de otras regiones como nucleares, ribosomales y microsátélites.

Se recomienda también hacer un estudio complementario de relaciones filogenéticas con muestras de otras poblaciones dentro del país como Quiché o Huehuetenango.

Se recomienda realizar un estudio complementario que contemple otros tejidos como flores, raíces y flores para extraer y amplificar ácidos nucleicos.

Basado en la evidencia presentada en la presente investigación se recomienda la implementación de planes de conservación tanto in situ como ex situ.

Recategorizar a *T. guatemalensis* dentro del listado especies amenazadas del CONAP y clasificarla en una categoría más estricta que brinde más regulación al comercio de esta especie.

X. Literatura citada

- Al-Samarai, F. R., & Al-Kazaz, A. A. (2015). *Molecular markers: An introduction and applications*. European journal of molecular biotechnology, 9(3), 118-130.
- Anderson, R. P., Lew, D., & Peterson, A. T. (2003). *Evaluating predictive models of species' distributions: criteria for selecting optimal models*. Ecological modelling, 162(3), 211-232.
- Barfuss, M. H. J., Samuel, R., Till, W., & Stuessy, T. F. (2005). *Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions*. American Journal of Botany, 92(2), 337–351.
- Barfuss, M., Till, E. Leme, J. Pinón, J. Manzanares, H. Halbritter,, R. Samuel y G. Brown. (2016). *Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology*. Phytotaxa 279 (1): 001-097.
- Bell, D., Long, D. G., Forrest, A. D., Hollingsworth, M. L., Blom, H. H., & Hollingsworth, P. M. (2012). *DNA barcoding of European Herbertus (Marchantiopsida, Herbertaceae) and the discovery and description of a new species*. Molecular Ecology Resources, 12(1), 36-47.
- Benzing, D. H. (2000). *Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation*. Cambridge University Press.
- Calderón-Oliva, E. S. (2008). *CLONACIÓN IN VIVO DE TRES ESPECIES DEL GENERO TILLANDSIA (Tillandsia pruinosa, Tillandsia magnusiana, y Tillandsia streptophylla) EN VIAS DE EXTINCION Y DE POTENCIAL USO SUSTENTABLE*. Extraído de: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2434.pdf
- Cano, E. (2006). *Biodiversidad de Guatemala*. Editorial de la Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.

- Castro Hernández, J. C., Wolf, J. D., García-Franco, J. G., y González-Espinosa, M. (1999). *The influence of humidity, nutrients and light on the establishment of the epiphytic bromeliad Tillandsia guatemalensis in the highlands of Chiapas, Mexico*. Revista de Biología Tropical, 47(4), 763-773.
- Cathcart, D.J. (1995). *The importance of maintaining Bromeliad imports*. Florida Entomol 78: 16 -21.
- Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., & Zhou, S. (2016). *Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity*. Molecular ecology resources, 16(1), 138-149.
- Chew, T., De Luna, E., y González, D. (2010). *Phylogenetic Relationships of the Pseudobulbous Tillandsia species (Bromeliaceae) Inferred from Cladistic Analyses of ITS 2, 5.8S Ribosomal RNA Gene, and ETS Sequences*. Systematic Botany, 35(1), 86–95.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas [CONAP]. (2010). *Guía de Reconocimiento del Género Tillandsia de Guatemala*. 118 pp.
- Cuenoud, P., Savolainen, V., Chatrou, L. W., Powell, M., Grayer, R. J., & Chase, M. W. (2002). *Molecular phylogenetics of Caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid rbcL, atpB, and matK DNA sequences*. American Journal of Botany, 89(1), 132–144.n
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing*. Nature Methods 9(8), 772.
- Dix, M. y Dix, M. (2006). *Diversity, distribution, ecology and economic importance of Bromeliaceae in Guatemala*. p. 199-210
- Donadío, S., Pozner, R., y Giussani, L. M. (2014). *Phylogenetic relationships within Tillandsia subgenus Diaphoranthema (Bromeliaceae, Tillandsioideae) based on a*

comprehensive morphological dataset. Plant Systematics and Evolution, 301(1), 387–410. doi:10.1007/s00606-014-1081-1

Eickbush, T. H., & Eickbush, D. G. (2007). *Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes*. Genetics, 175(2), 477–485. doi:10.1534/genetics.107.071399

Escobedo-Sarti, J., Ramirez, I., Leopardi, C., Carnevali, G., Magallon, S., Duno, R., & Mondragon, D. (2013). *A phylogeny of Bromeliaceae (Poales, Monocotyledoneae) derived from an evaluation of nine supertree methods*. Journal of Systematics and Evolution, 51(6), 743-757.

Estrella-Parra, E., Flores-Cruz, M., Blancas-Flores, G., Koch, S. D., & Alarcón-Aguilar, F. J. (2019). *The Tillandsia genus: history, uses, chemistry, and biological activity*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 18(3).

European Molecular Biology Laboratory [EMBL]. (2022). *Phylogenetics*. Extraído de: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/introduction-to-phylogenetics/what-is-a-phylogeny/aspects-of-phylogenies/topology/#:~:text=The%20topology%20is%20the%20branching,have%20the%20same%20biological%20interpretation.>

Excoffier, L. y Lischer, H. (2010). *Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows*. Molecular Ecology Resources. 10: 564-567.

Fraser, D. J., & Bernatchez, L. (2001). *Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units*. Molecular ecology, 10(12), 2741-2752.

Gomes-da-Silva, J., & Ferreira-da Costa, A. F. (2013). *An updated overview of taxonomy and phylogenetic history of Tillandsioideae genera (Bromeliaceae: Poales)*. Global Journal of Botanical Science, 1, 1-8.

- Granados M.C., Salazar G.A., Flores-Cruz M. (2016). *A new species of the Mexican Tillandsia erubescens group (Bromeliaceae)*. Phytotaxa 260: 57 - 65.
- Hampe, A. (2004). *Bioclimate envelope models: what they detect and what they hide*. Global Ecology and Biogeography 13.5: 469-471.
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. B. (2020). *The chemistry behind plant DNA isolation protocols*. Biochemical Analysis Tools–Methods for Bio-Molecules Studies, 8.
- Hughes, A. R., & Stachowicz, J. J. (2004). *Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(24), 8998-9002.
- Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2019). *Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants*. Herbal medicine, 1, 13.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (2012). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic press.
- Inglis, P. W., Pappas, M. D. C. R., Resende, L. V., & Grattapaglia, D. (2018). *Fast and inexpensive protocols for consistent extraction of high-quality DNA and RNA from challenging plant and fungal samples for high-throughput SNP genotyping and sequencing applications*. PloS one, 13 (10).
- Jörger, K. M., & Schrödl, M. (2013). *How to describe a cryptic species? Practical challenges of molecular taxonomy*. Frontiers in Zoology, 10(1), 59.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. Molecular biology and evolution, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Ladino, G., Ospina-Bautista, F., Estévez Varón, J., Jerabkova, L., & Kratina, P. (2019). *Ecosystem services provided by bromeliad plants: A systematic review*. Ecology and evolution, 9(12), 7360-7372.
- Latta, R. G. (2008). *Conservation genetics as applied evolution: from genetic pattern to evolutionary process*. Evolutionary Applications, 1(1), 84-94.
- Lauro, F. M., Chastain, R. A., Blankenship, L. E., Yayanos, A. A., & Bartlett, D. H. (2007). *The unique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation*. Applied and environmental microbiology, 73(3), 838-845.
- Leigh, J.W. y Bryant, D. (2015). *PopART: Full-feature software for haplotype network construction*. Methods Ecol Evol 6(9):1110–1116.
- Maddison, W. P. y D.R. Maddison. 2019. *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Versión 3.61. Extraído de: <http://www.mesquiteproject.org>
- Martínez Márquez, D. (2017). *Diferenciación de dos poblaciones de Tillandsia guatemalensis L. B. Sm. (Bromeliaceae) en Guatemala por medio de caracteres morfológicos*. Trabajo de Graduación de Licenciatura, Departamento de Biología, Universidad del Valle de Guatemala.
- Meacle, F. J., Lander, R., Ayazi Shamlou, P., & Titchener-Hooker, N. J. (2004). *Impact of engineering flow conditions on plasmid DNA yield and purity in chemical cell lysis operations*. Biotechnology and bioengineering, 87(3), 293-302.
- Montero, G., Feruglio, C., & Barberis, I. M. (2010). *The phytotelmata and foliage macrofauna assemblages of a bromeliad species in different habitats and seasons*. Insect Conservation and Diversity, 3(2), 92–102.

- Monteiro, R. F., Forzza, R. C., & Mantovani, A. (2011). *Leaf structure of Bromelia and its significance for the evolution of Bromelioideae (Bromeliaceae)*. *Plant Systematics and Evolution*, 293(1-4), 53–64. doi:10.1007/s00606-011-0426-2
- Morales, J. F., & Alfaro, E. (2003). *Tillandsia guatemalensis (Bromeliaceae), un registro nuevo en la flora de Costa Rica*. *Lankesteriana*.
- Murray, M. G., & Thompson, W. (1980). *Rapid isolation of high molecular weight plant DNA*. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4326.
- Negrelle, B., Rejane, R., Mitchell, D., Anacleto, A. (2012). *Bromeliad ornamental species: conservation issues and challenges related to commercialization Acta Scientiarum. Biological Sciences*, vol. 34, núm. 1, pp. 91-100
- Neves, B., Zanella, C. M., Kessous, I. M., Uribbe, F. P., Salgueiro, F., Bered, F., ... & Costa, A. F. (2020). *Drivers of bromeliad leaf and floral bract variation across a latitudinal gradient in the Atlantic Forest*. *Journal of biogeography*, 47(1), 261-274.
- Niechayev, N. A., Pereira, P. N., & Cushman, J. C. (2019). *Understanding trait diversity associated with crassulacean acid metabolism (CAM)*. *Current Opinion in Plant Biology*, 49, 74-85.
- Phillips, S. J., Dudík, M. y Schapire, R. E. (2022). *Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1)*. Extraído de: https://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/
- Palma-Silva, C., Wendt, T., Pinheiro, F., Barbará, T., Fay, M. F., Cozzolino, S., & Lexer, C. (2011). *Sympatric bromeliad species (Pitcairnia spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs*. *Molecular Ecology*, 20(15), 3185-3201.
- Riahi, K., van Vuuren, D. P., Kriegler, E., Edmonds, J., O'Neill, B. C., Fujimori, S., ... Tavoni, M. (2017). *The Shared Socioeconomic Pathways and their energy, land use, and*

greenhouse gas emissions implications: An overview. Global Environmental Change, 42, 153–168.

Rambaut, A. y Drummond, A. J. (2012). *FigTree versión 1.4. 0*. Extraído de: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1987). *Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer*. Plant Molecular Biology, 9(5), 509-520.

Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. (2003). *MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models*. Bioinformatics, 19:1572-1574.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017). *DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets*. Mol. Biol. Evol. 34: 3299-3302.

Ruano-Fajardo, G., Rovito, S. M., & Ladle, R. J. (2014). *Bromeliad selection by two salamander species in a harsh environment*. PloS one, 9(6), e98474.

Shitan, N. (2016). *Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 80(7), 1283-1293.

Silvera, K., Neubig, K. M., Whitten, W. M., Williams, N. H., Winter, K., & Cushman, J. C. (2010). *Evolution along the crassulacean acid metabolism continuum*. Functional Plant Biology, 37(11), 995-1010.

Smith, L. B., y Till, W. (1998). *Bromeliaceae. Flowering Plants*. Monocotyledons, 74–99.

Templeton, A. R. (1991). *Genetics and conservation biology*. In Species conservation: a population-biological approach (pp. 15-29). Birkhäuser, Basel.

- Terry, R. G., Brown, G. K., & Olmstead, R. G. (1997). *Phylogenetic Relationships in Subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) Using ndhF Sequences*. *Systematic Botany*, 22(2), 333.
- Thomassen, H. A., Fuller, T., Buermann, W., Mila, B., Kieswetter, C. M., Jarrín-V, P., ... & Smith, T. B. (2011). *Mapping evolutionary process: a multi-taxa approach to conservation prioritization*. *Evolutionary applications*, 4(2), 397-413.
- Toledo, E. (1997). *Fitodistribución de epífitas del género Tillandsia L. (Bromeliaceae: Tillandsioideae) en la cuenca del río Jones, Sierra de las Minas*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agrónomicas, pp 52.
- Warren, D. L., & Seifert, S. N. (2011). *Ecological niche modeling in Maxent: the importance of model complexity and the performance of model selection criteria*. *Ecological applications*, 21(2), 335-342.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wisseman, V. (2007). *Plant evolution by means of hybridization*. *Systematics and Biodiversity*, 5(3), 243-253.
- Wolfe, A. D., & Liston, A. (1998). *Contributions of PCR-Based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology*. *Molecular Systematics of Plants II*, 43–86.
- Yusoff, K., & Gabrys, J. (2011). *Climate change and the imagination*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, 2(4), 516–534. doi:10.1002/wcc.11

XI. Apéndices

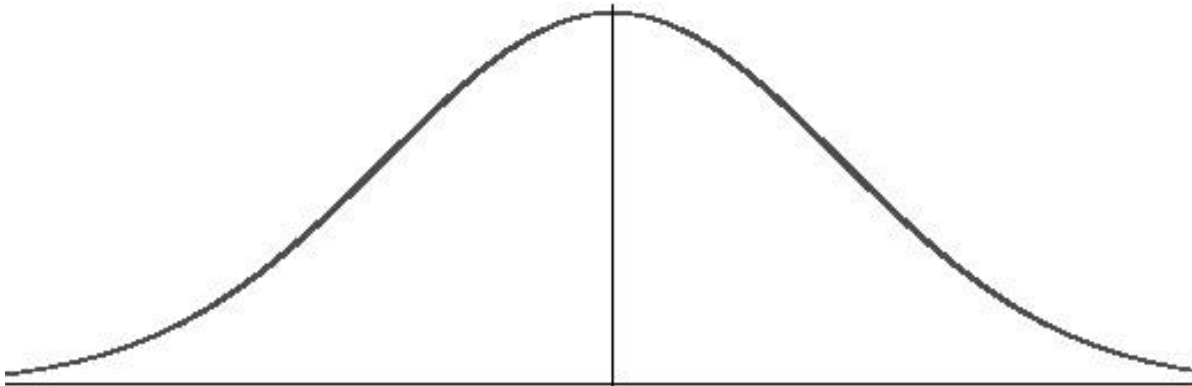


Figura 10. Campana de Gauss de datos distribuidos normalmente.

En la Figura 10 se muestra la representación gráfica de una serie de datos que siguen una distribución normal.

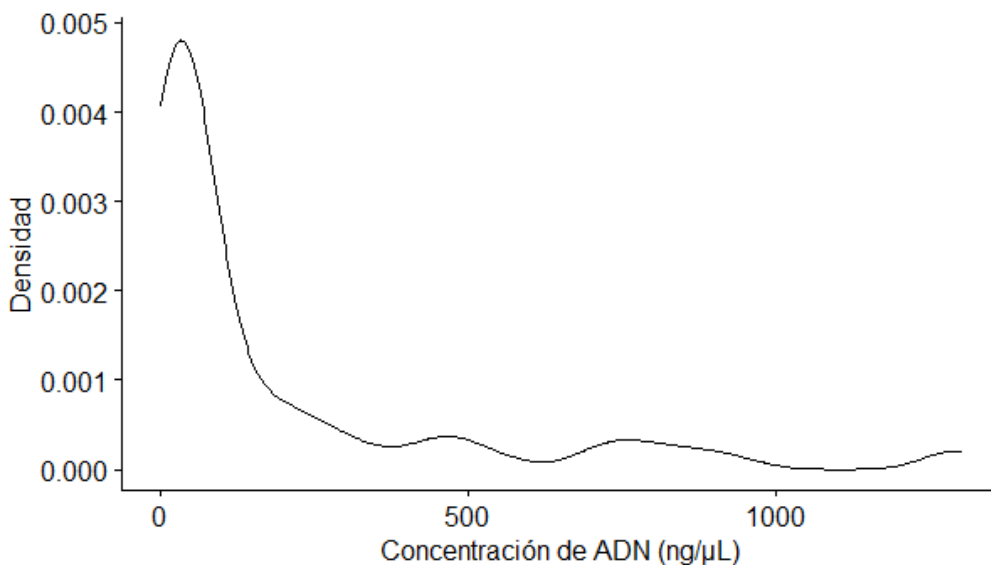


Figura 11. Gráfico de densidad de concentración de valores de concentración de ADN.

Se realizó una prueba de Shapiro-Wilks para determinar si los datos generados en la investigación siguen una distribución normal. De la prueba se obtuvo un estadístico ($W= 0.63842$) y un valor p ($p= 4.03e-12$), el cual es menor al intervalo

de confianza ($\alpha=0.05$). Al visualizar los datos en forma gráfica y compararlos con un conjunto de datos que si siguen una distribución normal (Figura 10), se hace evidente la diferencia entre ambos.

La presente figura sirve como una comparación gráfica entre la distribución de los datos experimentales y datos con una distribución normal. Como se puede observar los datos experimentales no forman la característica forma de campana de datos normales, por lo cual forzosamente debe asumirse que los datos experimentales no cumplen el supuesto de normalidad.

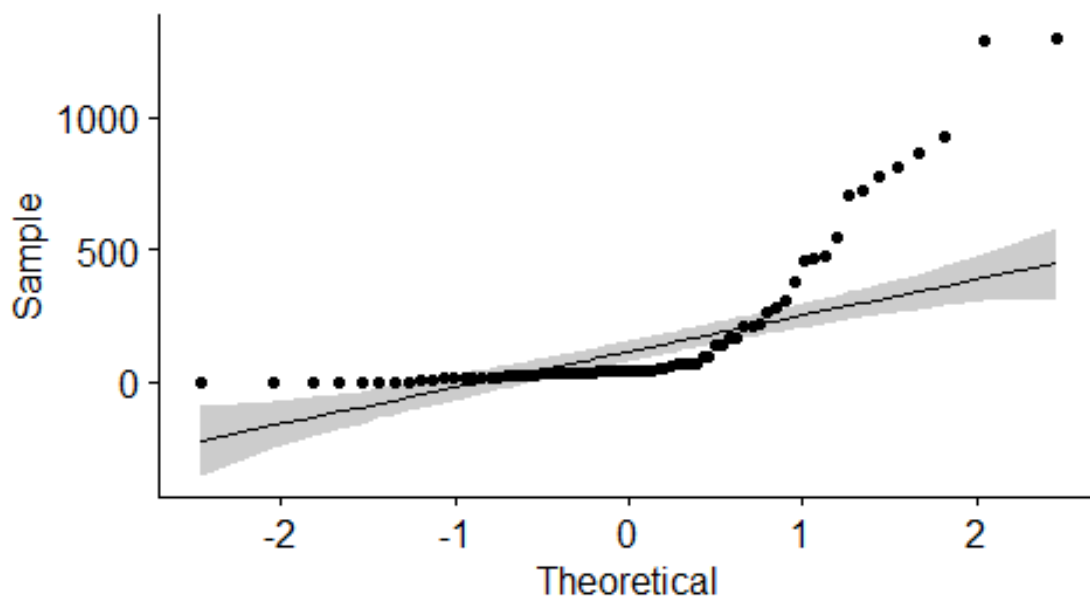


Figura 12. Gráfico Q-Q para datos de concentración de ADN extraído a partir de 3 protocolos y 2 tejidos diferentes de *T. guatemalensis*.

Se observa en la Figura 12, la comparación entre los cuantiles de una distribución normal (representado por una línea recta) y los cuantiles de los datos de concentración de ADN recabados en el presente trabajo. Como estos no se ajustan a dicha línea, es decir no siguen el mismo trayecto se puede asumir que las concentraciones de ADN de *T. guatemalensis* no siguen una distribución normal.

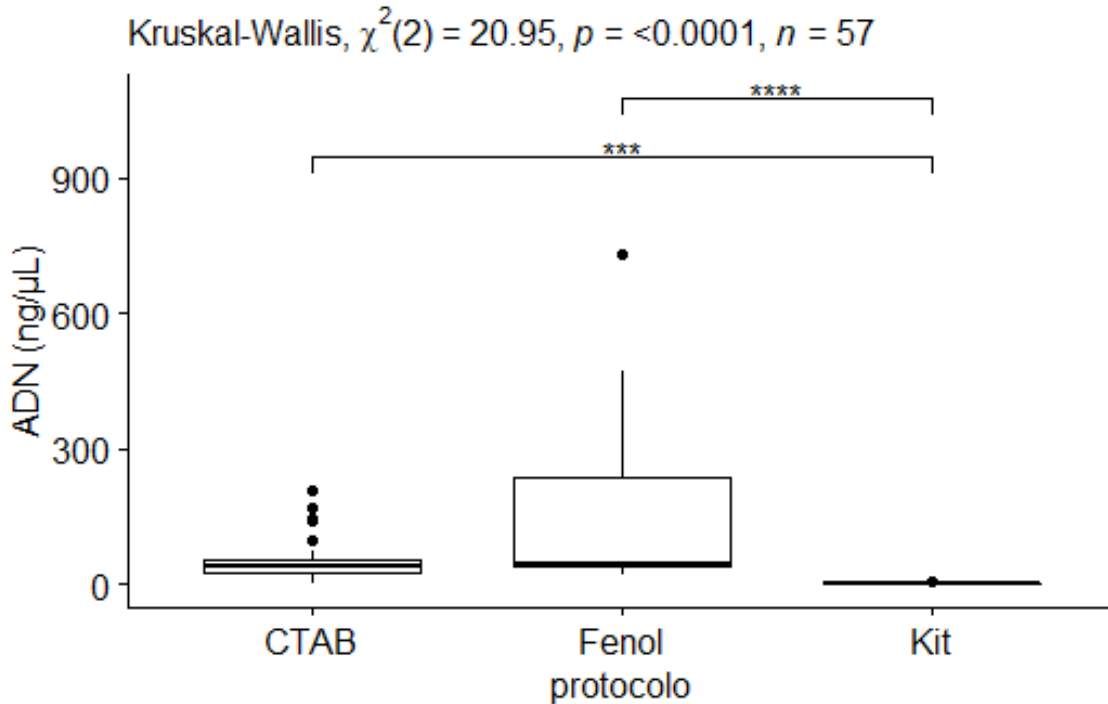


Figura 13. Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 3 protocolos diferentes (CTAB/Fenol/Kit de extracción) solo tomando en cuenta extracción a partir de hojas con estadístico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn.

El gráfico de caja y bigotes de la presente figura muestra que tomando en cuenta solamente los datos de extracciones a partir de tejidos foliares solo se encuentran diferencias estadísticamente significativas cuando se compara el Kit de extracción y el protocolo a partir de CTAB-FENOL (Murray y Thompson, 1998). La diferencia entre el protocolo de CTAB + Sorbitol y el protocolo de Fenol es despreciable solo tomando en cuenta estos datos.

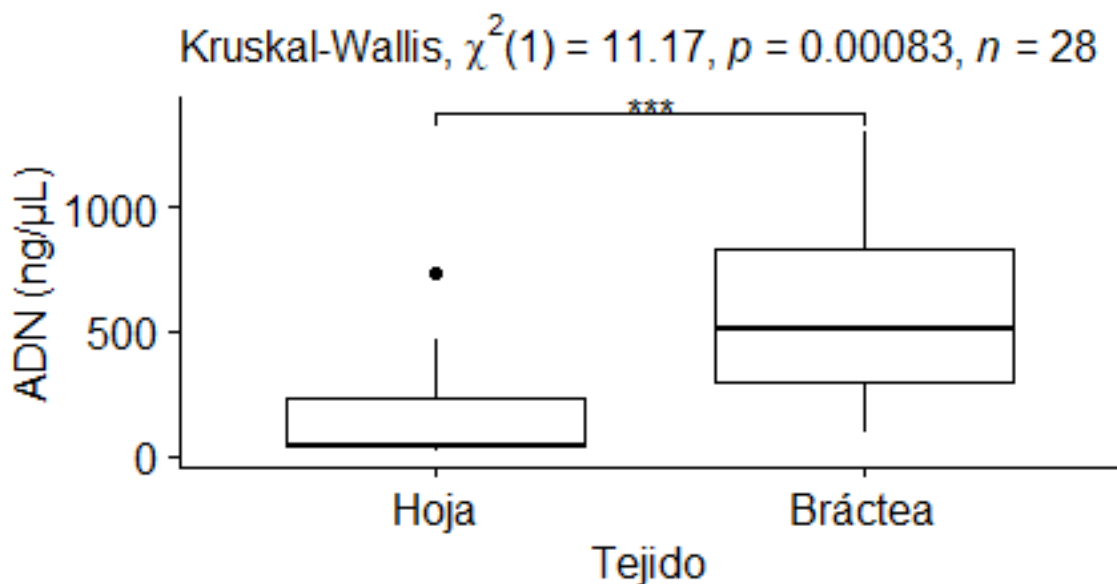


Figura 14. Diagrama de caja y bigote para la extracción de ADN a partir de 2 tejidos vegetales (hoja/bráctea) solo tomando en cuenta extracciones a partir de protocolo CTAB-Fenol, con estadístico Kruskal-Wallis y prueba de Dunn.

La presente figura muestra que la concentración de ADN mantiene su comportamiento en cuanto a la comparación de tejidos concierne, independientemente de con qué tipo de protocolo hayan sido extraído el material genético.

Cuadro 3 – Variables ambientales de worldclim con resolución espacial de 1 Km² para generar los modelos de nicho ecológico en MaxEnt.

Variables	Descripción
bio_1	Temperatura media anual (°C)
bio_2	Rango medio diario (Media de la mensual (temperatura máxima temperatura mínima) (°C)
bio_3	Isotermalidad (Bio_2/Bio_7) x (100) (°C)
bio_4	Estacionalidad de la Temperatura (desviación estándar x 100) (°C)
bio_5	Temperatura máxima del mes más cálido (°C)
bio_6	Temperatura mínima del mes más frío (°C)
bio_7	Rango anual de temperatura (bio_5 x bio_6) (°C)
bio_8	Temperatura media del cuarto más húmedo (°C)
bio_9	Temperatura media del cuarto más seco (°C)
bio_10	Temperatura media del cuarto más caluroso (°C)
bio_11	Temperatura media del cuarto más frío (°C)
bio_12	Precipitación anual (mm)

bio_13	Precipitación del mes más húmedo (mm)
bio_14	Precipitación del mes más seco (mm)
bio_15	Estacionalidad en las precipitaciones (Coeficiente de variación) (mm)
bio_16	Precipitación del cuarto más húmedo (mm)
bio_17	Precipitación del cuarto más seco (mm)
bio_18	Precipitación del cuarto más caluroso (mm)
bio_19	Precipitación del cuarto más frío (mm)