

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Diferenciación de dos poblaciones de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.
(Bromeliaceae) en Guatemala por medio de caracteres morfológicos.**

Trabajo de investigación presentado
por Diego Andrés Martínez Márquez
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala

2017

Diferenciación de dos poblaciones de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.
(Bromeliaceae) en Guatemala por medio de caracteres morfológicos.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



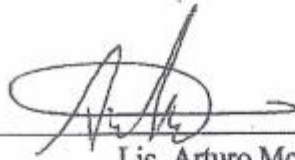
**Diferenciación de dos poblaciones de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.
(Bromeliaceae) en Guatemala por medio de caracteres morfológicos.**

Trabajo de investigación presentado
por Diego Andrés Martínez Márquez
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala

2017

Vo. Bo. : (f)



Lic. Arturo Monterroso

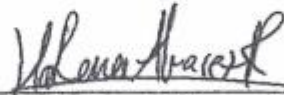
Tribunal Examinador:

(f)



(Lic. Arturo Monterroso)

(f)



(Lic. María Renée Álvarez Ruano)

(f)



(Ms.sc. Gabriela Alfaro)

Guatemala, 1 de septiembre de 2017.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios porque siempre me ha acompañado con su Dulce Mirada, especialmente durante esta época de mi vida que satisfactoriamente estoy terminando.

Luego, agradecer a mi familia, Rafael Martínez (mi papá), Sonia Márquez (mi mamá) y Rafael Alejandro Martínez Márquez (mi hermano) por su apoyo, regaños y enseñanzas; sin los cuales no hubiera podido llegar satisfactoriamente hasta este momento importante en mi vida. A mis abuelos, Fabián Márquez y Josefa Vásquez, que desde algún lugar del Universo siguen protegiéndome y guiándome por el camino correcto.

A mis amigos, quienes siempre me han motivado y nunca me abandonaron y supieron estar ahí cuando lo necesitaba. Me es imposible mencionarlos en este espacio, pero sé que al leerlo sabrán que me refiero a ellos.

El presente trabajo no se hubiera podido llevar a cabo sin la valiosa colaboración de la Asociación de Reservas Privadas de Guatemala (ARNPG), quienes, como parte de su compromiso con el estudio, conocimiento y conservación de la biodiversidad de Guatemala me apoyaron en la logística en la mayoría de los viajes de campo. Para esta logística fue de vital importancia el apoyo de cada una de las fincas afiliadas a la ARNPG, sus propietarios y trabajadores, quienes muy amablemente me abrieron sus puertas y brindaron las comodidades necesarias para visitarlas, a las cuales agradezco grandemente.

Por otro lado, el agradecimiento a las personas individuales que me abrieron sus puertas para hacer mi estudio en esos lugares: Familia Jelkmann Marroquín (Sacatepéquez), Sr. Pedro Guorón (Chimaltenango) y Lic. Werner Donis (Jalapa).

Mi profundo agradecimiento también a mis compañeros y colegas que me acompañaron a las visitas de campo, sin quienes el trabajo hubiera sido mucho más complicado. Ellos son Ninoshka López, Rodrigo Mussapp, José Javier Cruz y Marcelo Serrano.

Además, agradecer al Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala, quien por medio de la Lic. Priscila Juárez me brindó todo su apoyo en el material a necesitar durante el presente trabajo. También agradecer al Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica y Percepción Remota de la Universidad del

Valle de Guatemala, donde se me facilitaron los datos ambientales y utilizados y me brindaron ayuda técnica para realizar el mapa.

También quiero agradecer a mi asesor, Lic. Arturo Monterroso, quien con mucha paciencia y profesionalismo supo guiarme durante esta investigación; al igual que la Lic. María René Álvarez, curadora del Herbario UVAL, quien me brindó apoyo desde el inicio de este proyecto y que supo guiarme cuando no sabía cómo seguir, o bien, no sabía siquiera si seguir.

ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MÉTODOS.....	9
III. RESULTADOS.....	13
IV. DISCUSIÓN.....	23
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
VI. LITERATURA CITADA.....	31
VII. ANEXOS.....	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Información general de los lugares donde se realizaron las colectas.	10
2	VARIABLES seleccionadas para el muestreo, su dimensional y forma en que se midieron en campo.	11
3	Rangos numéricos por departamento muestreado para las tres variables morfológicas medidas y la altitud sobre el nivel del mar.	14
4	Resumen de los datos morfológicos y ambientales asociados a cada uno de los grupos encontrados.	16
5	Tres tipos de correlación entre datos ambientales y morfológicos con su valor p (Intervalo de confianza de 95%)	19
6	Correlación entre variables morfológicas y ambientales, sin tomar en cuenta una de las variables ambientales a la vez.	20
7	Primers forward (F) y reverse (R) obtenidos, con valores de tamaño (en pares de bases, pb), porcentaje de C-G (%CG), temperatura de alineamiento (Tm, en grados centígrados) asociadas, tamaño teórico del amplicón y cantidad de dímeros y hairpins que formarían.	21
8	Contribución de cada uno de los caracteres morfológicos a cada componente principal (PC).	37
9	Correlación entre todas las variables (r^2).	37
10	Aporte de cada una de las variables en las correlaciones entre los dos grupos de variables.	38
11	Aporte de cada variable ambiental en las correlaciones mostradas en el cuadro 5.	38
12	Formación de hairpins para cada uno de los pares de primers (F: forward, R: reverse).	39
13	Formación de homodímeros para cada uno de los primers (F: forward, R: reverse).	40
14	Formación de heterodímeros para cada par de primers (F: forward, R: reverse).	41

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Ubicación geográfica de los puntos de muestreo	9
2	Boxplots para los datos obtenidos para todas las variables morfológicas medidas y la altitud sobre el nivel del mar	13
3	Diagrama del análisis de componentes principales para las variables morfológicas.	15
4	Fotografías de un organismo de cada uno de los grupos morfológicos encontrados.	17
5	Mapa de ubicación de los organismos, según el grupo morfológico al que pertenecen.	18
6	Histogramas de las variables morfológicas y ambientales para los organismos pertenecientes al grupo	35
7	Histogramas de las variables morfológicas y ambientales para los organismos pertenecientes al grupo 2.	36

RESUMEN

Se ha propuesto que existen diferentes morfologías de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. dependiendo del lugar en el que se encuentren, sugiriendo que dichas diferencias son debido a las características ambientales asociadas.

El objetivo del presente estudio distinguir al menos dos grupos morfológicos de *T. guatemalensis* L. B. Sm. Para ello se analizaron caracteres referentes a las hojas (ancho promedio y largo) e inflorescencia (largo) de esta especie en diferentes sitios de estudio, utilizando variables ambientales asociadas específicas para los organismos estudiados (precipitación anual media, temperatura media, y humedad relativa).

A partir de un análisis de componentes principales (PCA) utilizando los datos morfológicos medidos, se identificaron dos grupos de *T. guatemalensis* L. B. Sm. Ambos grupos se diferencian morfológicamente de la siguiente manera (grupo 1, grupo 2): largo de inflorescencia (30-90cm; 60-140cm), largo de hoja (20-26cm, 38-48cm) y ancho de hoja (2-5cm, 4-5.2cm). Sin embargo, las variables ambientales (a excepción de la humedad relativa) mostraron distribuciones diferenciales para ambos grupos, de la siguiente manera (grupo 1, grupo 2): precipitación media anual (-1000, +4000); temperatura media anual (12-15°C, 15-22°C); altitud sobre el nivel del mar (1800-2000m, 1400-1700). Los miembros del grupo 1 fueron más frecuentes en Jalapa y Chimaltenango, mientras que los del grupo 2 en las Verapaces. Huehuetenango presentó organismos de ambos grupos.

Además, se encontró que las variables ambientales utilizadas únicamente explican entre el 48 y 67% de dicha variación morfológica. Por ello, se recomienda realizar la evaluación filogenética entre estos dos grupos morfológicos, porque podrían formar parte de un complejo de especies, no siendo la misma especie, como se cree actualmente. Para este fin, también se crearon cinco pares de primers de la región *MatK* y se probaron en sílico, y se recomienda su uso.

ABSTRACT

It has been proposed that there are different morphologies of *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. depending on where they are, suggesting that these differences are due to the associated environmental characteristics.

The aim of this study is to describe two morphological groups of *T. guatemalensis* L. B. Sm. Leaf characters (leaf length and width and inflorescence length) were analyzed in different study sites, using specific environmental variables for the organisms studied (mean annual rainfall, mean annual temperature and relative humidity).

Through principal component analysis (PCA) using measured morphological data, two *T. guatemalensis* L. B. Sm. they were identified. Both groups differ morphologically as follows (group 1, group 2): inflorescence length (30-90cm, 60-140cm), leaf length (20-26cm, 38-48cm) and leaf width (2-5cm, 4-5.2cm). However, environmental variables (except relative humidity) showed differential distributions for both groups as follows (group 1, group 2): average annual precipitation (-1000, +4000); average annual temperature (12-15 ° C, 15-22 ° C), altitude above sea level (1800-2000m, 1400-1700m). The members of group 1 were more frequent in Jalapa and Chimaltenango, while group 2 in Verapaces. Huehuetenango showed organisms of both groups.

In addition, it was found that the environmental variables used only explain between 48 and 67% of such morphological variation. Therefore, the phylogenetic evaluation between these two morphological groups is recommended, since they could belong to a species complex, not the same species, as it is believed. For this purpose, 5 pairs of primers were created for the *Matk* region and tested on silica and recommended for use.

I. INTRODUCCIÓN

Las bromelias, como las del género *Tillandsia*, tienen potencial económico, debido a su uso ornamental y medicinal en la mayoría de casos (Dix y Dix 2006; Flores, 1998; Granados, 2008; Sandoval *et al.* 2006), a tal punto que según Dix y Dix (2006), de ser sustentable su uso, Guatemala podría ser el mayor exportador de bromelias (especialmente de tillandsias) del continente americano. El uso que actualmente se les da no es sustentable, por lo que algunas especies se encuentran amenazadas (e.g. *T. guatemalensis* L. B. Sm., CONAP III (CONAP 2008)) y no se han emprendido acciones para su conservación ni la de sus recursos genéticos, y se ha generado poca información específicamente para *T. guatemalensis* L. B. Sm. Por ello, se realizó un análisis estadístico multivariado utilizando caracteres morfológicos (largo de hoja, ancho de hoja y largo de inflorescencia) y datos ambientales propios de los organismos colectados (temperatura media anual, precipitación media anual, altitud sobre el nivel del mar y humedad relativa) para verificar la existencia de al menos dos grupos morfológicos.

A. ANTECEDENTES

1. Bromelias

a. Familia Bromeliaceae. La familia Bromeliaceae pertenece al grupo de las monocotiledóneas. Cuenta con aproximadamente 56 géneros y 3000 especies. Por lo general son herbáceas, a menudo las hojas están dispuestas en espiral, con vainas basales fuertemente superpuestas que forman depósitos de agua (fitotelmata) y tienen tricomas para absorción de agua en forma de cuchillas (Versieux y Wendt 2007). La absorción y conservación de agua son importantes en bromelias y se han observado diferentes estilos morfológicos de manejo de agua, dependiendo del ambiente en el que se encuentren (Benzing 1990). Esta familia es característica de la región neotropical, está en toda América y se ha reportado una especie en la región tropical del este de África (Versieux y Wendt 2007). En Guatemala, la mayoría de bromelias (cerca del 80%) son epífitas (especialmente de los géneros *Tillandsia* y *Catopsis*) (Dix y Dix, 2006)

b. Usos de las bromelias. Se ha reportado que las bromelias tienen importancia horticultural (en Brasil), y además se usa como ornamental. Brasil es el país más rico de especies de bromelias (Versieux y Wendt, 2007). Algunas prosperan en suelos áridos (ambiente donde se cree que habitaron sus antepasados), sin embargo, la mayor parte se encuentra sobre otras plantas (son epífitas) (Campbell *et al.* 2001). Otras, según Dix y Dix (2006) se usan como alimento (*Ananas comosus* (L.) Merrill. - piña) de las cuales se tienen, actualmente, grandes plantaciones en Guatemala, lo cual representa grandes

fuentes de ingresos debido a la exportación de las mismas. Otras como las *Aechmea* se usan para producir fibra y papel.

c. Importancia ecológica de las bromelias. Dix y Dix (2006) mencionan que muchos invertebrados acuáticos se reproducen en tanques de bromelias. Además, algunos insectos acuáticos que migran han sido observados que las usan como puentes temporales. La humedad y agua que proveen las plantas fitotelmatas son importantes para la supervivencia de muchos grupos de vertebrados. En Guatemala, algunas lagartijas arbóreas encuentran comida en el agua de bromelias. Los huevos de muchos de éstas, al igual que de las serpientes arbóreas, pueden ser encontrados entre la base de las hojas y los detritos asociados con bromelias. Se sabe que el sesenta y nueve por ciento (69%) de especies de bromelias tienen metabolismo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) obligado, las cuales se encuentran desde climas cálidos hasta bosques nubosos (Pierce *et al.* 2002). En Guatemala, la mayoría de especies de bromelias de bosque nuboso tienen metabolismo C3 (Dix y Dix 2006).

Como especies indicadoras, las bromelias sirven para determinar la edad y estabilidad del bosque, indicar zonas y asociaciones húmedas en el sistema de Holdrige y para monitorear la contaminación atmosférica. Además representan un refugio importante para la vida silvestre y son usadas por muchas especies para protección de depredadores y como una fuente de agua y comida (flores, néctar, frutos y fauna) y pueden ser consideradas un grupo importante para las comunidades animales en bosques canopies (Dix y Dix 2006).

La biomasa en bromelias usualmente excede la de orquídeas en un hábitat dado y acumulan cantidades apreciables de materia orgánica en descomposición entre la base de sus hojas además de que, individualmente, pueden tener hasta 4L de agua en sus tanques y pueden tener hasta 50,000 L de agua por hectárea en bosques nubosos mesofíticos (Dix y Dix 2006).

d. Género Tillandsia. El género *Tillandsia* fue propuesto por Lineo en 1753, actualmente se ha estudiado la delimitación de este género y su relación con otros géneros (Granados 2005). Tradicionalmente se divide a este género en siete (7) subgéneros (Mez 1935): *Allardtia* (A. Dietr.) Baker, *Anoplophytum* (Beer) Baker, *Diaphoranthema* (Beer) Baker, *Phytarrhiza* (Vis.) Baker, *Pseudalcantarea* Mez, *Pseudo-Catopsis* Baker y *Tillandsia* (Chew, De la Luna y González, 2010). Gardner (1982, 1986) reconoce que hay cinco (5) grupos en el género delimitados por caracteres del androceo, forma del filamento en corte transversal, su ancho en la base y en el apéndice, el largo relativo entre filamentos e inserción y largo de la antera; añadiendo posteriormente la corola y el cáliz (simetría, forma, etc.) (Granados 2005). Se cree que para la mayoría de

bromelias, la cantidad de cromosomas es igual a 25 (excepto para *Ananascomosus* donde $n=5$) (Brown y Gilmartin 1986). Unas cuantas especies de *Tillandsia* son poliploides (Dix y Dix 2006). En Guatemala, la mayoría de bromelias (cerca del 80%) son epífitas (especialmente de los géneros *Tillandsia* y *Catopsis*) (Dix y Dix, 2006)

e. Distribución de las tillandsias. Granados (2005) indica que la distribución del género *Tillandsia* es Neotropical y, de la familia Bromeliaceae, es el que tiene la mayor riqueza específica (alrededor de 560 especies de alrededor de 3000 especies de la familia). Se caracteriza por su diversidad morfológica y por tener hábito epífito o rupícola y tener metabolismo CAM tener tricomas para absorber agua y nutrientes, y por su reducción vegetativa. Habita casi todos los tipos de vegetación (bosque nublado con alta humedad ambiental y matorrales xerófilos), mostrando así diversidad morfológica debido a los cambios adaptativos que sufren. Las tillandsias son epífitas (en algunas ocasiones pueden ser terrestres o crecer sobre rocas), acaulescentes o caulescentes (CONAP, 2008).

Las *Tillandsia* de regiones secas (por ejemplo *T. paucifolia*, *T. pseudobaileyi*) han reducido la superficie de hojas y tienen tricomas foliares. Muchas bromelias de bosques nuboso tienen hojas con superficie cerosa o tricomas repelentes de agua (por ejemplo *T. guatemalensis*, *Catopsis* sp.). Los tanques de agua en todas las bromelias proveen una fuente de agua estancada, así como nutrientes debido a la descomposición de materia orgánica y del metabolismo de pequeños animales que viven en el tanque (Benzing 1990).

f. Morfología de las tillandsias. Las tillandsias, en general, tienen sus hojas arrosadas o fasciculadas, raramente distribuidas a lo largo del tallo, polísticas o dísticas, enteras; las láminas son liguladas a angostamente triangulares o lineares; las escamas de las hojas centralmente asimétricas. El escapo es terminal, generalmente erecto, a veces ligera a marcadamente péndulo. La inflorescencia puede ser simple o compuesta, por lo general en espigas dísticas o reducidas a una simple espiga polísticamente florecidas y raramente reducidas a una sola flor. Sus brácteas florales son visibles a pequeñas; flores perfectas, en su mayoría cortamente pediceladas. Tres sépalos asimétricos o simétricos, libres o el par adaxial variadamente connatos, o raramente los 3 connatos en igual medida; los 3 pétalos que tienen son libres, sin apéndices; estambres libres o unidos a los pétalos basalmente, raramente connatos basalmente; ovario súpero. Fruto en una cápsula septicida; semillas erectas, angostamente cilíndricas o fusiformes, con apéndices plumosos (CONAP, 2008).

g. Usos de las tillandsias. Como género, *Tillandsia* es ampliamente utilizado por las comunidades. Muchas especies son consumidas como alimentos (por ejemplo las vainas florales de *Tillandsia prodigiosa*), mientras que las hojas se usan como forraje

para arreglos florales y como adorno en época navideña (e.g. *T. imperialis*). En el caso de *T. usneoides* se usa principalmente como medicinal y como relleno de colchones (entre otros usos) y otras veces es usada como adorno común en las casas (Flores, 1998; Granados, 2008; MacVean, 2009). Según Dix y Dix (2006) muchas especies de tillandsias en Guatemala son usadas como decoraciones de Navidad. Otro uso que menciona es el medicinal (e.g. *T. usneoides*, *T. recurvata*).

h. Amenazas de las tillandsias. Muchas especies de poblaciones de *Tillandsia* han disminuido sus poblaciones debido a su extracción ilegal para exportación (e.g. *T. ionantha*) y otras, como *T. guatemalensis* y *T. usneoides* debido a su uso extensivo como decoraciones navideñas (Dix y Dix 2006). Cantidades grandes, de aproximadamente 30 especies, son exportadas y representan una fuente importante de divisas para Guatemala, pero esta exportación es mal manejada según Dix y Dix (2006), ya que no es sustentable y ha causado una fuerte disminución en las poblaciones de varias especies, incluyendo las listadas en CITES II.

i. *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. se puede reconocer fácilmente por sus brácteas florales más cortas y conspicuamente nervadas (Morales y Alfaro, 2003). Suelen encontrarse entre los (1200-) 1300-2800 (-3000) msnm (CONAP, 2010; Morales y Alfaro 2003). En Guatemala se conoce en los departamentos de Zacapa, Baja Verapaz, Santa Rosa, Jalapa, Sacatepéquez, Guatemala, Chimaltenango, Totonicapán, Sololá, Quezaltenango, Quiché, Huehuetenango y San Marcos (CONAP, 2010). Según el índice del CONAP está en categoría 3. Eso indica que si bien en la actualidad no se encuentran en peligro de extinción podrían llegar a estarlo si no se regula su aprovechamiento (CONAP, 2010). Según Morales y Alfaro (2003), y Granados (2008), se conoce a esta especie desde México hasta Panamá, en bosques muy húmedos, bosques estacionalmente secos y en robledales (Hammelet. *al.*, 2003).

Tillandsia guatemalensis L. B. Sm. (al igual que *T. utriculata*) muere luego de su floración (Dix y Dix 2006).

j. Usos de *Tillandsia guatemalensis* L.B. Sm. Según Sandoval *el al.* (2006), al menos en Chiapas, México (estado fronterizo con Guatemala), *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. tiene usos ceremoniales, medicinales y ornamentales. El uso medicinal es, por lo general, para cuando se padece de “majbenal” (enfermedad que se manifiesta por la presencia de temperatura alta, escalofríos, tos y dolor de pecho, cabeza y cuerpo) y se usa la flor de la planta. Comúnmente, para este fin, se combina con laurel. A los usos ornamentales el CONAP (2010) agrega que, aunque no suele ser cultivada, se emplea para las fiestas navideñas como adorno. Además, debido a su hermosura, son cultivadas

en algunos casos por coleccionistas (se ha reportado en la Sierra de Juárez, México) (Granados 2005).

k. Bromelias en Guatemala. Según Dix y Dix (2006) en Guatemala hay 17 géneros y 148 especies de bromelias reportadas, lo que representa aproximadamente el 2% de las especies de flora vascular conocidas del país. Se encuentran en cualquier altitud y ocupan diversos hábitats, desde tierras bajas xéricas hasta bosques nubosos de montaña.

La primera publicación grande de la lista de especies de bromelias en Guatemala, según Dix y Dix (2006) fue Hemsley entre 1882 y 1886 mostrando 13 especies y 4 géneros. Smith, en 1958, listó 124 especies en 14 géneros para la Flora de Guatemala. En 1994 Utey y Davidse *et al.* por separado redujeron el número a 118 especies en 14 géneros. El estudio de Dix y Dix muestran 148 especies en 17 géneros, siendo *Tillandsia* (650 especies en Guatemala) el género con mayor diversidad.

l. Importancia económica de las tillandsias en Guatemala. Dix y Dix (2006) mencionan que Guatemala podría ser el principal exportador de tillandsias del continente americano y las cerca de 30 especies exportadas representa un cultivo no tradicional importante. En 1993, 24 negocios exportaron cerca de 14 millones de plantas con un valor estimado de al menos \$1.4 millones. Muchas especies son ampliamente usadas como ornamentales tanto local como internacionalmente (Dix y Dix 2006).

2. Morfometría

a. Definición. La morfometría puede definirse como la medición de la "forma" (estructura, tamaño, arquitectura, etc.) de la apariencia externa de los organismos (Remagnino *et al.* 2017).

b. Métodos estadísticos aplicados a la morfometría. Se han utilizado métodos estadísticos para investigar cuantitativamente los patrones de caracteres discretos y continuos en conexión con algunos estudios genéticos, haciendo uso de estadística multivariada. Se han utilizado métodos como la regresión múltiple, la función discriminante de Fisher, la generalización de Hotelling de la T de Student, análisis de correlación canónica, la distancia métrica generalizada D^2 de Mahalanobis, etc. Por otro lado, el análisis de componente principales (PCA), análisis de factor, análisis de coordenadas principales, análisis de variación canónica, análisis de correspondencia, etc. (Remagnino *et al.* 2017).

c. Caracteres utilizados en morfometría de plantas y su medición. En plantas, las hojas han sido usadas por taxónomos debido a que normalmente varían considerablemente (incluso en una misma planta). Por ello, para medir la forma externa (borde, área, etc.) de las hojas de una planta deben usarse al menos 10 hojas de ese organismo. Normalmente la información de las hojas se combina con otros caracteres o bien, otro tipo de información (por ejemplo, ambiental) (Remagnino *et al.* 2017).

Para determinar la forma externa de una hoja se usa muy frecuentemente el análisis elíptico de Fourier (EFA, en inglés), que necesita de un análisis digital de las hojas. También puede usarse el "eigenshape analysis", que también necesita de análisis digital de las hojas. De las hojas también puede obtenerse información de su borde, dimensiones fractales, patrones de venación, textura, etc. Uno de los métodos más modernos utiliza imágenes 3D para modelar las hojas por medio de la combinación de varias imágenes 2D. Sin embargo, debe analizarse en su contexto ambiental, porque se menciona que, utilizando estas técnicas, se encontró que algunas plantas en climas más fríos tienen más "dientes" en los bordes, con mayor área cada uno, en comparación con los de climas más calientes (Remagnino *et al.* 2017).

B. Justificación

El género *Tillandsia* tiene importancia cultural y económica, debido a que estos individuos son ampliamente utilizados por las comunidades como alimentos, forraje, como adorno en época navideña, medicinal, relleno de colchones, en ceremonias tradicionales, etc. (Flores, 1998; Granados, 2008; MacVean, 2009 y Sandoval *et. al.*, 2006).

Es importante la generación de información de la biodiversidad que tenemos en el país debido a la gran cantidad que se posee, para su posterior uso en la conservación de la misma. Por ejemplo, el Dr. Michael Dix y la Dra. Margaret Dix (2006) han encontrado densidades de bromelias de 25,000 a 35,000 plantas por hectáreas.

Por otro lado, *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. tiene un potencial económico como planta ornamental (Dix y Dix 2006; Flores, 1998; Granados, 2008; Sandoval *et al.* 2006), pero su uso debe ser regulado, debido a que sus poblaciones han disminuido en los últimos años (Dix y Dix, 2006). Este uso regulado conlleva la conservación a nivel genético de la especie, para evitar la pérdida de la diversidad genotípica y fenotípica de la misma. Además es importante generar información para esta especie ya que *T. guatemalensis* L. B. Sm. se encuentra en índice 3 del CONAP (CONAP, 2008), lo que indica que, si bien no está en peligro de extinción podría llegar a estarlo si no se regula su aprovechamiento. Hay que considerar que *T. guatemalensis* L. B. Sm. (así como el 95% de especies del género *Tillandsia*) es sensible a cambios ambientales y disminución de áreas de distribución; unido a su extracción selectiva y comercialización indebida, cambio climático y falta de políticas que garanticen su conservación (CONAP, 2008). Esto hace necesario crear una línea base debido a la falta de estudios sobre la misma.

Según el Dr. Michael Dix, existen dos variedades morfológicas de esta especie, diferenciándose principalmente por el tamaño y color de inflorescencia y hojas. Al mismo tiempo, varios autores (CONAP (2010), Granados (2005), Stevens *et al* (2001), MacVean (2009) y Martínez (1998)) han descrito esta especie variando algunas características morfológicas, dentro de ellas, el tamaño de la inflorescencia. Sin embargo, no se han hecho estudios estadísticos y fenológicos para corroborar dicha información.

Es importante dilucidar si estas diferencias son significativas para ser separadas, en principio, como grupos morfológicos diferentes. De lograrse la separación de estos grupos morfológicos, podría identificarse cuál presenta la mayor amenaza por medio de sus usos tradicionales para que los esfuerzos de conservación se concentren en dicho grupo morfológico y así ahorrar recursos, esfuerzo y tiempo; haciendo que sea más efectiva la estrategia de conservación.

C. Objetivos

1. General

Diferenciar morfológicamente dos grupos de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.

2. Específicos

- Identificar marcadores morfométricos de importancia para la separación de grupos morfológicos de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.
- Determinar si existen uno o más grupos morfológicos de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.
- Proponer, al menos, un par de primers moleculares para la región de *MatK* para su uso en estudios filogenéticos de los grupos morfológicos encontrados.

D. HIPÓTESIS

Ho: Se puede dividir a *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. en dos grupos por medio de caracteres morfológicos.

Ha: No se puede dividir a *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. en dos grupos por medio de caracteres morfológicos.

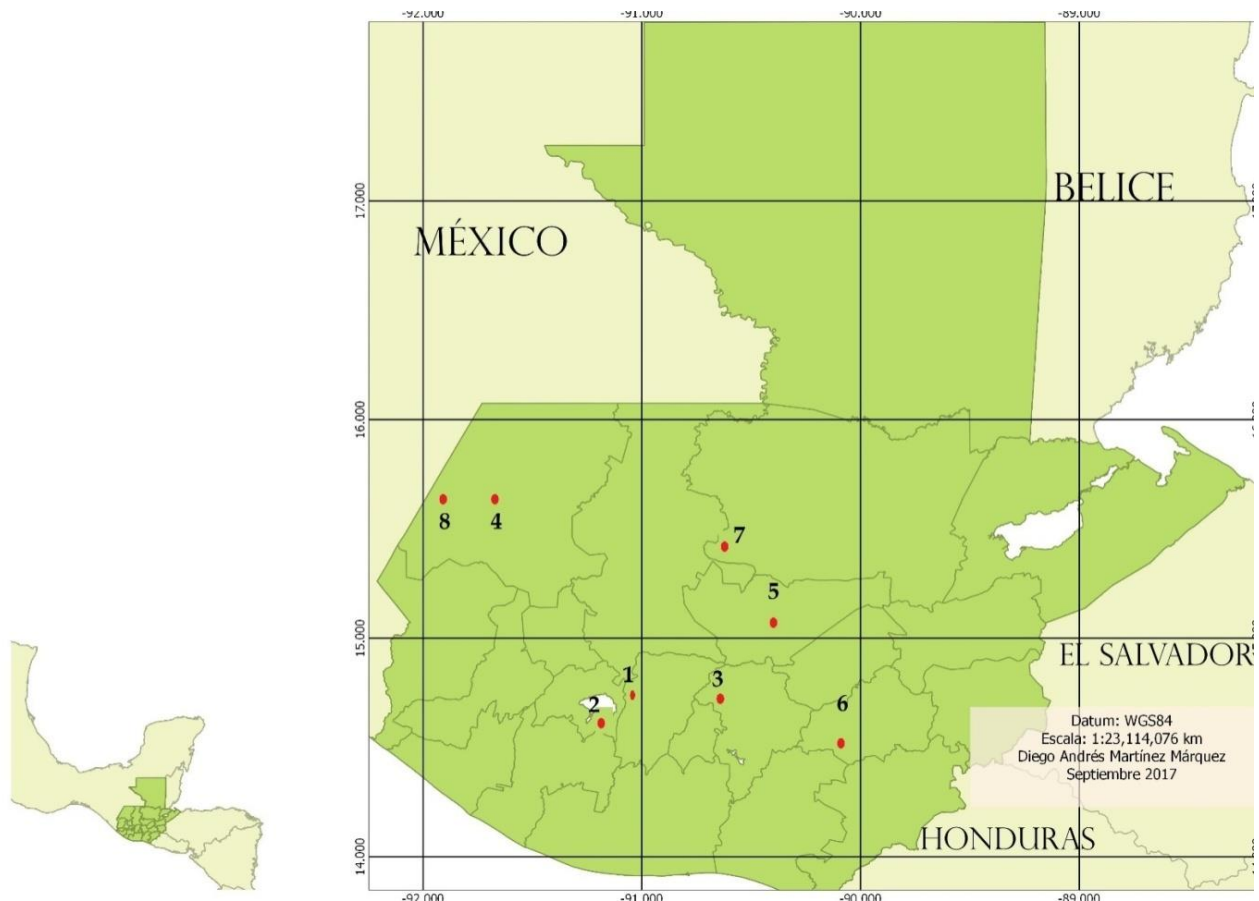
III. MÉTODOS

A. Sitio de estudio y puntos de colecta

1. Sitio de estudio. Las colectas se llevaron a cabo en el altiplano guatemalteco en altitudes entre (1200-)1300-2800(-3000) msnm en Huehuetenango, Sololá, Guatemala, Alta Verapaz, Baja Verapaz y Jalapa; principalmente en bosques de pino-encino y bosque nuboso. Estas altitudes se seleccionaron según las altitudes reportadas en literatura en las cuales se ha encontrado esta planta (CONAP 2010; Granados,2005; Stevens *et al* 2001; MacVean 2009; y Martínez 1998).

2. Puntos de muestreo. En el Cuadro 2 se presenta la información disponible de cada una de las fincas en las que se muestreó, mientras que en la Fig. 1, su ubicación geográfica

FIGURA 1. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo. Los números, en ese orden, muestran la información de cada una de las localidades en el Cuadro 2.



CUADRO 1. Información general de los lugares donde se realizaron las colectas

No. en el mapa	Departamento	Municipio	Localidad	Descripción
1	Chimaltenango	Tecpán	Parque Ecológico Jotay	Es un parque ecológico privado enfocado en la cosmovisión maya. Está alrededor de 2600 msnm.
2	Sololá	San Lucas Tolimán	Reserva Natural Privada Santo Tomás Pachuj.	Finca cafetalera formada por 308 ha de bosque, de las cuales 70 ha son plantaciones de café (25 ha en el bosque y 45 con sombra de <i>Inga spuria</i>). Contiene alturas mayores a los 1200 msnm.
3	Guatemala	Mixco	Área de Bosque de El Encinal	Lotificación y residenciales que cuentan con un área boscosa.
4	Huehuetenango	La Libertad	Reserva Natural Privada Miralvalle	Finca cafetalera formada por 53.83 ha, de las cuales 13.25 ha son de bosque natural. Tiene alturas de los 971 a los 1800 msnm.
5	Baja Verapaz	Salamá	Reserva Natural Privada Rincón Grande	Finca cafetalera que cuenta con 1167.97 ha donde hay pasto para ganado, potrero, cafetal, área de reforestación, regeneración y reforestación. Tiene una altitud de 1000 a 1700 msnm.
6	Jalapa	Mataquescuintla	Reserva Privada Pino Dulce	Está alrededor de 2400 msnm, en lo más alto del oriente del país. Cuenta con aproximadamente una caballería de terreno (aprox. 45 ha).
7	Alta Verapaz	San Cristóbal	Bosque Privado SacWachjá	Está ubicada a 1,484msnm en la parte más baja. Constituido de bosque nuboso en un área total de 27 manzanas.

No. en el mapa	Departamento	Municipio	Localidad	Descripción
8	Huehuetenango	La Libertad	Finca El Injerto	Finca cafetalera con un área de 245 ha. Posee altitudes de entre 1,500 y 2,100msnm aproximadamente.

(Ríos 2006; Mendinilla, Leiva y Chinchilla, 2004; y Díaz, 2009).

B. Toma de muestras

Las colectas se hicieron durante noviembre y diciembre de 2016, y enero de 2017. Se tomaron en cuenta las plantas que mostraron diversidad en cuanto a tamaño de inflorescencia principalmente. El segundo factor de selección fue el largo de las hojas. Al determinar la presencia de las mismas, se procedió a utilizar equipo de escalada de árboles para tomar las siguientes medidas sin tener que mover la planta de su lugar. Se utilizó una hoja de toma de datos como la observada en el Cuadro 8, Anexos.

C. Caracterización morfológica

Se buscó en la literatura descripciones morfológicas de distintos autores (CONAP 2010; Granados 2005; Stevens *et al* 2001; MacVean 2009; y Martínez 1998), para identificar diferencias morfológicas entre los individuos reportados de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.

En el Cuadro 1 se observa las variables que se tomaron en cuenta y cómo fue su forma de medición de cada una de ellas.

CUADRO 2. Variables seleccionadas para el muestreo, su dimensional y forma en que se midieron en campo.

Característica	Dimensional	Forma de toma de muestra
Ancho promedio de las hojas	Centímetros	Se tomaron tres medidas en cada hoja: justo al centro y dos al azar (una más cerca a la punta y otra a la base). Se usó una cinta métrica.
Largo de las hojas	Centímetros	Se midió desde la base hasta la punta tres hojas de cada planta: la más pequeña, la más grande y una al azar; guiándose por la vena principal de la hoja. Se usó una cinta métrica.
Largo de la inflorescencia	Centímetros	Se midió desde la base hasta la punta. Se usó una cinta métrica.
Altitud sobre el nivel del mar	Metros	Se utilizó un GPS.

Para los datos obtenidos de esas mediciones se realizaron bloxplots (uno por cada variable) para observar la distribución de los datos totales, para lo que se utilizó el paquete *Graphics* en el software R.

D. Análisis estadístico

1. Análisis de multivarianza. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los datos morfológicos para determinar si existe al menos un gradiente de distribución de las muestras obtenidas utilizando el paquete *Stats* del software R con la función *prcomp*.

2. Correlación entre datos morfológicos y ambientales. El Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica y Percepción Remota de la Universidad del Valle de Guatemala nos facilitó los datos de precipitación media anual, temperatura media anual y humedad relativa para los puntos muestreados. Con estos datos, se realizó una correlación en el software R, utilizando el paquete CCAPP entre el grupo de variables morfológicas y el grupo de variables ambientales, para saber si algún porcentaje de la variación de unos de esos grupos puede ser explicada por el otro. No se pudo realizar una correlación canónica debido a que los datos ambientales no son normales, pero el paquete utilizado utiliza métodos no paramétricos.

E. Selección de primers para la región *MatK*

Utilizando la secuencia completa del gen de cloroplasto *MatK* (maturasa K) (en GenBank: AY614094.1) se obtuvieron cinco (5) pares de primers al analizar la secuencia con la herramienta OligoAnalyzer 3.1 provista por IDTDNA (disponible en <http://www.idtdna.com/site>). Estos pares de primers fueron analizados según sus características físicas y químicas (e.g. tamaño, %GC, etc.)

Todos los pares de primers fueron alineados (forward y el reverse-complemento-inverso) utilizando el software CLC MainWorkBench 7. Se alinearon con varias especies del género *Tillandsia*., *T. argentina* (GenBank: AY614124.1), *T. usneoides* (GenBank: AY614122.1), *T. latifolia* var. *divaricata* (GenBank: AY614108.1), *T. guatemalensis*, (GenBank: AY614094.1), *T. bergeri* (GenBank: AY614134.1) *T. tenuifolia* var. *tenuifolia* (GenBank: AY614132.1), *T. aeranthos* (GenBank: AY614131.1) y *T. ixiioides* (GenBank: AY614129.1). Esto para confirmar que el par de primers seleccionados darían, al menos *in silico*, un buen resultado.

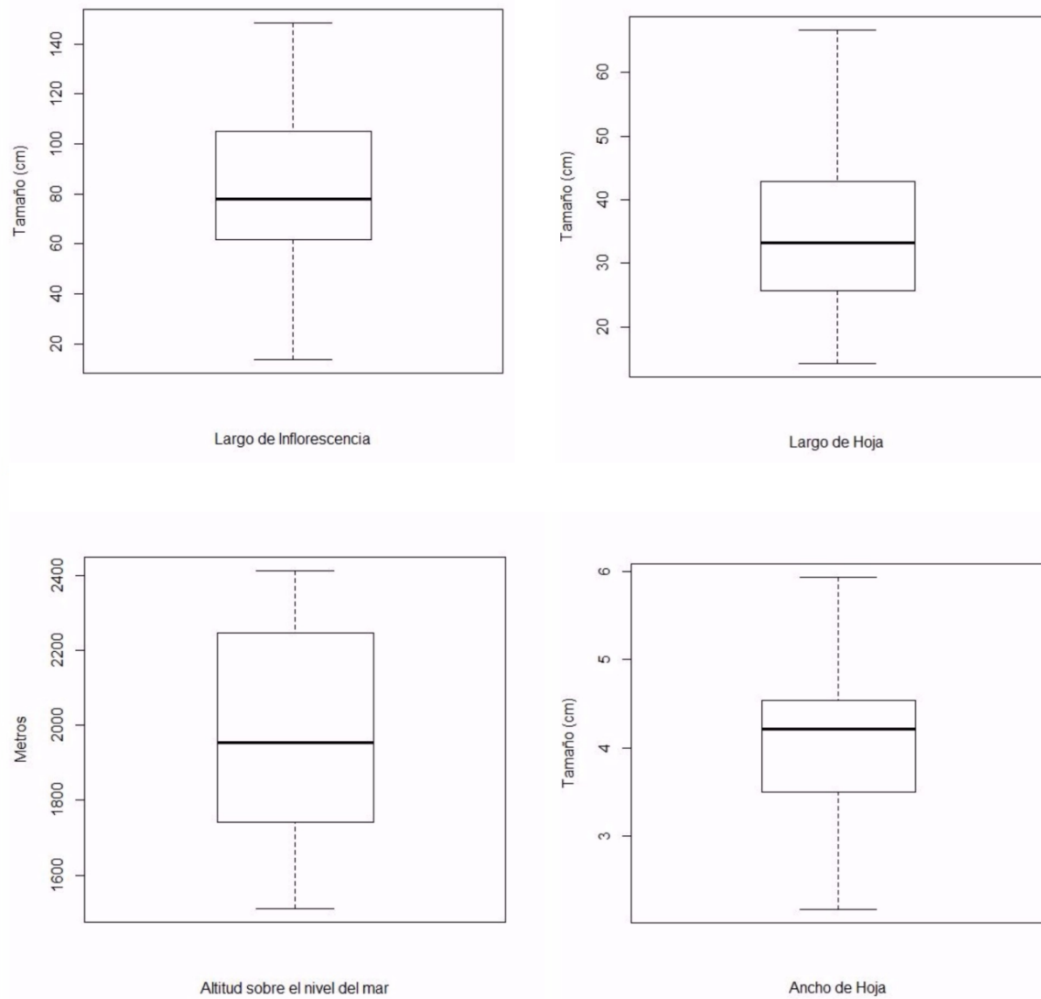
III. RESULTADOS

A. Caracterización morfológica

La matriz obtenida con la información morfológica de las fuentes consultadas se puede observar en el Cuadro 16, Anexos. De ello, se pudo determinar que los caracteres que diferían entre las descripciones en literatura son:

1. Largo de hojas
2. Anchohojas.
3. Color de hojas.
4. Tamaño de la inflorescencia.
5. Color de inflorescencia.

FIGURA 2. Boxplots para los datos obtenidos para todas las variables morfológicas medidas y la altitud sobre el nivel del mar.



Se muestrearon un total de 47 organismos con un rango de largo de hoja de 14.30 a 66.67cm; de ancho de hoja de 2.17 a 5.93cm; de largo de inflorescencia de 13.8 a 148.3cm y en altitudes de 1457 a 2412msnm. En la Fig. 2 observamos que no se presenta ningún dato atípico para ninguna de las variables medidas. Por otro lado, los datos de largo de inflorescencia y altitud sobre el nivel del mar se distribuyen muy uniformemente, mientras que para el largo de hoja la distribución está sesgada para los valores más pequeños (el 50% debajo de la mediana) se encuentran regularmente distribuidos en un pequeño rango (aproximadamente de 10 a 33cm) mientras que los más grandes (el 50% por encima de la mediana), están distribuidos en un mayor rango (aproximadamente de 33 a 70 cm). Para el ancho de hoja pasa de manera similar, pero el 50% de los datos por encima de la mediana están distribuidos en un menor rango de tamaños, a diferencia del 50% por debajo de la mediana, en un mayor rango de tamaños. Esto es especialmente visible en el tercer cuartil (de abajo hacia arriba), en el que el 25% de los datos (de la mediana hacia arriba) se encuentran concentrados en un rango muy pequeño, a diferencia del 25% de los datos por debajo de la mediana.

B. Toma de muestras

Como primer resultado importante tanto para largo de inflorescencia y largo y ancho de hoja, se obtuvieron datos (Fig. 2) fuera de lo que indica la literatura (CONAP 2010; Granados 2005; Stevens *et al* 2001; MacVean 2009; y Martínez 1998). Para largo de hoja se encontraron hojas entre 10 y 15cm(debajo de lo esperado) y también se tienen hojas con un largo cercano a los 70cm, (más de lo esperado). Para el ancho de hoja, incluso, cerca de los 6cm. Para largo de inflorescencia, se esperaba, según la literatura, de 50 a 80cm, pero se encontraron mucho más pequeñas (cerca de los 20cm) y mucho más grandes (más de 140cm).

CUADRO 3. Número de individuos muestreados por departamento

Departamento	Individuos	Observaciones
Huehuetenango (sitio 1)	12	-
Huehuetenango (sitio 2)	4	-
Baja Verapaz	6	-
Alta Verapaz	12	No se tienen datos de hojas de un organismo por error humano.
Jalapa	13	De un organismo no se tienen datos morfológicos por error humano.
Guatemala	0	Se observó únicamente un individuo pero estaba inaccesible para muestrear.
Sololá	0	En la finca no se observó ningún individuo, pero en la carretera a San Lucas Tolimán (Sololá) se observó uno, pero estaba inaccesible para muestrear.

Continuación Cuadro 3

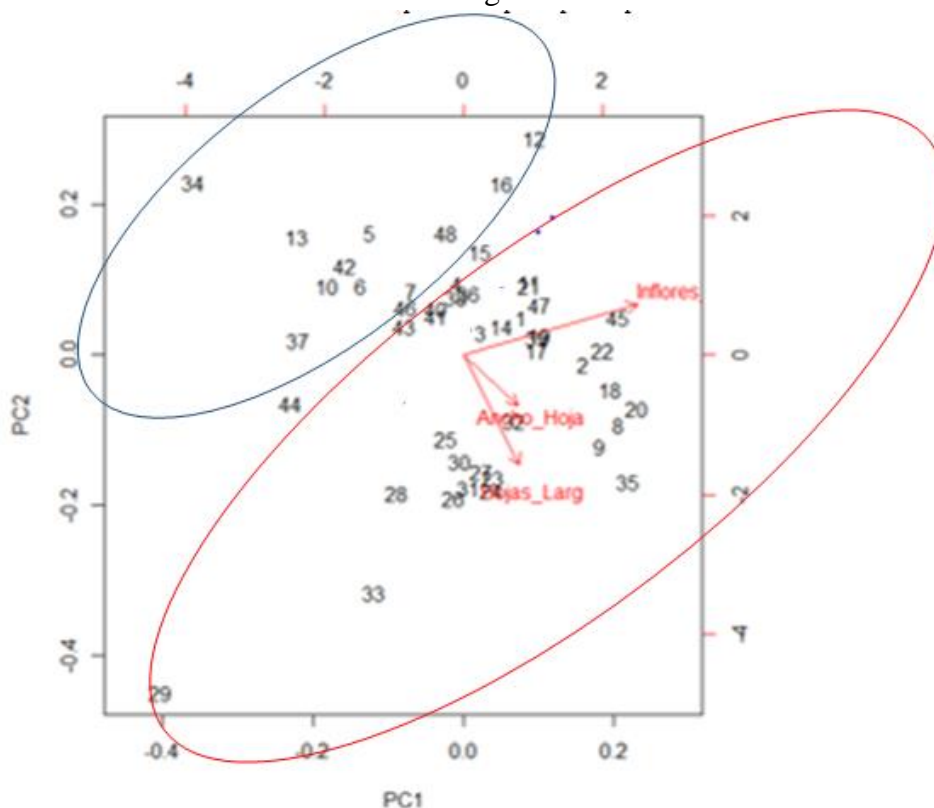
Departamento	Individuos	Observaciones
Chimaltenango	3	No se encontraron los organismos marcados días antes por el dueño del lugar. La misma persona indica que se debe a la extracción por parte de las comunidades aledañas.
Total	50	La diferencia en la cantidad de organismos muestreados por sitio dependió en primer lugar en la cantidad de organismos presentes, en segundo lugar, en la facilidad para colectarlos.

C. Análisis estadístico

A continuación se presentan los resultados obtenidos al realizar el PCA con los todos los datos morfológicos de los organismos muestreados y la correlación entre datos morfológicos y ambientales.

1. Análisis de multivarianza. A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis de componentes principales y la separación de los grupos morfológicos encontrados.

FIGURA 3. Diagrama del análisis de componentes principales para las variables morfológicas.



En el PCA (Fig. 3) puede observarse un gradiente de esquina superior izquierda a esquina inferior derecha. Como podemos ver en el Cuadro 2, el largo de la inflorescencia es muy importante en el componente principal 1 (que explica el 61.49% de la varianza), porque por sí sola explica el 91.28% del mismo; mientras que en componente principal 2 (que explica el 29.20% de la varianza) el largo de las hojas es la variable más importante, explicando el 83.59% (Cuadro 9, Anexos).

Se analizaron entonces los dos grupos (en óvalo azul el grupo 1 y en óvalo rojo el grupo 2, Fig. 2): los de la esquina superior izquierda (grupo 1) y los de la esquina inferior derecha (grupo 2). Para ese fin, se realizaron histogramas por grupo para cada una de las variables, tanto morfológicas como ambientales, para observar su distribución y distinguir tendencias por variable para cada grupo.

En combinación la Fig.6 y la Fig.7 (Anexos) se obtiene el resumen encontrado en el Cuadro 4.

CUADRO 4. Resumen de los datos morfológicos y ambientales asociados a cada uno de los grupos encontrados.

	Grupo morfológico 1	Grupo morfológico 2
Largo de inflorescencia	30-90cm	60-148.3cm
Largo de hoja	20-26cm	38-48cm
Ancho de hoja	2-5cm	4-5.2cm
Porcentaje de humedad	70-80	70-80
Altitud sobre el nivel del mar (m)	1800-2000	1400-1700
Temperatura media anual (en °C)	12-15°C	15-22°C
Precipitación media anual (en mm)	(-)1000, 4000(+)	1000-3000

FIGURA 4. Fotografía de un organismo de cada uno de los grupos morfológicos encontrados.

Grupo morfológico 1



Grupo morfológico 2



Fotografías por Rodrigo Mussapp (2016)

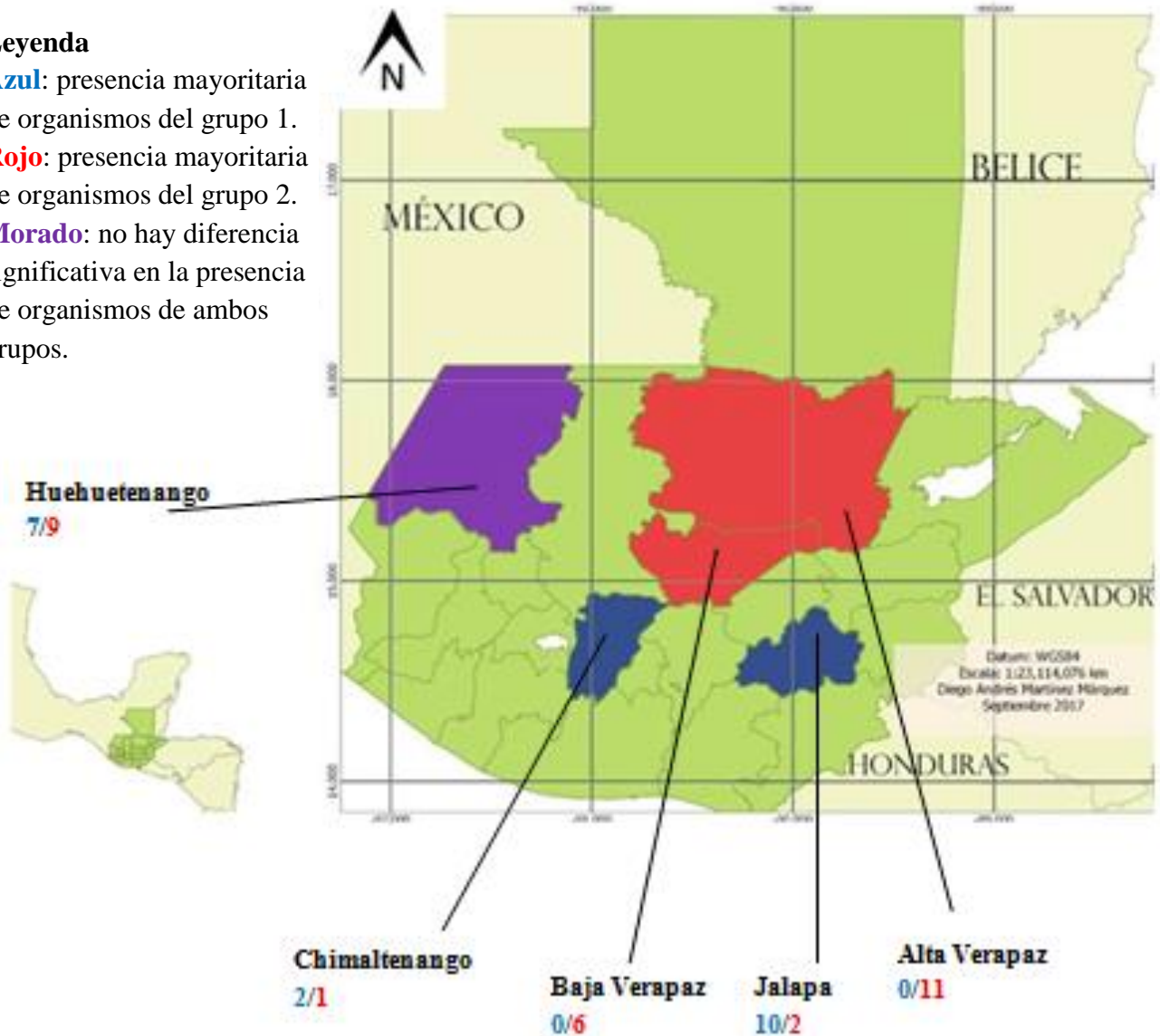
FIGURA 5. Mapa de ubicación de los organismos, según el grupo morfológico al que pertenecen.

Leyenda

Azul: presencia mayoritaria de organismos del grupo 1.

Rojo: presencia mayoritaria de organismos del grupo 2.

Morado: no hay diferencia significativa en la presencia de organismos de ambos grupos.



En la Figura 5 se observa la distribución de organismos encontrados según el grupo al que pertenecen. Huehuetenango mostró casi la misma cantidad de organismos de ambos grupos, similar a Chimaltenango, pero debido que de este departamento solo entraron tres organismos al estudio, no se tienen suficientes datos para asegurar que dicho departamento posee en mayor cantidad organismos de cierto grupo. Alta Verapaz y Baja Verapaz mostraron exclusivamente organismos del grupo 2 y Jalapa tuvo mayoría del grupo 1.

En el Cuadro 4, en lo que se refiere a humedad, los del grupo 1 tienen valores de 70, 75 y 80% de humedad, en ese orden descendente; mientras que para los de la esquina inferior derecha tienen los mismos valores pero los de 75% son mayoría, pero ambos comparten frecuencias y valores para humedad.

Como se puede ver en el Cuadro 6 (Anexos), la correlación más alta del largo de hojas la tiene con la temperatura ($r^2=0.33$), al igual que el ancho de hoja ($r^2=0.57$). Estas correlaciones son la más alta para dichas variables morfológicas, mientras que para el largo de inflorescencia la correlación es muy pequeña para la temperatura ($r^2=-0.19$, aunque es la más grande para este carácter morfológico).

Correlación entre grupos de variables ambientales y morfológicas

A continuación se muestran las correlaciones encontradas para los grupos de variables estudiados para su posterior análisis.

CUADRO 5. Tres tipos de correlación entre datos ambientales y morfológicos con su valor p (Intervalo de confianza de 95%).

	Spearman	Kendall	M
Correlación	0.7904566	0.600891	0.7354914
P	0.000000	0.000000	0.001000

Podemos ver que en el Cuadro 5 la correlación entre el conjunto de datos morfológicos y ambientales medidos, según la prueba, es de entre el 60% y el 79%. Esto quiere decir que entre el 60 y 79% del cambio en las tres variables morfológicas estudiadas puede ser explicado por las variables ambientales utilizadas; y viceversa. El resto, del 21 al 40%, queda sin ser explicado utilizando únicamente estos dos grupos de variables.

Para todas las pruebas el valor p fue menor a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis de que la correlación es igual a cero. Es decir, con un 95% de confianza, sí existe correlación entre los dos grupos de variables.

Para todos los casos, como puede verse en el Cuadro 5, la temperatura es el dato ambiental más importante para la correlación de ambos grupos, mientras que la variable morfológica más importante es el ancho de hoja, igual para todos los casos.

Como se puede ver en el Cuadro 11 (Anexos), la temperatura es la variable ambiental que más aporta a la correlación entre grupos de variables, pero debido a que la temperatura y la altitud, según el Cuadro 6 (Anexos), están estrechamente relacionadas ($r^2=-0.92$), se procedió a realizar las mismas correlaciones entre grupos de variables pero

eliminado uno por uno las variables ambientales. Esto fue útil para observar si existía redundancia en la correlación entre grupo de variables por utilizar la temperatura y la altitud al mismo tiempo.

CUADRO 6. Correlación entre variables morfológicas y ambientales, sin tomar en cuenta una de las variables ambientales a la vez.

Correlación	Variable ambiental eliminada			
	Altitud	Temperatura	Humedad	Precipitación
Spearman	0.624806	0.575050	0.790457	0.726236
Kendall	0.481737	0.400001	0.609780	0.510224
M	0.678125	0.658384	0.695429	0.662151

Como se puede ver en el Cuadro 6, las correlaciones disminuyeron, a excepción de cuando se eliminaba la variable de “humedad”, en la que se ve que la correlación se mantiene. Lo interesante es que cuando se elimina la variable ambiental más importante para la correlación de los grupos de datos originales (la temperatura) era la humedad la que aportaba más a la correlación, aunque como ya se dijo antes, la misma disminuía. Para todos los casos de eliminación de datos ambientales, el ancho de hoja mostró ser el que más aportaba a la correlación. Las correlaciones más bajas se obtuvieron cuando se eliminaba la altitud o la temperatura, además de que el rango de las mismas es muy parecido.

Esto podría indicar algún grado de peso extra (o redundante) que da a la correlación el uso de ambas variables debido a la alta correlación entre las mismas. Por ello se decidió eliminar una de las variables ambientales, la altitud. Esto para evitar dar peso extra a la correlación. No se eliminó la temperatura debido a que en la mayoría de correlaciones era la más importante (mientras que la altitud no), además de que en caso de eliminarse, una de las tres correlaciones no era significativa ($p=0.055$).

Por otro lado, el ancho de hoja es la que guarda la mayor correlación con cada una de las variables ambientales (en valor absoluto, de 0.16 a 0.57) mientras que el ancho de hoja y el largo de inflorescencia tienen obvios valores más bajos (en valor absoluto, de 0.05 a 0.33 y de 0.07 a 0.19 respectivamente). Esta alta correlación individual del ancho de hoja con todas las variables ambientales estudiadas en comparación con el largo de hoja y la inflorescencia (Cuadro 10, Anexos) hace que sea el ancho de hoja muy importante para la correlación de ambos grupos (morfológica y ambiente).

Por lo tanto, se lograron separar dos grupos morfológicos por medio del largo de inflorescencia y el largo de hoja.

D. Selección de primers para la región *MatK*

CUADRO 7. Primers forward (F) y reverse (R) obtenidos, con valores de tamaño (en pares de bases, pb), porcentaje de C-G (%CG), temperatura de alineamiento (Tm, en grados centígrados) asociadas, tamaño teórico del amplicón y cantidad de dímeros y hairpins que formarían.

Pareja		Secuencia	Tamaño (pb)	Tm	%CG	Amplicón esperado (pb)	Cantidad de homodímeros	Cantidad de heterodímeros	Cantidad de hairpins
1	F	ACCGTATCGGGACATCCTATT	21	63	47.6	442	33	22	3
	R	GCTTCAACCACTACACCACTAC	22	63	50		10		3
2	F	GTCTCAACCACACAGGATTCA	21	62	47.6	424	20	36	2
	R	CGGTCCAGATTGGCTTACTAAT	22	62	45.5		31		5
3	F	TGGAACCTTTCTTGAGCGAATA	21	62	40.9	395	30	50	5
	R	GTTCTCGACGTGATCCATGTAA	21	62	45.5		34		8
4	F	GCCTCTGGCTCAAGTAGAAAT	21	62	47.6	739	26	37	5
	R	TCGCTCAAGAAAGGTTCCAG	20	62	50		23		7
5	F	ACCCGTGGGAATTATTGGTTAT	22	62	40.9	592	39	25	2
	R	TGAATCCTGTGTGGTTGAGAC	21	62	47.6		20		2

Podemos observar en el Cuadro 7 que todos los primers tienen un tamaño y Tm adecuados mientras el % GC es apenas adecuado para todos los primers. Esto según Taylor *et al.* (2010), quienes indican que los primers deberían tener un %GC entre 50 y 60 y un Tm entre 55 y 65°C. Únicamente el R del par 1 y el R del par 4 cumplen con, al menos, tener una Tm de 50°C, todos los demás tienen temperaturas menores. El rango del tamaño teórico del amplicón va de 395 a 739, un rango aceptable para estudios entre especies. Todos los primers están dentro de un rango de 1,631 pares de bases de la secuencia completa de la región *MatK* de las especies de *Tillandsia* analizadas, de manera continua y traslapada, intervalo que puede alcanzarse al usarse únicamente las parejas 1, 2 (o 3) y 4. El par de primers que da un amplicón teórico más grande es el 4. Pero si se usan los pares 2 y 4 se obtendría un amplicón continuo de 1,189 pares de bases, siendo la mejor combinación (la que usa menos pares de primers y da un amplicón más grande).

IV. DISCUSIÓN

A. Caracterización morfológica

En campo se tomaron, de manera subjetiva, el color de hojas e inflorescencia. Sin embargo, se hace difícil poder estandarizar de esa manera los colores observados. Por eso, no se tomaron en cuenta esas características para el análisis final. Además, según lo analizado en la caracterización morfológica, el color de estos caracteres era diferencial, se recomienda realizar el análisis del color de hojas e inflorescencia para las dos morfologías encontradas, debido a que se ha reportado, al menos para *T. dasylyriifolia*, que en temperaturas altas sus hojas son rojizas mientras que son verdes en lugares más húmedos y con sombra (García-Suárez, Rico-Gray y Serrano 2003).

B. Toma de muestras

Luego de analizar la información de cada uno de los organismos perteneciente a los dos grupos encontrados, se observó que había algunos datos que se traslapaban para organismos de distinto grupo morfológico o bien, en el mismo sitio de muestreo. Esto podría deberse, en parte, que no se encontraran maduros, sino que aun estuvieran en etapa de crecimiento. O bien, realmente se encuentran con las dos morfologías en ambos sitios de Huehuetenango, pero habría que hacer un estudio específico para estos grupos morfológicos encontrados para poder asegurar dicha información.

La ausencia de organismos en el punto de colecta de Sololá y los pocos encontrados en Chimaltenango (3) se deben posiblemente a la depredación por parte de las comunidades aledañas, quienes los usan para su venta, por su valor principalmente ornamental en esta región.

El intervalo de medidas compartidas de largo de inflorescencia entre ambos grupos (30-60cm) puede deberse a plantas que aún no eran adultas, por lo que no habían alcanzado su altura final. Además, esto podría explicar los datos debajo del rango de lo indicado por la literatura para todos los caracteres morfológicos medidos. Además, por lo observado en el Cuadro 4, los datos ambientales no sugieren una distribución específica para cada uno de los grupos morfológicos encontrados. Por otro lado, la relación entre morfología y cantidad de lluvia claramente no es lineal.

C. Análisis estadístico

Las correlaciones encontradas en el Cuadro 6, en Anexos (especialmente de ancho y largo de hoja con la temperatura) indica que el aumento de la temperatura (para el grupo 2) está asociado a un aumento en largo y ancho de hoja, siendo más importante éste último. Esto sugiere que la temperatura está directamente relacionada con el aumento de las variables morfológicas estudiadas, especialmente del área foliar (largo y ancho de hoja).

Aunque en la literatura no se menciona sobre el aumento del área de las hojas en relación de la temperatura (únicamente de ancho de hoja, que disminuye al aumentar la temperatura, como *T. multiflora* y *T. tragophoba* (Rundel y Dillon 1998)), sí se menciona que en lugares más calientes se tienen más tricomas para evitar pérdida de agua (más

tricomas a mayor temperatura) (Rundel y Dillon 1998; Benz y Martin 2007). Debido a que en este estudio se encontró un área de hoja diferencial (tanto el largo promedio, el ancho de hoja y temperatura aumentaron, en conjunto, directamente proporcional), se esperaría, entonces que los organismos de la morfología grande (que está asociada a temperaturas más altas) tengan mayor densidad de tricomas (aparte de absorción de agua, la función de reflectancia para minimizar el daño al aparato fotosintético y reducir el calor solar en el tejido de la planta (Rundel y Dillon 1998; Benz y Martin 2007) y, por ello, el área es mayor. Sin embargo, debe tenerse cuidado al hacer este tipo de análisis, debido a que se ha reportado que la morfología y densidad de tricomas no varía únicamente entre especies, sino también podría variar en el mismo organismo, dependiendo de la parte de la hoja que se estudie y la edad de la planta (Benz y Martin 2007). Por otro lado, se recomienda estudiar la temperatura óptima de fotosíntesis para cada morfología, porque eso podría demostrar el porqué es tan importante la temperatura (media anual) para cada morfología. Esto porque *T. deppeana* ha sido reportada con diferentes temperaturas óptimas de fotosíntesis dependiendo de su estadio (adulto o juvenil), debido a la tasa de transpiración que poseen (Adams y Martin 1986), factor que podría generalizarse también para relaciones entre especies.

El hecho que tenga más impacto la temperatura que la altitud (Cuadro 11 y Cuadro 12, Anexos) puede deberse a que dos puntos a un metro de distancia (de altitud sobre el nivel del mar) no representan una diferencia de 1°C; sino que por cada 1000m (1km) de diferencia entre dos puntos (en altitud sobre el nivel del mar) hay una diferencia aproximada de 6.5°C (o bien, 1.98°C cada 1000 pies, cuando el movimiento del aire seco es ascendente)(Adusar 2007). Esto quiere decir que para todos los puntos que se encuentren dentro de un mismo intervalo de 100m de altitud, la temperatura va a variar muy poco. Por lo tanto, la diferencia entre dos puntos donde se encuentre la planta debe ser de al menos de 154m para que la temperatura varíe 1°C. Es por ello que muchos puntos son tomados como con una temperatura similar (o idéntica) porque se encuentran muy cerca (en cuanto a altitud) y un cambio de temperatura significativo se da cuando hubo varios cambios de altitud, por lo que parece afectar más la temperatura. Además, los datos morfológicos tienen la mayor correlación individual, en cuanto a las variables ambientales, con la temperatura (Cuadro 10, Anexos), lo cual hace que su peso sea mayor en la correlación conjunta. La variable con gran peso en la correlación entre grupos de variables, aparte de la temperatura, fue la humedad. Esto puede deberse a que los valores obtenidos son datos discretos (de 5% en 5%) por lo que pequeños cambios de humedad no son perceptibles y cuando hay un cambio, ya es importante (de un 5% por lo menos), lo cual hace que tenga un mayor peso perceptible en la correlación. Tanto para la temperatura como para la humedad, la correlación parece estar influenciada por la forma en que se tomaron los datos.

Para la precipitación, el valor es promedio por departamento, por lo que también son datos sin continuidad, bastante discretos, teniendo el mismo efecto que la humedad en la correlación. A diferencia de la humedad y temperatura, la precipitación presenta más valores en intervalos más pequeños (aunque no continuos), lo que podría aparentar una continuidad de datos, disminuyendo su aporte en la correlación. Además, claramente se puede observar

en el cuadro 4 que la precipitación no guarda una relación lineal con la morfología, y la correlación toma únicamente en cuenta el grado de relación lineal entre los grupos, disminuyendo entonces el aporte de esta variable en el total de la correlación.

Como se vio anteriormente pareciera haber algún patrón, algunas veces no tan claro, de los datos ambientales específico para cada grupo morfológico encontrado. Esto quizá por efecto de la cantidad de datos por grupo, no tanto de la cantidad de datos totales, porque los dos grupos separados en la Fig. 3 difieren en cantidad de datos para cada uno. Se esperaría tener, por lo menos, treinta datos para cada uno de los grupos. Se esperaría que al tener muestra representativa para cada grupo morfológico se logre vislumbrar de mejor manera el patrón ambiental para cada uno de ellos.

Barve *et al.* (2014) reportó que para *T. usneoides* la humedad relativa y cantidad de días sin lluvia son muy importantes para determinar su distribución general; mientras que su distribución al norte también está afectada por la temperatura mínima en la época más fría, pero no de la temperatura máxima en los días más calientes. En este estudio utilizamos temperatura media anual, un valor fuera de los extremos. Se recomienda, entonces, hacer un estudio con datos más específicos de temperatura (temperatura máxima en los días más calientes y la temperatura mínima en los días más fríos), porque es posible que se encuentre una distribución específica de los datos para cada morfología encontrada. Además, es importante la calidad de la información obtenida, debido a que se encontró en (Barve *et al* 2014) que un factor de error al usar información ambiental es que mucha de esa información asume que algunas áreas son homogéneas para este dato ambiental, sin tomar en cuenta micro climas. Esto es importante porque, por ejemplo, *T. usneoides* ha reportado respuestas fisiológicas específicas a los individuos dependiendo del microclima en los que habita, haciendo difícil su generalización como adaptaciones para poblaciones en general.

D. Selección de primers para la región *Matk*

En primera instancia se puede observar en Cuadro 7 que la pareja de primers 1 pareciera ser la que sobresale entre las otras cuatro parejas por sus características físico químicas encontradas. En primer lugar, en cuanto a hairpins (Cuadro 7 y Cuadro 13, Anexos) dicha pareja tiene en conjunto la menor cantidad de enlaces (3) y, aunque no son la pareja que forman menos, sí las que tienen menor posibilidad de ocurrir (los cambios de energía libre de Gibbs para el reverse es positivo). Además, si nos enfocamos en los homodímeros, (Cuadro 7 y Cuadro 14, Anexos) que de los forward de cada par de primers, el número 1 es el segundo que tiene mayor número de enlaces (33) pero el Reverse de ese par es el que menos enlaces forma (10), y el cambio de energía libre de Gibbs, aunque es negativa, tiene un valor absoluto pequeño (cerca de cero). En cuanto a heterodímeros (Cuadro 7 y Cuadro 15, Anexos) el par número 1 es el que forma menor cantidad de enlaces (22).

Sin embargo en cuanto a hairpins (Cuadro 7 y Cuadro 13, Anexos) la pareja 3, aun siendo de las que en conjunto más hairpins forman, ambos tienen un cambio de energía libre

de Gibbs positivo, lo cual hace que las probabilidades de formarlos sean casi nulas. Para homodímeros (Cuadro 7 y Cuadro 14, Anexos), todas las conformaciones tienen un cambio de energía libre de Gibbs negativo y, en conjunto, todos los pares de primers forman homodímeros en el rango de 43 (par 1) a 64 (par 3). Para heterodímeros (Cuadro 7 y Cuadro 15, Anexos), aunque la pareja 1 es la que menos cantidad formaría (22), la pareja 5 no varía demasiado a esa cifra (25). Todos los pares de primers tienen cambio de energía libre de Gibbs negativo, pero las parejas 1 y 5 son los que tienen un valor más cercano a cero (-21.13 y -29.58), haciendo menos probable que se formen en relación a los otros pares de primers, por ejemplo, en comparación con la pareja 3 (50 heterodímeros, cambio de energía libre de Gibbs de -70.31).

Entonces, todos los primers tienen buenas cualidades físicas y químicas para ser utilizados. Sin embargo, la pareja 1 muestra, en conjunto, la mejor combinación en las características estudiadas, por lo que se eligió entre todos los pares. Sin embargo, se recomienda estudiar las regiones (más que los tamaños) de los amplicones dentro de *MatK*, para analizar la posibilidad de uso alternado de más de un par de primers.

Debido a que los grupos encontrados son simpátricos (como en Huehuetenango principalmente, aunque, en menor medida, se encontró en Jalapa y Chimaltenango), además del hecho que únicamente del 48 al 67% de dicha variación puede ser explicada por los datos morfológicos estudiados (y entendiendo que el hecho que sean simpátricos en algunos sitios disminuye el efecto de las variables ambientales sobre la morfología) y considerando que se ha reportado (para *T. usneoides*) que es capaz de responder únicamente con cambios fisiológicos y no morfológicos (tamaño de hoja, tamaño y densidad de tricomas, etc) a cambios en los niveles de luz ambiental (Martin, *et al.* 1985), se recomienda realizar análisis moleculares para evaluar la filogenia entre ambos grupos morfológicos de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. encontrados.

Estudios de este tipo se consideran importantes de llevar a cabo debido que en las bromelias suelen formarse complejos de especies (especies diferentes que divergieron hace relativamente poco tiempo, por lo que morfológicamente no han variado mucho). Entonces, se debe analizar desde el punto de vista molecular.

Algunos estudios taxonómicos de bromelias han incluido a *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. Por ejemplo, Barfuss *et. al.* (2005) realizó un estudio, en la que a partir de información obtenida por medio de secuencias de ADN obtenidas de siete regiones plastidales, concluyen que *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. está relacionado, a partir de los marcadores utilizados, con *T. remota*, *T. klausii*, *T. caput-medusae*, *T. juncea*, *T. fasciculata* y *T. ionantha*. Barfuss *et. al.* (2016) propone una clasificación de la sub familia Tillandsioideae (a la cual pertenece *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.) a partir de la información de las secuencias de ptADNrpoB-trnC-petN, trnK-matK-trnK, ycf1, y nADN PHYC; además de incluir varios caracteres morfológicos. Para ambos casos, ponen a *Tillandsia leiboldiana* como especie hermana de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. Cabe mencionar que en el primero de los estudios mencionados, no se analizó a *T. leiboldiana* y

posiblemente por eso es que salió más relacionada con esas otras seis especies del género. Por otro lado, Granados (2005 y 2008) ha realizado estudios taxonómicos sobre el género *Tillandsia* en México, en la cual no incluye a *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. y sobre la sistemática del complejo de *Tillandsia mcdougallii*, por ejemplo.

No se cuenta con este tipo de información para *T. guatemalensis*, porque no se han realizado estudios. Y debido a la importancia económica y ambiental de la misma, se recomienda llevar a cabo un estudio para evaluar la filogenia entre los dos grupos de *T. guatemalensis* encontrados en este estudio

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logaron separar dos grupos morfológicos de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm.

Se encontró que para la caracterización de los dos grupos encontrados los marcadores morfológicos más importantes son el largo de hoja (explica el 24.41% de la variación) y largo de inflorescencia (explica el 56.13% de la variación).

Ambos grupos se diferencian morfológicamente de la siguiente manera (grupo 1; grupo 2): largo de inflorescencia (30-90cm; 60-140cm), largo de hoja (20-26cm, 38-48cm) y ancho de hoja (2-5cm; 4-5.2cm).

Las variables ambientales (a excepción de la humedad relativa) mostraron distribuciones diferenciales para ambos grupos, de la siguiente manera (grupo 1, grupo 2): precipitación media anual (-1000mm, +4000mm); temperatura media anual (12-15°C, 15-22°C); altitud sobre el nivel del mar (1800-2000m, 1400-1700m).

Los miembros del grupo 1 fueron más frecuentes en Jalapa y Chimaltenango, mientras que los del grupo 2 en las Verapaces. Huehuetenango presentó organismos de ambos grupos.

La diferencia morfométrica entre los grupos es explicada únicamente del 48 al 67% en base a la temperatura media anual, precipitación media anual y porcentaje de humedad asociadas.

Se recomienda realizar una evaluación de la filogenia entre estos dos grupos encontrados de *Tillandsia guatemalensis* L. B. Sm. por la posibilidad que formen parte de un complejo de especies, y no sean la misma especie como se cree actualmente.

Se recomienda utilizar una paleta de colores estandarizados para evaluar si el color de hojas e inflorescencia pueden ser utilizados como marcadores morfológicos para los dos grupos encontrados.

La pareja 1 de primers encontrados posee características fisicoquímicas adecuadas para su uso en estudios moleculares, específicamente para alguno de filogenia entre ambos grupos.

VI. LITERATURA CITADA

- Adusar, J. *Principios de vuelo*. 2007. Editorial Thomson Internacional, Madrid. 231 pp.
- Barfuss, M., R. Samuel, W. Till y F. Stuessy. 2005. *Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions*. American Journal of Botany 92(2): 337-351
- Barfus, M., W. 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.
- Bing-Yuan, C. y H. Janes. 2002. *PCR Cloning Protocols*. Humana Press, New Jersey. 417 pp.
- Cadavid, I. 2013. *Tipificación molecular y separación de especies de plantas del subgénero Leptostemonum (Solanaceae: Solanum), usando regiones barcode*. Trabajo de graduación para optar al título de Magíster en Ciencias Biotecnológicas. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 189 pp.
- Campbell, N. L. Mitchel y J. Reece. 2001. *Biología: conceptos y relaciones*. Editorial Pearson Educación, 896 pp.
- Chew, T., E. De la Luna y D. González. 2010. *Phylogenetic Relationships of the Pseudobulbous Tillandsia species (Bromeliaceae) Inferred from Cladistic Analyses of ITS 2, 5.8 Ribosomal RNA Gene, and ETS Sequences*. Systematic Botany 35 (1): 99. 86-95.
- Cóbar, A. 2014. *Plan Maestro: Reserva Natural Privada Rincón Grande*. Asociación De Reservas Naturales Privadas de Guatemala. 33 pp.
- Consejo Nacional de Áreas Protegidas - CONAP. 2010. *Guía de Reconocimiento del Género Tillandsia de Guatemala*. 118 pp.
- Del Claro, K., P. Oliveira y V. Rico-Gray. 2009. *Tropical biology and conservation management Vol. 1: natural history of tropical plants*. EolssPublishers, UK. 155pp.
- Díaz, M. 2009. *Ficha técnica para establecer Reserva Natural Privada: Finca Monte Cristo*. Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala. 10 pp.

- Dix, M. y M. Dix. 2006. *Diversity, distribution, ecology and economic importance of Bromeliaceae in Guatemala*. p. 199-210. En: Cano, E. 2006. Biodiversidad de Guatemala. Editorial de la Universidad del Valle de Guatemala, Guatemala.
- Espinosa, D., J. Morrone, J. Llorente y O. Flores. 2002. *Introducción al análisis de patrones en biogeografía histórica*. Editorial de la Universidad Autónoma de México, México D.F. 132 pp.
- Forbes, B. 2007. *Diagnóstico microbiológico*. Editorial Panamericana, Madrid. 1015 pp.
- Flores, M. 1998. *Flora genérica de la familia Bromeliaceae en el Estado de México. Manual para la identificación de las especies de la familia Bromeliaceae presentes en el estado*. Tesis para obtener el título de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. 186 p.
- García, M., T. Terrazas, O. Segura, S. Arias, H. Vibrans y L. López-Mata (2013). *Caracterización molecular de tres especies de Hylocereus (Cactaceae) presentes en México*. *Revista fitotécnica mexicana*, 36(1), 13-22.
- Gardner, C. 1986. *Preliminary classification of Tillandsia based on floral characters*. *Selbyana* 9(1): 130-146.
- Granados, C. 2005. *Estudio taxonómico del género Tillandsia L. (Bromeliaceae) en la Sierra de Juárez (Oaxaca, México)*. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 131 pp.
- Granados, C. 2008. *Sistemática del complejo Tillandsia macdougallii (Bromeliaceae)*. Tesis para obtener el título de Magister en Sistemática, Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 91 pp.
- Gaucher, E., J. Kratzer, J. y R. Randall. (2010). *Deep Phylogeny—How a Tree Can Help Characterize Early Life on Earth*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a002238.
- Hammel, B.M. Grayum, C. Herrera y N. Zamora. 2003. *Manual de plantas de Costa Rica, Volumen 2: Gimnospermas y Monocotiledóneas (Agavaceae-Musaceae)*. 694 pp.
- Heuvel, J., J. Pardo, S. Quirós y L. Espinoza. 1986. *Agroclimatología tropical*. Editorial de la Universidad Estatal a Distancia, San José de Costa Rica. 375 pp.
- Hilu, K., Liang, H., 1997. *The matK gene: sequence variation and application in plant systematics*. *American Journal of Botany* 84(6), 830–830.

- Hu, J. M. Lavin, M. Wojciechowski y M. Sanderson. (2000). *Phylogenetic systematics of the tribe Millettieae (Leguminosae) based on chloroplast trnK/matK sequences and its implications for evolutionary patterns in Papilionoideae*. Am. J. Bot. 87: 418-430.
- Karehed, J., I. Groenickx, S. Dessein, T. Motley y B. Bremer. (2008). *The phylogenetic utility of chloroplast and nuclear DNA markers and the phylogeny of the Rubiaceae tribe Spermacoceae*. Molecular Phylogenetics and Evolution. 49(2008): 843-866.
- Kelch, D. G. and Baldwin, B. G. (2003). *Phylogeny and ecological radiation of New World thistles (Cirsium, Cardueae – Compositae) based on ITS and ETS rDNA sequence data*. Molecular Ecology, 12: 141–151.
- Lam, T., C. Chung y H. Tang. (2010). **Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections**. Critical Reviews in Clinical Sciences. 47(1): 5-49.
- MacVean, A. 2009. *Plantas de los Bosques Montanos de Guatemala*. PrintStudio, Herbario UVAL, Instituto de Investigación.
- Mackay, M. 2007. *Real-time PCR in Microbiology: from diagnosis to characterization*. Caister Academic Press, UK.440 pp.
- Medinilla, O., X. Leiva y J. Chinchilla. 2004. *Plan de Manejo: Reserva Natural Privada Santo Tomás Pachuj*. Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala. 36 pp.
- Montiel, M. 1991. *Introducción a la flora de Costa Rica*. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José de Costa Rica. 345 pp.
- Morales, J. y E. Alfaro. 2003. *Tillandsia guatemalensis L. B. Sm. , un registro nuevo en la flora de Costa Rica*. Revista Científica Lankesteriana 3(3), 5-6.
- Paz, A, M. González y A. Crawford. (2011). *Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva*. Acta Biológica Colombiana, 16(3), 161-176.
- R Core Team (2015). *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria. En línea en: <https://www.R-project.org/>.
- Ríos, L. 2006. *Plan Maestro: Reserva Natural Privada Santa Isabel*. Asociación de Reservas Naturales Privadas de Guatemala. 36 pp.

- Sandoval, B., E. Nadezhna, M. Flores-Cruz, A. Martínez-Bernal. 2006. *Bromelias útiles de México*. Cactáceas y Suculentas Mexicanas, Tomo 49 (29). 100- 114.
- Shanthi, J., D. Murphy, J. Miller y M. Bhave. (2013). *Application of Molecular Markers for Identification of Potential Salt Tolerant Plant Species for use in Agroforestry and Saline Land Reclamation*. APCBEE Procedia. 5(2013): 514-519.
- Stevens, W., C. Ulloa, A. Pool y O. Montiel. 2001. *Flora de Nicaragua, Tomo 1: introducción a gimnospermas y angiospermas (Acanthaceae-Euphorbiaceae)*. Missouri Botanical Garden Press. 903 pp.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). *A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. Methods*, 50(4), S1-S5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2010.01.005>
- Versieux, L. y T. Wendt. 2007. *Bromeliaceae diversity and conservation in Minas Gerais state, Brazil*. Biodiversity and Conservation. 16(11) 2989-3008p.

VII. ANEXOS

FIGURA 6. Histogramas de las variables morfológicas y ambientales para los organismos pertenecientes al grupo 1.

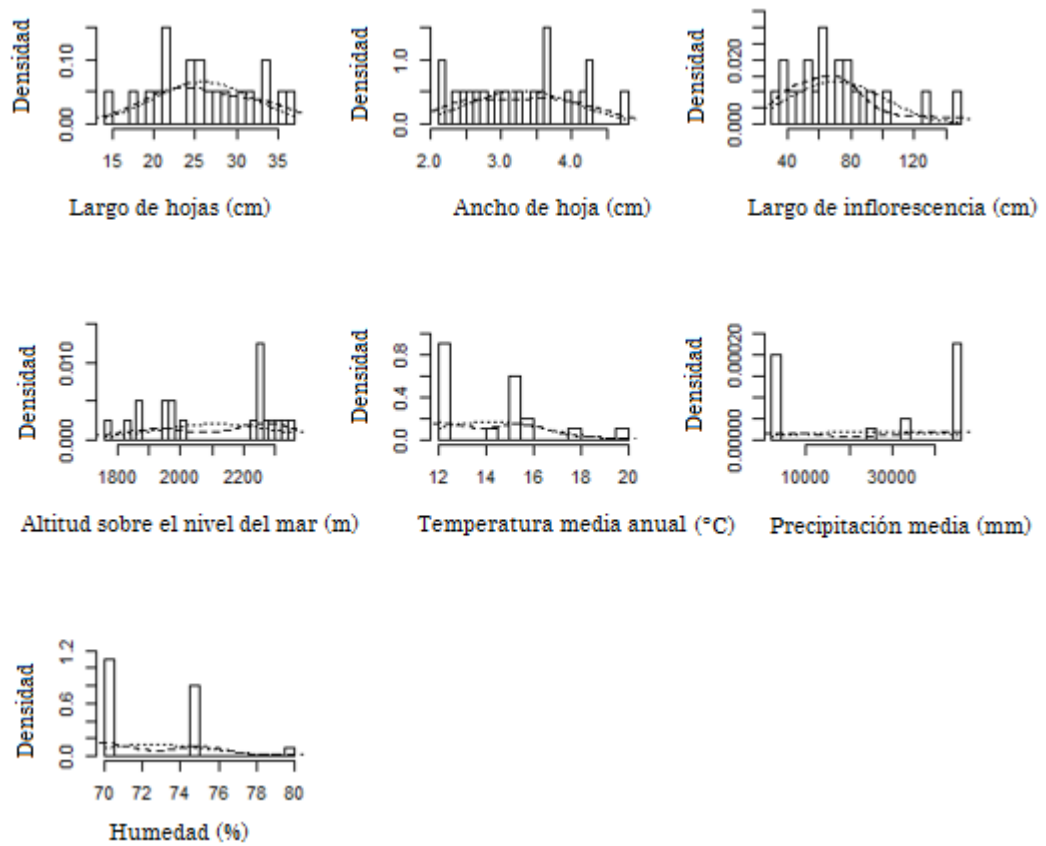
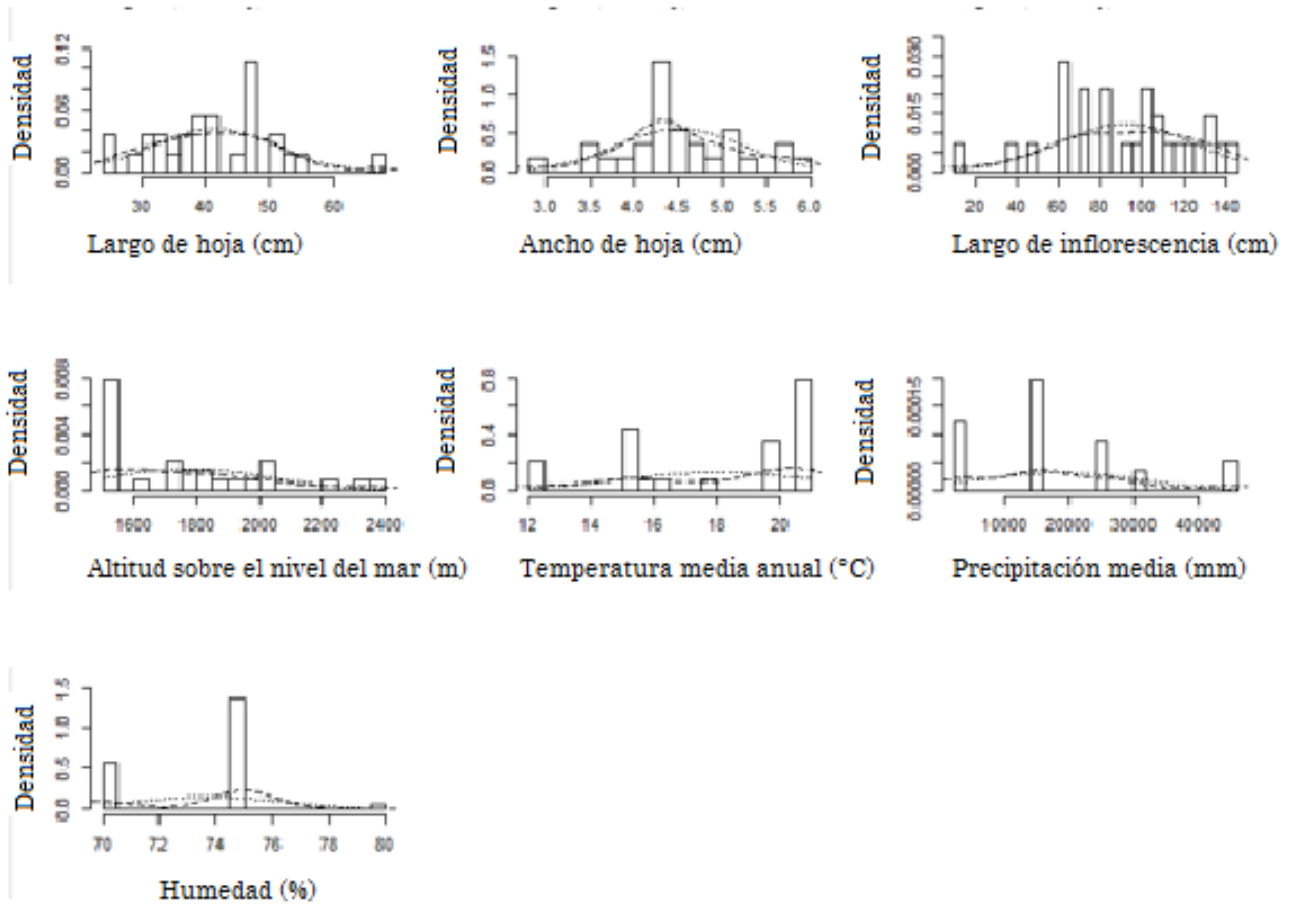


FIGURA 7. Histogramas de las variables morfológicas y ambientales para los organismos pertenecientes al grupo 2.



CUADRO 8. Contribución de cada uno de los caracteres morfológicos a cada componente principal (PC).

	PC1	PC2	PC3
Largo de hoja	0.2934613	-0.8359968	0.4636700
Ancho de hoja	0.2838062	-0.3869699	-0.8773302
Largo de inflorescencia	0.9128716	0.3890349	0.1237004
Varianza (%)	61.49	29.20	9.31
Desviación estándar	0.4923	0.3393	0.1915

CUADRO 9. Correlación entre todas las variables (r^2).

	Altitud (msnm)	Temperatura	Precipitación	Humedad	Largo de hoja	Ancho de hoja	Largo de inflorescencia
Altitud (msnm)	1	-0.92	0.57	-0.40	-0.27	-0.47	-0.08
Temperatura	-0.92	1	-0.47	0.29	0.33	0.57	0.19
Precipitación	0.57	-0.47	1	-0.61	0.09	-0.44	-0.12
Humedad	-0.40	0.29	-0.61	1	-0.005	0.16	-0.08
Largo de hoja	-0.27	0.33	0.09	-0.005	1	0.50	0.23
Ancho de hoja	-0.47	0.57	-0.44	0.16	0.50	1	0.43
Largo de inflorescencia	-0.08	0.19	-0.12	-0.08	0.23	0.43	1

CUADRO 10. Aporte de cada una de las variables en las correlaciones entre los dos grupos de variables.

Variables		Spearman	Kendall	M
Morfológicas	Ancho de hoja	0.999	-0.999	0.999
	Largo de hoja	0.003	-0.003	-0.041
	Largo de inflorescencia	-0.012	0.012	0.005
Ambientales	Altitud	0.005	-0.005	0.009
	Temperatura	0.999	-0.965	0.869
	Precipitación	-0.0001	0.000	-0.0001
	Humedad	0.000	0.261	-0.494

CUADRO 11. Aporte de cada variable ambiental en las correlaciones mostradas en el Cuadro 3.

Variable analizada	Variable ambiental eliminada y tipo de correlación realizada											
	Altitud			Temperatura			Humedad			Precipitación		
	Spe.	Ken.	M	Spe.	Ken.	M	Spe.	Ken.	M	Spe.	Ken.	M
Alt.	-	-	-	0.02	0.02	-0.01	0.01	-0.01	0.01	0.01	-0.00	0.00
Tem.	0.88	-0.99	0.94	-	-	-	0.99	-0.99	0.99	0.97	-0.99	0.99
Hum.	-0.48	-0.48	-0.79	0.99	0.99	-0.99	-	-	-	-0.26	-0.02	-0.06
Prec.	-0.00	0.00	-0.00	0.00	0.00	0.00	-0.00	0.01	0.00	-	-	-

Spe.= Spearman, Ken.= Kendall. Alt. Altitud sobre el nivel del mar, Tem.=Temperatura, Hum.=Humedad, Prec.=Precipitación.

CUADRO 12. Formación de hairpins para cada uno de los pares de primers (F: forward, R: reverse).

Par de primers						Suma total
1	F	Enlaces	3	-	-	3
		G	-1.97	-	-	-1.97
	R	Enlaces	1	2	-	3
		G	2.66	3.25	-	5.91
2	F	Enlaces	2	-	-	2
		G	-1.45	-	-	-1.45
	R	Enlaces	2	3	-	5
		G	-0.38	-0.26	-	-0.64
3	F	Enlaces	2	3	-	5
		G	-0.19	0.26	-	0.07
	R	Enlaces	5	2	1	8
		G	-0.06	0.72	0.75	1.41
4	F	Enlaces	3	2	-	5
		G	-1.13	-0.14	-	-1.27
	R	Enlaces	2	3	2	7
		G	0.1	0.55	0.93	1.58
5	F	Enlaces	2	-	-	2
		G	-1.42	-	-	-1.42
	R	Enlaces	2	-	-	2
		G	-0.54	-	-	-0.54

G =cambio de energía libre de Gibbs.

CUADRO 13. Formación de homodímeros para cada uno de los primers (F: forward, R: reverse).

Par de primers																				Suma total	
.1	F	Enlaces	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	-	-	33
		G	-6.68	-4.64	-3.61	-3.61	-3.07	-3.07	-1.57	-1.47	-1.47	-1.47	-1.47	-1.34	-0.96	-0.96	-0.96	-	-	-	-36.35
	R	Enlaces	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
		G	-3.14	-1.94	-0.96	-0.96	-0.96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-7.96
2	F	Enlaces	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	20
		G	-3.07	-1.94	-1.6	-1.57	-1.57	-1.57	-1.47	-1.34	-1.34	-1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-16.81
	R	Enlaces	3	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	31
		G	-5.02	-3.61	-3.42	-3.14	-3.07	-2.91	-1.6	-1.6	-1.57	-1.47	-1.47	-1.34	-0.96	-0.96	-	-	-	-	-32.14
3	F	Enlaces	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	30
		G	-3.61	-3.52	-3.52	-3.14	-3.07	-1.94	-1.94	-1.94	-1.94	-1.6	-1.6	-1.57	-1.47	-0.96	-	-	-	-	-31.82
	R	Enlaces	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	34
		G	-6.76	-6.3	-5.38	-4.62	-3.61	-1.95	-1.94	-1.57	-1.57	-1.57	-1.47	-1.34	-0.96	-	-	-	-	-	-39.04
4	F	Enlaces	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	26
		G	-6.21	-3.17	-3.14	-3.14	-1.95	-1.6	-1.6	-1.6	-1.6	-1.57	-1.47	-0.96	-	-	-	-	-	-	-28.01
	R	Enlaces	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	23
		G	-3.61	-3.52	-3.14	-3.07	-1.94	-1.94	-1.6	-1.6	-1.6	-1.57	-1.57	-	-	-	-	-	-	-	-25.16
5	F	Enlaces	3	4	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	39
		G	-6.14	-5.36	-4.41	-3.61	-3.42	-3.07	-3.07	-3.07	-3.07	-1.94	-1.47	-1.47	-1.47	-1.47	-1.34	-0.96	-0.96	-0.96	-44.19
	R	Enlaces	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	20
		G	-3.07	-1.94	-1.6	-1.57	-1.57	-1.57	-1.47	-1.64	-1.64	-1.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-17.41

G =cambio de energía libre de Gibbs.

CUADRO 14. Formación de heterodímeros para cada par de primers (F: foward, R: reverse).

Par de primers																	Suma total	
1	G	-3.07	-3.07	-3.07	-3.07	-1.57	-1.34	-1.34	-1.34	-1.34	-0.96	-0.96	-	-	-	-	-	-21.13
	Enlaces	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	22
2	G	-5.02	-4.41	-3.9	-3.42	-1.95	-1.95	-1.95	-1.94	-1.6	-1.6	-1.57	-1.57	-1.47	-1.34	-1.34	-1.34	-36.37
	Enlaces	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	36
3	G	-41.39	-3.54	-3.54	-3.52	-3.52	-1.95	-1.95	-1.94	-1.94	-1.94	-1.94	-1.57	-1.57	-	-	-	-70.31
	Enlaces	22	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	50
4	G	-6.62	-4.67	-3.52	-3.17	-3.14	-3.14	-1.95	-1.94	-1.94	-1.6	-1.6	-1.6	-1.6	-1.6	-1.57	-1.57	-41.23
	Enlaces	4	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	37
5	G	-4.64	-4.41	-3.42	-3.07	-3.07	-3.07	-1.94	-1.94	-1.34	-1.34	-1.34	-	-	-	-	-	-29.58
	Enlaces	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-	-	-	-	25

G =cambio de energía libre de Gibbs.

Glosario

Amplicón: secuencia obtenida (fragmento de ADN amplificado) luego de la realización de un PCR (reacción en cadena de la polimerasa, en inglés) (Mackay, 2007).

Fenología: estudio de los fenómenos o eventos biológicos periódicos en relación con los factores ambientales, puede dividirse en fitofenología y zoofenología (Heuvel *et al.*, 1986).

Fitotelmatas: conjunto de espacios ocupados por agua en las cavidades de los troncos, axilas de las raíces, plantas epífitas y tejido de musgos, o cualquier otra estructura del dosel del bosque de neblina (Sarmiento, 2000).

Hairpin: estructura que se forma cuando el primer (cebador) interactúa consigo mismo (Bing-Yuan y Janes, 2002).

Heterodímero: estructura que se forma cuando dos primers (cebadores) diferentes interactúan entre ellos (Bing-Yuan y Janes, 2002).

Homodímero: estructura que se forma cuando dos primers (cebadores) iguales interactúan entre ellos (Bing-Yuan y Janes, 2002).

Inflorescencia: grupo de flores que sucede en una rama del tallo. Pueden, o no, ser ramificadas (Del Claro, Oiveira y Rico-Gray, 2009).

Monocotiledóneas: grupo de las angiospermas que pertenece a la clase Liliopsida que se caracteriza por tener un cotiledón, hojas con nervadura paralela (Generalmente), cambium interfasicular ausente, bandas vasculares generalmente dispersas, partes florales en grupos de 3 o 4 pero jamás 5, polen uniaperturado y sistema radical constituido por raíces adventicias (generalmente) (Montiel, 1991).

Primer (cebador): son secuencias, relativamente pequeñas, de nucleótidos que se diseñan en pares (forward y reverse) que se utilizan para unirse a la secuencia objetivo (secuencia diana) que está por estudiarse, para poder clonarla por medio del PCR (reacción en cadena de la polimerasa, en inglés) (Forbes, 2007).